

Evaluación del daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino

✉ Daniel F Arencibia¹, Luis A Rosario², Yanet Rodríguez²

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

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, UH
Calle 222 e/ 25 y 27, La Coronela, Playa, La Habana, Cuba
E-mail: darencibia@finlay.edu.cu

RESUMEN

Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, son parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad. Se ha demostrado su implicación en enfermedades degenerativas, en el cáncer, y recientemente, su vínculo con el estrés oxidativo. En la década de 1980 se desarrolló la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para la detección de daño en el ADN. Por primera vez se proporcionaron datos en células individuales. Este artículo tuvo como objetivo la comparación de la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida, de las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN de leucocitos de sangre periférica, mediante el ensayo cometa alcalino, en tres líneas de ratones. Se utilizaron 10 ratones de los dos sexos, de las líneas Balb/c, OF-1 y NMRI. Se formó un grupo control negativo (al que no se le administró ninguna sustancia), dos grupos controles, a los que se administraron sustancias vehículo, y un grupo control positivo al que se administraron 50 mg/kg de ciclofosfamida por vía intraperitoneal. Pasados 14 días, se realizó la electroforesis alcalina de células individuales en gel de leucocitos de sangre periférica, para demostrar el posible daño en el ADN. Se concluyó que la línea más adecuada para estos estudios es la Balb/c, por la baja frecuencia basal que presentan las variables analizadas. Este resultado indica que puede ser el mejor biomodelo para la evaluación preclínica de drogas, vacunas y otros productos.

Palabras clave: ensayo cometa, daño, ADN, ratones, ciclofosfamida

Biotecnología Aplicada 2011;28:96-100

ABSTRACT

Assessment of basal and induced damage on DNA lymphocytes of three mice breeds, by means of the alkaline comet assay. The formation of single-strand breaks and alkali-labile sites on DNA has been extensively used for genotoxicity testing, given its involvement in degenerative disorders, cancer and oxidative stress. An alkaline variation of the single-cell electrophoresis (comet) assay used for the detection of DNA damage was developed during the eighties, providing data on this phenomenon at the level of individual cells for the first time. The present work employs the alkaline comet assay to compare three mouse lines regarding the basal and cyclophosphamide-induced frequency of single-strand breaks and the appearance of alkali-labile sites in DNA from peripheral blood lymphocytes. A total of 10 mice/sex/group of the Balb/c, OF-1 and NMRI lines were treated for 14 days, distributed into an untreated negative control group, two groups receiving excipients and a positive control group receiving intraperitoneal cyclophosphamide at 50 mg/kg. After 14 days, single cells from peripheral blood leukocytes were analyzed by alkaline electrophoresis to estimate DNA damage. It was concluded that the best choice for this type of studies is represented by the Balb/c line, due to its low basal frequency for the analyzed variables. This result indicates that Balb/c may be the best biomodel for preclinical testing of drugs, vaccines and other products.

Keywords: Comet assay, damage, DNA, mice, cyclophosphamide

Introducción

La introducción en el mercado de un gran número de nuevos productos farmacéuticos, ha tenido una doble consecuencia en nuestro entorno. Aunque muchos de estos compuestos han contribuido a mejorar la calidad de vida, algunos constituyen riesgos por su elevada toxicidad [1, 2]. La legislación actual exige que antes del registro y comercialización de un producto, se evalúe su seguridad, para poder anular o minimizar su uso, si en la relación riesgo/beneficio se declarara indeseable para la sociedad [2].

Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, son parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad. Se ha demostrado su implicación en enfermedades degenerativas, en el cáncer, y recien-

temente, su vínculo con el estrés oxidativo [3, 4]. En la década de 1980 se desarrolló la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para la detección de daño en el ADN. Por primera vez se proporcionaron datos en células individuales. Este es utilizado como ensayo pivote en evaluaciones de fármacos, fertilizantes, plaguicidas y otros [5].

El ensayo cometa consiste en embeber las células del ADN en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel. Luego se someten a lisis, para remover las proteínas celulares, y permitir que se desenrolle [6] por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN, bajo condiciones alcalinas/neutras. Con un pH mayor que

1. Mortelmans K, Rupa DS. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Adv Appl Microbiol.* 2004;56: 379-401.

2. Paz M, Magdaleno A, Tornello C, Balbis N, Moretton J. Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Rev Int Contam Ambient.* 2008;(24):79-87.

3. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem.* 2001; 49(9):1183-6.

13, los sitios lábiles al álcali (SLA), como los sitios apurínicos, rápidamente se transforman a rupturas de simple cadena [7]. El uso de este pH posibilita maximizar la expresión de los SLA a rupturas de simple cadena [8]. Seguidamente el ADN desenrollado se somete a una electroforesis en tampón alcalino [6, 9]. Al finalizar, se tiñe el ADN, y se observa una estructura parecida a la de un cometa [10].

Las células con el ADN dañado sufren un aumento de la migración nuclear [8, 11]. Las células controles, con un bajo número de rupturas, exhiben cometas de nivel 0, de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN. En tales células, el ADN tiene escasa migración: en la cola del cometa se aprecia solo el 10% del ADN. Para detectar y cuantificar el daño, se puede teñir el ADN con diferentes agentes como el nitrato de plata; aunque los más frecuentemente usados son los agentes fluorescentes. La elección de uno u otro depende de las necesidades específicas de la investigación [12].

En la evaluación genotoxicológica, es muy importante el uso de biomodelos experimentales que expresen la menor frecuencia de aparición de rupturas de simple cadena y la formación de SLA en el ADN de leucocitos de sangre periférica, como parámetro del daño genotóxico, con el mínimo margen de error, y que además sean sensibles a las sustancias mutagénicas y genotóxicas.

En los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas como controles positivos. Entre las más utilizadas está la ciclofosfamida (CF). Esta constituye un agente alquilante que forma monoaductos y enlaces cruzados entre cadenas, como consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos. Es muy efectiva como antineoplásica. Su efecto genotóxico, evaluado mediante el ensayo cometa alcalino *in vivo*, se conoce poco, ya que en este ensayo se reportó la bleomicina como control positivo con mayor grado de uso. Sin embargo, la CF es más barata y fácil de manipular, provoca menos riesgo para el personal, así como un rápido y fácil tratamiento de desactivación de útiles contaminados durante el experimento [9]. Esta evidencia conduce al uso de la CF como control positivo en este ensayo de genotoxicidad.

Ante esta problemática surge la necesidad de una comparación de la frecuencia basal e inducida con CF, de las rupturas de simple cadena y la formación de SLA en el ADN de leucocitos de sangre periférica de ratones Balb/c, OF-1 y NMRI, de ambos sexos, mediante el ensayo cometa. De esta forma se puede identificar el mejor biomodelo experimental, para el estudio de otros fármacos o agentes cuyos efectos genotóxicos no se han explorado.

Materiales y métodos

Animales

Para este ensayo se utilizaron ratones adultos jóvenes de los dos sexos (8-9 semanas), de las líneas Balb/c, OF-1 y NMRI. Al término de la cuarentena, el peso corporal oscilaba entre 26 y 30 g. Se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa de $60 \pm 10\%$, y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento fue *ad libitum*. Para alimentarlos, se les suministró pienso para ratas y ratones, todo propósito, esterilizable, que no requiere suplemento dietético: fórmula EMO1002, con número de lote 1181102, suministrado por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Estas características fueron comunes para todos los grupos del ensayo. Durante el experimento, se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio [13].

Administración y dosificación

Grupos experimentales

La tabla 1 resume los grupos experimentales en el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (ensayo cometa), en las tres líneas de ratones de ambos sexos; así como las sustancias administradas, las vías de administración oral o intraperitoneal (i.p.) y el volumen máximo de administración, para dos réplicas.

La sustancia se administró entre 10:30 y 11:30 a.m., y las concentraciones se ajustaron semanalmente, según el aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria (10 ratones por grupo por sexo y por línea). Por el alto costo de los reactivos que se utilizan en este ensayo solo se hicieron dos réplicas.

En el grupo experimental 1 se utilizaron animales no tratados como control negativo. Se les realizó la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones que los demás grupos, durante 14 días.

En el grupo experimental 2 se utilizó Tween 65 al 2%, vehículo presente en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo [14-16]; administrado por vía oral durante 14 días, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 3 se utilizó NaCl al 0.9%, disolvente de la mayoría de las sustancias hidrofílicas [17, 18]. Administrado por vía oral durante 14 días, preparado 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4, como control positivo, se emplearon 50 mg/kg de CF, por vía i.p. La

4. Puchades Montesa MJ, González Rico MA, Solís Salguero MA, Torregrosa Maicas I, Tormos Muñoz MC, Saez Tormo G, et al. Study of oxidative stress in advanced kidney disease. *Nefrología*. 2009;29(5):464-73. Spanish.

5. Yiqiang L, Mengmeng Q, Liwei S, Yulin W, Yuangao CH, Haigang CH, et al. Genotoxicity study of phenol and o-cresol using the micronucleus test and the comet assay. *Toxicol Environ Chem*. 2005;87(3):365-72.

6. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004;26(3):249-61.

7. Lee RF, Steinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res*. 2003 Sep;544(1):43-64.

8. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.

9. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res*. 2010;696(1):69-80.

10. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*. 2003;18(2):159-66.

11. Frieauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*. 2001;16(2):133-7.

12. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45-51.

13. Chapter XIII: The use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. *Guide to the care and use of experimental animals*, 2nd edition, Vol. 1. Ottawa: Canadian Council on Animal Care; 1993. p. 155-62.

14. Arrazabal ML, Carbajal D, Mas R, Molina V, Rodríguez E, González V. Preventive effects of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm (*Rostoynea regia*) fruits, on prostate hyperplasia induced with testosterone on intact and castrated rodents. *Drugs Exp Clin Res*. 2004;30(2):227-34.

15. Arrazabal ML, Mas R, Molina V, Noa M, Carbajal D, Mendoza N. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R D*. 2006;7(4):233-41.

Tabla 1. Grupos experimentales en el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (ensayo cometa), aplicado en ratones de ambos sexos de las líneas Balb/c, OF-1 y NMRI con dos réplicas en cada una

Grupos experimentales	Total de animales	Sustancia administrada	Vía de administración	Volumen máximo de administración (mL/kg)
Control negativo	20	No tratado	Oral (simulacro)	-
Sustancia vehículo 1	20	Tween 65, al 2%	Oral	2
Sustancia vehículo 2	20	NaCl 0.9%	Oral	2
Control positivo	20	CF ^a , 50 mg/kg	i.p. ^b	15

^a CF: Ciclofosfamida

^b i.p.: Intraperitoneal

CF (n,n-bis-(-cloruro de etilo)-n'), o-esterdiamida del ácido fosfórico propinel ($C_{17}H_{15}C_{12}N_2O_5P$), se adquirió mediante la firma comercial mexicana Lemri S.A., con la marca Ledoxina. Se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0.9% [19], y se suministró a los animales inmediatamente después de ser preparada, a las 48 horas, y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado [9, 20].

Clinica

Se realizaron dos observaciones diarias: en el horario de la mañana, comprendido entre las 8:30 y las 10:30 a.m., y en la tarde, entre 3:00 y 4:30 p.m. En cada observación se tuvo en cuenta el estado general del animal, que incluyó la palpación y la detección de lesiones, así como las posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, del sistema cardiovascular, del gastrointestinal, el estado de la piel, del pelo, la coloración de las mucosas y de los ojos.

Sacrificio

Todos los animales se anestesiaron bajo atmósfera de éter, hasta la pérdida total de los reflejos, y luego de la extracción de su sangre, se sacrificaron mediante la técnica de dislocación cervical. El sacrificio de los grupos experimentales 1, 2 y 3 fue 24 horas después de la última administración, pasados los 14 días. El grupo experimental 4, tratado con CF, se sacrificó 24 horas después de la segunda administración del mutágeno, para que coincidiera el día del sacrificio de todos los animales, en cada una de las réplicas.

Exámenes

Toma de las muestras de sangre

Al constatar la pérdida total de los reflejos, se extrajo una gota de sangre de la cola del ratón, equivalente a 15 y hasta 20 μ L. Luego se vertió en un vial que contenía 10 μ L de heparina sódica, adquirida de los laboratorios LIORAD, a una concentración de 5000 UI/mL. Las muestras se manipularon a 4 °C. El muestreo se efectuó bajo luz atenuada para evitar daño adicional en el ADN, lo que permitió disminuir los falsos positivos y que la manipulación no constituyera un factor determinante de los resultados [21].

Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales en leucocitos de sangre periférica (ensayo cometa alcalino)

Las muestras de sangre (de 15 a 20 μ L) se suspendieron en 140 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%. Luego 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 sometidas a 20 min de desenrollado en solución reguladora de electroforesis (3% de NaOH 10 N, 0.5% de EDTA 200 mM, pH > 13). La electroforesis se efectuó a 300 mA y 1 V/cm durante 18 a 20 min. Las láminas se lavaron con solución reguladora de neutralización utilizando el Tris 0.4 M a pH 7.5, y se aclararon con agua destilada. La tinción se hizo con nitrato de plata al 0.05%. Los nucleoides teñidos se evaluaron mediante un microscopio de transmisión de luz, por tres

observadores independientes, para luego establecer un promedio entre lecturas [6, 7].

Análisis visual

Se analizaron 200 leucocitos por animal y 100 leucocitos por gel. Se cuantificaron 100 cometas en el centro del gel. Cada cometa se clasificó acorde con la categoría o el grado de daño en el ADN que podía corresponder entre 0 y 4 [6, 22]. La magnitud del daño en el ADN se expresó en unidades arbitrarias (UA), de acuerdo con Collins en el año 2004 [6]. A partir de valores posibles en un rango de 0 a 400 [23, 24].

El procedimiento para el cálculo de las UA es:

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

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 bajo, con frecuencia baja de lesiones en el ADN).

TCG3 = Total de células, grado 3 (daño alto, con frecuencia alta de lesiones en el ADN).

TCG4 = Total de células, grado 4 (células totalmente dañadas).

Análisis estadístico

En las comparaciones entre los grupos y entre las líneas de ratones, para analizar los parámetros del ensayo cometa (UA y los diferentes niveles de daño), se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. A priori se estableció un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Todos los análisis se efectuaron empleando el programa estadístico informático Statsoft, Inc. (2003), Statistica (sistema de software para análisis de datos para Windows, versión 6).

Resultados y discusión

Durante los 14 días del ensayo, no se evidenciaron signos indicativos de toxicidad en los animales.

Las rupturas de simple y de doble cadena del ADN pueden originarse por la formación del radical OH, especie altamente tóxica y contra la cual no existe antioxidante, que además puede generar enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas [25, 26].

No hubo diferencias significativas entre los resultados de las unidades arbitrarias y el porcentaje de nucleoides en cada uno de los niveles analizados, entre el grupo control negativo y las sustancias vehículo 1 y 2 en las tres líneas de ratones evaluadas (Tablas 2, 3 y 4). Tampoco hubo diferencias significativas entre los sexos.

Al comparar el grupo al que se suministró la CF, mutágeno utilizado como control positivo en este ensayo, con el control negativo y con las sustancias solventes 1 y 2, se observaron diferencias significativas en cada una de las variables analizadas. El número de UA que indujo la CF constituyó el doble de las UA que indujeron las demás sustancias utilizadas. Además, el efecto fundamental de este mutágeno fue el aumento considerable del por ciento de nucleoides de nivel 3 y 4, niveles que provocan mayor daño y degradación del ADN.

16. Carbajal D, Molina V, Mas R, Arruzabala 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(5-6):193-7.

17. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer W. Stimulation and scabestragedn-inducible inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Andrology.* 2000;44:147-54.

18. Gad SC. The mouse. *Toxicology.* In: Gad SC, editor. *Animal Models in Toxicology*, Second Edition (Drug and Chemical Toxicology). Boca Ratón: Taylor & Francis Group, LLC.; 2002. p.24-71.

19. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossio M, Prieto E. VIMANG: los efectos antitumorigénicos y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2001;20(1):48-53.

20. Rodríguez I, Valdés YC, Proveyer S. Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Rev Cubana Med.* 2004;43(2-3):15-9.

21. Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutat Res.* 2009; 681(1):3-12.

22. da Costa Lopes L, Albano F, Augusto Travassos Laranja G, Marques Alves L, Fernando Martins e Silva L, Poubel de Souza G, et al. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicol Lett.* 2000;116(3):189-98.

23. García O, Mandina T. DNA damage evaluated by the comet assay in lymphocytes of children with 137Cs internal contamination caused by the Chernobyl accident. *Mutat Res.* 2005;565(2):191-7.

24. Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O'Donovan MR. Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis.* 2008;23(3):233-40.

25. Srujana K, Begum SS, Rao KN, Devi GS, Jyothy A, Prasad MH. Application of the comet assay for assessment of oxidative DNA damage in circulating lymphocytes of Tetralogy of Fallot patients. *Mutat Res.* 2010;688(1-2):62-5.

26. Gocke E, Bürgin H, Müller L, Pfister T. Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicol Lett.* 2009;190(3):254-65.

Tabla 2. Ensayo Cometa en ratones Balb/c de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica, para las dos series ensayadas^a

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias (media $\pm$ D.E. ^a)	Porcentaje de nucleoides (media $\pm$ D.E.)				
			Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Control negativo ¹ , oral	H	49.51 $\pm$ 10.24	56.00 $\pm$ 8.01	39.29 $\pm$ 7.49	4.01 $\pm$ 4.17	0.60 $\pm$ 0.68	0.10 $\pm$ 0.05
	M	56.37 $\pm$ 7.51	51.03 $\pm$ 3.14	42.72 $\pm$ 5.68	5.10 $\pm$ 2.77	1.15 $\pm$ 1.05	0
Sustancia vehículo 1, oral	H	57.23 $\pm$ 10.20	50.82 $\pm$ 9.32	42.13 $\pm$ 2.22	6.05 $\pm$ 5.28	1.00 $\pm$ 0.93	0
	M	54.25 $\pm$ 8.90	55.50 $\pm$ 9.01	36.15 $\pm$ 3.58	7.00 $\pm$ 4.66	1.30 $\pm$ 1.45	0.05 $\pm$ 0.03
Sustancia vehículo 2, oral	H	52.15 $\pm$ 10.31	57.47 $\pm$ 3.76	34.27 $\pm$ 8.58	6.90 $\pm$ 4.50	1.36 $\pm$ 0.46	0
	M	56.33 $\pm$ 7.62	49.97 $\pm$ 10.03	44.92 $\pm$ 2.02	4.00 $\pm$ 5.76	1.03 $\pm$ 0.49	0.08 $\pm$ 0.02
Control positivo (CF ^b), i.p.	H	118.02 $\pm$ 13.28*	23.33 $\pm$ 5.22*	53.02 $\pm$ 10.64*	10.41 $\pm$ 4.99*	8.78 $\pm$ 3.90*	4.46 $\pm$ 1.43*
	M	112.69 $\pm$ 14.11*	25.80 $\pm$ 3.41*	52.78 $\pm$ 11.98*	9.37 $\pm$ 1.90*	7.03 $\pm$ 2.01*	5.02 $\pm$ 0.91*

^a Los valores mostrados difirieron para todos los grupos al compararlos con las líneas OF-1 y NMRI, salvo para los niveles 3 y 4.

^b D.E.: desviación estándar.

^c CF: ciclofosfamida.

*p < 0.05 (comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).

Las rupturas de simple cadena se reparan por la escisión de nucleótidos y por escisión de bases. Entre las modificaciones de bases más frecuentes se encuentra la 8-oxo-2'-deoxiguanosina [23, 27]. Este es un proceso complejo que elimina al menos un segmento de 29 oligonucleótidos y que puede producir la migración del ADN; que luego es corregido según el cálculo de las UA de forma experimental [8, 24].

Teniendo en cuenta, en una primera instancia, las UA como índice de citotoxicidad y genotoxicidad, se pudo observar que, bajo nuestras condiciones experimentales, la línea de ratones Balb/c presentó un intervalo menor de UA basales. Estos valores se encuentran en el rango de 49.51 y 57.23. Basado en estos criterios es posible afirmar que entre las líneas de ratones evaluadas, la línea Balb/c es la más conveniente para utilizar, pues de forma endógena, en ella se genera un mayor porcentaje de nucleoides de nivel 0 o sin daño. Ello concuerda con la determinación de la frecuencia espontánea de aberraciones cromosómicas, donde los valores más bajos se observan en ratones Balb/c [28]. Las UA en las demás líneas de ratones se encuentran en el rango de 56.27 a 62.55 en la OF-1 y de 61.13 a 71.45 UA en la NMRI, resultados que están en conjunción con los obtenidos en los animales controles por Cancino y cols., 2001 [19]. Teniendo en cuenta el por ciento de nucleoides grado 0, se obtuvo como resultado que la línea NMRI presentó los valores más bajos, y la Balb/c los más altos. Esto justifica que la línea NMRI muestre los valores más altos de UA.

Al analizar los niveles de daño 1 y 2, igualmente la línea NMRI presentó los valores más altos; la línea Balb/c, los más bajos; y los OF-1, los valores interme-

dios. En los niveles 3 y 4 tienden a comportarse de forma similar en las tres líneas. Estos resultados también concuerdan con los hallados por nuestro grupo en un estudio genotóxico según el ensayo de micronúcleos y de la morfología de la cabeza del espermatozoide, donde igualmente los resultados basales más bajos se consiguieron en la línea Balb/c en ambos ensayos [29], y concuerdan con los resultados de Rodríguez y cols. (2001), en los animales controles de la línea Balb/c utilizados en el ensayo cometa del tinidazol [30].

Los mayores valores inducidos de UA y del por ciento de nucleoides en los niveles que experimentan daño del 1 al 4, inducidos por la CF, se observaron en la línea más susceptible: la NMRI (Tablas 2, 3 y 4). Se observaron resultados máximos de 126.21 UA, con una desviación estándar de 13.22. Al analizar los resultados de los niveles de daño, se pudo apreciar hasta un 55.82% de nucleoides con nivel de daño 1 y 5.85% de nucleoides con nivel de daño 4. En tanto la línea Balb/c fue más resistente al daño inducido por la CF [30], que la línea NMRI [5, 26].

El alto por ciento de inducción de nucleoides del nivel 1 al 4 encontrado en estas tres líneas de ratones con el uso de la CF como control positivo, evidencia la utilidad de este clastógeno químico como inductor de daño genotóxico, evaluado mediante esta técnica. Sus ventajas (antes expuestas) ayudarían a la implementación de este mutágeno como control positivo; lo que disminuiría el riesgo al que está expuesto el personal que realiza estos estudios de genotoxicidad y antigenotoxicidad *in vivo*.

Los resultados basales bajos en la línea Balb/c en el ensayo de micronúcleos, aberraciones cromosómicas,

27. Doak SH, Jenkins GJ, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM. Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-reactive carcinogens. *Cancer Res.* 2007;67(8):3904-11.

28. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, López Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb/c de ambos sexos. *Rev Toxicol Linea.* 2009;23(2):8-22.

29. Arencibia DF, Rosario LA, Rodríguez Y, Martín Y, Díaz D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide y micronúcleos en médula ósea de ratones Balb/c y OF-1. *Rev Toxicol Linea.* 2009;24:7-29.

30. 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.

Tabla 3. Ensayo Cometa en ratones OF-1 de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias (media $\pm$ D.E. ^a)	Porcentaje de nucleoides (media $\pm$ D.E.)				
			Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Control negativo ¹ , oral	H	57.40 $\pm$ 9.64	49.10 $\pm$ 8.09	44.90 $\pm$ 3.05	5.50 $\pm$ 6.07	0.50 $\pm$ 0.86	0
	M	59.48 $\pm$ 7.51	50.00 $\pm$ 5.21	42.29 $\pm$ 2.36	6.00 $\pm$ 4.71	1.65 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.03
Sustancia vehículo 1, oral	H	62.55 $\pm$ 10.23	48.34 $\pm$ 8.33	42.73 $\pm$ 4.72	7.06 $\pm$ 4.28	1.78 $\pm$ 0.84	0.09 $\pm$ 0.04
	M	57.68 $\pm$ 8.49	51.56 $\pm$ 7.55	40.34 $\pm$ 3.90	6.98 $\pm$ 4.48	1.10 $\pm$ 0.98	0.02 $\pm$ 0.01
Sustancia vehículo 2, oral	H	56.27 $\pm$ 10.11	53.85 $\pm$ 7.12	37.29 $\pm$ 7.10	7.60 $\pm$ 4.60	1.26 $\pm$ 0.91	0
	M	59.06 $\pm$ 8.29	49.25 $\pm$ 10.01	43.84 $\pm$ 8.22	5.71 $\pm$ 3.61	1.00 $\pm$ 0.33	0.20 $\pm$ 0.10
Control positivo (CF ^b), i.p.	H	123.59 $\pm$ 12.57*	22.00 $\pm$ 3.23*	51.62 $\pm$ 10.87*	12.05 $\pm$ 3.56*	9.45 $\pm$ 4.70*	4.88 $\pm$ 3.02*
	M	123.79 $\pm$ 13.16*	21.54 $\pm$ 6.40*	53.13 $\pm$ 11.58*	10.33 $\pm$ 4.34*	10.00 $\pm$ 3.08*	5.00 $\pm$ 2.17*

^a D.E.: desviación estándar.

^b CF: ciclofosfamida.

*p < 0.05 (comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).

Tabla 4. Ensayo Cometa en ratones NMRI de ambos sexos sobre la inducción de daño al ADN de leucocitos de sangre periférica

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias (media $\pm$ D.E. ^a)	Nivel 0	Porcentaje de nucleoides (media $\pm$ D.E.)			
				Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Control negativo ¹ , oral	H	63.84 $\pm$ 8.24	45.71 $\pm$ 6.09	45.99 $\pm$ 2.05	7.05 $\pm$ 6.09	1.25 $\pm$ 0.34	0
	M	61.13 $\pm$ 8.31	48.05 $\pm$ 1.30	43.86 $\pm$ 1.56	7.10 $\pm$ 4.33	0.89 $\pm$ 1.01	0.10 $\pm$ 0.06
Sustancia vehiculo 1, oral	H	64.54 $\pm$ 10.89	43.98 $\pm$ 2.39	49.35 $\pm$ 5.22	5.02 $\pm$ 4.28	1.45 $\pm$ 0.56	0.20 $\pm$ 0.15
	M	65.22 $\pm$ 10.56	43.57 $\pm$ 7.41	49.61 $\pm$ 3.18	5.10 $\pm$ 4.36	1.47 $\pm$ 1.20	0.25 $\pm$ 0.10
Sustancia vehiculo 2, oral	H	67.74 $\pm$ 10.31	44.26 $\pm$ 4.99	47.29 $\pm$ 1.40	6.90 $\pm$ 6.41	1.55 $\pm$ 0.81	0
	M	71.45 $\pm$ 9.51	41.98 $\pm$ 8.84	48.03 $\pm$ 2.02	6.83 $\pm$ 5.16	2.88 $\pm$ 2.28	0.28 $\pm$ 0.43
Control positivo (CF ^b), i.p.	H	126.21 $\pm$ 13.22*	19.00 $\pm$ 3.27*	55.82 $\pm$ 10.24*	11.00 $\pm$ 2.09*	8.33 $\pm$ 4.41*	5.85 $\pm$ 4.00*
	M	123.95 $\pm$ 11.53*	20.40 $\pm$ 5.37*	54.66 $\pm$ 9.78*	10.50 $\pm$ 3.68*	9.47 $\pm$ 3.99*	4.97 $\pm$ 5.80*

^a D.E.: desviación estándar.^b CF: ciclofosfamida.

*p < 0.05 (comparación contra el control negativo, test de U de Mann Whitney).

morfología de la cabeza del espermatozoide y ahora en el ensayo cometa alcalino, demuestran que esta línea es más estable genéticamente y más resistente al daño [28, 29, 31-33]. A su vez, estos resultados concuerdan con los obtenidos tanto en los animales controles como en los tratados con CF por Cancino y cols. [19], lo que reafirma que la línea de ratones Balb/c es el mejor biomodelo experimental en los ensayos de genotoxicidad potencial y antigenotoxicidad *in vivo*.

Conclusiones

Bajo nuestras condiciones experimentales, de las tres líneas de ratones empleadas, la más adecuada en ambos sexos, es la Balb/c. Por la baja frecuencia basal en las variables analizadas, es el mejor biomodelo experimental para este tipo de ensayo. Estos resultados posibilitarán utilizarla con mayor eficiencia en la evaluación preclínica de drogas, vacunas y otros productos.

31. Gámez R, Fernández I, Acosta PC, Alemán C, Rodeiro G, Rodríguez M. Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos en médula ósea y mutaciones letales dominantes en ratones NMRI. Rev CENIC Cienc Biol. 2000;31(3):211-6.

32. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D. Frecuencia espontánea e inducida de anomalías en la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones NMRI. Rev Toxicol Línea. 2009;20:2-14.

33. Arencibia DF, Rosario LA, Hernández Y. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. Rev Cubana Farm. 2010;44(4):503-11.

Recibido en diciembre de 2009. Aprobado en mayo de 2011.