

**ESTUDIO DE LA FACTIBILIDAD DEL CERDO COMO MODELO INDICADOR DE AGENTES GENOTÓXICOS MEDIANTE EL CONTEO DE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS**

**FEASIBILITY STUDY OF THE PIG AS AN INDICATOR MODEL OF GENOTOXIC AGENTS BY MICRONUCLEATED ERYTHROCYTES COUNT**

**<sup>2</sup>Cedano Díaz Antonio<sup>1</sup>, Martínez González Sergio<sup>2</sup>, Torres Bugarín Olivia<sup>3</sup>, Zúñiga González Guillermo<sup>4</sup>, Trujillo Hernández Benjamín<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Unidad Académica Preparatoria No. 4, Universidad Autónoma de Nayarit. <sup>2</sup>Unidad Académica de Med Vet y Zoot. Universidad Autónoma de Nayarit. <sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara. <sup>4</sup>Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS, Guadalajara, Jalisco. <sup>5</sup>Centro Universitario de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Colima.

**RESUMEN**

El enorme aumento de la población mundial, el desarrollo industrial y la fuerte urbanización han tenido un gran efecto toxicológico ambiental. Por lo que es importante detectar sobre todo, los compuestos que producen daño a nivel cromosómico. El objetivo fue evaluar al cerdo como un bioindicador de agentes micronucleogénicos, mediante la prueba de micronúcleos. Se usaron 40 lechones los cuales se dividieron en 4 lotes: lote control, lote 5 mg, lote 10 mg, y lote 20 mg de ciclofosfamida, usando a este compuesto como agente inductor micronucleogénico. Los resultados fueron analizados por las pruebas estadísticas de Friedman y de Wilcoxon ( $P < 0.05$ ). Los eritrocitos policromáticos micronucleados muestran diferencia estadística significativa en los lotes 5 mg y 10 mg. En tratamiento 20 mg no hay diferencia significativa. En el análisis de eritrocitos micronucleados no se encontró diferencia significativa. De acuerdo a los resultados se concluye que en el lechón se incrementan los eritrocitos policromáticos micronucleados significativamente con dosis de 5 y 10 mg/kg de ciclofosfamida. A dosis de 10 y 20 mg/kg de ciclofosfamida el lechón presenta efectos de citotoxicidad en su sistema mielóide.

**Palabras claves:** contaminación, biomonitor, animal, detección, mutación.

---

<sup>2</sup> Antonio Cedano Díaz. Unidad Académica Preparatoria No. 4, Universidad Autónoma de Nayarit. Domicilio Conocido. Tecuala, Nayarit. C.P. 63440. cedandiaz@hotmail.com

Recibido: 21/06/2011 Aceptado: 25/09/2011

## ABSTRACT

The massive increases in world population, industrial development and urbanization have led strong environmental toxicological effects. Therefore it is important to identify particularly the compounds that cause damage chromosomal level. The objective was to evaluate the pig as bioindicators micronucleogénicos agents by the micronucleus test. 40 piglets were used which were divided into 4 lots: control lot 5 mg, 10 mg lot, and 20 mg of cyclophosphamide lot. , using this compound as a micronucleogénico inducing agent. Results were analyzed by the statistical tests of Friedman and Wilcoxon ( $P < 0.05$ ). Micronucleated polychromatic erythrocytes showed a significant statistical difference in lots 5 mg and 10 mg. In treatment 20 mg there is no significant difference. In the analysis of micronucleated erythrocytes, no significant difference was found. According to the results, we conclude that in piglets micronucleated polychromatic erythrocytes increased significantly at doses of 5 and 10 mg / kg of cyclophosphamide. At doses of 10 and 20 mg / kg of cyclophosphamide, piglets have cytotoxic effects in their myeloid system.

**Keywords:** pollution, bioindicator, animal, detection, mutation.

## INTRODUCCIÓN

El enorme aumento de la población mundial, el desarrollo industrial y la fuerte urbanización han tenido un gran efecto toxicológico ambiental. Esta contaminación ha aumentado exageradamente en los últimos años, por lo que se vuelve importante tener nuevas alternativas para su detección en forma particular, de aquellos que producen daño a nivel cromosómico (Salamanca, 1990).

En toxicología genética se acepta el hecho de que una sola prueba no puede detectar con exactitud o predecir con confiabilidad los efectos genotóxicos de una sustancia en el humano y animales. Por esto se pretende buscar nuevos métodos y modelos ideales de evaluación, así como otros organismos que sirvan como indicadores biológicos de sustancias con efectos genotóxicos, mediante la prueba de formación de micronúcleos, (Deveisbach y Robertson, 1989).

Por lo que se propone estudiar al cerdo como un indicador biológico de agentes micronucleogénicos. Ya que el cerdo presenta un alto número de eritrocitos micronucleados en la sangre periférica, siendo esto una característica ideal para los bioindicadores de sustancias genotóxicas micronucleogénicas, además es de amplia distribución geográfica y doméstico; estos organismos deben responder a la formación de micronúcleos en número suficiente que puedan diferenciarse de organismos tratados y controles para posteriormente determinar si pueden ser usados como bioindicadores, (Yamamoto y Kikuchi, 1980; Zúñiga y Col., 1996).

## MATERIAL Y MÉTODO

En este estudio se utilizaron 40 cerdos de la cruce de razas landrace/yorkshire de 35 días de edad como indicadores biológicos, los cuales fueron asignados aleatoriamente a 4 lotes (lote control, lote 5 mg, lote 10 mg y lote 20 mg de ciclofosfamida).

La ciclofosfamida se aplicó vía oral como única dosis, como agente inductor micronucleogénico. Las muestras fueron tomadas en diferentes tiempos: tiempo basal, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. La extracción sanguínea se realizó de la vena cava anterior con la técnica descrita por Carle y Dewhirst. Los frotis fueron teñidos con anaranjado de acridina y observados con un microscopio de fluorescencia (Zúñiga y Col.,1996; Coffin, 1966).

Se contaron 10,000 ET (eritrocitos totales los cuales son eritrocitos normocromáticos (ENC) y eritrocitos policromáticos (EPC) para determinar los EMN (eritrocitos micronucleados totales), 1000 ET para el conteo de EPC, así como 1000 EPC para cuantificar los EPCMN (eritrocitos policromáticos micronucleados). Los resultados fueron analizados por las pruebas estadísticas de Friedman y de Wilcoxon ( $p>0.05$ ) con el paquete estadístico SPSS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor basal promedio y su desviación estándar de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN), eritrocitos micronucleados (EMN) y eritrocitos policromáticos (EPC) fueron de:  $3.55 \pm 3.06$ ,  $17.8 \pm 8.38$  y  $9.5 \pm 7.58$  respectivamente.

El análisis estadístico de los resultados muestra que: Los EPCMN de los animales del lote control (0 mg) no indican diferencia significativa. Los EPCMN muestran diferencia estadística significativa, en los lotes de 5 mg y 10 mg, siendo en el tratamiento de 5 mg en los tiempos 24 h y 48 h, en el tratamiento 10 mg solo en el tiempo 48 h y finalmente en el tratamiento 20 mg no hay diferencia significativa.

No se encontró diferencia significativa en los diferentes tratamientos y tiempos cuando se analizaron los EMN.

Por otra parte, los EPC mostraron diferencias significativas en los tratamientos de 5, 10 y 20 mg. Si bien en este caso particular el número de estos fue menor al paso de las horas. En el tratamiento 5 mg en el tiempo 48 h, en el tratamiento 10 mg en los tiempos 24 h, 48 h y 72 h y en el tratamiento 20 mg en los tiempos 48 h y 72 h.

Es de conocimiento general que el inductor usado (ciclofosfamida) deprime el sistema hematopoyético en diferentes especies incluyendo al humano; en los cerdos esta

mielodepresión resultó muy notoria ya que en el presente trabajo el número de los EPC tienden a disminuir en forma significativa desde la segunda dosis aquí probada.

Esto fue observado en el estudio de este parámetro ya que los EPC son los eritrocitos jóvenes y si la médula ósea produce células de manera normal la proporción de EPC/ENC se mantendrá constante, pero si la médula es dañada por el agente probado esta proporción varía y en el particular caso aquí presentado disminuyen drásticamente.

Esto lo podemos interpretar de dos maneras: una posibilidad es el tener un daño por una droga especie específica y la otra es la que encontramos con una especie de una alta sensibilidad para sustancias genotóxicas (Ramírez y Col., 1999). Otro dato que corrobora el efecto supresor de esta droga fue el observado en tres casos en los que se presentó dermatitis supurativa severa a las dosis de 10 y 20 mg/kg de ciclofosfamida; este dato nos indica una probable disminución de la respuesta inmunológica como resultado del daño a la médula ósea, mientras que con la dosis baja este efecto no se presenta, manteniéndose la proporción de EPC/ENC a las 24 y 72 h, además se observa incremento significativo de EPCMN.

Por otro lado, los valores de EMN permanecen constantes o con poca variación aun y cuando se tiene el efecto micronucleogénico del inductor; lo cual quedó manifiesto en el incremento de los EPCMN, esto es debido a que el porcentaje de EPC es muy bajo con respecto al de los ET y por tanto, este efecto queda diluido, además probablemente en el caso del cerdo, para esperar incremento de EMN por acumulación es necesario una exposición prolongada a los genotóxicos (Zúñiga y Col., 1996).

Tradicionalmente se exponen a los individuos por única vez al posible genotóxico y se toman muestras 24 o 48 h después, ya que los EPC aparecen en la circulación en este tiempo, esto indica la certeza de que los EPCMN son originados por la exposición al agente probado.

Los EPC maduran posteriormente a ENC y por esta razón, cuando la exposición es continua, es notable el incremento de EMN por su acumulación (Ramírez y Col., 1999). Durante las tres y seis semanas de vida los cerdos crecen rápidamente, requiriéndose un mayor volumen sanguíneo por lo que existe una intensa eritrogénesis (Taylor, 1992), esto es ideal para la realización de la prueba de micronúcleos según estudios con ratones a los que en tratamiento previo se administra eritropoyetina o en su caso cobalto y enseguida el inductor micronucleogénico, lo que revela un aumento en la sensibilidad del bioindicador debido a estas sustancias (Suzuki y Nagae, 1989; Suzuki y Shimizu, 1993), sin embargo, en el particular caso del cerdo esto no resultó así ya que

este fenómeno natural en esta especie ocasiona falta de estabilidad mieloide y con esto una irreproducibilidad de nuestros resultados.

En experimentos para observar incremento de células sanguíneas micronucleadas, inducir aberraciones cromosómicas y como control positivo se aplica a ratas y ratones dosis de 5, 10 y 20 mg/kg incluso dosis de 50 y 100 mg/kg (Hayashi y Col., 1992; Moore, 1995). Se ha descrito ampliamente en la literatura el efecto de la ciclofosfamida en especies como la rata y el ratón dejando muy claro la dosis que se requiere para poder utilizar este compuesto como control positivo en pruebas de este tipo.

El resultado del presente estudio mostró que aun a dosis bajas de las recomendadas para los roedores (para control positivo), el cerdo presenta efectos de toxicidad sobre su sistema hematopoyético con lo que cabe la pregunta: ¿El cerdo es un organismo con más sensibilidad que otros modelos ya presentados?

### **CONCLUSIÓN**

De acuerdo a los resultados se concluye que en el lechón se incrementan los eritrocitos policromáticos micronucleados significativamente con dosis de 5 y 10 mg/kg de ciclofosfamida. A dosis de 10 y 20 mg/kg de ciclofosfamida el lechón presenta efectos de citotoxicidad en su sistema mieloide.

### **LITERATURA CITADA**

- SALAMANCA F. 1990. Citogenética Humana. 1ª ed. Ed.Méd.Panamericana. Mexico.D.F.
- DEVEISBACH HR, RobertsonW. 1989. Manual de toxicología clínica. Ed. Manual Moderno México D.F.
- YAMAMOTO K, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. Mutation Res. 1980; 71: 127-13141.).
- ZÚÑIGA G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J.: Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. Mutation Res. 1996; 369: 123-127.
- COFFIN LD. 1996. Laboratorio clínico en medicina veterinaria. Ed. La Prensa Medica Mexicana. México D.F.
- RAMÍREZ Muñoz M., Torres Bugarín O., Ramos A., Zúñiga G.: Evidencia de micronucleogenicidad especie-específica del cloramfenicol en roedores de laboratorio. AMMVEPE 1999; 10: 50-52.
- TAYLOR DJ. 1992. Enfermedades del Cerdo. 2da Ed. Ed. Manual Moderno, México D.F.

SUZUKI Y, Nagae Y. Effect of Erythropoietin on the Micronucleus Test. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1989; 13: 314-318.

SUZUKI Y, Shimizu H. Micronucleus Test and Erythropoiesis:Effect of Cobalt on the Induction of Micronuclei by Mutagens. Enviromental and Molecular Mutagenesis. 1993; 22:101-106.

HAYASHI M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-C and cyclophosphamide-treated rats. Mutation Res. (1992) 278: 209-213.

MOORE F. An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosomal aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide. Mutation Research. 1995; 335: 191-199.