

Respuesta de ratas Sprague Dawley a la ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*1}, Alexis Vidal Novoa^{2}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{***3}, Yolanda Emilia Suárez Fernández^{****4}.**

1. Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Aspirante a Investigador.
2. Licenciado en Bioquímica, Profesor Titular, Doctor en Ciencias Biológicas.
3. Licenciado en Microbiología, Profesor Instructor.
4. Doctor en Medicina Veterinaria, Profesor Titular, Doctor en Ciencias Veterinarias.

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

**Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, Cuba.

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

****Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola, email: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En este artículo decidimos evaluar el efecto genotóxico de la ciclofosfamida y bleomicina en células individuales mediante el ensayo cometa alcalino utilizando ratas Sprague Dawley de ambos sexos como biomodelo experimental. Fueron formados 5 grupos experimentales/sexo, el primero administrado con NaCl al 0,9% por vía intraperitoneal (i.p) como control negativo, el segundo y el tercero administrados con ciclofosfamida por vía i.p, con diseños de tratamientos diferentes en dosis de 50 mg/kg. El cuarto y quinto grupo fueron administrados con bleomicina por vía i.p, igualmente en dos diseños de tratamientos diferentes en dosis de 40 mg/kg. Al final de la experiencia se obtuvo mayor inducción de daño con el uso de la ciclofosfamida y bleomicina, ambas en el diseño de administración de 48 y 24 horas antes del sacrificio. Esto constituye bajo nuestras condiciones experimentales los dos mejores diseños experimentales para inducir la formación de rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN. Aumentando considerablemente la frecuencia espontánea presente en esta especie de rata, siendo útil en estudios de evaluación de drogas que no han sido exploradas en el ámbito de la antigenotoxicidad y genotoxicidad *in vivo*.

Palabras clave: Ensayo cometa alcalino, leucocitos de sangre periférica, ratas Sprague Dawley, ciclofosfamida, bleomicina.

Abstract

Sprague Dawley response to the cyclophosphamide and bleomycin in the alkaline comet assay of peripheral blood leukocytes.

In this article we decide to evaluate genotoxic effect of the cyclophosphamide and bleomycin in the individual cells by means of alkaline comet assay using the Sprague Dawley rats in both sexes as experimental biomodel. Which were formed 5 experimental groups per sex, the first administered with NaCl 0,9 % by intraperitoneal (i.p) route, the second and third groups were administered with cyclophosphamide by i.p route, with designs of different treatments at doses of 50 mg/kg. The fourth and fifth groups were administered with bleomycin by i.p route, equally in two designs of different treatments at doses of 40 mg/kg. At the end of the experience bigger induction of damage was obtained with the use of the cyclophosphamide and bleomycin, both in the design of 48 and 24 hours administration before the sacrifice. This constitutes under our experimental conditions the two better experimental designs to induce the strand breaks (SB) or alkali-labile sites formation on DNA, increasing considerably the frequency spontaneous present in this species of rat, being useful in studies of drugs evaluation that they have not been explored in to the *in vivo* antigenotoxicity and genotoxicity environment.

Key words: Alkaline comet assay, peripheral blood leukocytes, Sprague Dawley, cyclophosphamide, bleomycin.

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 cometa), 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,⁶ 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.

Por lo general en los estudios de genotoxicidad *in vivo* se utilizan sustancias mutagénicas conocidas, dentro de las más utilizadas se encuentra la ciclofosfamida (CF) y la bleomicina (BL),⁹⁻¹² la primera constituye un agente alquilante que forma monoadductos y enlaces cruzados entre cadenas en consecuencia de la aparición de rupturas por efectos de los mecanismos reparativos;¹³ y la segunda induce labilidad y ruptura de la estructura del ADN; al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres.^{14,15}

Ambas drogas son utilizadas con gran efectividad como antineoplásicas. La ciclofosfamida pertenece al grupo cloro-etilaminas, con el desarrollo de éste agente se logró

mayor selectividad de la droga hacia el tejido tumoral. Considerado un agente alquilante bifuncional, no posee especificidad por fase alguna del ciclo celular.¹⁶ En tanto la bleomicina es considerada dentro del grupo de los antibióticos tumorales.^{14, 15} Las células tumorales son más susceptibles a la bleomicina durante la proliferación activa y son demoradas específicamente en su progresión a través de la fase G del ciclo celular.¹⁶

Existe gran polémica sobre los diferentes tipos de esquemas de tratamiento en los cuales se utilizan las sustancias mutagénicas como controles positivos en los ensayos de mutagénesis y/o genotoxicidad. Así como diversas dosis han sido utilizadas, pero por lo general todo versa en el uso del biomodelo animal ideal respondedor a la acción de la sustancia mutagénica utilizada.

Por lo cual en este artículo decidimos evaluar en ratas SD de ambos sexos, la respuesta a ciclofosfamida y a bleomicina, administradas por vía intraperitoneal (i.p), diferenciado la respuesta a ambos mutágenos cuando son administrados 48 y 24 horas antes del sacrificio y cuando es administrado 24 antes del mismo, en el ensayo cometa alcalino de leucocitos de sangre periférica.

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 término 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:

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba 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 (5 ratas/grupo/sexo), en cada una de las dos réplicas realizadas para un total de 10 ratas/grupo/sexo/.

En el grupo experimental 1 se utilizó como control negativo el cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%, adquirido de la firma BDH (BDC), con un 99% de pureza. Administrado por vía i.p, en dosis de 2 mL/kg en dos ocasiones con intervalos de 24 horas entre ambas administraciones.

En los grupos experimentales 2 y 3 se utilizó la CF, adquirida de la firma comercial mexicana Lemri S.A bajo la marca LEDOXINA. Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 2 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 3. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 50 mg/kg,¹⁷ por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.^{18, 19}

En los grupos experimentales 4 y 5 se utilizó la BL, adquirida de los Laboratorios PISA, S.A. de C.V. México, bajo el nombre BLOMINDEX (polvo). Administrada inmediatamente después de ser preparada, 48 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 4 y 24 horas antes del sacrificio programado para el grupo 5. En ambos grupos se utilizó el mutágeno en dosis de 40 mg/kg,^{18,19} por vía i.p, el cual se disolvió en disolución salina (NaCl) al 0,9 % administrado a razón de 10 mL/kg.

- Obtención de leucocitos: 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 μl ,²⁰⁻²² para verterla en un vial que contenía previamente 10 μl de heparina sódica, manipulando las muestras a 4°C. 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 (Ensayo Cometa): Las muestras (20-25 μl),²⁰⁻²² fueron suspendidas en 140 μl 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).²² 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: 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, 23} 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:^{22,24}

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

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: Las comparaciones entre todos los grupos para analizar parámetros del ensayo Cometa (UA y los diferentes niveles de daño) se llevaron a cabo utilizando la prueba U

de Mann-Whitney. Además con este mismo programa y prueba se realizaron las comparaciones de los resultados entre mutágenos. 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 y Discusión

Durante la inspección clínica diaria a los animales no se encontraron síntomas clínicos indicativos de toxicidad.

Según los resultados expuestos en la tabla 1, en los 4 grupos en los cuales se utilizaron las sustancias mutagénicas reconocidas difirieron de forma significativa con el grupo control solvente. Esto demuestra que se logro inducir una respuesta genotóxica en los linfocitos de sangre periférica aceptable. Los valores encontrados con el uso del NaCl al 0,9% concuerdan con los hallados por nosotros en estudio de determinación de variables espontáneas en esta misma especie utilizando este mismo ensayo. Tanto para el % de nucleoides en cada uno de los niveles analizadas como para las UA. Por lo cual permitió corroborar que los valores espontáneas del % de nucleoides de grado 0 en esta especie de rata se encuentra entre 83.12 ± 4.35 en las hembras y 75.27 ± 7.21 en los machos.

Por otro lado teniendo en cuenta los dos esquemas de tratamientos en los cuales se utilizó la CF se observa que difirieron de forma significativa en ambos sexos. Se obtuvieron mayores resultados de inducción de daño en el ADN y de UA con el uso de la CF administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio. Dado por un carácter genotóxico acumulativo y de tiempo para ejercer su potencial genotóxico.²⁵ Los valores de UA en este grupo estuvieron entre 100.98 ± 14.38 en las hembras y de 109.63 ± 11.21 en los machos. En tanto el % de nucleoides grado 0 estuvo en las hembras entre $34.09\pm 2.94\%$ y en los machos entre $30.13\pm 4.41\%$.

Los dos grupos tratados con BL también difirieron de forma significativa. Obteniéndose mayores resultados de inducción al administrar la BL en dos ocasiones. Los valores de UA para el grupo en el cual se administró la BL 48 y 24 horas antes del sacrificio estuvieron entre 100.72 ± 10.68 en las hembras y 103.13 ± 17.33 en los machos. El % de nucleoides grado 0 fue de $35.66\pm 1.46\%$ en las hembras y $33.92\pm 2.11\%$ en los machos. Esto se debe a una mayor

biodisponibilidad del mutágeno, estando estrechamente relacionadas las variables número de exposiciones-daño detectado.²⁶ Ya que la BL constituye un mutágeno verdadero.²⁷

No se observaron diferencias significativas entre la CF y BL en los grupos en los cuales se administraron los animales en dosis única. Como tampoco difirieron los resultados entre CF y BL al administrarlas en dos ocasiones 48 y 24 horas antes del sacrificio en ambos sexos.

Se ha utilizado como control positivo más eficiente en este ensayo la BL, midiendo el daño tanto en modelos de genotoxicidad como de estrés oxidativo. La BL induce labilidad de la estructura del ADN y ruptura del ADN al interactuar con el oxígeno y el hierro produciendo radicales libres.²⁸ La BL 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.^{26, 29}

No obstante nuestros resultados alentadores con el uso de la CF, nos permitieron afirmar que es posible utilizar este mutágeno en la inducción de daño en la estructura primaria del ADN. Se ha destacado 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 ADN degradado al ser observado en el ensayo a nivel de células individuales.^{24,25} Además el uso de la CF permitirá utilizar un mutágeno 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,^{16,30} todo esto hace que la CF se pueda implementar con mayor uso en este ensayo de genotoxicidad, mediante esta técnica al determinar genotoxicidad, estrés oxidativo y efecto antígenotóxico de nuevas drogas.

En la figura (a) se puede observar el cometa grado 4 que indujo la CF al ser administrada 24 horas antes del sacrificio. En la figura (b) se observa el cometa grado 4 que indujo este mismo mutágeno pero al ser administrado en dos ocasiones, 48 y 24 horas antes del sacrificio. La figura (c), muestra el cometa grado 4 que induce la BL al ser administrada 24 horas antes del sacrificio. La figura (d) muestra el cometa que induce este mismo mutágeno al ser administrado 48 y 24 horas antes del sacrificio. Así mismo en la figura (e) se observa un

cometa grado 0 de una en hembra del grupo control negativo y la figura (f) pertenece a un cometa grado 0 de un macho igualmente del grupo control negativo.

En la figura (b) y (d), se puede observar que la cabeza del cometa es bastante pequeña, destacándose un gran incremento de la migración y por ende mayor cantidad de fragmentos de ADN degradados. Esto está asociado con la fragmentación del ADN que tiene lugar durante los procesos de necrosis o apoptosis inducidos por ambos mutágenos.³¹

Conclusiones

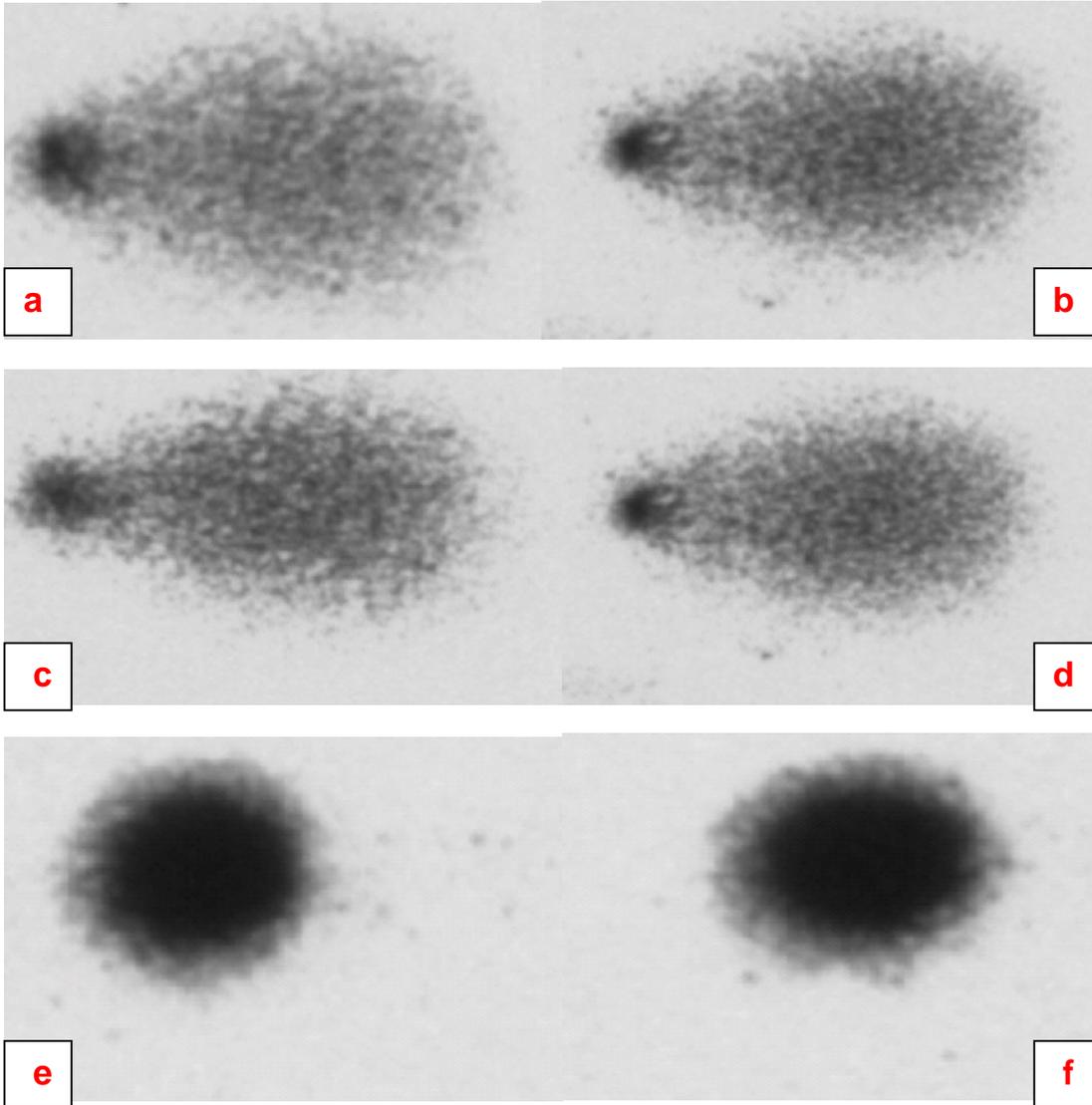
Al final de la experiencia se obtuvo mayor inducción de daño con el uso de CF y la BL, ambas en el diseño de administración de 48 y 24 horas antes del sacrificio. Esto constituye bajo nuestras condiciones experimentales los dos mejores diseños experimentales para inducir la formación de rupturas de cadena simple y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN. Aumentando considerablemente la frecuencia espontánea presente en esta especie de rata, siendo útil en estudios de evaluación de drogas que no han sido exploradas en el ámbito de la antigenotoxicidad y genotoxicidad *in vivo*.

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

Grupos (mg/kg)	Sexo	Unidades Arbitrarias ^T	Nivel 0 ^T	Nivel 1 ^T	Nivel 2 ^T	Nivel 3 ^T	Nivel 4 ^T
			(% Nucleoides)				
Control Negativo	H	29.51 ± 14.10	83.12 ± 4.35	8.47 ± 3.18	5.17 ± 2.90	2.26 ± 1.43	0.98 ± 0.44
	M	37.79 ± 7.80	75.27 ± 7.21	16.16 ± 2.68	5.08 ± 2.03	2.49 ± 1.24	1.00 ± 0.23
CF1 ¹	H	55.26 ± 8.49a	64.09 ± 3.74a	23.41 ± 3.11a	7.01 ± 1.88a	4.13 ± 1.81a	1.36 ± 1.09a
	M	61.59 ± 3.29a	60.98 ± 2.91a	25.37 ± 2.52a	6.95 ± 2.32a	4.48 ± 2.57a	2.22 ± 1.46a
CF2 ¹	H	100.98 ± 14.38abc	34.09 ± 2.94abc	44.61 ± 2.14abc	11.41 ± 2.71abc	6.01 ± 1.72abc	3.88 ± 1.99abc
	M	109.63 ± 11.21abc	30.13 ± 4.41abc	46.87 ± 3.57abc	10.96 ± 4.52abc	7.32 ± 1.97abc	4.72 ± 2.21abc
BL1 ¹	H	56.34 ± 7.92a	63.11 ± 2.94a	24.51 ± 2.14a	6.89 ± 2.11a	3.91 ± 1.63a	1.58 ± 0.39a
	M	56.91 ± 2.75a	63.78 ± 4.41a	23.17 ± 3.57a	7.13 ± 1.22a	4.20 ± 1.51a	1.72 ± 0.46a
BL2 ¹	H	100.72 ± 10.68abc	35.66 ± 1.46abc	43.10 ± 3.61abc	10.32 ± 1.99abc	5.90 ± 1.22abc	4.82 ± 3.39abc
	M	103.13 ± 17.33abc	33.92 ± 2.11abc	44.56 ± 5.28abc	10.32 ± 3.82abc	6.87 ± 2.47abc	4.33 ± 2.11abc

^TTodo el análisis estadístico se realizó utilizando el test de U de Mann Whitney, con p<0.05 prefijada. (X media; DE desviación estándar, para las dos réplicas experimentales).¹Administración por vía i.p. a= difiere con el control negativo, b=difiere entre los diferentes tratamientos para el mismo mutágeno y c=difiere entre mutágenos sin tener en cuenta el tratamiento. CF1= Ciclofosfamida administrada 24 horas antes del sacrificio, CF2= Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio, BL1= Bleomicina administrada 24 horas antes del sacrificio y BL2= Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio.

- Figura. a**=Ciclofosfamida administrada 24 horas antes del sacrificio
Figura. b= Ciclofosfamida administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio
Figura. c= Bleomicina administrada 24 horas antes del sacrificio
Figura. d= Bleomicina administrada 48 y 24 horas antes del sacrificio
Figura. e= control negativo (hembra)
Figura. f= control negativo (macho).



Referencias Bibliográficas

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 acuatic (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. *The 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. Frieauff 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. Preston R, Dean B, Galloway S. Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res* 1999; 189:157-165.
10. Sorsa M, Ojajärvi A, Salomaa S. Cytogenetic surveillance of workers exposed to genotoxic: chemicals. *Teratogen, Carcinogen, and Mutagen* 1999; 10:215-221.
11. Richold M, Chandly A, Ashby J, Catehouse DG, Bootman J. *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney; 1990.p.115-141.
12. Tice RR, Hayashi M, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH. Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res* 1994; 312:305-312.

13. Te C, Gentile JM, Baguley BC, Pearson AE. *In vivo* effects of chlorophyllin on antitumour agent cyclophosphamide. *Int J Cancer* 1997; 70(1):84-89.
14. Sanchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez AJ, Davison GP, León OS. Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 2000; 42:565-573.
15. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ. Effect of *Mangifera indica* L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 2001; 15:581-585.
16. Prieto G, Errecalde C, Trotti N. Farmacología clínica de los antineoplásicos. *Monog Med Vet* 1999; 19(2):1-8.
17. Arencibia DF, Rosario LA. Evaluación de ratas *Sprague Dawley* como biomodelos experimentales en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. *Rev Arg Vet* 2010; 27(264):1-13.
18. Arencibia DF, Rosario LA. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *Retel* 2010; 29(1):1-15.
19. Arencibia DF, Rosario LA. Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. *Retel* 2010; 28(1):1-14.
20. 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.
21. 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.
22. 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* 2010; 26(1):1-12.

23. 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.
24. 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.
25. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. *Retel* 2009; 23(3):23-40.
26. Cancino L, Leiva A, Garrido G, Cossío M, Prieto E. VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Rev Cub Invest Biomed* 2001; 20(1):48-53.
27. Rodríguez I, Valdés YC, Proveyer S. Citostáticos: medicamentos riesgosos. *Rev Cub Med* 2004; 43(2-3):15-19.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Meintieres S, Nesslany F, Pallardy M, Marzin D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure the apoptosis. *Envir. Mol. Mut* 2003; 41:260-269.

Recibido: 14/06/10

Aceptado: 17/06/10