

EL CERDO JOVEN COMO BIOINDICADOR DE CONCENTRACIONES BAJAS DE GENOTÓXICOS MEDIANTE ERITROCITOS MICRONUCLEADOS**THE YOUNG PIG AS BIOMARKER OF LOW CONCENTRATIONS OF GENOTOXIC USING MICRONUCLEI ERYTHROCYTES**

Cedano Díaz Antonio¹, ^{IV}Martínez-González Sergio², Torres-Bugarín Olivia³, Trujillo-Hernández Benjamín⁴, Zúñiga-González Guillermo⁵, Peña-Parra Bladimir².

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

RESUMEN

El objetivo del presente fue establecer la respuesta eritrocitaria micronucleada del cerdo joven (10 a 13 semanas/edad) expuesto a la ciclofosfamida (0.5, 1.0 2.0 y 4.0 mg/Kg), para utilizarlo como un bioindicador de concentraciones bajas de genotóxicos. Así, en los cerdos inducidos con ciclofosfamida encontramos incrementos significativos en el número de células micronucleadas en los tratamientos de 0.5, 1.0 y 4 mg/Kg de ciclofosfamida. Por lo que concluimos que los cerdos jóvenes (10 a 13 semanas/edad), muestran respuesta eritrocitaria micronucleogénica a la ciclofosfamida, aún a dosis más bajas de las recomendadas para los roedores en pruebas de daño cromosómico. Por lo tanto, el cerdo puede ser considerado, como una prueba confiable para detectar agentes genotóxicos micronucleogénicos.

Palabras clave: respuesta, mutagenicos, sangre.

ABSTRACT

The aim of this was to determine the response of the young pig erythrocyte micronuclei (10-13 weeks / age) exposed to cyclophosphamide (0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg / kg), for use as a biomarker of low concentrations of genotoxic. Thus, in pigs induced with cyclophosphamide found significant increases in the number of micronucleated cells in the treatments of 0.5, 1.0 and 4 mg / kg of cyclophosphamide. So we conclude that young pigs (10-13 weeks / age) show micronucleated erythrocyte response to cyclophosphamide, even at lower doses than recommended for rodent evidence of

^{IV}Sergio Martínez González, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera de cuota Chapalilla-Compostela KM 3.5, Compostela, Nayarit, México. C.P. 63700 sergiotopic@hotmail.com

Recibido: 22/12/2012. Aceptado: 20/02/2013.
Identificación del Artículo: abanicoveterinario3(2):39-47/0000035

chromosomal damage. Therefore, the pig can be considered as a reliable test to detect genotoxic agents micronucleated.

Keywords: response, mutagenic, blood.

INTRODUCCIÓN

Desde 1969 en respuesta al gran interés por investigar la mutagénesis ambiental, los objetivos fueron claramente enfocados en tres áreas: la definición del rango de efectos producidos en el humano por los mutágenos, el desarrollo de métodos confiables para la detección de los mismos y la elucidación de mecanismos de daño cromosómico y mutaciones génicas (Wiley, 1990). Dentro de los múltiples efectos de los contaminantes se encuentra el efecto genotóxico expresado en sus diversas formas, como por ejemplo teratogénesis, mutagénesis y por supuesto la cancerogénesis. En las pruebas de genotoxicidad se acepta que una sola prueba no puede detectar con exactitud o predecir en forma confiable los efectos genotóxicos de una sustancia en el humano (Jena y Bhunya, 1985). Se entiende la genotoxicidad como la acción deletérea de un agente o sustancia que interactúa de una forma directa o indirecta con el ADN, modificándolo y afectando su integridad. El efecto genotóxico del agente o sustancia sobre el ADN genera cambio errático permanente (mutación) en el genotipo de determinada célula en el proceso de división celular, pudiendo producir o no un cáncer. Aunque, existen aspectos por aclarar en la relación compleja entre la exposición a un genotóxico y el desarrollo de cáncer que puede ser o no cancerígeno. En el caso de ser cancerígeno, éste tiene una alta probabilidad de ser genotóxico (Cuenca y Ramírez, 2004).

Por eso es importante disponer de diversas alternativas de estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para probar genotóxicos. La prueba de micronúcleos, es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Esta indica el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados (Heddle *et al.*, 1991; Corazza 1990; Fuic y Mijic, 1999; Normann *et al.*, 2008). Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular, observe figura 1 (Schmid, 1975).

La presencia de eritrocitos micronucleados (6 EMN/10000 eritrocitos) se ha observado en algunos animales cuyo control de calidad que ejerce el sistema reticuloendotelial, principalmente el bazo, es menor y por tanto, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos, los eritrocitos micronucleados se incrementan de manera significativa y pueden ser organismos con características de bioindicadores naturales (Zúñiga *et al.*, 1998).

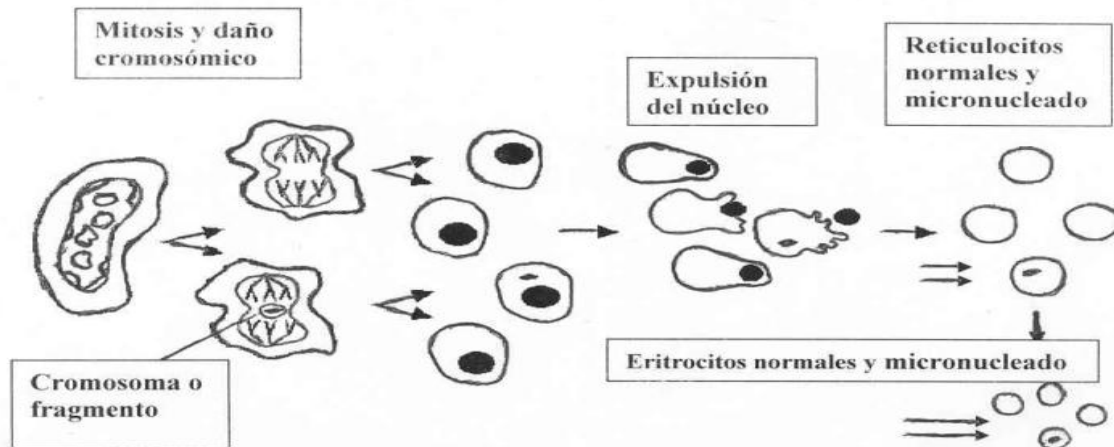


Figura 1 Formación de Micronúcleos en Eritrocitos

En la búsqueda de nuevos bioindicadores se reporta: en un estudio se muestran 9 especies de felinos (gato doméstico, león, jaguarundi, lince, jaguar, puma, tigre de bengala, ocelote y leopardo) con presencia de eritrocitos micronucleados, que puede ser propuestos como un grupo potencialmente adecuado para estudios de toxicogenética (Zamora-Perez *et al.*, 2008). También hay reportes de otros organismos biomonitores de agentes genotóxicos (Zúñiga 1996^a; Zúñiga *et al.*, 2001^a; Zúñiga *et al.*, 2001^b; Zúñiga *et al.*, 1996^b; Torres-Bugarín *et al.*, 1999; Torres-Bugarín, 1988; Torres-Bugarín, 2003) de entre los cuales se encuentra el cerdo debido a que presenta las características ideales para ser utilizado como tal (Zúñiga *et al.*, 1996^a, Zúñiga *et al.*, 2001^b).

En la literatura se destaca que el cerdo es un organismo que al ser expuesto a la radiación permite fácilmente detectar el daño micronucleogénico tanto *in vivo* como *in vitro* (Se *et al.*, 2003; Ludewig *et al.*, 1991). En otros trabajos demostramos que los cerdos (5 semanas de edad) reflejan de manera eficiente el efecto de potentes micronucleogénicos en reticulocitos, sin embargo, a esta edad presentan el inconveniente de tener una producción de eritropoyesis inestable que interfiere con la interpretación de resultados (Cedano *et al.*, 2011).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 cerdos de la cruce Landrace/Yorkshire. Estos fueron sometidos a dos tipos de exposición: exposición 1) ciclofosfamida vía oral en dosis única, y exposición 2) administración de ciclofosfamida vía oral en dosis continua /24 h /4 días. Todos los cerdos fueron sometidos y/o cruzados a las dos exposiciones (dosis única o dosis

continua) en la misma dosis de ciclofosfamida. Los animales antes de usarse en la dosis continua tuvieron un tiempo de lavado de 8 días. Los cerdos fueron divididos en 5 grupos (n =10). En la exposición de dosis única fue: el grupo 1) control, grupo 2) 0.5 mg/Kg, grupo 3) 1 mg/Kg, grupo 4) 2 mg/Kg y grupo 5) 4 mg/kg. En la exposición de dosis continua (cada 24 h / 4 días) fue: grupo 1) Control, grupo 2) Dosis total 2 mg/Kg, (fraccionada a 0.5 mg/Kg), grupo 3) Dosis total 4 mg/Kg (fraccionada a 1.0 mg/Kg), grupo 4) Dosis total 8 mg/Kg (fraccionada a 2.0 mg/Kg), grupo 5) Dosis total 16 mg/Kg (fraccionada a 4.0 mg/Kg).

Los frotis sanguíneos, fueron teñidos con anaranjado de acridina y observados con microscopio de fluorescencia. Los resultados se analizaron con la prueba de Friedman y Wilcoxon con corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Las comparaciones pareadas se hicieron con su tiempo basal. Se utilizó un intervalo de confianza de 95 % ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor basal en cerdos de 10 semanas de edad fue de 7.68 ± 4.7 , 2.6 ± 1.5 y 10.42 ± 5.7 de eritrocitos micronucleados/10,000 eritrocitos, eritrocitos policromáticos micronucleados/ 1000 eritrocitos policromáticos y eritrocitos policromáticos/ 1,000 eritrocitos totales, respectivamente. Los datos se presentan en medias y desviación estándar.

En el análisis de los datos en dosis única: En los Eritrocitos Micronucleados se encontro incremento significativo en los grupos de 0.5 mg/Kg a los tiempos 48 y 72 h. y en el de 4.0 mg/Kg a las 24 h. En los Eritrocitos Policromáticos Micronucleados se encontro incremento significativo en los grupos de 0.5 mg/Kg a las 48 h. y en el de 4 mg/Kg a las 24 h.

En el análisis de los datos en dosis continua: En los Eritrocitos Micronucleados solo se encontro diferencia en el grupo de 4 mg/Kg en los tiempos 48 h, 72 h y 144 h. En los Eritrocitos Policromáticos Micronucleados solo se encontro diferencia en el grupo de 1mg/Kg en los tiempos 72 h y 120 h.

Como antecedente sabe que para que un organismo sea un buen bioindicador de sustancias micronucleogenicas debe presentar una frecuencia aproximadamente de 6 eritrocitos micronucleados espontáneos, pues esto nos indica que su sistema depurador no es muy eficiente y por lo tanto cuando dicho organismo sea expuesto a un genotóxico nos permitirá fácilmente identificar el daño. Actualmente se cuenta con diversos biomonitores en los cuales es esencial tomar en cuenta la edad del organismo para aprovechar al máximo su poder para detectar los agentes genotóxicos

básicamente micronucleogénicos, ya que a menor edad mayor respuesta en la formación de eritrocitos micronucleados (Zúñiga *et al.*, 2001^a, Zúñiga *et al.*, 2001^b).

En este trabajo se demuestra que el cerdo presenta características ideales como bioindicador, ya que a las 10 semanas de edad presenta 7.6 EMN/10,000 eritrocitos, lo cual es un buen número de eritrocitos micronucleados espontáneos, para estos fines. En cambio los cerdos desde su nacimiento hasta las 5 semanas tienen una eritropoyesis acelerada e inestable lo que interfiere en la interpretación de resultados, así como en la reproducibilidad del modelo. Mientras que en cerdos de 10 semanas de edad el sistema de eritropoyesis ya se encuentra estable (Zúñiga *et al.*, 2001^b, Fuchs y Eder, 1991).

Por otra parte muchos de los compuestos son tóxicos hasta cuando son metabolizados, tal es la situación de la ciclofosfamida, y en el caso del cerdo su sistema microsomal dependiente de citocromo P-450, que es el responsable de metabolizar compuestos, en el cerdo este sistema termina de madurar hasta las 6 semanas de edad (Davis, 1989). Por lo se prefiere la edad de 10 semanas como la más satisfactoria para utilizar al cerdo en estas pruebas. En el presente trabajo se administró la ciclofosfamida en dos exposiciones: en dosis única y en dosis continua.

Se realizó la dosis única porque se busca un efecto entre las 24 h y 72 h, el cual se verá reflejado en los eritrocitos policromáticos ya que estos son los eritrocitos recién formados, de tal suerte que si estos policromáticos presentan micronúcleos entonces tenemos la certeza de que son originados por la exposición al inductor usado (Beaula y Subramanyam, 1991).

Los eritrocitos policromáticos maduran posteriormente a eritrocitos normocromáticos y por esta razón, cuando la exposición es continua, es notable el incremento de eritrocitos micronucleados por su acumulación (Fuic y Mijic, 1999; Heddle *et al.*, 19919). Para valorar el incremento de células micronucleadas por su acumulación se llevó a cabo el tratamiento en dosis continua durante 4 días.

El cerdo joven detectó el efecto de la ciclofosfamida en la dosis única a los tratamientos de 0.5 y 4 mg/Kg . En la dosis continua respondió a los tratamientos de 1 y 4 mg/Kg. Con respecto al tratamiento de 2 mg se observa una franca miolodepresión, la que queda demostrada por la disminución significativa de los eritrocitos policromáticos.

Resultados similares se han descrito en otros trabajos (Ludewig *et al.*, 1991; Beaula y Subramanyam, 1991). Se conoce que muchos compuestos dependiendo de la dosis y

el período de administración pueden inhibir la mitosis, lo que se ve reflejado en el número de EPC en la circulación sanguínea, y si hay disminución de mitosis también baja la formación eritrocitos policromáticos micronucleados (Beaula y Subramanyam, 1991). Lo anterior explica por qué no hubo incremento en el tratamiento de 2 mg/Kg/día de ciclofosfamida.

Como se ve en los resultados, el cerdo es un excelente bioindicador de agentes micronucleogénicos de dosis bajas de agentes genotóxicos, esto se constata al observar que hay incremento significativo de células micronucleadas a las dosis de 0.5, 1 y 4 mg/Kg. Estos resultados concuerdan perfectamente por los descritos en otros trabajos en los que usaron como bioindicador a gatos, ardillas y ratones (Zúñiga *et al.*, 1998; Zúñiga *et al.*, 2001^a; Kishi *et al.*, 1992). Así también en estudios de daño genotóxico en “Gamitana” (*Colossoma macropomum*) al ser expuesta al plaguicida fipronil (C1: 0.075mg/L, C2: 0.15mg/L y C3: 0.30 mg/L), para lo cual se utilizó el test de micronúcleos. Los resultados obtenidos para alevinos de *Colossoma macropomun* nos indican que el fipronil, a la concentración de 0.075 mg/L ha ocasionado la formación de micronúcleos (López *et al.*, 2011). En un trabajo previo se encontro resultados similares en cerdos de 5 semanas de edad, con una dosis mayor (5 mg/Kg). Estos resultados nos indican que el cerdo es un buen bioindicador de genotóxicos (Cedano *et al.*, 2011).

Algunos autores señalan que este animal tiene una alta sensibilidad a diversos compuestos así por ejemplo cuando se expusieron a la ocratoxina presentan incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y que este animal tiene un DL50 para la ocratoxina menor que la rata y el ratón (Krogt, 1987; Rutqvist *et al.*, 1978) por otra parte se describe que el cerdo responde a menor dosis de radiación ionizante que otros organismos (Ludewig *et al.*, 1991; Se *et al.*, 2003).

En estudios citogenéticos se comparó el efecto de la colchicina, el colcemid y la vinblastina, cada uno a cinco concentraciones diferentes (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 µg/ml), sobre dos parámetros, la morfología cromosómica, evaluada mediante la longitud del par cromosómico No. 1, y el índice mitótico de linfocitos de cerdo en cultivo estimulados con fitohemaglutinina. Los resultados de los dos parámetros muestran que la vinblastina aplicada a la dosis más baja 0.1µg/ml, favorece los estudios citogenéticos para el diagnóstico de aberraciones cromosómicas en cerdos, ya que es donde se obtienen los cromosomas más elongados y el mayor Índice Mitotico (Rodríguez-Romero *et al.*, 2000).

La ciclofosfamida es usada al menos en ratas (Hayashi *et al.*, 1992) y ratones (Mukherjee *et al.*, 1991) a dosis de 5,10,20 e incluso hasta 50 y 100 mg, además es importante señalar que la dosis letal en ratas es de 160 mg/Kg/iv como podemos darnos cuenta las dosis usada en los diversos modelos son muy superiores a las que nosotros usamos, incluso realizamos un experimento piloto en 2 cerdos para analizar el comportamiento del cerdo a 50 mg de ciclofosfamida en dosis única. De estos dos animales, uno murió a las 72 h, el otro recibió tratamiento, lográndose recuperar, esto

causado por el gran efecto citotóxico mielodepresivo a esta dosis de ciclofosfamida en el cerdo (Ludewig *et al.*, 1991).

La diferencia tan marcada de la dosis de ciclofosfamida, entre roedores y el cerdo, posiblemente se deba a la variación de la vía metabólica a la ciclofosfamida entre las especies (Shaw, 1990).

CONCLUSIÓN

Se concluye que el cerdo presenta respuesta eritrocitaria micronucleogénica a la ciclofosfamida, aún a dosis más bajas de las recomendadas para otros modelos en pruebas de daño cromosómico. Por lo tanto puede ser considerado como una prueba confiable para detectar genotóxicos micronucleogénicos.

LITERATURA CITADA

- BEAULA KD, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of ara-c by multiple parameters. *Mutat Res.* 1991; 263:185-196.
- CEDANO DA, Martínez GS, Torres BO, Zúñiga GG, Trujillo HB. Estudio de la factibilidad del cerdo como modelo indicador de agentes genotóxicos mediante el conteo de eritrocitos micronucleados. *Abanico Vet.* 2011; 1(2): 21-28.
- 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. *Clinical Lab Haematol.* 1990; 12: 269-275.
- CUENCA P, Ramírez V. Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Rev Biol Trop.* 2004; 52(3):623-628.
- DAVIS LE. Drugs disposition in neonatal animals. *J. A. Vet. Med Admon.* 1989; 320: 1161-1162.
- FUCHS A, Eder H. Zahl und reifegradverteilung der retikulozyten von sechs tierarten. *J. Vet Med Assoc.* 1991; 38:749 –754.
- FUIC A, Mijic A. In vitro and in vivo micronucleus tests in genotoxicity research. *Arh Hig Rada Toksikol.* 1999; 50: 299-306.
- HAYASHI M, Kodama Y, Awogi T, Suzuki T, Asita AO, Sofuni T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin-C and cyclophosphamide-treated rats. *Mutat Res.* 1992; 278:209-213.
- HEDDLE J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J, McGregor J. Micronuclei as an index of cytogenetic damage : past, present and future. *Environ Mol Mutag.* 1991; 18: 277- 291.
- JENA GB, Bhunya SP. Use of chick, *Gallus domesticus*, as an in vivo model for the study of chromosome aberration: A study mitomycin C and probable location of a “hot spot”. *Mutat Res.* 1985 ; 334 : 167-174.

- KISHI M, Horiguchi Y, Watanabe S, Hayashi M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutat Res.* 1992; 278:205-208.
- KROGT P. Ochratoxins in food. En: *Mycotoxins in food. Food science and technology series of monographs*, USA: Oxford University Press, Inc. New York.1987.
- LOPEZ A, Siles-Vallejos M, Toscano E, Melchor B, Alvarez G, Heredia V, Norberto V. Efecto genotóxico del plaguicida fipronil en alevinos de "Gamitana" *Colossoma macropomum* en condiciones de laboratorio. *Scientia Agropecuaria* 2011; 2: 247 – 253.
- LUDEWIG E, Koch F, Kamprad F, Melzer R. The micronucleus test in pigs: induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes by various doses of x-rays. *Mutat. Res.* 1991; 249: 1-6.
- LUDEWIG E, Koch F, Kamprad F, Melzer R. The micronucleus test in pigs: induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes by various doses of x-rays. *Mutat. Res.* 1991; 249:1-6.
- MUKHERJEE A, Agarwal K, Aguilar MA, Sharma A. Anticlastogenic activity of B-caroteno against ciclophosphamide in mice in vivo. *Mutat Res.* 1991; 263:41- 46.
- NORMANN CA, Fonseca JC, Veiga V. Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium dichromate. *African Journal of Biotechnology.* 2008; 7(7): 893-896.
- RODRÍGUEZ-ROMERO MI, Hernández-González R, Calderón-Segura ME. Estudio comparativo de la morfología cromosómica del cerdo (*sus scrofa domesticus*), bajo tres diferentes inhibidores mitóticos: colchicina, colcemid y vinblastina. *Salud Pública y Nutrición.* 2000; No. 2.
- RUTQVIST L, Björklund NE, Hult K, Hokby E, Carlsson B. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *App Environ Microb.* 1978; 36:920-925.
- SCHMID W. The micronucleus test. *Mutat Res.* 1975; 31: 9-15.
- SE RK, Tae HK, Si YR, Hae JL, Heon O, Sung KJ, Ki SO, In CP, Jong CK, Chang MK, Sung HK. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated *in vitro* with gamma radiation. *In Vivo.* 2003; 17: 433-438.
- SE RK, Tae HK, Si YR, Hae JL, Heon O, Sung KJ, Ki SO, In CP, Jong CK, Chang MK, Sung HK. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated *in vitro* with gamma radiation. *In vivo.* 2003; 17:433-438.
- SHAW IC. Species differences in the metabolism and toxicity of agrochemicals and veterinary medicines. *St. Vet. J.* 1990; 44: 54-65.
- TORRES-BUGARÍN O, Ventura Aguilar A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Morgan-Villela G, Gutiérrez-Franco A, Zúñiga-González G. Evaluation of cisplatin +5-FU, carboplatin +5FU, and ifosfamida + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the bucal mucosa. *Mut Res Genet Toxicology.* 2003; 539:177-186.

- TORRES-BUGARÍN O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Múñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1988; 413: 277-281.
- TORRES-BUGARÍN O, Zamora-Pérez A, Esparza-Flores A, López-Guido B, Feria-Velasco A, Cantú JM, Zúñiga G. Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Bol Méd Hos Infan Méx.* 1999; 56: 212-217.
- WILEY J. Mutation and the environment. Part. A: Basic mechanisms. John Wiley. 1990:340.
- ZÚÑIGA G, Torres O, Zamora A, Gómez B, Ramos M, Martínez S, González A, Luna J, Ramos A, Ontiveros D, Gallegos M. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res.* 2001^b; 494:161-167.
- ZÚÑIGA G, Torres O, Ramos M, Zamora A, Gómez B, Ventura A, Ramos A, Ortiz G., Álvarez C, González A, Luna J, Gallegos M. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: An increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen.* 2001^a; 37: 173-177.
- ZÚÑIGA G, Ramírez MP, Torres O, Pérez J, Ramos A, Zamora A, Gallegos MP, Sánchez J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res.* 1998; 413: 187-189.
- ZÚÑIGA G, Torres O, Ramírez MP, Delgado JL, De Loza R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res.* 1996^b; 361: 107-112.
- ZÚÑIGA G, Torres O, Ramírez MP, Ramos A, Fanti E, Portilla E, García D, Cantú JM, Gallegos MP, Sánchez J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat Res.* 1996^a; 369: 123-127.