

Butirato de sodio como agente coadyuvante de la acción radioprotectora de la amifostina

- Martín Hernán Costantini^{1a,c}, María Isabel Díaz Gómez^{2c}, Florencia Formosa Lemoine^{3a}, María Montalto de Mecca^{2a}, Gabriel Diego López^{4b}, José Alberto Castro^{5a,c}, Gerardo Daniel Castro^{5a,c*}

¹ Analista Químico Industrial.

² Dra. en Ciencias Químicas.

³ Técnica en Histología.

⁴ Técnico Mecánico.

⁵ Dr. en Ciencias Químicas.

^a División Toxicología. Departamento Química Aplicada. CITEDEF. Juan B. de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli, Argentina.

^b Laboratorio de Ensayos No Destructivos. Departamento Sistemas de Armas. CITEDEF. Juan B. de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli, Argentina.

^c Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental. UNSAM. Av. 25 de Mayo y Francia, San Martín, Argentina.

* Autor para correspondencia.

Resumen

Entre los escasos radioprotectores en uso, la amifostina resulta eficaz para reducir la toxicidad aguda inducida por la radiación ionizante. Sin embargo, presenta efectos tóxicos importantes que impiden su uso repetido o en dosis altas. Es necesario entonces desarrollar radioprotectores menos tóxicos, por sí mismos o como coadyuvantes de la amifostina en dosis bajas. Se expusieron ratas Sprague-Dawley a una dosis de rayos X de 6 Gy (cuerpo entero). Se ensayó el butirato de sodio como mitigante luego de una dosis baja de amifostina previa a la irradiación. A distintos tiempos después de la irradiación se realizó el recuento de eritrocitos, leucocitos y la fórmula leucocitaria. Los efectos genotóxicos se evaluaron en leucocitos de sangre mediante el ensayo Cometa. Se realizaron también estudios de supervivencia a 60 días y la evaluación histológica del duodeno e intestino grueso. El efecto del tratamiento resultó moderadamente protector respecto de la recuperación de los valores normales de eritrocitos, leucocitos y la fórmula leucocitaria en los animales sobrevivientes en ambos sexos, así como de los epitelios intestinales y el ADN de los leucocitos. También aumentó significativamente la sobrevida a 60 días. La radioprotección con amifostina en una dosis baja seguida de una mitigación con butirato fue claramente significativa.

Palabras clave: Radioprotección; Butirato de sodio; Amifostina; WR-2721; Radiación X

Sodium butyrate as a coadjuvant agent of the radioprotecting action of amifostine

Abstract

Among the few radioprotectors in use, amifostine is effective in reducing the acute toxicity induced by ionizing radiation. However, it has important toxic effects that prevent its repeated use or in high doses. It is necessary then to develop less toxic radioprotectors, by themselves or as adjuvants of amifostine in low doses. Sprague-Dawley rats were exposed to an X-ray dose of 6 Gy (whole body). Sodium butyrate was tested as a mitigant after a low dose of amifostine prior to irradiation. At different times after the irradiation, the erythrocytes, leukocytes and the leukocyte formula were counted.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Genotoxic effects were evaluated in blood leukocytes by the Comet assay. Sixty-day survival studies and histological evaluation of the duodenum and large intestine were also performed. The effect of the treatment was moderately protective with respect to the recovery of the normal values of erythrocytes, leukocytes and the leukocyte formula in the surviving animals in both sexes as well as for the intestinal epithelia and leukocytes DNA. It also significantly increased the 60-day survival. The radioprotection with amifostine in a low dose followed by mitigation with butyrate was clearly significant.

Keywords: Radioprotection; Sodium butyrate; Amifostine; WR-2721; X radiation

Butirato de sódio como agente coadjuvante da ação radioprotetora da amifostina

Resumo

Entre os poucos radioprotetores em uso, a amifostina é eficaz na redução da toxicidade aguda induzida pela radiação ionizante. No entanto, tem importantes efeitos tóxicos que impedem seu uso repetido ou em altas doses. É necessário, então, desenvolver radioprotetores menos tóxicos, isoladamente ou como coadjuvantes da amifostina em baixas doses. Ratos Sprague-Dawley foram expostos a uma dose de raios X de 6 Gy (corpo inteiro). O butirato de sódio foi testado como mitigante após uma dose baixa de amifostina antes da irradiação. Em diferentes momentos após a irradiação, os eritrócitos, leucócitos e a fórmula de leucócitos foram contados. Os efeitos genotóxicos foram avaliados em leucócitos de sangue pelo ensaio Cometa. Estudos de sobrevivência de 60 dias e avaliação histológica do duodeno e do intestino grosso também foram realizados. O efeito do tratamento resultou moderadamente protetor em relação à recuperação de valores normais de eritrócitos, leucócitos e fórmula leucocitária nos animais sobreviventes em ambos os sexos, bem como protegeu epitélios intestinais e o DNA dos leucócitos. Também aumentou significativamente a sobrevivência para 60 dias. A radioproteção com amifostina em baixa dose seguida de uma mitigação com butirato foi claramente significativa.

Palavras chave: Radioproteção; Butirato de sódio; Amifostina; WR-2721; Radiação

Introducción

En distintas instituciones de diferentes países se han evaluado las ocasiones factibles en las cuales podrían verificarse exposiciones a radiaciones ionizantes, que pueden causar efectos dañinos de intensidad y consecuencias variables. Existen ejemplos derivados de incidentes en instalaciones de la industria nuclear (en plantas de generación de energía como las de *Chernobyl*, *Fukujima* o *Three Miles Island*); por usos militares de la energía atómica (bombas de *Hiroshima* y *Nagasaki*, ensayos de armas nucleares y las resultantes precipitaciones radiactivas, en la fabricación de los materiales involucrados); de accidentes durante el uso de fuentes de medicina nuclear; ocupacionales (minería de uranio, exposición a radón, personal de aeronaves y vuelos espaciales, otros usos industriales). En tiempos recientes ha aumentado la preocupación por el uso de fuentes radioactivas para acciones terroristas (1-3).

En diciembre de 2001 se reunió una comisión de expertos en radiaciones ionizantes pertenecientes a distintas áreas del gobierno de EE.UU. (por ejemplo, *National Cancer Institute*, *Department of Energy*, *NASA*, *EPA*, *Uniformed Services University for the Health Sciences*,

Armed Forces Radiobiology Research Institute) con el propósito de analizar los problemas derivados de estas exposiciones accidentales y las alternativas de protección o tratamiento. Una primera definición elaborada en esta reunión de especialistas definió las dosis comprendidas entre 1 y 10 Gy como las de una exposición factible en tratamientos de pacientes con cáncer, poblaciones potencialmente expuestas a situaciones accidentales o intencionales (terrorismo) y a trabajadores de la industria nuclear (3). Este rango de exposición entre 1 y 10 Gy involucra al síndrome hematopoyético y a una parte del denominado síndrome gastrointestinal (3).

En la actualidad solo existe un radioprotector aprobado para su uso en humanos, la amifostina (WR-2721). Este compuesto también encontró aplicaciones radioterapéuticas en la clínica del cáncer, por tener selectividad en su efecto respecto del tejido tumoral. No obstante estas interesantes cualidades, dista de ser un radioprotector ideal debido a su toxicidad. Esto hizo que la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de Estados Unidos aprobara su uso limitado en pacientes contra el daño por radioterapia posterior a cirugías de cánceres de cabeza y cuello y para prevenir la xerostomía. Se hace muy importante entonces el desarrollo de radioprotec-

tores nuevos o fórmulas de ellos que actúen previniendo las consecuencias de una exposición. Este problema y el ensayo de una terapia coadyuvante con otros compuestos no tóxicos como el piruvato de etilo fueron informados por este laboratorio (4). El objetivo de esos estudios consistió en aprovechar la capacidad radioprotectora de la amifostina administrada en una sola dosis previa a la radiación y continuar con otras sustancias de baja toxicidad que permitieran reforzar el efecto protector inicial. Parece claro que difícilmente una sola sustancia pueda bloquear o mitigar los efectos dañinos agudos de las radiaciones ionizantes y que resulta más factible el empleo de formulaciones donde cada componente aporte propiedades que sean cooperativas o complementarias (4). Esto implica ensayos de nuevos componentes con características muy diversas en su potencial terapéutico y que, de resultar efectivos, luego deban estudiarse por su compatibilidad con los existentes.

El síndrome agudo por radiación involucra, entre otros blancos, la médula ósea y los epitelios gastrointestinales. La combinación de una falla en el sistema inmune con una alteración de la absorción de nutrientes y permeabilidad a las bacterias lleva a un cuadro agudo que es causa de una mortalidad elevada.

El anión butirato es la fuente de energía principal para la microbiota y las células epiteliales intestinales, y desempeña un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad e integridad de ambos. También posee propiedades antitumorales, dado que puede inhibir la proliferación celular, inducir la diferenciación celular, promover la apoptosis y reducir la invasividad de las células tumorales, desempeñando así un papel importante en la salud del colon (5-10). Por otra parte, se ha ensayado a esta sustancia como mitigante de los efectos severos sobre el colon de la radioterapia para cáncer de próstata, con resultados ambiguos (11) (12).

En el presente trabajo se estudió el potencial del butirato de sodio como coadyuvante de la amifostina y mitigante de los efectos adversos agudos de la radiación ionizante para una irradiación de cuerpo entero en ratas.

Materiales y Métodos

Compuestos químicos

El butirato de sodio (98%) y la amifostina grado USP (como trihidrato, WR-2721) se adquirieron en Sigma Co. (St. Louis, EE.UU.). Los otros compuestos usados fueron de grado reactivo analítico.

Animales, tratamientos e irradiación

En todos los experimentos se utilizaron ratas machos y hembras de la cepa Sprague-Dawley (10 semanas de vida, 240-270 g de peso) que se mantuvieron en un am-

biente controlado con un ciclo de 12 horas de luz-12 horas de oscuridad (de 6:00 a 18:00, luz); la temperatura fue controlada en 23 ± 2 °C y la humedad relativa entre 45 y 65%. El procedimiento utilizado para el manejo y la crianza de los animales siguió las recomendaciones y regulaciones de organismos internacionales en la materia (13). El alimento y el agua estuvieron siempre disponibles *ad libitum*.

La irradiación de los animales (8 animales por grupo, cuerpo entero) se realizó con una máquina de rayos X (marca: ANDREX, modelo: SLX 402). Los siguientes parámetros se utilizaron para la exposición: potencia RX 200 kV, intensidad 5 mA, distancia 30 cm, tiempo de exposición 18 minutos. Los animales se expusieron, de a dos por vez, alojados en una caja de policarbonato de base rectangular (17 cm x 28 cm) con cubierta de fibra de papel, centrada bajo la máquina. Con estos valores de operación, la dosis estimada fue de 6 Gy.

La amifostina se administró por la vía intraperitoneal media hora antes de la irradiación, disuelta en solución fisiológica, en una dosis de 100 mg/kg de peso corporal. El butirato de sodio se administró por vía oral disuelto en agua en una dosis de 200 mg/kg 24, 72 y 144 horas posteriormente a la irradiación. Para cada estudio se utilizaron los grupos de control correspondientes.

Ensayo Cometa

El ensayo se llevó a cabo en la sangre venosa heparinizada de las ratas. Las ratas machos y hembras Sprague Dawley fueron tratadas como se indica en Métodos. El ensayo de cometa alcalino (pH>13), del inglés *single cell gel electrophoresis* (SCGE), fue realizado siempre una hora después de la irradiación. Se emplearon 5 ratas por grupo, por duplicado para cada muestra en 5 µL de la mezcla de sangre. La determinación de la viabilidad y el ensayo SCGE se llevaron a cabo esencialmente de acuerdo con Tice *et al* (14), como se describe a continuación. La muestra de sangre se depositó en agarosa de bajo punto de fusión (0,5% en PBS) y 75 µL se depositaron sobre portaobjetos que habían sido cubiertos previamente con agarosa de punto de fusión normal (0,5% en PBS). Después que la agarosa solidificó (4 °C por 10 min), se aplicó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión de modo similar a la primera. Los portaobjetos fueron sumergidos luego en una solución lisante (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 10, que contenía Triton X100 al 1% recién preparado y DMSO al 10%) por al menos 1 hora a 4 °C. Luego se colocó en un aparato de electroforesis horizontal que contenía *buffer* recién preparado (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13). Después de 20 minutos de pre-incubación (para desenrollar el ADN), la electroforesis se llevó a cabo por 20 minutos a un voltaje fijo de 25 V (0,83 V/cm) y 300 mA, ajustado ya sea elevando o bajando el nivel del *buffer* de

electroforesis en la cuba. Al final de la electroforesis, los portaobjetos se lavaron dos veces con *buffer* de neutralización (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), se secaron a temperatura ambiente y se fijaron en etanol absoluto por 5 min. Los portaobjetos se tiñeron con 40 μ L de bromuro de etidio (20 μ g/mL).

Detección de los cometas: Las células se analizaron 24 horas después del teñido con un microscopio de fluorescencia Eclipse E 400 (Nikon, Japón) equipado con filtros de epifluorescencia y a una magnificación de 20X. La captación de imágenes se realizó mediante un programa Nikon ACT-2U con una cámara DS 5M digital. Se usó el *software* CASP adquirido desde <http://www.casp.of.pl>, para determinar la longitud de la cola, intensidad de la cola y el momento Olive de la cola (TL, TI y TM), todos parámetros relacionados con el grado de daño al ADN en cada célula (15). Para cuantificar el daño al ADN, se analizaron un total de 50 células por portaobjetos. La viabilidad de las suspensiones celulares se evaluó con una tinción dual con diacetato de 5,6-carboxifluoresceína y bromuro de etidio. La viabilidad celular después de los tratamientos fue siempre mayor del 80%.

Estudios de los parámetros sanguíneos en los animales irradiados y tratados con radioprotectores

Se tomaron muestras de sangre de la vena lateral de la cola de la rata, que permite múltiples colecciones de un mismo animal. La extracción de sangre, que fue anticoagulada con EDTA, se realizó a distintos tiempos (48 horas, 7, 14, 21, 28 y 60 días) posteriores a la irradiación. Se usó una cámara de Neubauer para el recuento de leucocitos y eritrocitos. Además, se realizó el recuento diferenciado de leucocitos empleando la técnica de coloración de los extendidos sanguíneos de May-Grünwald Giemsa.

Estudios de supervivencia y variación porcentual del peso

Con el propósito de evaluar la eficacia radioprotectora general de los tratamientos, se registró la supervivencia y la variación porcentual del peso de los animales durante los sesenta días posteriores a la irradiación. Los grupos control, sin irradiar o con los tratamientos solos, se registraron simultáneamente (4). La evaluación estadística del efecto radioprotector mediante las curvas de supervivencia Kaplan-Meier se realizó con el *test* Log rank (Mantel-Cox), según el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 19.

Estudios histopatológicos del intestino delgado y grueso

De cada animal se extrajeron porciones del duodeno (zona inmediatamente posterior al píloro), colon (zona 1: próxima a la unión colo-cecal; zona 2: a unos 3 cm

del ano), se enjuagó con solución fisiológica, fijando luego inmediatamente las piezas en una solución tamponada neutra de formaldehído al 10%. La morfología intestinal se examinó en secciones de tejido luego de su tinción con hematoxilina-eosina. En las secciones de duodeno se cuantificó el número de criptas por circunferencia intestinal.

Análisis estadístico de los datos

Las diferencias significativas entre los valores medios se evaluaron mediante el análisis de varianza de una vía y la prueba posterior de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Los cálculos se realizaron utilizando el programa Graph Pad (GraphPad Instat). Para todos los análisis, el criterio de significación se estableció en $p < 0,05$ (16).

Resultados

Efecto del tratamiento sobre parámetros del ensayo Cometa en sangre de rata a una hora postirradiación

Se midió el efecto del tratamiento con amifostina sobre la inducción de roturas en las hebras del ADN en células individuales por acción de la radiación ionizante, usando el ensayo Cometa alcalino en sangre entera (4) (17)(18).

En las ratas hembras se observó que la irradiación con una dosis de rayos X de 6 Gy condujo a un incremento significativo de imágenes de Cometa en los leucocitos a una hora de irradiarse. La diferencia en todos los parámetros determinados, longitud de la cola, %ADN en la cola y el momento de la cola fue muy significativa (Tabla I). La amifostina mostró un efecto protector claramente significativo sobre el daño oxidativo producido por la radiación. De todos modos, en ningún caso se llegaron a recuperar los valores del control.

En los animales machos se observó un comportamiento similar al de las hembras frente a la dosis de rayos X, así como hacia el tratamiento radioprotector (Tabla I). La amifostina *per se* en la dosis ensayada no produjo incrementos de los parámetros del ensayo Cometa (4).

Efecto de la irradiación y de los tratamientos radioprotectores sobre los parámetros hematológicos

En el caso de los eritrocitos, la radiación ionizante no produjo una disminución significativa durante los primeros días (Tabla II). Solo pudo observarse un efecto sobre el número de glóbulos rojos en los animales machos irradiados a los catorce días o bien inferirse de los recuentos realizados en el grupo con el tratamiento, que sobrevivió el periodo de sesenta días. Los tratamientos ensayados

Tabla I. Evaluación del tratamiento con amifostina sobre el daño inducido por la radiación X en parámetros del ensayo Cometa alcalino en sangre de ratas a una hora.

	Parámetros		
	Longitud de la cola (μm)	%ADN en la cola	Momento de la cola (unidades arbitrarias)
<i>Hembras</i>			
Control	3,19 \pm 0,30	0,10 \pm 0,01	0,021 \pm 0,002
6 Gy	26,70 \pm 4,05 ^a	22,01 \pm 3,95 ^a	5,80 \pm 1,01 ^a
6 Gy + WR	10,68 \pm 1,52 ^b	9,35 \pm 1,15 ^b	2,25 \pm 0,35 ^b
<i>Machos</i>			
Control	3,14 \pm 0,27	0,23 \pm 0,02	0,029 \pm 0,002
6 Gy	24,50 \pm 3,06 ^a	20,15 \pm 2,06 ^a	4,01 \pm 0,49 ^a
6 Gy + WR	10,50 \pm 1,70 ^b	9,10 \pm 1,20 ^b	1,90 \pm 0,33 ^b

Las ratas se trataron con amifostina (WR) (100 mg/kg i.p. 30 minutos antes de la irradiación) y se extrajo sangre una hora posteriormente a la irradiación. El ensayo Cometa se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos. Control se refiere a la sangre de animales sin irradiar. Los datos son el promedio \pm DE. a. $p < 0,001$ cuando se compara con el grupo Control. b. $p < 0,001$ cuando se compara con el grupo "6 Gy". En los animales tratados con amifostina pero sin irradiar los valores no difirieron significativamente de los del control.

Tabla II. Efecto de la irradiación con rayos X y de los tratamientos radioprotectores sobre los parámetros hematológicos: eritrocitos.

	Eritrocitos ($\times 10^6$ cél./mm ³)					
	48 horas	7 días	14 días	21 días	28 días	60 días
<i>Hembras</i>						
Control	3,50 \pm 0,50	3,68 \pm 0,53	3,82 \pm 0,33	4,08 \pm 0,40	3,77 \pm 0,31	4,10 \pm 0,45
6 Gy	4,11 \pm 0,39 ^a	3,42 \pm 0,18 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR	4,13 \pm 0,28 ^b	4,06 \pm 0,23 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR + BU	4,41 \pm 0,33 ^b	3,53 \pm 0,22 ^b	1,21 \pm 0,13 ^c	1,69 \pm 0,74 ^c	3,55 \pm 0,75 ^a	4,54 \pm 0,11 ^a
<i>Machos</i>						
Control	3,08 \pm 0,50	3,11 \pm 0,48	3,62 \pm 0,39	3,89 \pm 0,26	4,26 \pm 0,21	4,5 \pm 0,25
6 Gy	3,42 \pm 0,18 ^a	3,56 \pm 0,33 ^a	1,68 \pm 0,98 ^c	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR	4,00 \pm 0,37 ^b	3,19 \pm 0,54 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR + BU	3,89 \pm 0,09 ^b	3,81 \pm 0,32 ^b	1,89 \pm 0,56 ^{b,c}	2,30 \pm 0,40 ^c	3,40 \pm 0,70 ^d	4,53 \pm 0,36 ^a

Los animales fueron irradiados y tratados según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para el recuento de eritrocitos, mediante el uso de una cámara de Neubauer, a distintos tiempos posteriores a la irradiación.

n.d. El número de animales sobrevivientes fue nulo o insuficiente para realizar una evaluación estadística de los datos. a. $p > 0,05$ comparado con "control". b. $p > 0,05$ comparado con "6 Gy". c. $p < 0,001$ comparado con "control". d. $p < 0,05$ comparado con "control".

podieron revertir este efecto con distinta eficacia. En particular, la acción radioprotectora de la amifostina junto con el butirato de sodio logró restablecer los niveles eritrocitarios normales a partir del mes (19).

En el caso de los leucocitos de las ratas de ambos sexos, la radiación produjo una disminución severa en el número total y una alteración marcada en la fórmula leucocitaria relativa desde la primera medida a las 48 horas (Tabla III) (Tabla IV) (Tabla V). El tratamiento con amifostina y butirato de sodio pudo revertir esta condición, y se alcanzaron niveles normales de leucocitos a partir de

los 28 días en las hembras y de 21 días en los machos. A los sesenta días los animales irradiados y tratados con amifostina y butirato de sodio lograron restablecer la fórmula leucocitaria normal (Tabla IV) (Tabla V).

Efecto de la irradiación y de los tratamientos radioprotectores sobre la supervivencia y variación porcentual del peso de los animales

Se evaluó la supervivencia de los animales durante un período de 60 días luego de la irradiación y de los

Tabla III. Efecto de la irradiación con rayos X y de los tratamientos radioprotectores sobre los parámetros hematológicos: leucocitos.

	Leucocitos ($\times 10^3$ cél./mm ³)					
	48 horas	7 días	14 días	21 días	28 días	60 días
<i>Hembras</i>						
Control	7,21±0,80	7,19±0,96	7,98±0,88	8,74±1,11	6,76±0,46	7,43±0,70
6 Gy	0,97±0,22 ^a	0,53±0,18 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR	1,34±0,26 ^b	0,93±0,18 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR + BU	1,50±0,21 ^b	0,87±0,25 ^b	1,45±0,39 ^a	4,58±1,94 ^a	5,80±0,66 ^c	8,07±1,07 ^c
<i>Machos</i>						
Control	6,99±0,75	6,89±0,60	8,05±1,35	7,81±0,81	7,48±0,70	8,10±0,5
6 Gy	0,87±0,10 ^a	0,45±0,10 ^a	1,55±0,35 ^a	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR	1,11±0,18 ^b	0,83±0,27 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6 Gy + WR + BU	1,24±0,17 ^b	0,94±0,17 ^b	1,67±0,50 ^{a,b}	8,55±2,31 ^c	8,23±1,16 ^c	9,13±0,98 ^c

Los animales fueron irradiados y tratados según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para el recuento de leucocitos, mediante el uso de una cámara de Neubauer, a distintos tiempos posteriores a la irradiación. n.d. El número de animales sobrevivientes fue nulo o insuficiente para realizar una evaluación estadística de los datos. a. $p < 0,001$ comparado con "control". b. $p > 0,05$ comparado con "6 Gy". c. $p > 0,05$ comparado con "control".

Tabla IV. Efecto de la irradiación con rayos X y de los tratamientos radioprotectores sobre la fórmula leucocitaria relativa de ratas hembras.

	Fórmula leucocitaria relativa				
	Eosinófilos %	Basófilos %	Neutrófilos %	Linfocitos %	Monocitos %
Control	0,13	0	9,87	89,37	0,63
	(0-1,0)		(3,0-17)	(82-97)	(0-2,0)
6 Gy (48 horas)	0	0	86,25	11,25	2,50
			(80-90)	(10-20)	(0-10)
6 Gy + WR (48 horas)	0	0	90	10	0
			(87-95)	(9-13)	
6 Gy + WR + BU (48 horas)	0	0	83,33	11,67	5,00
			(80-90)	(10-20)	(0-10)
6 Gy + WR + BU (60 días)	0,40	0,40	16,80	82,00	0,40
	(0-1,0)	(0-1,0)	(12-23)	(75-87)	(0-1,0)

Los animales fueron irradiados y tratados según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para el recuento diferenciado de leucocitos, mediante coloración de May-Grünwald Giemsa, a distintos tiempos posteriores a la irradiación.

tratamientos ensayados. Los resultados obtenidos mostraron que, en ambos sexos, una dosis de rayos X de 6 Gy redujo severamente la supervivencia (Fig. 1) (Fig. 2).

La amifostina en la dosis administrada no resultó radioprotectora, a menos que se la combinara con la posterior administración del butirato de sodio.

El tratamiento combinado de amifostina con butirato de sodio logró corregir la alteración en la curva de crecimiento de los animales sobrevivientes a la irradiación en ambos sexos. El efecto fue más marcado en las hembras que en los machos (Fig. 3) (Fig. 4).

Efecto de la irradiación y del tratamiento radioprotector sobre características histológicas de los epitelios intestinales

Para evaluar la acción de la radiación ionizante de 6 Gy sobre el epitelio del intestino delgado (en el duodeno) se tomaron muestras del órgano a las 48 horas posteriores a la irradiación, tiempo que coincidió con el comienzo del descenso rápido del peso corporal y la aparición de signos visibles de mal funcionamiento gastrointestinal, como la diarrea. En

Tabla V. Efecto de la irradiación con rayos X y de los tratamientos radioprotectores sobre la fórmula leucocitaria relativa de ratas machos.

	Fórmula leucocitaria relativa				
	Eosinófilos %	Basófilos %	Neutrófilos %	Linfocitos %	Monocitos %
Control	0	0	12,50 (8-16)	87,25 (83-92)	0,25 (0-1)
6 Gy (48 horas)	0	1,25 (0-10)	82,50 (70-90)	11,25 (10-20)	5,0 (0-10)
6 Gy + WR (48 horas)	0	0	85 (70-90)	15 (10,0-30)	0
6 Gy + WR + BU (48 horas)	2,5 (0-10)	0	85 (80-90)	10 (7-14)	2,5 (0-10)
6 Gy + WR + BU (60 días)	0	0,80 (0-2)	17,6 (10-29)	81,2 (69-88)	0,40 (0-1)

Los animales fueron irradiados y tratados según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para el recuento diferenciado de leucocitos, mediante coloración de May-Gründwald Giemsa, a distintos tiempos posteriores a la irradiación.

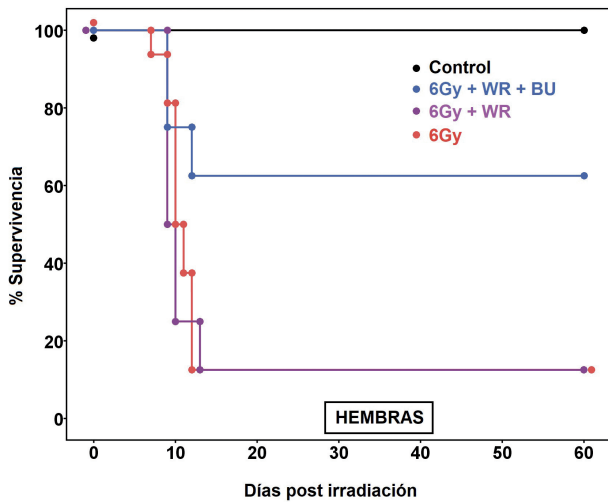


Figura 1. Evaluación de la supervivencia de ratas hembras a la irradiación con rayos X a una dosis de 6 Gy y el efecto protector del butirato de sodio (BU) combinado con amifostina (WR). Curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Grupos: control (no irradiado); 6 Gy (irradiado solamente); 6 Gy + WR (irradiación y tratamiento con amifostina 100 mg/kg); 6 Gy + WR + BU (irradiación y tratamiento con amifostina y butirato de sodio, según se describe en Materiales y Métodos). La evaluación estadística del efecto radioprotector se realizó mediante el test Log rank (Mantel-Cox): $p > 0,5$ ("6 Gy" vs. "6 Gy + WR"); $p < 0,05$ ("6 Gy" vs. "6 Gy + WR + BU"); $p > 0,05$ ("6 Gy + WR + BU" vs. "control"). En los animales no irradiados los tratamientos per se no produjeron mortalidad en el plazo de 60 días (100% de supervivencia).

efecto, pudo observarse una disminución significativa en el número de criptas por circunferencia intestinal para ambos sexos (Tabla VI). El tratamiento combinado de amifostina con butirato de sodio consiguió recuperar la integridad del epitelio, como lo demostraron los valores significativamente más altos en los duodenos de los animales sobrevivientes a sesenta días, que

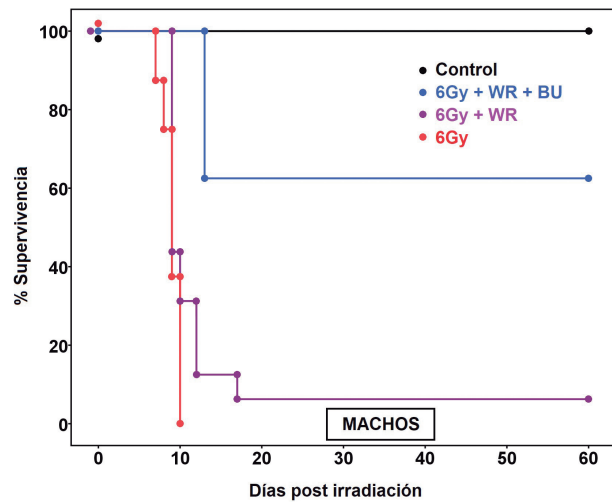


Figura 2. Evaluación de la supervivencia de ratas machos a la irradiación con rayos X a una dosis de 6 Gy y el efecto protector del butirato de sodio (BU) combinado con amifostina (WR). Curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Grupos: Control (no irradiado); 6 Gy (irradiado solamente); 6 Gy + WR (irradiación y tratamiento con amifostina 100 mg/kg); 6 Gy + WR + BU (irradiación y tratamiento con amifostina y butirato de sodio, según se describe en Materiales y Métodos). La evaluación estadística del efecto radioprotector se realizó mediante el test Log rank (Mantel-Cox): $p > 0,05$ ("6 Gy" vs. "6 Gy + WR"); $p < 0,001$ ("6 Gy" vs. "6 Gy + WR + BU"); $p > 0,05$ ("6 Gy + WR + BU" vs. "Control"). En los animales no irradiados, los tratamientos per se no produjeron mortalidad en el plazo de 60 días (100% de supervivencia).

de todos modos no alcanzaron a los de los controles respectivos.

En el caso del intestino grueso, se evaluó la morfología en dos zonas, una cercana al ciego y otra cercana al recto. El efecto de la radiación X fue variable y dependiente del sexo (Fig. 5) (Fig. 6). Las ratas irradiadas con 6 Gy mostraron severos cambios degenerativos caracterizados por la

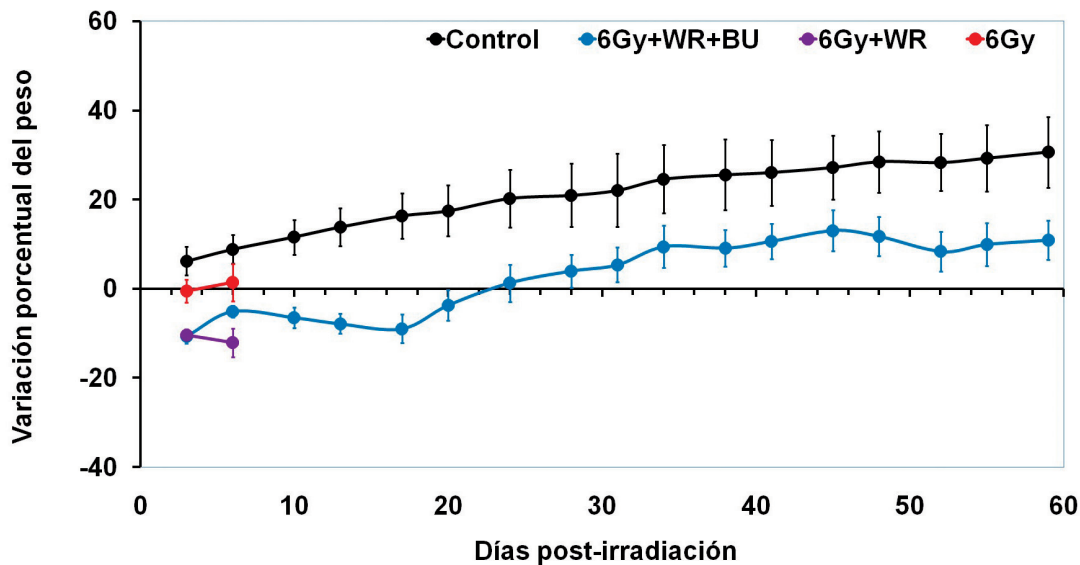


Figura 3. Evolución del peso corporal relativo para los animales hembras irradiados y el efecto protector del butirato de sodio (BU) combinado con amifostina (WR). Grupos: control (no irradiado); 6 Gy + WR + BU (irradiación y tratamiento con amifostina y butirato de sodio, según se describe en Materiales y Métodos); 6 Gy + WR (irradiación y tratamiento con amifostina 100 mg/kg); 6 Gy (irradiado solamente).

Cada punto corresponde al promedio \pm DE de los animales sobrevivientes en cada tiempo. Control: Ocho (días 3 a 59). "6 Gy + WR + BU": ocho (días 3 y 6), seis (día 10), cinco (días 13 a 59). "6 Gy + WR": ocho (días 3 y 6). "6 Gy": Ocho (día 3), siete (día 6). En los animales no irradiados los tratamientos *per se* no produjeron diferencias significativas con el control en la evolución del peso corporal relativo durante los sesenta días del estudio.

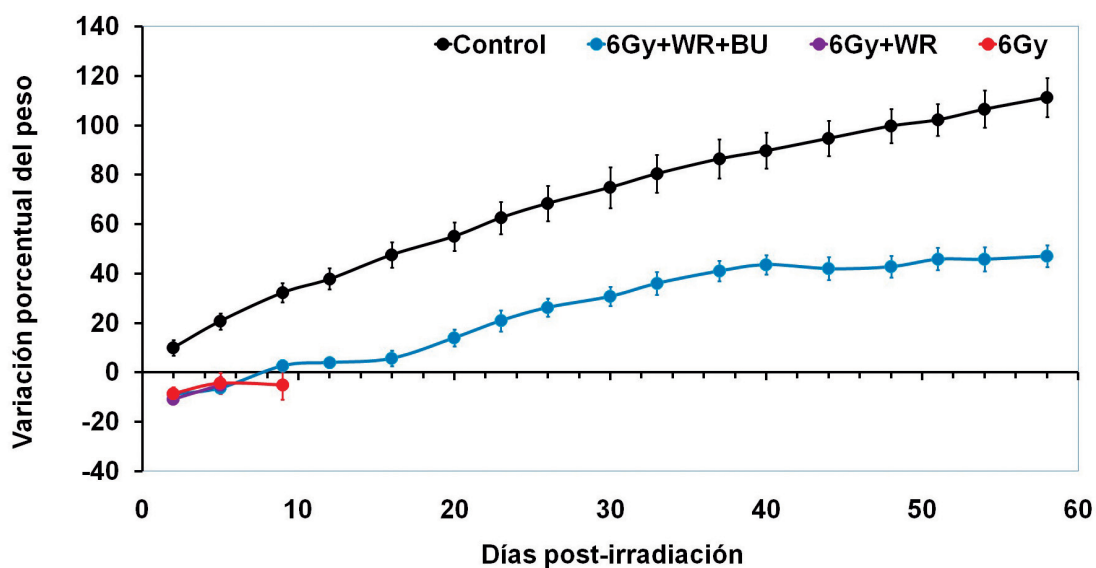


Figura 4. Evolución del peso corporal relativo para los animales machos irradiados y el efecto protector del butirato de sodio (BU) combinado con amifostina (WR). Grupos: Control (no irradiado); 6 Gy + WR + BU (irradiación y tratamiento con amifostina y butirato de sodio, según se describe en Materiales y Métodos); 6 Gy + WR (irradiación y tratamiento con amifostina 100 mg/kg); 6 Gy (irradiado solamente).

Cada punto corresponde al promedio \pm DE de los animales sobrevivientes en cada tiempo. Control: ocho (días 2 a 61). "6 Gy + WR + BU": ocho (días 2 a 9), cinco (días 12 a 61). "6 Gy + WR": ocho (día 2); siete (día 5). "6 Gy": ocho (día 2), siete (día 5); tres (día 9). En los animales no irradiados los tratamientos *per se* no produjeron diferencias significativas con el control en la evolución del peso corporal relativo durante los sesenta días del estudio.

Tabla VI. Efecto de la irradiación y del tratamiento radioprotector sobre características histológicas del intestino delgado.

	Número de criptas / circunferencia intestinal ^a		
	Control	6 Gy ^b	6 Gy + WR + BU ^c
Hembras	193±2	98±8 ^d	151±9 ^e
Machos	199±10	110±16 ^d	162±14 ^f

a. Los valores en cada grupo experimental se calcularon como un promedio de las criptas por circunferencia de duodeno de ocho animales (grupos control e irradiados) o de los sobrevivientes luego del tratamiento (cinco animales para ambos sexos). b. Los animales fueron sacrificados a las 48 horas posteriores a la irradiación. c. Los animales fueron sacrificados a los 60 días posteriores a la irradiación. d. $p < 0,001$ comparado con "control". e. $p < 0,001$ comparado con "6 Gy" o "control". f. $p < 0,01$ comparado con "6 Gy" o "control".

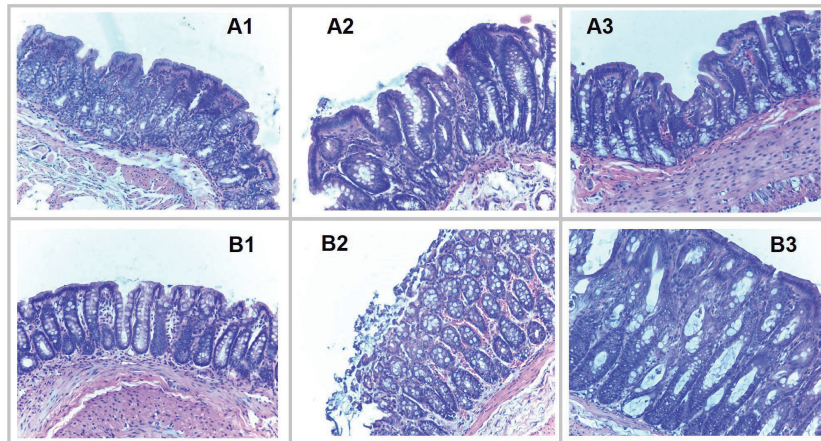


Figura 5. Características histológicas de dos secciones de colon de ratas hembras, una próxima al ciego (A) y la otra al recto (B). Hematoxilina-eosina, 200X.

A1 y B1: Aspecto normal de la mucosa intestinal de ratas control (no irradiadas ni tratadas, ocho animales). A2 y B2: Mucosa intestinal de ratas irradiadas (6 Gy, día 8, seis animales) que exhibe distorsión de la arquitectura glandular, ligera hemorragia en la lámina propia (B2), inflamación, submucosa con ligero edema. A3 y B3: Mucosa intestinal de ratas irradiadas y tratadas con WR + BU (día 8, ocho animales) que muestran histoarquitectura parcialmente preservada, con una reducción significativa de la inflamación y conservación del epitelio, y ausencia de hemorragias (B3).

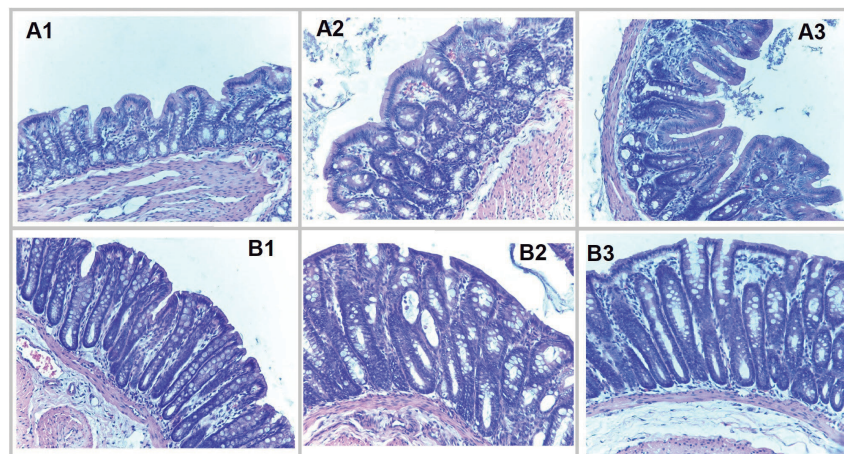


Figura 6. Características histológicas de dos secciones de colon de ratas machos, una próxima al ciego (A) y la otra al recto (B). Hematoxilina-eosina, 200X.

A1 y B1: Aspecto normal de la mucosa intestinal de ratas control (no irradiadas ni tratadas, ocho animales). A2 y B2: Mucosa intestinal de ratas irradiadas (6 Gy, día 8, seis animales) que exhiben distorsión de la arquitectura glandular, inflamación y ligera hemorragia (A2). A3 y B3: Mucosa intestinal de ratas irradiadas y tratadas con WR + BU (día 8, ocho animales) que muestran histoarquitectura globalmente preservada.

alteración en criptas en la mucosa, inflamación, edema, daño vascular y hemorragias. También se vio que las ratas hembras fueron más susceptibles en la porción del colon próximo al recto, cuando se las comparó con los machos.

Los resultados histológicos en ambos sexos mostraron que el tratamiento con amifostina y butirato de sodio logró una recuperación en cuanto a la arquitectura histológica y no mostró alteraciones significativas respecto de los controles.

Discusión y Conclusiones

El desarrollo de tratamientos capaces de proteger contra los efectos dañinos de las radiaciones ionizantes ha sido motivo de grandes esfuerzos a nivel internacional durante muchos años. Sin embargo, el hallazgo de radioprotectores con propiedades ideales para emplearse en el caso de exposiciones accidentales todavía es un objetivo no cumplido (1-3). Luego de haber ensayado miles de compuestos, solo un producto, la amifostina (WR-2721), logró la aprobación de la FDA para su uso en humanos. Las limitaciones para su administración derivan de su toxicidad. Dado que la dosis efectiva de amifostina difiere poco de su dosis tóxica, frecuentemente los pacientes presentan efectos adversos que incluyen hipocalcemia, diarrea, náuseas y vómitos (20). Este aspecto fue analizado con más detalle en una publicación reciente (4). En ese estudio se pudo verificar que su uso en dosis más bajas y junto con el piruvato de etilo disminuyó la toxicidad y mantuvo su eficacia (4). El piruvato de etilo es un compuesto con muy baja toxicidad que mostró capacidad para impedir de modo significativo el daño sobre el ADN que evidencia el ensayo Cometa, así como el daño por estrés oxidativo (4).

No obstante, se concluyó que no era posible prevenir todos los efectos tóxicos de las radiaciones con esta combinación de compuestos, lo cual se hizo evidente con los estudios de supervivencia en los animales expuestos y tratados. Esto sugiere que sería conveniente desarrollar "cócteles" integrados por sustancias compatibles entre sí y que aporten propiedades protectoras atendiendo a distintos aspectos del proceso que conduce al daño.

En el colon, los ácidos grasos de cadena corta son productos de la degradación bacteriana del almidón no absorbido y el polisacárido (fibra) que no contiene almidón. Son moléculas importantes en la luz colónica, que afectan tanto a la morfología como a la función de los colonocitos. Los tres ácidos principales (acetato, propionato y butirato) estimulan la absorción de líquidos y sodio en el colon y ejercen efectos proliferativos sobre el colonocito (8)(10).

Los estudios experimentales en animales han demostrado que promueven respuestas adaptativas a la resección del intestino delgado y la anastomosis colónica. En particular, se ha demostrado que el butirato es el sustrato de energía preferido para el colonocito y que es un potente

agente de diferenciación en el cultivo celular. El anión butirato también puede tener un papel en la prevención de ciertos tipos de colitis. Una dieta baja en almidón y fibra resistente resultará en una baja producción de estos ácidos de cadena corta en el colon, lo cual puede explicar la alta incidencia de trastornos colónicos en los países de occidente (8).

El síndrome agudo por radiación involucra, entre otros blancos, la médula ósea y los epitelios gastrointestinales. La combinación de una falla en el sistema inmune con una alteración de la absorción de nutrientes y la permeabilidad a las bacterias lleva a un cuadro agudo que es causa de una mortalidad elevada. En tal sentido, se consideró que el anión butirato podría constituir un agente mitigante efectivo para reducir el impacto tóxico.

Para estudiar el efecto del tratamiento sobre los daños tempranos de las radiaciones ionizantes, se realizaron determinaciones de alteraciones en el ADN de leucocitos a una hora de la irradiación de los animales empleando el ensayo Cometa (4). Este ensayo permite establecer si ha ocurrido un proceso de hidroxilación en las bases del ADN. El mecanismo de la acción radioprotectora de la amifostina se relaciona básicamente con su capacidad para atrapar radicales libres y para destruir algunos productos muy reactivos que se forman desde moléculas biológicas alteradas. Esta capacidad depende de su conversión previa por defosforilación enzimática a su metabolito activo, el WR-1065. El proceso está mediado por una fosfatasa alcalina presente en las células de distintos órganos y en suero de distintas especies y el humano. Esta activación es muy rápida pero debe suceder previamente a la irradiación, de modo de disponer del compuesto sulfhidrúlico en concentración suficiente cuando se generan los radicales libres de tan corta vida. Por su parte, el anión butirato no tiene una reactividad importante hacia radicales libres, por lo que el tratamiento ensayado no lo consideró como radioprotector sino como mitigante.

Los resultados obtenidos mostraron un efecto protector significativo de la amifostina en la dosis empleada sobre el daño en el ADN en ambos sexos (Tabla I). No obstante, su acción fue menos importante que la mostrada en estudios previos para dosis de radiación y tiempos de exposición menores (4). Estas diferencias pueden interpretarse en función del tiempo de irradiación, relacionado con la rápida farmacocinética de esta sustancia, que en la condición presente debería estar en concentraciones efectivas menores frente a un daño tan rápido como el que provoca la radiación ionizante sobre el ADN de los leucocitos (18).

Los resultados de las Tablas II y III muestran los efectos dañinos que tienen las radiaciones ionizantes durante la exposición de cuerpo entero sobre los eritrocitos y los leucocitos. No solamente los valores totales de ambos resultaron alterados significativamente, sino que también se observaron alteraciones muy importantes en la fórmula leucocitaria relativa (Tablas IV) (Tabla

V). Pudieron verificarse disminuciones drásticas en la proporción de linfocitos acompañadas de un aumento significativo de los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos. Estos resultados son comparables con los reportados para una exposición humana a dosis entre 1 y 8 Gy, y vinculados con el síndrome hematopoyético (21). El tratamiento con amifostina combinada con butirato de sodio resultó efectivo para la recuperación del número de eritrocitos, con valores comparables a los de los controles a partir del mes en las hembras y más adelante en el caso de los machos (Tabla II).

El tratamiento con amifostina y butirato de sodio no fue capaz de impedir la disminución violenta que las radiaciones produjeron sobre el número total de leucocitos en los primeros días (Tabla III). Sin embargo, permitió la supervivencia y la lenta recuperación de los niveles leucocitarios hasta alcanzar los valores del control a los 21 días en machos y 28 días en hembras. Respecto a la fórmula leucocitaria relativa, en ambos sexos pudo observarse una recuperación completa en los sobrevivientes al día sesenta (Tabla IV)(TablaV).

Se estudió también el impacto de la radiación X y del tratamiento con potencial radioprotector sobre la supervivencia y la variación porcentual del peso en ambos sexos. Como era esperable, la acción radioprotectora de la amifostina depende marcadamente de la dosis que se emplee (4). Fue así como con la dosis de 100 mg/kg la mortalidad resultó muy elevada, ya que sobrevivió sólo un 10% de los animales de ambos sexos a los 60 días post irradiación, en modo similar al efecto causado por la radiación sola (Fig. 1)(Fig. 2).

Sin embargo, el tratamiento combinado de amifostina a esa dosis con butirato de sodio logró mejorar significativamente la supervivencia en ambos sexos. Tanto en el caso de las hembras como de los machos, las muertes ocurrieron antes de los once días, tiempo similar al de la radiación sola.

También se consideró importante estudiar el comportamiento del tratamiento sobre la variación de peso de los animales de ambos sexos por posibles interacciones adversas o favorables, teniendo en cuenta que las mismas radiaciones ionizantes afectan severamente el peso corporal. La irradiación con 6 Gy afectó drásticamente el peso tanto de hembras como de machos y como provocó una mortalidad alta en pocos días ya no fue posible seguir una curva de crecimiento (Fig. 3)(Fig. 4). Esta misma situación se observó para el grupo irradiado y tratado con amifostina solamente. En las hembras, el tratamiento con amifostina y butirato de sodio logró compensar la pérdida de peso a partir de los 20 días posteriores a la irradiación mientras que los machos pudieron recuperarse antes (a partir del día 9). Es probable que estas variaciones en el peso se deban a varios factores: la malabsorción provocada por el daño en el epitelio intestinal, el decaimiento general de la salud de los animales, la pérdida de fluidos por diarrea y el efec-

to protector del tratamiento. En particular, fue notoria la ausencia de diarrea en los animales tratados, lo que puede relacionarse con el efecto protector del butirato, sumado al hecho que esta sustancia aporta calorías útiles en una forma rápidamente absorbible. De todos modos, el tratamiento combinado de ambas drogas nunca consiguió incrementar el peso hasta los niveles del control. Por último, debe notarse que tanto en hembras como machos ninguno de los tratamientos ensayados *per se* produjo un cambio significativo en la evolución del peso en el período de dos meses.

La radiación ionizante produce alteraciones muy severas en el epitelio del intestino delgado y este efecto pudo verificarse en el modelo experimental estudiado. Un modo cuantitativo para evaluarlo es a través del número de criptas por circunferencia intestinal (Tabla VI). Los resultados muestran que el tratamiento combinado de amifostina con butirato de sodio logró recuperar el número de criptas de modo significativo en ambos sexos, aunque sin alcanzar los valores del control. Por otra parte, las alteraciones histológicas observadas y descritas también por otros autores, como la menor altura de las vellosidades, el edema o el daño vascular, también fueron reducidas por el tratamiento, como pudo observarse en los especímenes tomados de los animales sobrevivientes a sesenta días (22).

Más allá de la eficacia de cada uno de estos compuestos para prevenir o mitigar los efectos dañinos agudos de las radiaciones ionizantes parece claro que difícilmente una sola sustancia pueda lograrlo y sea más conveniente entonces el empleo de fórmulas cuyos componentes aporten propiedades que sean cooperativas o complementarias (22-24). Esto no solamente permite abordar el problema desde distintos aspectos de la patología sino que en la práctica puede significar una disminución en la dosis de cada uno, si es que poseen alguna toxicidad (4). Estos estudios iniciales de radioprotección intentan desarrollar tratamientos que disminuyan o impidan los daños observados, a pesar de que en la experiencia en seres humanos para dosis entre 1 y 6 Gy el pronóstico de recuperación es bueno (21).

Todo el personal que intervenga en la contención de un incidente radiológico debería contar con una alternativa terapéutica precoz para la eventual exposición a dosis relevantes de radiaciones ionizantes. En tal sentido, es obvio que la baja toxicidad del tratamiento es crucial para no provocar un problema adicional al que se quiere resolver (25).

En resumen, en el presente trabajo se consideró relevante extender y profundizar estudios previos vinculados con el uso conjunto de amifostina con coadyuvantes en situaciones de exposición aguda a radiaciones ionizantes (4). La hipótesis de trabajo fue identificar y caracterizar moléculas naturales (o derivadas de ellas) con muy baja toxicidad, que permitieran disminuir sustancialmente la dosis de la amifostina como radioprotector (o reempla-

zarla por completo) y proseguir con una terapéutica mitigante. El potencial de transferencia de estos tratamientos es elevado debido a su baja toxicidad, lo que facilitaría su aprobación para el uso en humanos (4) (26).

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto PIDDEF 03/2016 (MINDEF) el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

Correspondencia

Dr. GERARDO D. CASTRO
CITEDEF

Juan B. de La Salle 4397. B1603ALO VILLA MARTELLI, Argentina.
Correo electrónico: gcastro@citedef.gob.ar

Referencias bibliográficas

- Patel VN, Gupta S, Shareef MM, Ahmed MM. Contemporary radiation countermeasure. *Def Sci J* 2011; 61: 138-45.
- Moulder JE. Radiobiology of nuclear terrorism: report on an interagency workshop (Bethesda, Md, December 17-18, 2001). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 327-8.
- Coleman CN, Blakely WF, Fike JR, MacVittie TJ, Metting NF, Mitchell JB, *et al.* Molecular and cellular biology of moderate-dose (1-10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Radiat Res* 2003; 159: 812-34.
- Maciel ME, Quintans LN, Díaz Gómez MI, Costantini MH, Formosa Lemoine F, Montalto de Mecca M, *et al.* Efecto radioprotector del piruvato de etilo, solo o como coadyuvante de la amifostina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2016; 50: 733-44.
- Wang Y, Hu PC, Ma YB, Fan R, Gao FF, Zhang JW, *et al.* Sodium butyrate-induced apoptosis and ultrastructural changes in MCF-7 breast cancer cells. *Ultrastruct Pathol* 2016; 40: 200-4.
- Böcker U, Nebe T, Herweck F, Holt L, Panja A, Jobin C, *et al.* Butyrate modulates intestinal epithelial cell-mediated neutrophil migration. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 53-60.
- Wu X, Wu Y, He L, Wu L, Wang X, Liu Z. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *J Cancer* 2018; 9: 2510-7.
- Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994; 35(1 Suppl): S35-S38.
- Peng L, Li Z-R, Green RS, Holzman IR, Lin J. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2009; 139: 1619-25.
- Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, *et al.* Impact of diet-modulated butyrate production on intestinal barrier function and inflammation. *Nutrients* 2018; 10: 1499.
- Mete LS, Assisi D, Casale V. Efficacy of butyrate on rectal toxicity of radiotherapy in prostate cancer patients. *Digestive and Liver Disease Supplements* 1 (translation). 2007; 23-6.
- Maggio A, Magli A, Rancati T, Fiorino C, Valvo F, Fellin G, *et al.* Daily sodium butyrate enema for the prevention of radiation proctitis in prostate cancer patients undergoing radical radiation therapy: results of a multicenter randomized placebo-controlled dose-finding phase 2 study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014; 89: 518-24.
- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, eighth edition. Washington DC: The National Academies Press; 2011.
- 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: 206-21.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiat Res* 1990; 122: 86-94.
- Gad SC. Statistics for toxicologists. En: Hayes AW, editor. *Principles and Methods in Toxicology*. Philadelphia: Taylor and Francis; 2001. p. 285-364.
- Müller AC, Pigorsch S, Beyer C, Lautenschläger C, Dunst J. Radioprotective effects of amifostine *in vitro* and *in vivo* measured with the comet assay. *Strahlenther Onkol* 2004; 180: 517-25.
- Wang Y, Xu C, Du LQ, Cao J, Liu JX, Su X, *et al.* Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 22449-61.
- Car BD, Eng VM, Everds NE, Bounous DI. Clinical pathology of the rat. En: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editores. *The Laboratory Rat*. Second edition. Amsterdam: Elsevier-Academic Press; 2006. p. 128-32.
- Zhang H, Hao Yan H, Xiaoliang Zhou X, Wang H, Yang Y, Zhang J, *et al.* The protective effects of resveratrol against radiation-induced intestinal injury. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17: 410.
- International Atomic Energy Agency. Effects of ionizing radiation on blood and blood components: A survey. Vienna: IAEA; 1997. IAEA-TECDOC-934, p. 7-22.
- Crescenti E, Croci M, Medina V, Sambuco L, Bergoc R, Rivera E. Radioprotective potential of a novel therapeutic formulation of oligoelements Se, Zn, Mn plus Lachesis muta venom. *J Radiat Res* 2009; 50: 537-44.
- Berger ME, Christensen DM, Lowry PC, Jones OW, Wiley AL. Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med (Lond)* 2006; 56: 162-72.
- Shadad AK, Sullivan FJ, Martin JD, Egan LJ. Gastrointestinal radiation injury: prevention and treatment. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 199-208.
- Weiss JF, Landauer MR. History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol* 2009; 85: 539-73.
- Winczura P, Jassem J. Combined treatment with cytoprotective agents and radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 268-75.

Recibido: 25 de febrero de 2019

Aceptado: 21 de mayo de 2019