

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de ratas Sprague Dawley como biomodelo para detectar daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas, mediante el ensayo Comet.

Evaluation of Sprague Dawley rats as biomodels to detect damage on DNA in leukocytes of peripheral blood and hepatic cells, by means of the comet assay.

Arencibia Arrebola DF^{*1}, Rosario Fernández LA²

¹Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

²Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfono: 057(2716911). email: darencibia@finlay.edu.cu

RESUMEN

Las rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas, el cáncer, y recientemente están vinculadas al estrés oxidativo. Este artículo tuvo como objetivo realizar una comparación en cuanto a la frecuencia espontánea (basal) e inducida con ciclofosfamida, de las rupturas de cadena simple y la formación sitios lábiles al álcalis en el ADN de leucocitos de sangre periférica y células hepáticas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, mediante el ensayo Comet. Se administraron 10 ratas/sexo/grupo durante 14 días, utilizando un grupo control negativo (no administrado), dos controles con sustancias vehículo y un control positivo administrado con ciclofosfamida 50 mg/kg por vía intraperitoneal. Pasado este tiempo se realizó la electroforesis alcalina de células individuales en gel de leucocitos de sangre periférica y de las células hepáticas, para demostrar el posible daño en el ADN. Se concluyó que esta línea de rata constituye un buen modelo experimental in vivo para demostrar el daño primario en el ADN dado la baja frecuencia espontánea de los indicadores analizados. Además bajo nuestras condiciones experimentales resulta más factible la utilidad de este biomodelo en las determinaciones de daño en leucocitos de sangre periférica en ambos sexos.

PALABRAS CLAVE: Espontánea, inducida, ensayo comet, ruptura de cadena simple, formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, ratas Sprague Dawley, ciclofosfamida.

ABSTRACTS

The induction of strand breaks (SB) or alkali-labile sites formation on DNA have been parameters broadly used for the genotoxicity detection and their implications have been demonstrated in degenerative illnesses, the cancer, and recently linked to the oxidative stress. This article had as objective to carry out a comparison to the spontaneous basal frequency and induced with cyclophosphamide, the induction of strand breaks or alkali-labile sites formation on DNA of leukocytes of peripheral blood and hepatic cells of Sprague Dawley rats of both sexes, by means of the Comet Assay. We administered 10 rats/sex/group for 14 days, using a negative control group (not administered), two substance-vehicle controls and positive control cyclophosphamide administered with 50 mg/kg, intraperitoneal route. The last time of administered was performed the alkaline electrophoresis them gel individual cells from leukocytes of peripheral blood and hepatic cells to demonstrate the possible damage to the DNA. These rat line constitute a good in vivo experimental

Fecha de Recepción (Date received): 20/01/10

Fecha de Aceptación (Date accepted): 16/02/10

Ars Pharm, 2010, Vol.51 n° 1; 49-56.

model to demonstrate the primary damage in the DNA given the low spontaneous frequency of the analyzed indicators. Also under our experimental conditions it is more feasible the biomodels utility in the determinations of damage in leukocytes of peripheral blood in both sexes.

KEYWORDS: Spontaneous, induced, comet assay, strand breaks, alkali-labile sites formation on DNA, Sprague Dawley rats, cyclophosphamide.

INTRODUCCIÓN

Las rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas, el cáncer, y vinculadas al estrés oxidativo.¹ En 1988, Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo Comet), proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual. Este ensayo consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para eliminar todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento² por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras.^{3,4}

Al someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, los fragmentos de ADN cargados negativamente o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo⁵ para formar un halo,² apreciándose una estructura parecida a la de un cometa⁶ al teñir el ADN después de la electroforesis. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN⁷ siendo las rupturas de doble cadena las causantes de mayor frecuencia de migración del material genético. Por otra parte las células controles tienen un bajo número de rupturas, estas exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN, pero existiendo siempre cierta migración,⁸ encontrándose un 10% de este en la cola. Para detectar y cuantificar el daño al ADN este puede ser teñido con diferentes agentes como el nitrato de plata siendo mas frecuentemente usados los agentes fluorescentes.

Este artículo tuvo como objetivo realizar una comparación en cuanto a la frecuencia espontánea (basal) e inducida con ciclofosfamida, de las rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcalis en el ADN de leucocitos de sangre periférica y de las células hepáticas en ratas Sprague Dawley de ambos sexos, mediante el ensayo Comet.

MATERIALES Y MÉTODOS.

- Animales: Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-210 g al termino de la cuarentena, que se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para esta especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de los animales de Laboratorio de la República de Cuba.

- Diseño experimental: La sustancia a administrar en cada uno de los grupos experimentales era suministrada en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente (10 ratas/grupo/sexo), para un total de 20 ratas/grupos.

En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo, a los cuales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 14 días.

En el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2 %, siendo el vehículo más utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo; ^{9,10} en el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9 %, útil como disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar, ^{11,12} ambas sustancias fueron administradas por vía oral a 2 ml/kg durante un periodo de 14 días, preparadas 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la ciclofosfamida a una dosis de 50 mg/kg, por vía i.p. (Ledoxina®, Lemri, S.A.), la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 %. ¹³ La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales a las 48 horas y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita a razón de 10 ml/kg. ¹⁴

Todos los animales fueron sacrificados bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de los reflejos, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 14 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con ciclofosfamida, el sacrificio se realizó 24 horas después de la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día del sacrificio en todos los casos.

- Obtención de leucocitos y de células hepáticas: En un primer paso se realizó la punción en la cola de todos los animales y se extrajo una gota de sangre la cual era equivalente aproximadamente a 20-25 μ l, ¹⁵⁻¹⁷ para verterla en un vial que contenía previamente 10 μ l de heparina sódica, manipulando las muestras a 4°C. En un segundo paso, se procedió a obtener las muestras de células hepáticas realizando la disección del animal eutanizado con éter y se cortó un fragmento del órgano (0.1 g), el cual se lavó varias veces con solución salina balanceada de Hanks (SSBH) a 4°C y se colocó en un 1 ml de SSBH fresco, luego se creó un flujo con la pipeta automática para dispersar las células y se tomaron aproximadamente de 20-25 μ l de la suspensión celular para el análisis. ^{15,17} Todo el muestreo se realizó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN, para de esta forma disminuir los falsos positivos y que la manipulación no constituyera un factor determinante de los resultados.

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica y de células hepáticas (Ensayo Comet): Este procedimiento fue válido para ambos tipos de células aisladas. Las muestras (20-25 μ l), ¹⁵⁻¹⁷ fueron suspendidas en 140 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 %, después se añadieron láminas previamente preparadas con agarosa, se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 1 % Tritón, 10 % DMSO, pH 10) durante 1,5 h a 4 °C y fueron sometidas a 20 min de desenrollamiento en solución reguladora de electroforesis (3 % NaOH 10 N, 0,5 % EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se realizó a 300 mA y 1 V/cm durante 18-20 min. Las láminas fueron lavadas con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0,4 M a pH 7,5 y aclaradas con agua destilada. La tinción se realizó con nitrato de plata al 0,05 % y los nucleoides teñidos fueron evaluados empleando un microscopio de transmisión de luz, por dos observadores independientes, para luego establecer un promedio entre ambas lecturas. ^{2,3}

Análisis visual: En ambos tipos de muestras se analizaron 200 leucocitos/animal y 100 leucocitos/gel, cuantificándose 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa fue clasificado acorde a la categoría o grado de daño correspondiente en el ADN entre 0 y 4. ^{2, 18} La magnitud del daño en el

ADN fue expresado en unidades arbitrarias (UA) de acuerdo con Collins,² con valores posibles en un rango de 0-400, según la siguiente ecuación:¹⁹

$$UA = 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4.$$

TCG0= Total de células grado 0 (células no dañadas). TCG1= Total de células grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN). TCG2= Total de células grado 2 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN). TCG3= Total de células grado 3 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN). TCG4= Total de células grado 4 (células totalmente dañadas con cometas visibles).

- Análisis estadístico: Las comparaciones entre todos los grupos para analizar parámetros del ensayo Comet (UA y los diferentes niveles de daño) se llevaron a cabo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se estableció a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$. Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.⁶

RESULTADOS

Tabla 1. Ensayo Cometa en ratas Sprague Dawley de ambos sexos sobre la inducción con ciclofosfamida de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica.

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
			(% Nucleoides)				
Control Negativo	H	34.80 ± 10.24	79.14 ± 4.32	11.86 ± 5.02	5.37 ± 3.10	2.32 ± 1.01	1.31 ± 1.00
	M	33.46 ± 7.51	80.10 ± 5.22	11.23 ± 5.56	5.00 ± 2.89	2.45 ± 1.20	1.22 ± 0.98
Sustancia Vehículo 1	H	32.56 ± 10.20	80.32 ± 7.83	11.11 ± 4.28	5.25 ± 2.99	2.33 ± 1.73	0.99 ± 0.34
	M	35.03 ± 8.90	78.21 ± 9.10	13.19 ± 4.77	4.98 ± 2.33	2.60 ± 1.26	1.02 ± 0.83
Sustancia Vehículo 2	H	33.19 ± 10.31	80.46 ± 6.59	10.78 ± 5.11	5.17 ± 3.15	2.29 ± 1.51	1.30 ± 0.99
	M	33.44 ± 7.62	79.75 ± 3.83	12.19 ± 4.99	4.96 ± 2.51	2.07 ± 1.65	1.28 ± 1.01
Control Positivo (CF) ¹	H	101.45 ± 13.28*	35.56 ± 3.55*	43.47 ± 3.44*	10.31 ± 3.91*	6.08 ± 2.80*	4.78 ± 2.46*
	M	106.83 ± 14.11*	32.76 ± 4.88*	44.67 ± 4.77*	10.56 ± 3.68*	7.00 ± 2.00*	5.01 ± 2.51*

CF (Ciclofosfamida), ¹Administración por vía i.p.

*p<0.05 (Comparación frente al control negativo, test de U de Mann Whitney).

(X media; DE desviación estándar, por grupo).

Tabla 2. Ensayo Cometa en ratas Sprague Dawley de ambos sexos sobre la inducción con ciclofosfamida de daño al ADN de células hepáticas.

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
			(% Nucleoides)				
Control Negativo	H	82.27 ± 11.14	57.68 ± 16.22	19.40 ± 7.11	11.40 ± 8.27	6.01 ± 4.67	5.51 ± 3.12

	M	84.83 ± 9.41	55.71 ± 11.74	20.63 ± 10.38	12.22 ± 7.57	6.00 ± 3.88	5.44 ± 2.99
Sustancia Vehículo 1	H	79.11 ± 10.10	59.12 ± 15.82	18.23 ± 10.02	12.05 ± 8.18	5.62 ± 4.92	4.98 ± 3.22
	M	82.96 ± 9.80	55.57 ± 13.11	22.05 ± 9.78	11.87 ± 7.65	4.87 ± 4.48	5.64 ± 3.10
Sustancia Vehículo 2	H	77.52 ± 11.71	58.39 ± 16.56	19.71 ± 10.14	12.90 ± 7.58	3.99 ± 2.26	5.01 ± 2.78
	M	79.72 ± 11.52	57.05 ± 10.87	21.00 ± 9.82	12.00 ± 8.36	5.08 ± 3.59	4.87 ± 3.35
Control Positivo (CF) ¹	H	149.30 ± 10.22*	20.31 ± 9.29*	40.02 ± 15.34*	19.31 ± 9.99*	10.78 ± 2.80*	9.58 ± 1.33*
	M	149.65 ± 11.03*	18.48 ± 3.41*	42.18 ± 16.08*	20.44 ± 8.91*	9.01 ± 2.41*	9.89 ± 1.07*

CF (Ciclofosfamida), ¹Administración por vía i.p.

*p<0.05 (Comparación frente al control negativo, test de U de Mann Whitney).

(**X** media; **DE** desviación estándar, por grupo).

Como se puede observar en la Tabla 1 no hubo diferencias significativas entre el grupo control negativo y las sustancias solventes 1 y 2 en ambos sexos en cuanto a las U.A y el % de nucleoides según el grado en daño de leucocitos de sangre periférica. No siendo así para la ciclofosfamida la cual como era de esperar indujo un aumento del % de nucleoides con grado 1, existiendo diferencias significativas tanto con el índice anterior como con las U.A y el % de nucleoides con nivel de daño 2, 3, 4. En cuanto a la inducción de daño en las células hepáticas se puede observar en la Tabla 2 que igualmente no hubo diferencias significativas entre los animales controles negativos y los animales tratados con las sustancias solventes 1 y 2 en ambos sexos, como era de esperar los animales tratados con estas sustancias se comportaron de forma similar a los controles negativos, e igualmente la ciclofosfamida indujo un aumento considerable de las U.A y del % de nucleoides en los diferentes niveles de daños, pero destacándose su mayor efecto genotóxico en el aumento de la inducción de daño al aumentar el % de nucleoides con grado de daño 1 y 2.

DISCUSIÓN.

Según los resultados obtenidos por nosotros podemos afirmar que bajo nuestras condiciones experimentales el % de nucleoides espontáneos de grado 0 en leucocitos de sangre periférica en esta especie de rata y en ambos sexos se encuentra entre 78.21-80.46 %, lo cual es bastante alto, este resultado ayudaría a tener una mayor confiabilidad a la hora de evaluar nuevos fármacos etc. Igualmente para el caso de la determinación de daño en las células hepáticas los valores espontáneos se mueven entre 55.57-59.12 %, un rango más bajo que la determinación en el otro tipo celular, indicando que bajo nuestras condiciones experimentales este biomodelo resulta más factible su utilidad en las determinaciones de daño en leucocitos de sangre periférica en ambos sexos. Ya que mientras mayor sea la resistencia espontánea al daño permitirá valorar de forma rápida y concisa un posible desplazamiento de los valores de las determinaciones que se llevan a cabo en este trabajo.²⁰ Resultados que concuerdan con González et al.¹⁸, el cual destacó como otros resultados obtenidos en su investigación además de la evaluación mediante esta técnica de un producto en desarrollo, la diferencia de los resultados obtenidos utilizando ambas técnicas, subrayando que las determinaciones en sangre periférica son más factibles.¹⁵

A su vez se puede apreciar en la tabla 1 y 2 que los valores de daño en el nivel 4, los cuales experimentan el mayor índice de degradación del ADN fue mayor de forma espontánea en la determinación utilizando las células hepáticas que en la de leucocitos de sangre periférica tanto en los

animales controles como en los tratados con las sustancias vehículos 1 y 2.¹⁵

Los valores de los resultados obtenidos en los controles negativos y las sustancias vehículos 1 y 2 en ambas técnicas resultaron ser prácticamente similares, lo cual nos permite afirmar que dichas sustancias se pueden utilizar con confiabilidad a la hora de preparar nuestras suspensiones y emulsiones. Igualmente se destacó la sensibilidad de este biomodelo experimental al daño inducido por la ciclofosfamida, pero hemos de destacar que se manifestó de forma diferente entre ambos tipos celulares, lo cual es biológicamente explicable ya que la ciclofosfamida al metabolizarse en el hígado su metabolito activo es más tóxico que la sustancia en sí y por ende provoca un daño acelerado e irreversible en el hígado por lo cual las U.A se encuentran en el rango de 149.30-149.65 destacando de forma veraz la actividad citotóxica y genotóxica de este clastógeno químico.²¹

Por lo general se ha utilizado como control positivo más eficiente en este ensayo la bleomicina unido al uso de este ensayo comet para determinar estrés oxidativo, la bleomicina induce labilidad de la estructura del ADN y ruptura del ADN al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres.²² La bleomicina se une al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo activado genera radicales libres que se encargan de la ruptura, lo cual trae consigo la aparición de aberraciones sobre todo rupturas de cromátidas, huecos, fragmentos y translocaciones, éstas últimas en menor medida.^{23,24}

No obstante nuestros resultados alentadores con el uso de la ciclofosfamida, nos permitieron afirmar que es posible utilizar este mutágeno en la inducción de daño en la estructura primaria del ADN, destacándose dentro de sus efectos principales la formación de monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparadores, los cuales manifiestan una determinada migración del AND degradado al ser observado en el ensayo a nivel de células individuales;^{24,25} justificando el mayor uso de este mutágeno el cual es más barato, fácil de manipular, manifestando menor riesgo para el personal, así como un rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles contaminados durante el experimento,^{26,27} todo esto hace que la ciclofosfamida se pueda implementar con mayor uso en este ensayo de genotoxicidad, mediante esta técnica, a la par de que se ha reportado poco en la literatura su uso en este ensayo evaluándolo en ratas.

En los animales tratados con ciclofosfamida se experimentó mayor inducción de nucleoides de nivel 4 en las células hepáticas en comparación con la frecuencia encontrada en los leucocitos de sangre periférica, justificado por el metabolismo de la ciclofosfamida en el hígado, el cual es bastante activo y para ejercer su acción mutagénica y/o farmacológica es necesario la activación de la droga en los microsomas hepáticos, en un primer paso a hidroxíciclofosfamida, transformándose espontáneamente a aldofosfamida, y posteriormente en las células blanco se convierte en mostaza fosforamida, del que surgen cuatro metabolitos: -mostaza fosforamida (activo), acroleína, carboxi-fosforamida y 4-ceofosforamida que son escasamente activos. La ciclofosfamida es inactivada por enzimas microsomales y hepáticas, con participación del citocromo P-450.²⁸

Por otra parte al ser diferentes significativamente de forma estadística los valores de los controles negativos, controles vehículos 1 y 2 en comparación con los tratados con ciclofosfamida, nos permitió corroborar los resultados obtenidos de forma espontánea e inducida en nuestra investigación, dando mayor veracidad a estos resultados.

CONCLUSIONES.

Se concluyó que esta línea de rata constituye un buen modelo experimental *in vivo* para demostrar el daño primario en el ADN dado la baja frecuencia espontánea de los indicadores analizados. Además bajo nuestras condiciones experimentales resulta más factible la utilidad de este biomodelo en las determinaciones de daño en leucocitos de sangre periférica en ambos sexos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11):874-897.
2. Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. *Mol. Biotech* 2004; 26:249-261.
3. Lee R, Steinert S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res* 2003; 544:43-64.
4. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206-221.
5. Nadin S, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A Silver Staining Method for Single-cell Gell Assay. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49(9):1183-1186.
6. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 2003; 18(2):159-166.
7. Friauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis* 2001; 16(2):133-137.
8. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1):45-51.
9. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs in R&D* 2006; 7:233-241.
10. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res* 2005; 31:193-198.
11. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer W. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Androl* 2000; 44:147-154.
12. Shayne CG. Animal Models in toxicology. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. Toxicology: Chapter 2. The Mouse. 2nd ed. New York: (U.S.A), LLC edition, 2007; p.24-72.
13. Mitchell AD. Product Safety Evaluation Handbook. In: Marcel Dekker, Inc edition Gad S.C. Genetic Toxicology Testing. U.S.A, 1999; p.167-168.
14. Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical Mutagens. In: United Kingdom edition published. Principles and Methods for their detection. 2nd ed (vol 2).England, 1978; p.135-136.
15. González JE, Gámez R, Rodeiro I, García H. Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas Sprague Dawley empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo Cometa). *Revista CENIC* 2004; 35(2):125-127.
16. Marrero G, Gutiérrez A, Pardo B, Gámez R, Curveco D. Evaluación del efecto genotóxico del D-004 en ratones NMRI empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo cometa). *Revista CENIC* 2007; 38(3):200-203.
17. Arencibia DF, Rosario LA. Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa *in vivo* en leucocitos de sangre periférica y células del hígado. *retel (revista de toxicología en línea)* 2010; 26(1):1-12.
18. Lopes L, Albano F, Laranja GA. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an

-
- aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicol Lett* 2000; 116:189-198.
19. García O, Mandina T. DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with ¹³⁷Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. *Mut Res* 2005; 565(2):191-197.
 20. Rodríguez G, Cancino L, Prieto EA, Espinosa J. El Tinidazol induce roturas de simple cadena en leucocitos de ratón. *Anu Toxicol* 2001; 1(1):57-64.
 21. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Natsume H, Toya M, Ito N. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mut. Res.* 2007; 634(1-2):135-145.
 22. Mani S, Buzaid AC, Cadman EC. Pharmacology of antineoplastic agents, multidrug resistance, and the feature. En: Hoffman R, et al eds. *Hematology: basic principles and practice*. 2 ed. New York: Churchill Livingstone; 1995.p.915-940.
 23. Alvarez C, Rodríguez R, Wong P, Arévalo J, Canga M, Torres R, Chang L. Nueva Alternativa en el Manejo del Craneofaringioma Sólido Quístico: Bleomicina Intracavitaria más Resección Neuroendoscópica. *Anales de la Facultad de Medicina* 1999; 60(4):293-297.
 24. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antígeno tóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(1):48-53.
 25. Hartman A, Herkommer K, Glück M, Speit G. DNA-Damaging effects of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet Assay). *Environ Mol Mutagen* 1995; 25:180-187.
 26. Undeger L, Basaran N, Kars A, Guc D. Assesment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutat. Res* 1999; 439(2):277-285.
 27. Carmignani SS, Raymund GG. Safe handling of cytotoxic drugs in the physician's office: a procedure manual model. *Oncol Nurs Forum* 1997; 24 (suppl 1):41-48.
 28. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet* 1999; 19(2):1-8.