

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



"MICRO NUCLEOS EN LA SANGRE PERIFÉRICA DEL
GATO COMÚN (*Felis domesticus*) COMO INDICADOR
BIOLÓGICO DE SUSTANCIAS GENOTOXICAS"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN MÉDICO
VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
JUAN PÉREZ JIMÉNEZ
D I R E C T O R
DR. EN C. GUILLERMO ZÚNIGA GONZÁLEZ
Asesor: M.V.Z. ALBERTO RAMOS MORA
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., DICIEMBRE 1997

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis de la
División de Medicina Molecular del Centro de Investigación
Biomédica Occidente, I.M.S.S.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por su gracia divina.

A MI ALMA MATER

La Universidad de Guadalajara por formarme como profesional.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE MUTAGENESIS

Guillermo, María de la Paz, Olivia, y Ana, por su gran apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

AL MVZ ALBERTO RAMOS MORA

Por su animó y constancia para la realizarme como profesional.

y a todos que de alguna forma contribuyeron en mi formación

DEDICATORIAS

**A mis padres JUAN Y EUGENIA.
Por su apoyo y ejemplo para salir adelante.**

**A mi esposa NYDIA y a mi hijo JUAN URIEL SINOHE.
Por los momentos gratos que paso con ustedes y por que son parte importante de mi.**

Y a mis hermanos ADRIÁN, RAUL, GUILLERMO y LEODEGARIO.

Contenido

	Página
Resumen	X
Introducción	1
Planteamiento del problema	12
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivos	15
Material y Métodos	16
Resultados	18
Discusión	27
Conclusiones	32
Bibliografía	33
Anexo	39

RESUMEN

Los bioensayos ofrecen la ventaja de poder procesar o metabolizar el compuesto a probar a otros que pueden ser incluso más tóxicos, particularmente para el caso de agentes genotóxicos se utiliza la prueba de micronúcleos en la cual se detectan los fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que originaron estas estructuras. En un trabajo previo, en el que se reportaron el número de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de 35 especies de mamíferos, el gato resultó ser una de las especies con los valores más altos y debido a que en los organismos con estas características el sistema reticuloendotelial no tiene un estricto control sobre los eritrocitos micronucleados. En el presente trabajo se probó al gato como un indicador biológico de genotóxicos mediante la administración de la mezcla de colchicina y arabinosa-C a 3 dosis diferentes durante 4 días comparando la acumulación de los eritrocitos micronucleados a las 48 y 96 horas con los valores basales de cada grupo y contra un grupo control.

Los eritrocitos micronucleados incrementaron con respecto a los valores del grupo control cuando fue comparado con los grupos tratados así como cuando se comparó dentro de cada grupo tratado a sus diferentes tiempos, alcanzando la mayor significancia en las muestras tomadas a las 96 hrs. Estos resultados dan la evidencia de que el gato es un indicador biológico de genotóxicos básicamente micronucleogénicos.

INTRODUCCIÓN:

Un primer paso para evitar el incremento de daño ecológico, es impedir la liberación de sustancias tóxicas al ambiente, mismas que pueden ser detectadas con organismos indicadores (26). El monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos, requiere de gran precisión y del conocimiento del contaminante a verificar; además su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado.

Ante esto, los bioensayos ofrecen ventajas, ya que un organismo puede procesar o metabolizar un compuesto cualquiera a su forma tóxica original (26).

El bazo

El bazo esta situado en la cavidad abdominal, generalmente a la izquierda del estómago, pero en los carnívoros se halla completamente en la prolongación intratorácica de dicha cavidad (región del hipocondrio izquierdo). El extremo ventral del bazo de los carnívoros es más ancho que los tercios medio y dorsal. En el bazo distinguimos una cara parietal o diafragmática y otra visceral en la que se halla el hilio. Por éste entran los ramales vasculares al órgano y salen de él. En todos los mamíferos domésticos excepto los rumiantes, el bazo esta incluido de tal forma entre las dos hojas de la cavidad del omento, que ésta parece fijarse en el hilio. El bazo posee una cápsula de tejido conjuntivo, de esta parten trabéculas y septos hacia el interior del órgano, que forman el armazón intersticial a modo de una red tridimensional en virtud de sus múltiples ramificaciones. Esta armazón es de naturaleza conjuntivo-muscular y contiene los vasos. En las mallas de dicha red, se halla el parenquima, llamado pulpa esplénica, a causa de su consistencia pastosa y blanda. (19).

Hay dos pulpas esplénicas, la roja y la blanca, llamadas así por su relación con los vasos sanguíneos determinantes de la función del bazo y por la presencia celular. Ambas son la expresión de las dos funciones del órgano: el depósito de sangre (con la destrucción de eritrocitos) en la pulpa roja y la participación de la pulpa blanca en los procesos inmunológico del organismo (19).

La pulpa esplénica roja está integrada por las ramificaciones de los vasos con el retículo tridimensional, así como por los capilares venosos dilatados en forma de senos, procedentes de las arterias (senos esplénicos). Al disminuir la velocidad de la corriente sanguínea, las condiciones son propicias para formar y destruir eritrocitos y para almacenar sangre. Esto último ocurre especialmente en los senos, que pueden estrecharse ó dilatarse gracias a las fibras que constituyen sus paredes, fibras que están vinculadas al armazón intersticial del bazo (19).

La pulpa blanca rodea las arterias y constituye los corpúsculos esplénicos ó de Malphigio, que son esféricos ó fusiformes. En ellos se encuentran a menudo centros germinales como signos de la diferenciación y formación de linfocitos B maduros y de células plasmáticas (Zona dependiente de los linfocitos B). (19).

La proporción de la pulpa esplénica blanca es muy variable según la especie. En el caballo, perro y gato, no pasa del 3 al 5%, en el cerdo llega a un 11%, en los rumiantes asciende del 20 al 24%, en el conejo y el hombre alcanza el máximo un 33%. Por eso el bazo del caballo y los carnívoros tienen el carácter de un órgano de depósito, el cerdo y los rumiantes presentan una forma de transición y el de el conejo y el hombre se considera más como un órgano defensivo (19).

-Los micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que por causa de agentes clastógenos como radiaciones y medicamentos antineoplásicos como la ciclofosfamida, arabinosa-c, busulfan, metotrexate o aneuploidógenicos como la vincristina, colchicina y vinblastina entre otros, quedan fuera del núcleo (12,34).

En hematología los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly cuya forma es generalmente almendrada (Fig.1), su diámetro varía desde 1/20 a un 1/5 (0.4 a 1.6 micras) del tamaño normal del eritrocito (6,34).

La formación de los MN se basa en el siguiente principio: en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, pues carece del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómero, darán origen a los núcleos de las células hijas regulares. Los elementos rezagados (fragmentos o cromosomas completos) quedarán incluidos en el citoplasma de las células hijas y una considerable proporción es transformada en uno o varios núcleos secundarios que son como regla mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de MN (Fig 2) (13). Eventos similares ocurren si se daña el funcionamiento del aparato mitótico.

Después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (en mamíferos, aproximadamente cinco horas después de completar la última mitosis), por razones no conocidas los MN permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es cuando es posible visualizarlos.

La prueba de MN sirve para detectar el efecto de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo, forman estas estructuras (12,34).

La prueba permite detectar tanto agentes clastogénicos (que rompen cromosomas) como aneuploidogénicos (que afectan el huso mitótico) (10,13), pudiéndose diferenciar unos de otros por el tamaño de los MN (40) o la presencia de cinetocoro (1,24).

-Ventajas y limitaciones.

Dentro de las ventajas de la técnica de MN se incluyen facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular, y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase (13,31,34).

Dentro de sus limitaciones está el hecho de que la prueba no detecta agentes que no producen fracturas o rezagos anafásicos (esto es, aberraciones que no implican la ocurrencia de

fragmentos acéntricos, como translocaciones e inversiones), tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividen, ni cuando se prueban mutágenos órgano-específicos o especie-específicos. Por otra parte, puede dar falsos negativos en el caso de procarcinógenos y promutágenos que requieran activación metabólica en periodos cortos de exposición (13,34). Por esta razón cualquier prueba in vitro debe incluir un sistema de activación metabólica del compuesto original mediante una preparación de microsomas de hígado (23).

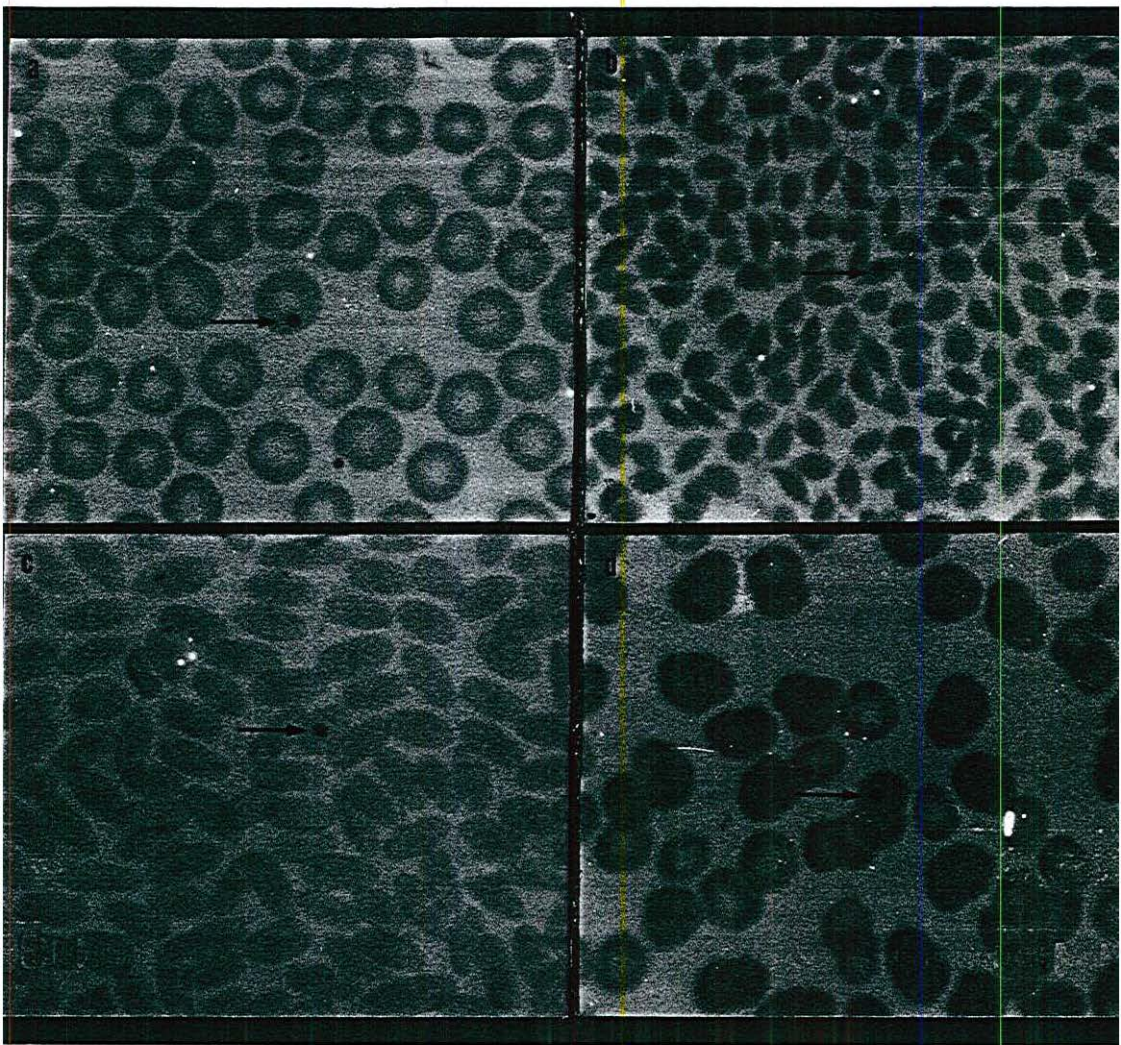


Figura. 1 Micronúcleos en eritrocitos de diferentes especies de mamíferos: a) *Mus musculus*, b) *Tamias americana*, c) *Lama galea glama*, d) *Equus caballus*.

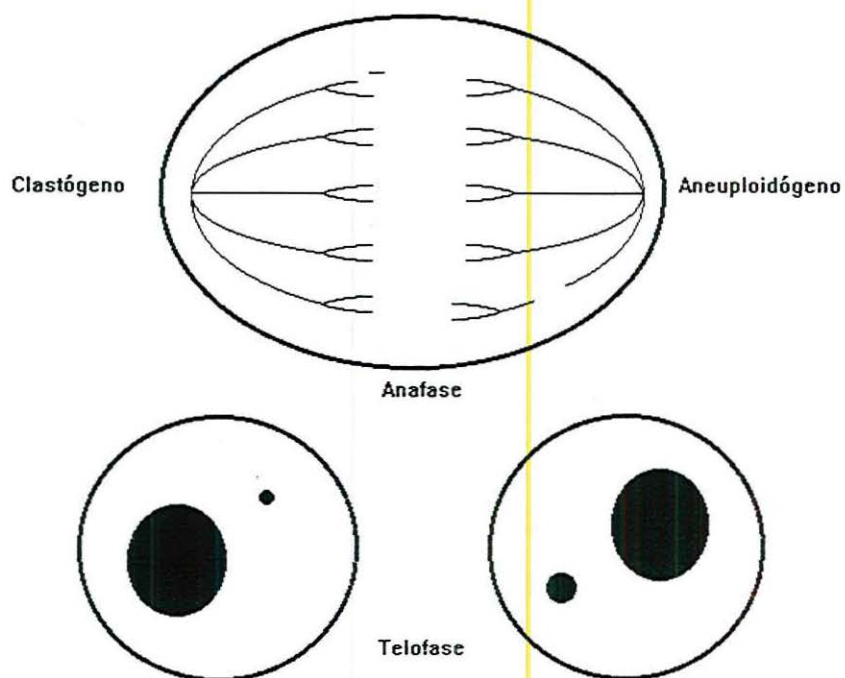


Figura 2 Formación de micronúcleos

Biomonitores

En la prueba de MN se pueden utilizar animales de laboratorio para los diferentes agentes a probar, los más comunes son la rata (37), el ratón (8,11), el hámster(29) y algunos primates, en el que los estudios se han extendido a la médula ósea de los fetos de madres tratadas (8). Recientemente se ha propuesto el estudio de los eritrocitos de sangre periférica de larvas de anfibios como: *Rana temporaria* que han resultado mas sensibles que las de *Xenopus laevis*, (27) de igual manera los renacuajos de *Rana catesbeiana* (20) y del primer anfibio usado como biomonitor *Pleurodeles waltl*, organismos cuyos eritrocitos son muy grandes y por lo tanto facilitan la observación de Micronúcleos (16), Un buen número de peces Teleosteos han sido propuestos como la trucha *Oncorhynchus mykiss*, el pez Japones *Oryzias latipes*, la carpa *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*, o *Umbra pygmaea*, este último de reducida distribución geográfica (20,2), o aves como los pollos, con las que se puede tener también un sistema in vivo (4,17) mediante el estudio de su médula ósea.

Invertebrados también están siendo sumados a los biomonitores como es el caso de la ostra *Crassostrea gigas* en la cual, el estudio se realiza en hemocitos, así mismo las branquias de otros bivalvos son utilizadas (5,38). Por último, las plantas están siendo tomadas en cuenta cada vez más, ya que también pueden manifestar daño por agentes contaminantes de efecto genotóxico, con la formación de MN así es el caso de *Vicia faba*, y *Allium cepa* (22) en la que se utilizan los meristemos de la raíz para la observación de los MN o Tradescantia en la que se utiliza el polen (9,14,28).

En un estudio para determinar la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN) de 35 especies de mamíferos con la intención de seleccionar a aquellas que presenten el mayor número de éstos, para proponerlos como probables biomonitores de daño genotóxico se encontró que dentro de las especies que resultaron con los valores mas altos se encontró al gato con un valor de 8.4 ± 2.5 y 11.0 ± 0.9 EMN por cada 10,000 eritrocitos, obtenidos en 6 gatos Europeo domestico y en 3 gatos siamés respectivamente (41).

Inductores utilizados:

La arabinosa c (Ara-c) es un antimetabolito análogo de la deoxicitidina, es convertida al nucleósido trifosfatado (Ara-CTP) intracelularmente. Ara-CTP es un inhibidor de ADN polimerasa y es incorporado dentro del ADN y del ARN (3,7).

La colchicina es un compuesto que actúa sobre los microtubulos bloqueando la formación del huso mitótico para que lleve a cabo la mitosis (30). Estos inductores utilizados tienen un modo de acción diferente, la arabinosa-c es un clastógeno y la colchicina es aneuploidógeno.

Importancia del gato

El gato ha acompañado al hombre desde que aparece en la historia hacia el año 8000 a. de J.C., el origen exacto no se conoce pero se cree que es una subespecie del gato salvaje probablemente *Felis silvestris libyca* (15,25). Se ha especulado que cuando el hombre primitivo apareció, el gato le evitó que los roedores destruyeran sus granos e invadieran sus posesiones (25). Parece irónico que muchos siglos después, el gato permanezca aún como compañero inseparable del hombre para impedir que otros animales puedan dañarle (25).

Parece probable según se desprende del estudio de los fósiles, que los gatos tal como los conocemos hoy día comenzaron a aparecer hace unos 40 millones de años. Es probable que los primeros gatos que vivieron con el hombre fuesen domesticados por los egipcios, que los reverenciaron y adoraron como dioses. Hace 4,000 años, los egipcios esculpían figuras de madera con la figura del gato, dando esta forma a muebles y joyas. Momias de gatos, así como de ratas y ratones, colocados juntos en tumbas, han sido desenterrados en antiguos cementerios egipcios para gatos. Bajo un punto de vista práctico, los gatos egipcios impedían que ratas y ratones irrumpiesen en gran número en los almacenes de cereales. Los mercaderes fenicios llevaron probablemente gatos egipcios al continente europeo entre los años 600 y 900 a de J. C., donde se cruzaron con especies nativas en estado salvaje. Existen pruebas concluyentes de que la nueva raza floreció y posteriormente vivió en estrecha vecindad con el

hombre, llegando a América del Norte con los primeros colonizadores para ser el fundamento de la población de gatos comunes de este continente (35).

Si bien el gato no es un cazador que va en grupos, el gato conserva su enorme capacidad para ser sociable y admite las ventajas de vivir en el seno de una familia y en el interior de la vivienda del hombre sin renunciar a su comportamiento autodeterminante e independiente (35). Es un animal solitario y ha llegado a ser tan popular como el perro como animal de hogar, se adapta bien a la vida familiar. En condiciones de libertad tanto hembras como machos son territoriales limitado este a los alrededores del lugar en el que tiene su morada (15,25). Los territorios de los machos suelen ser mayores que los de las hembras, estos pueden por tanto incluir territorios de varias hembras por lo que son polígamos, marcando los límites con el rocío de su glándula anal (15).

El gato no es un animal que de problemas y ambos sexos mejoran su condición de domesticidad cuando son castrados. Los gatos están representados por numerosas razas, sin embargo, la selección no ha cambiado el tamaño del animal. Las diferencias se han limitado fundamentalmente a características tales como el color del pelo, la longitud del rabo, el número de dedos, el perfil de su cara. Por lo general los machos tienen pelo de un solo color o bicolor, mientras que las hembras pueden ser tricolores (15).

Para trabajos de experimentación se prefieren los gatos de pelaje corto. Su uso en el laboratorio se conoce desde mediados del siglo XVIII (25). Los gatos han sido importantes en el desarrollo de la investigación en campos como la neurofisiología, cardiología, neurología y neurofarmacología aunque también han sido utilizados en toxicología, oncología y en el estudio de anomalías cromosómicas.(15,25)

Los gatos son excelentes trepadores y pueden incluso nadar pero ellos generalmente evitan el agua. Su longevidad es de 9 a 14 años pero se conocen individuos de 20 años. Una estricta jerarquía se establece rápidamente entre gatos que viven juntos en un corral. Si un gato extraño es introducido en la comunidad, el consumo de alimento de los otros gatos puede decrementar considerablemente por varios días.(15)

Particularmente a los gatos es mejor tenerlos en grupos en jaulas comunitarias que solos, aunque si algún animal enferma es necesario separarlo de la colonia. (15).

Según una encuesta efectuada en 1961 por el Pet Food Institute, sobre el 25% de la totalidad de las familias americanas poseen un gato o más. Este total de unos 22 millones de gatos se ha incrementado rápidamente y no incluye a muchos otros gatos sin control, tales como los que habitan en los edificios de las granjas, almacenes y calles de las ciudades (35).

Finalmente el gato ofrecen un gran estímulo al veterinario para estudiarlo y como paciente para tratarlo, por el amplio margen de tipos corpóreos, tamaños y variaciones en las funciones metabólicas y comportamiento genético, que ofrece la oportunidad de analizar las reacciones endocrinas, ecología tumoral, función biomecánica, fisiología cardiovascular y las diferencias metabólicas que no podrían ser obtenidas de otra forma. (25).

Proponemos la selección de aquellas especies de animales (en forma particular en el presente trabajo al gato) que presenten el mayor número de EMN para utilizarlos como biomonitores naturales utilizando una gota de sangre periférica, que es menos traumático que los estudios tradicionales con médula ósea en pruebas de 24 hrs (34), o como últimamente se realizan y que consiste en el conteo de eritrocitos policromáticos o reticulocitos 24 hrs después de la administración del agente a probar (18,33). Para esto nos basamos en los siguientes puntos:

1) Sabemos que el humano presenta un número basal cercano a 0 de EMN en sangre periférica y que aun recibiendo drogas genotóxicas antineoplásicas con conocida micronucleogenicidad el valor de EMN no se eleva de manera importante debido a la eficiencia del bazo (6,33,42).

2) Algo similar observamos al estudiar al conejo, el cual partiendo de un valor basal bajo, no incremento sus EMN con inductores micronucleogénicos aunque tampoco con la esplenectomía e inductores (41).

3) El ratón presenta un número importante de EMN y ha sido utilizado como un biomonitor de genotóxicos mediante el conteo de eritrocitos policromáticos y reticulocitos en pruebas a corto tiempo y de exposición aguda (18,33).

Esto nos hizo pensar en que el sistema reticuloendotelial (encargado de retirar a los eritrocitos con alteraciones) de los organismos con mayor número de EMN espontáneos tiene en general un menor control sobre estos y como consecuencia los podemos observar, así como sus variaciones como resultado de su acumulación.

Como resultado de esto, en el presente trabajo se pretende probar si realmente el gato puede ser un indicador biológico de agentes genotóxicos básicamente micronucleogénicos mediante el conteo de EMN en su sangre periférica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación por desechos, (compuestos de la industria farmacéutica, de fabricas, minas, y de la actividad agropecuaria) ha aumentado en los últimos años, con lo que se vuelve importante tener nuevas alternativas para su detección, en forma particular, de aquellos que producen daño a nivel cromosómico.

Para el monitoreo de la contaminación por análisis directo de los agentes químicos, se requiere de una gran precisión y un amplio conocimiento de los contaminantes a verificar ademas su evaluación esta limitada por la sensibilidad y espesibilidad del método utilizado ante esto los bioensayos ofrecen ventajas.

Los gatos, los cuales son mamíferos con un alto número de EMN, amplia distribución geográfica y fácil manejo (41), ¿podrían servir como indicadores biológicos de contaminación genotóxica mediante el conteo de MN en eritrocitos de sangre periférica?

JUSTIFICACIÓN

Diversos contaminantes que se encuentran en el ambiente causan daño en los animales que habitan en las grandes ciudades, siendo los mismos daños los que pueden ocurrir en los humanos que habitan el mismo medio

Por esto se pretende buscar otros organismos que sirvan como indicadores biológicos de sustancias con efecto genotóxicos, mediante la prueba de formación de MN, información que podría darse en forma directa y en su hábitat natural, además de que la prueba es rápida, fácil y económica, comparada con las técnicas tradicionales de medula ósea.

Los indicadores biológicos ofrecen ventajas ya que un organismo vivo puede procesar o metabolizar cualquier elemento que se encuentre en el ambiente a su forma tóxica.

Por lo tanto el modelo propuesto es de gran utilidad para Médicos Veterinarios Clínicos muestreando gatos de consulta, además para investigadores en el laboratorio para probar nuevos medicamentos y a investigadores de campo para muestreo de zonas con posible contaminación.

HIPÓTESIS

El gato común (*Felis domesticus*) es un indicador biológico de sustancias con efecto genotóxico mediante el conteo de eritrocitos micronucleados en sangre periférica..

OBJETIVOS

Objetivo General:

- 1.- Evaluar al gato común como un indicador biológico de agentes micronucleogénicos.

Objetivos Particulares:

- 1.- Inducir el incremento de eritrocitos micronucleados en la sangre periférica del gato con agentes de conocida micronucleogenicidad como la colchicina y la arabinosa-c.
- 2.- Demostrar un incremento de eritrocitos micronucleados dosis respuesta en la sangre periférica del gato con los mismos inductores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 gatos de entre 6 y 8 semanas de edad recolectados al azar de la zona urbana de los municipios de Guadalajara y Zapopan, los cuales de manera individual fueron registrados asignándoseles un número progresivo (Cuadro 1 al 5). Se colectó una muestra de sangre periférica por punción de vena cefálica, de cada gato (39) y se elaboraron 3 extendidos de cada muestra uno se tiñó y los dos restantes se dejaron como archivo para ser utilizado solo en caso necesario.

Los frotis se elaboraron en portaobjetos limpios y desengrasados dejándolos secar al aire por 24 horas, posteriormente fueron teñidas con Wright durante 6 minutos enjuagados con agua destilada, secados al aire y sumergidos en una solución de Giemsa (50 ml de Buffer fosfatos pH 6.8 mas 5 ml de la solución stok de Giemsa) durante 10 minutos. Para cada individuo, 4 series de 10,000 eritrocitos (normo y policromáticos) fueron contados con el objetivo de inmersión y promediados y este valor se manejo como el valor promedio del individuo.

Los 50 gatos muestreados se dividieron en 5 grupos de 10 individuos y se le administró una mezcla de dos conocidos agentes genotóxicos micronucleogénicos (colchicina y la arabinosa-c) diariamente (vía intraperitoneal grupos 2,3,4 por vía subcutánea al grupo 5) (36) y por cuatro días.

- Al grupo 1 (Control negativo) se le administró 0.5ml de agua inyectable durante cuatro días.
- Al grupo 2 (Dosis 1) se le administró la mezcla de colchicina a una dosis de 0.1291mg/Kg de peso y Ara-c a una dosis de 3mg/Kg de peso en 0.5ml de agua inyectable.
- Al grupo 3 (Dosis 2) se le administró colchicina a una dosis de 0.1937mg/Kg de peso y Ara-c a una dosis de 4.5mg/Kg de peso en 0.5ml de agua inyectable.
- Al grupo 4 (Dosis 3) se le administró colchicina a una dosis de 0.2583mg/Kg de peso (37) y Ara-c a una dosis de 6mg/Kg de peso en 0.5ml de agua inyectable.
- Al grupo 5 (Dosis 2) se le administró colchicina a una dosis de 0.1937mg/Kg de peso y Ara-c a una dosis de 4.5mg/Kg de peso en 0.5ml de agua inyectable.

Se les tomó por segunda ocasión nuevamente una muestra de sangre al total de los gatos a las 48 y 96 horas de la primera inyección, los valores que se obtuvieron de EMN al contar 4 series de 10000 eritrocitos en cada muestra se promediaron y se compararon entre si y con el grupo control.

Debido a que las muestras tienen una distribución normal, los resultados fueron comparados por **análisis de varianza (ANOVA)**, así como *t-de Student* para grupos independientes y dependientes.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las normas y reglamentos Institucionales y a los de la Ley General de Salud y del bioterio del CIBO, acuerdo de Helsinki, modificación de Tokio y lo propuesto para las Instituciones de Salud de los Estados Unidos de Norte América..

RESULTADOS

Los valores obtenidos de Eritrocitos Micronucleados promedio por cada 10,000, de cada frotis de la muestra de sangre periférica de gato de los diferentes grupos probados se observa en los Cuadros 1 al 5 del anexo.

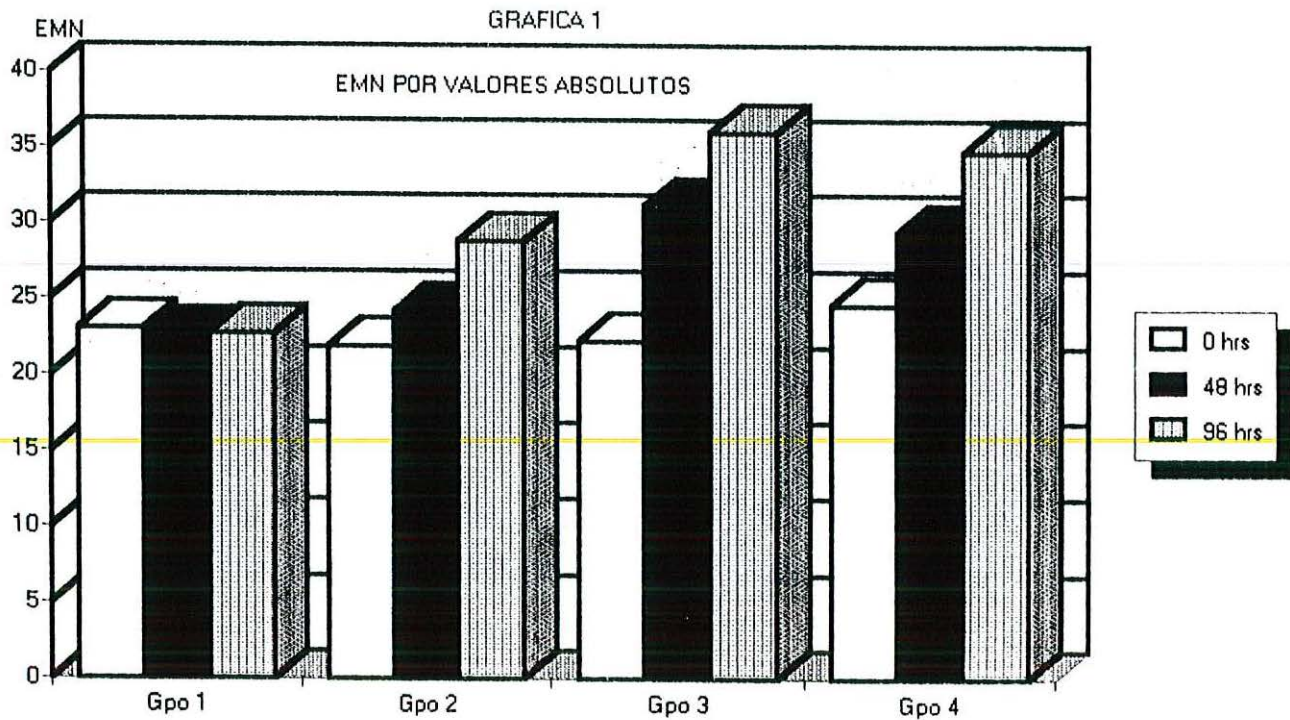
El rango de EMN en la sangre periférica de los 50 gatos estudiados antes de recibir los inductores fue de 7 a 47, la media de 23.27 y la desviación estandar de 9.40.

En el Cuadro I, y la Gráfica 1 se muestra los promedios y desviaciones estandar de los Valores Absolutos de Eritrocitos Micronucleados (VA-EMN), que son los números que se obtuvieron de las lecturas.

CUADRO I
MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE LOS VALORES
ABSOLUTOS DE LOS CINCO GRUPOS A LOS 3 DIFERENTES
TIEMPOS

	0 hrs	48 hr.	96 hrs	n
Grupo 1	23.02 ±11.88	22.55 ±9.91	22.70 ±9.71	10
Grupo 2	21.87 ±5.77	24.17 ±6.37	28.77 ±7.10	10
Grupo 3	22.20 ±10.20	31.10 ±14.63	36.00 ±14.29	10
Grupo 4	24.60 ±7.79	29.35 ±10.60	34.70 ±12.94	10
Grupo 5	24.70 ±11.38	28.50 ±12.23	35.10 ±11.69	10

n = número de gatos



En el Cuadro II y la Gráfica 2 se muestran la media y la desviación estandar encontradas de las Diferencias de Eritrocitos Micronucleados (D-EMN) en los grupos a las 0-48 horas y 0-96 horas.

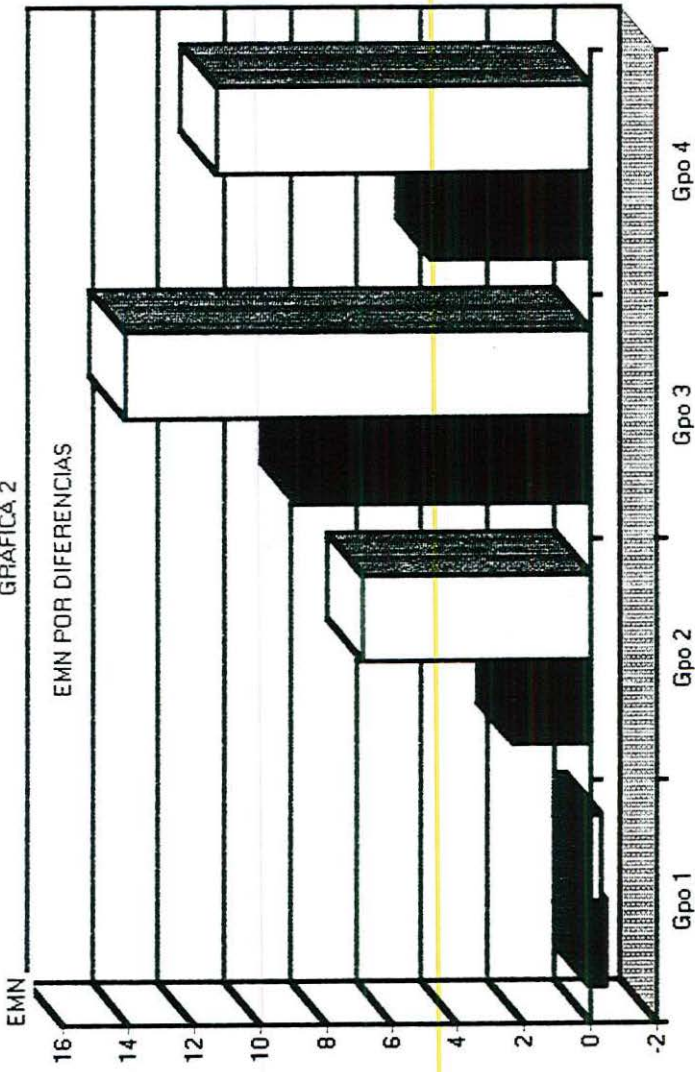
CUADRO II
MEDIA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DE LAS DIFERENCIAS
OBTENIDAS EN LOS CUATRO GRUPOS

	0 48 hrs	0-96 hr.	n
Grupo 1	-0.47 ±2.80	-0.32 ±2.68	10
Grupo 2	2.30 ±3.45	6.90 ±4.49	10
Grupo 3	8.90 ±9.08	14.10 ±8.02	10
Grupo 4	4.75 ±6.03	11.33 ±7.59	10

n = número de gatos

Por vía Intraperitoneal

GRAFICA 2



Analisis de varianza

-El análisis de varianza (Cuadro III) mostró que el número de EMN entre los 5 grupos aquí presentados no fue diferente a las 0 horas.

-A las 48 horas los EMN analizados por VA-EMN no presentó diferencias significativas, sin embargo por D-EMN la significancia fue con $p < 0.01$.

-A las 96 horas nuevamente no mostró diferencias significativas por VA-EMN pero por D-EMN fue significativa con $p < 0.001$.

CUADRO III
ANALISIS DE VARIANZA ENTRE LOS CINCO GRUPOS
ESTUDIADOS

	0 hrs	48 hrs	96 hrs
VA-EMN	NS	NS	NS
D-EMN	NS	$p < 0.01$	$p < 0.001$

VA-EMN-Valor absoluto de eritrocitos micronucleados.

D-EMN-Diferencia obtenida de eritrocitos micronucleados.

NS-No significativo.

$p <$ -Significancia.



***t* de Student para muestras independientes (comparación entre grupos)**

En el Cuadro IV muestran los resultados de esta prueba:

-Grupo 1 vs Grupo 2.

-No se encontró diferencias significativas entre estos grupos ni por VA-EMN ni por D-EMN a las 0 y 48 horas así como tampoco hubo diferencias por VA-EMN a las 96 horas, sin embargo en este tiempo por D-EMN si se encontró diferencias con una significancia de $p < 0.001$.

-Grupo 1 vs Grupo 3.

-No se encontró diferencias a las 48 horas por VA-EMN, pero por D-EMN si, con una $p < 0.05$.

-A las 96 horas fue significativo tanto por VA-EMN ($p < 0.05$) como por D-EMN ($p < 0.001$).

-Grupo 1 vs Grupo 4.

-A las 48 horas no se encontró significancia por VA-EMN, sin embargo por D-EMN se encontró significancia con $p < 0.05$.

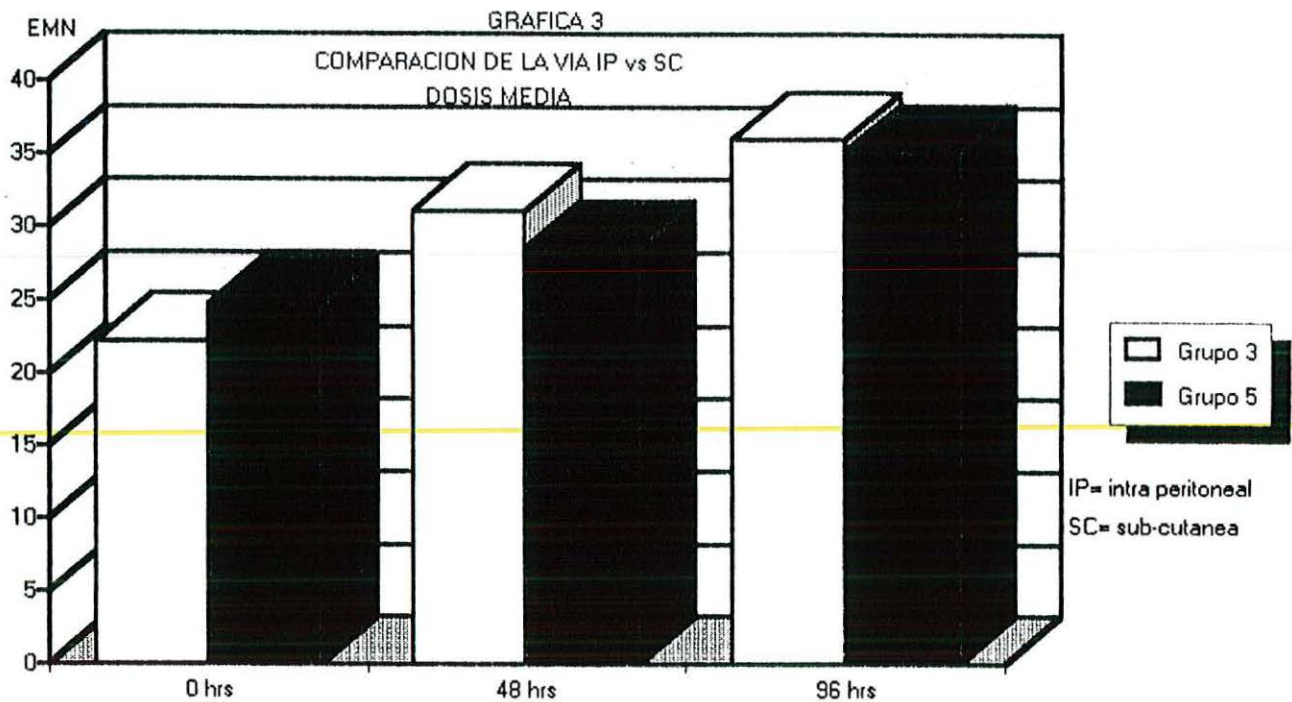
-A las 96 horas las diferencias fueron significativas tanto por VA-EMN ($p < 0.05$) como por D-EMN con $p < 0.01$.

-Grupo 1 vs Grupo 5.

-No se observó diferencias a las 48 horas por VA-EMN, sin embargo se encontró diferencias por D-EMN ($p < 0.01$), así mismo a las 96 horas tanto por VA-EMN ($p < 0.05$), como por D-EMN ($p < 0.001$).

-Grupo 3 vs Grupo 5.

El grupo 3 fue estadísticamente similar con respecto al grupo 5 que recibió los inductores a la misma dosis pero via subcutánea (Gráfica 3).



CUADRO IV
RESULTADOS DE LA *t* de Student PARA MUESTRAS
INDEPENDIENTES

GRUPOS		0hrs	48hrs	96hrs
1 vs 2	VA-EMN	NS	NS	NS
	D-EMN	—	NS	p<0.001
1 vs 3	VA-EMN	NS	NS	p<0.05
	D-EMN	—	p<0.05	p<0.001
1 vs 4	VA-EMN	NS	NS	p<0.05
	D-EMN	—	p<0.05	p<0.01
1 vs 5	VA-EMN	NS	NS	p<0.05
	D-EMN	—	p<0.01	p<0.001
3 vs 5	VA-EMN	NS	NS	NS
	D-EMN	NS	NS	NS

VA-EMN- Valores promedio absolutos obtenido de eritrocitos micronucleados.

D-EMN- Diferencia obtenida de eritrocitos micronucleados.

NS- No significativo.

p<- Significancia.

t de Student para muestras dependientes (comparación dentro de el grupo).

Como se puede observar en el Cuadro V, el grupo control no mostró incremento de EMN al comparar 0-48, 48-96 y 0-96hrs.

Con respecto a el grupo 2, la comparación entre 0-48hrs no fue significativa, sin embargo, en las comparaciones 48-96 hrs y 0-96 hrs las diferencias fueron con $p < 0.02$, $p < 0.001$ respectivamente.

El grupo 3 mostró diferencias significativas en las tres comparaciones con $p < 0.02$, $p < 0.02$ y $p < 0.001$.

El grupo 4 mostró incrementos estadísticamente significativos en las comparaciones 0-48 hrs con $p < 0.05$ y en 0-96 hrs con $p < 0.01$, sin embargo en 48-96 no.

Finalmente el grupo 5 tubo diferencias en las tres comparaciones 0-48 hrs con $p < 0.01$, 48-96 hrs con $p < 0.01$, y 0-96 hrs con $p < 0.001$.

CUADRO V
RESULTADOS DE LA *t-de Student* PARA MUESTRAS
DEPENDIENTES (ANTES-DESPUES)

	0-48 hrs	48-96 hrs	0-96 hrs
Grupo 1	NS	NS	NS
Grupo 2	NS	$p < 0.02$	$p < 0.001$
Grupo 3	$p < 0.02$	$p < 0.02$	$p < 0.001$
Grupo 4	$p < 0.05$	NS	$p < 0.01$
Grupo 5	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.001$

Grupo 1 control.

Grupo 2 colchicina 0.12915 mg/kg mas 3 mg/kg de ara-c. Via IP.

Grupo 3 colchicina 0.1937 mg/kg mas 4.5 mg/kg de ara-c. Via IP.

Grupo 4 colchicina 0.2583 mg/kg mas 6 mg/kg de ara-c. Via IP.

Grupo 5 colchicina 0.1937 mg/kg mas 4.5 mg/kg de ara-c. Via SC.

NS- No significativo.

$p <$ sigificancia.

DISCUSIÓN

Análisis de varianza

El número de EMN en los 5 grupos formados fueron similares al inicio del experimento como lo demostró el análisis de varianza, el tener grupos parejos resulta muy conveniente para cualquier experimento y particularmente en este caso ya que los gatos fueron obtenidos al azar de diferentes partes del área metropolitana y distribuidos en cada grupo aleatoriamente.

El rango de EMN en la sangre periférica de los 50 gatos estudiados antes de recibir los inductores se encontró desde 7 hasta 47, con un promedio de 23.27 ± 9.40 , estos valores podrán ser tomados como los valores normales en el área metropolitana, ya que estos fueron obtenidos antes de administrar los inductores micronucleogénicos, es decir la muestra refleja el estado original de EMN en el gato. El amplio rango encontrado puede deberse a la variabilidad genética de los gatos, las diferentes razas muestreadas, el tipo de alimentación y lugar en el que tienen su hábitat, estos dos últimos puntos se hacen más importantes por los resultados obtenidos en este trabajo, en el que demostramos la influencia del ambiente sobre la formación de EMN.

El análisis de los datos se realizó de dos maneras diferentes; utilizando los promedios de los valores absolutos (Cuadro I, Gráfica 1) de EMN (VA-EMN) tal y como se obtienen de las lecturas (que no resulta ser lo más conveniente por las grandes desviaciones estándar que se producen por la amplia variabilidad observada). Por otra parte procesando las diferencias encontradas de EMN (D-EMN) (Cuadro II, Gráfica 2) entre los grupos a las 0, 48 y 96 hrs contra el grupo control (lo que resulta en una más clara demostración del fenómeno y disminución de la desviación estándar).

Al comparar los grupos por sus D-EMN obtenidas tanto a las 48 como a las 96 hrs se encontró diferencias significativas en el incremento de EMN, siendo mayor la significancia a las 96 hrs, lo que se traduce en que la acumulación de micronúcleos se manifiesta al paso de los días y este modelo puede mostrar por lo tanto el daño producido por exposiciones

prolongadas a genotóxicos. Así mismo el resultado de esta parte nos permite demostrar un efecto dosis respuesta.

t de Student para muestras independientes.

Se observa como resultado de estas pruebas una mejor delimitación de los grupos cuando estas se realizan utilizando las diferencias en EMN que se presentan a los diferentes tiempos, esto es debido a que de esta manera se procesan realmente los incrementos en EMN producidos por los inductores micronucleogénicos aquí utilizados sin tomar en cuenta si los valores absolutos de las muestras son muy altos o muy bajos desde el inicio.

Así mismo es notorio que las mayores significancias se observan a las 96 hrs, lo que nos habla nuevamente de que este tipo de modelo puede funcionar mejor en pruebas en las que los genotóxicos son administrados por varios días en el laboratorio o por exposiciones prolongadas en pruebas de campo.

No se observó que algún sexo en particular tuviera un mayor número de EMN como se ha sugerido en otras especies, ni tampoco se observó que alguno de los dos tuviera una mayor respuesta a los inductores (ver anexo cuadros 1 al 5) con lo que al menos bajo las condiciones descritas en el presente, es indistinto utilizar machos o hembras.

La citotoxicidad aguda de la médula ósea puede ser producida por diversas etiologías (infecciosas y no infecciosas) las no infecciosas pueden incluir la radiación ionizante, la quimioterapia anticancerosa y la toxicidad por estrógenos (39). Se pudo observar un incremento de EMN determinado por la dosis en los grupos 2 y 3 no así en el grupo 4 el cual presentó un valor mas bajo que el encontrado en el grupo 3, la explicación a esto es que se conoce que los compuestos aquí utilizados como inductores son además de genotóxicos citotóxicos a ciertas dosis, particularmente la arabinosa-c se comporta de esta manera (3,42) con lo suponemos que la mezcla de colchicina a dosis de 0.2583 mg/Kg y arabinosa-c a dosis de 6mg/kg resultó citotóxica lo que provocó mitodepresión y con esto, al no haber proliferación celular tampoco producción de EMN y de ahí que en este grupo que recibió la mayor dosis no observáramos el mayor incremento de EMN (3,39,42).

Otro dato que apoya el hecho de que las dosis utilizadas en este grupo se encontraban ya en el rango de la citotoxicidad fue el que a partir de el 5to día los gatos de este grupo empezaron a fallecer.

Aplicamos la mezcla de inductores, colchicina 0.1937 mg/Kg de peso y Ara-c 4.5 mg/Kg de peso al grupo 3 via intraperitoneal y al grupo 5 via subcutánea con la intención de probar una segunda via obteniendo el mayor número de EMN en el grupo 3, si bien, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Esta pequeña diferencia podría explicarse por la diferente forma en que los inductores son absorbidos y el tiempo que requieren para que esto suceda así como el metabolismo local al que estos compuestos son expuestos. De cualquier manera, como las diferencias son pequeñas como se puede observar en la Gráfica 3, muy probablemente en futuros trabajos con este modelo, la via de administración podrá ser una u otra según la habilidad y preferencia del investigador.

t de Student para muestras dependientes.

Se observó nuevamente que los 4 grupos que recibieron los inductores presentaron las mayores diferencias a las 96 hrs (confirmando el resultado de las otras pruebas) y solo no se encuentra significancia en el grupo 4 en la comparación 48-96 hrs debido a que como se mencionó la mezcla de inductores fue citotóxica. Sin embargo en las comparaciones que realmente son importantes (0-48 hrs y 0-96 hrs) si hubo diferencias significativas.

Algunos animales no respondieron a la administración de los inductores lo que nos hace suponer que en el caso de los que recibieron los tratamientos vía intraperitoneal esto pudo deberse a que los inductores pudieron perderse en una "mala inyección", con esto suponemos que la inyección pudo perforar en estos casos la vejiga y ser desechada por la orina, o perfora el intestino y quedar depositada la dosis en la luz del mismo cercanamente a su salida por lo que los inductores no pudieron ejercer el efecto que se esperaba.

Por otro lado, en el caso del gato que no respondió con la administración subcutánea esto se debió a que tuvimos problemas para asegurarnos de que los inductores se administraran correctamente ya que la camada a la que pertenecía este gato presentaba un largo y abundante pelaje lo cual se reporta no es lo mas conveniente (15) pues dificulta la inyección. Sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que existan gatos resistentes a estos compuestos (como sucede en el humano con ciertos medicamentos antineoplasicos) si bien, para la demostración de esta suposición se requerirá de un diseño algo mas complejo. De cualquier manera, es importante subrayar el hecho de que para la realización de los cálculos de las comparaciones en este trabajo, se tomaron en cuenta siempre estos gatos que no respondieron a los inductores y aun así se observaron diferencias significativas, por lo que por el momento este punto es de una importancia menor.

Otros datos que deben ser tomados en cuenta son el hecho de que el estrés puede incrementar fácilmente los parámetros de los eritrocitos en los gatos, lo que a su vez podría incrementar el número de EMN circulantes y de aquí que cuando se realice algún experimento, en su interpretación siempre deba tenerse en cuenta esta posibilidad (39).

En el presente trabajo, es claro que el incremento de EMN no es debido a esto ya que se tubo el cuidado de manejar un grupo control el cual solo recibió la inyección con agua inyectable (vehículo en el que se disolvieron los inductores) y toda la manipulación que los demás gatos experimentales recibieron.

Ya que la vida del eritrocito en el gato es entre 68-77 días (32) se deberá de tener en cuenta este dato en el caso de que se quieran utilizar dos veces o más los mismos gatos en experimentos de prueba de genotóxicos ya que de no ser así se puede estar cuantificando el valor de EMN de un experimento anterior.

El bazo es parte del sistema reticuloendotelial. Las células reticulares del bazo tienen propiedades fagocíticas. El bazo junto con los nódulos linfáticos es el sitio de producción de los linfocitos y destrucción de corpúsculos rojos de la sangre (21), la supresión de eritrocitos anormales se realiza cuando atraviesan lentamente sus sinusoides (aquí se incluyen EMN). La fagocitosis de eritrocitos enteros desempeña un importante papel en el perro el ratón y cobayo pero no en el gato. (32) En el presente trabajo demostramos incrementos en EMN en los diferentes grupos experimentales, esto pudiera deberse a que el bazo en esta especie así como el resto del sistema reticuloendotelial no ejercen un estricto control sobre estos, lo que podemos aprovechar para el desarrollo de la presente propuesta

CONCLUSIONES:

- 1.- En el presente trabajo, el rango de EMN en la sangre periférica del gato antes de recibir los inductores fue de 7 a 47, la media de 23.27 y la desviación estandar de ± 9.40 .
- 2.- La administración de los 2 genotóxicos incremento el número de EMN en el gato con lo que queda validada la respuesta del modelo para el estudio de este tipo de compuestos.
- 3.- Los resultados observados con la administración de los inductores por via subcutanea sugiere que esta via puede ser otra alternativa en este modelo para futuros experimentos.
- 4.- Por lo tanto, en el presente trabajo se presenta al gato (*felis domestico*) como un nuevo modelo que puede ser utilizado como indicador biológico para la determinación de sustancias genotóxicas mediante el conteo de eritrocitos micronucleados en sangre periférica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Afshari, A., McGregor, P., Allen, J., Fuscoe, J. Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; 24: 96-102.
- 2.-Al-Sabti K., Metcalfe C.D.; Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Res.* 1995; 343:121-135.
- 3.-Beaula, K.D., Subramanyam S. Genotoxic evaluation of ara-c by multiple parameters. *Mutation Res.* 1991; 263: 185-196.
- 4.-Bhunya, S.P., Jena, G.B. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (gamma-BCH): an in vivo study in chicks. *Mutation Res.* 1992; 272: 175-181.
- 5.-Burgeot T., His E., Galgani F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. *Mutation Res.* 1995; 342: 125-140.
- 6.-Corazza, G., Ginaldi, L., Zoli, G., Frisoni, M., Lalli, G., Gasbarrini, G., Quaglino, D. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function, a reassessment. *Clin. Lab. Haematol.* 1990; 12: 269-275.
- 7.-Chabner B.A., Wilson W. Pharmacology and toxicit of antineoplastic drugs. In Williams Hematology. Beutler E., Lichtman M., Kipps TJ. USA. Mc Graw-Hill, Inc. 5 ta ed. 1995: 143-155.
- 8.-Choy, W.N., Henika, P.R., Willhite, C.C., Tarantal, A.F. Incorporation of a micronucleus study into a developmental toxicology and pharmacokinetic study of L-selenomethionine in non human primates. *Environ. Mol. Mutagen.* 1993; 21: 73-80.
- 9.-Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M., Salamone, M.F. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Res.* 1992; 270: 53-64.
- 10.-Hart, J.W., Hartley-Asp, B. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutation Res.* 1983; 120: 127-132.

- 11.-Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. The micronuclei assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.* 1990; 245: 245-249.
- 12.-Heddle, J., Lue, C., Saunder, E., Benz, R. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as a measure by the micronucleus method. *Cancer Res.* 1978; 38: 2983-2988.
- 13.-Heddle, J., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., McGregor, J., Newell, G., Salamone, M. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental protection agency gene-tox program. *Mutation Res.* 1983; 123: 61-118.
- 14.-Helma, C., Kronberg, L., Ma T.H., Knasmuller S. Genotoxic effects of the chlorinated hydroxifuranones 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and 3,4-dichloro-5-hydroxy-2(5H)-furanone in *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Res.* 1995; 346: 181-186.
- 15.-Hurni H. and Rossbach W. The laboratory cat. En: UFAW by Poole T. B. The UFAW handbook on The care & management of laboratory animals. ed. 6ta. NY, Longman Scientific & Technical. 1994: 476-492
- 16.-Jaylet, A., Deparis, P., Ferrier, V., Grinfeld, S., Siboulet, R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res.* 1986; 164: 245-257.
- 17.-Jena, G.B., Bhuruya, S.P. Use of chick, *Gallus domesticus*, as an in vivo model for the study of chromosome aberration: A study with mitomycin C and probable location of a "hot spot". *Mutation Res.* 1995; 334: 167-174.
- 18.-Kishi, M., Horiguchi, Y., Watanabe, S. Hayashi, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutation Res.* 1992 278: 205-208.
- 19.-Krahmer, R.L. Anatomía de los animales domesticos, España, ed. ACRIBIA, 1979: 156-157.

- 20.-Krauter, P.W, Anderson, S.L., Harrison, F.L. Radiation-Induced micronuclei in peripheral erythrocytes of *Rana catesbeiana*: An aquatic animal model for in vivo genotoxicity studies. *Environ Mol Mutagen* 1987; 10: 285-296.
- 21.-Loeffler K. *Anatomy and Physiology of domestic animals*. 4a ed., N.Y.Harper & Row., 1979
- 22.-Ma, T.H., Xu, Z., Xu, Ch., McConell, H., Valtierra, E., Arreola, G., Zhang, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Res.* 1995; 334:185-195.
- 23.-Miguel, A.G., Daisey, J.M., Sousa, J.A. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ. Mol. Mutagen.* 1990; 15: 36-43.
- 24.-Odagiri, Y., Zhang, J., Uchida, H., Kawamura, K., Adachi, S., Takemoto, K. Predominant induction of kinetochore-containing micronuclei by extracts of diesel exhaust particulates in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; 23: 45-50.
- 25.-Riser W.H. Carnívoros: Introducción. En *Anatomía de los animales domésticos* Robert Getty. Sisson S., Grossman J.D. Ed. Salvat., 5ta ed. Barcelona, 1982: Tomo II. 1569-1570
- 26.-Rodríguez-Ariza, A., Nieves, A., Navas, J.I., Dorado, G., López-Barea, J., Pueyo, C. Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ. Mol. Mutagen.* 1992; 19: 112-124.
- 27.-Rudek Z, Rozek M. Induction of micronuclei in tadpoles of *Rana temporaria* y *Xenopus laevis* by the pyrethroid Fastac 10 EC. *Mutation Res.* 1992 ; 298: 25-29.
- 28.-Ruiz, E.F., Rabago, V. M.E., Lecona, S.U., Perez, A.B. Ma T.H. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mutation Res.* 1992; 270: 45-51.
- 29.-Salamanca, F. *Citogenética Humana*. 1ª ed. Ed. Méd. Panamericana. 1990.

- 30.-Sandoval, I.V., Cuatrecasas, P. Microtubulos y función celular. Invest. Ciencia. 1978; No 17, 6-14.
- 31.-Sarto, F., Finotto, S., Giacomelli, L., Mazzotti, D., Tomanin, R. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 1987; 2, 11-17.
- 32.-Schalm O. W., *Hematología Veterinaria*. México. UTEA, . 1964: 138-228.
- 33.-Schlegel, R., MacGregor, J., Everson, R. Assesment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res*. 1986; 46: 3717-3721.
- 34.-Schmid, W. The micronucleus test. *Mutation Res*. 1975; 31: 9-15.
- 35.-Sims J.A., Johnson L.E. Introducción al estudio de las razas de los animales domésticos. España, ACRIBIA, 1974: 219
- 36.-Torres, B.O. Estandarización de las pruebas de micronúcleos e índice mitótico para determinar genotoxicidad de plantas con actividad aglutinante-inmovilizante de los espermatozoides de ratón. Tesis profesional para obtener el título de Lic. en Biología. Fac. Ciencias Biológicas. U. de G. 1993.
- 37.-Trzos, R.J., Petzold, G.L., Brunden, M.N, Swenberg, J.A. The evolution of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutation Res*. 1978; 58: 79-86.
- 38.-Waldmann, P., Pivcevic, B., Muller. W.E.G., Zahn R.K., Kurelec, B. Increased genotoxicity of acetaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Res*. 1995; 342: 113-123.
- 39.-Wills, J., Wolf, A. Manual de medicina felina, España, ed. ACRIBIA, 1995: 1-19, 104-106.
- 40.-Yamamoto, K., Kikuchi, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res*. 1980; 71: 127-13141.
- 41.-Zúñiga, G., Torres-Bugarin, O., Ramírez-Muñoz, M.P., Ramos, A., Fanti-Rodríguez, E., Portilla, E., Garcia-Martínez, D., Cantú, J.M., Gallegos-Arreola, M.P., Sánchez-Corona, J.

Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species.

Mutation Res. 1996; 369: 123-127.

- 42.-Zuñiga, G., Torres-Bugarin, O., Ramirez-Muñoz, Delgado-Lamas, J.L., De Loza-Saldaña, R., Cantú, J.M. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. Mutation.Res-Environ Mutagen. 1996; 361: 107-112.

Anexo

CUADRO 1
ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN EL GRUPO 1 CONTROL

No	Sexo	0hrs	48hrs	incremento-	96hrs	incremento
1	hembra	41.25	40.50	(-0.75)	38.00	(-3.25)
2	macho	41.50	36.00	(-5.50)	36.00	(-5.50)
3	macho	30.50	28.00	(-2.50)	31.00	(+0.50)
4	hembra	29.00	27.00	(-2.00)	27.00	(-2.00)
5	macho	14.00	14.00	(00.00)	16.00	(+2.00)
6	hembra	09.00	12.00	(+3.00)	10.00	(+1.00)
7	hembra	19.00	21.00	(+2.00)	21.00	(+2.00)
8	hembra	14.00	15.00	(+1.00)	16.00	(+2.00)
9	hembra	20.00	17.00	(-3.00)	18.00	(-2.00)
10	macho	12.00	15.00	(+3.00)	14.00	(+2.00)

Dosis 0.5 ml de agua inyectable

En 10,000 eritrocitos.

CUADRO 2
ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN EL GRUPO 2

No	Sexo	0hrs	48hrs	incremento-	96hrs	incremento
11	macho	15.75	16.50	(00.75)	27.75	(12.00)
12	hembra	19.50	25.75	(06.25)	33.00	(13.50)
13	macho	22.25	23.75	(01.50)	28.00	(05.75)
14	hembra	20.75	30.50	(09.75)	27.00	(06.25)
15	hembra	23.50	26.25	(02.75)	32.00	(08.50)
16	macho	16.00	15.00	(-1.00)	15.00	(-1.00)
17	hembra	25.00	23.00	(-2.00)	32.00	(07.00)
18	hembra	21.00	22.00	(01.00)	22.00	(01.00)
19	macho	36.00	37.00	(01.00)	42.00	(06.00)
20	macho	19.00	22.00	(03.00)	29.00	(10.00)

Dosis 0.12915 mg/kg de colchicina y 3mg/kg de ara-c

En 10,000 eritrocitos.

CUADRO 3
ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN EL GRUPO 3

No	Sexo	0hrs	48hrs	incremento-	96hrs	incremento
21	macho	12.00	14.00	(02.00)	25.00	(13.00)
22	hembra	20.00	20.00	(00.00)	21.00	(01.00)
23	macho	22.00	25.00	(03.00)	36.00	(14.00)
24	macho	12.00	20.00	(08.00)	24.00	(12.00)
25	hembra	10.00	13.00	(03.00)	17.00	(10.00)
26	hembra	21.00	31.00	(10.00)	34.00	(13.00)
27	hembra	22.00	48.00	(26.00)	55.00	(33.00)
28	hembra	25.00	49.00	(24.00)	42.00	(17.00)
29	hembra	38.00	47.00	(09.00)	55.00	(17.00)
30	hembra	40.00	44.00	(04.00)	51.00	(11.00)

Dosis 0.1937 mg/kg de colchicina y 4.5mg/kg de ara-c.
En 10,000 eritrocitos.

CUADRO 4
ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN EL GRUPO 4

No	Sexo	0hrs	48hrs	incremento-	96hrs	incremento
31	hembra	25.00	31.00	(06.00)	33.00	(08.00)
32	hembra	36.00	38.00	(02.00)	59.00	(23.00)
33	hembra	31.00	31.50	(00.50)	30.00	(-1.00)
34	macho	16.00	23.00	(07.00)	32.00	(16.00)
35	macho	25.00	25.00	(00.00)	44.00	(19.00)
36	macho	20.00	35.00	(15.00)	32.00	(12.00)
37	macho	37.00	52.00	(15.00)	49.00	(12.00)
38	hembra	21.00	19.00	(-2.00)	25.00	(04.00)
39	hembra	20.00	23.00	(03.00)	30.00	(10.00)
40	hembra	15.00	16.00	(01.00)	13.00	(-2.00)

Dosis 0.2583 mg/kg de colchicina y 6mg/kg de ara-c.
En 10,000 eritrocitos.

CUADRO 5
ERITROCITOS MICRONUCLEADOS EN EL GRUPO 5 CON
ADMINISTRACION SUBCUTANEA

No	Sexo	0hrs	48hrs	incremento-	96hrs	incremento
41	macho	22.00	24.00	(02.00)	34.00	(12.00)
42	hembra	07.00	16.00	(09.00)	24.00	(17.00)
43	hembra	22.00	28.00	(06.00)	28.00	(06.00)
44	hembra	11.00	12.00	(01.00)	13.00	(02.00)
45	hembra	21.00	19.00	(-2.00)	41.00	(20.00)
46	hembra	33.00	40.00	(07.00)	44.00	(11.00)
47	macho	25.00	25.00	(00.00)	32.00	(07.00)
48	macho	47.00	53.00	(06.00)	55.00	(08.00)
49	hembra	26.00	33.00	(07.00)	40.00	(14.00)
50	macho	33.00	35.00	(02.00)	40.00	(07.00)

Dosis 0.1937 mg/kg de colchicina y 4.5mg/kg de ara-c via subcutanea.

En 10,000 eritrocitos.