

EFFECTO DEL COCCIDIOSTÁTICO DECOQUINATO EN LA REORGANIZACIÓN DE CROMOSOMAS MEIÓTICOS DE *Eimeria tenella*.

Luis V. Monteagudo^a, Emilio Del Cacho^b, Margarita Gallego^b, Marc Pagès^c, Caridad Sánchez Acedo^b

^a: Departamento de Anatomía, Embriología y Genética. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet 177. 50013-ZARAGOZA.

^b: Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet 177. 50013-ZARAGOZA.

^c: Laboratorios HIPRA. Avenida La Selva s/n. 17170-AMER (Gerona)

Correos electrónicos de los autores, por orden de aparición: monteagu@unizar.es, edelcach@unizar.es, mgallego@unizar.es, mpb@hipra.com, csarmfm@unizar.es

INTRODUCCIÓN

A pesar del amplio conocimiento existente sobre la acción de las quinolonas de uso antibiótico (Sierra et al., 2005), se sabe muy poco de la forma de actuación de las empleadas como coccidiostáticos. Su efecto como inhibidores del transporte de electrones en las mitocondrias de los coccidios, así como la inhibición de la esporulación se han postulado como los posibles mecanismos de su efecto coccidiostático (Arakawa 1991, Fry y Williams, 1984, Williams 2005). Uno de los procesos que ocurren durante la esporulación es la meiosis (Canning y Anward, 1968).

En la actualidad, el uso del aditivo Deccox®, perteneciente al grupo de los coccidiostáticos y otras sustancias medicamentosas en la alimentación animal, está autorizado en la Unión Europea por el reglamento N° 1289/2004 de la Comisión de 14 de Julio de 2004 (DOCE del 15 de Julio de 2004). Su principio activo es el decoquinato, de la familia de las quinolonas.

En el presente trabajo se estudió el efecto del decoquinato sobre los cromosomas meióticos de *Eimeria tenella*. La dotación cromosómica de esta especie y sus cromosomas meióticos han sido previamente estudiados (Del Cacho et al., 2001 y 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Animal: Un total de 160 pollitos de un día, más otros 60 pollos de tres semanas de edad fueron mantenidos en condiciones laborales estándar libres de parásitos con comida y bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por la Comisión Ética Asesora de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Parásito: se utilizó una cepa de *E. tenella* procedente de la empresa Merck, Sharp and Dohme. Los ooquistes se propagaron, aislaron y esporularon utilizando procedimientos estandarizados (Raether et al., 1995).

Diseño experimental: Los pollitos de un día se dividieron aleatoriamente en 4 lotes de 40 ejemplares. El primer lote recibió alimentación sin decoquinato, mientras que los lotes número 2, 3 y 4 recibieron, respectivamente, alimentación conteniendo concentraciones (p/p) de decoquinato 0,001%, 0,003% y 0,009%. Los pollos fueron infectados mediante la inoculación por vía oral oral al buche de 15.000 ooquistes esporulados a las 3 semanas de edad. Siete días después, se aislaron ooquistes del ciego de los animales y se permitió su esporulación según las condiciones propuestas por Raether et al. (1995).

Estudio de los complejos sinaptonémicos. Los complejos sinaptonémicos se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión en muestras de 10⁴ ooquistes obtenidos de las aves de cada grupo según lo descrito por Del Cacho et al. (2001 y 2005).

Tasas de esporulación. Las tasas de esporulación se determinaron por recuento de 400 ooquistes a 400 aumentos a las 96 horas de comienzo del protocolo de esporulación.

Infectividad de los ooquistes: Se utilizaron tres lotes de 20 pollos de tres semanas de edad. El primero recibió 10.000 ooquistes esporulados procedentes de los pollos no medicados. El mismo número recibieron los lotes segundo y tercero, pero procedentes

de los ejemplares tratados con decoquinato a concentraciones 0,001% y 0,003%. Del lote tratado con decoquinato a concentración 0,009% no se pudieron obtener suficientes ooquistes para abordar un protocolo de infección.

Análisis estadístico. Se aplicó el Test de Duncan de rangos múltiples, con nivel de significación $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se apreciaron diferencias significativas en el número de ooquistes recogidos por individuo, en función de la concentración de decoquinato con la que fue tratado cada lote, siendo mayor en los ejemplares no medicados y reduciéndose al incrementarse la dosis del coccidiostático, como era de esperar.

La observación de los cromosomas meióticos en los ooquistes recogidos del lote no medicado no ofreció ninguna reorganización cromosómica (fig 1.). Por el contrario, aparecieron figuras de trivalentes (fig.2) y cuadrivalentes (fig 3), propias de fenómenos de translocación cromosómica, en los ooquistes recogidos en los lotes tratados con decoquinato. Pese a las dificultades propias de la identificación de cromosomas mediante microscopía electrónica, la morfología y tamaño de los observados en estas figuras apunta a los cromosomas 5 y 12 como los implicados en las reorganizaciones. La tabla I recoge el número de observaciones de trivalentes y tetravalentes efectuadas en cada uno de los lotes. Es de destacar que la proporción de figuras de reorganización cromosómica se incrementa al aumentar el porcentaje de decoquinato en el alimento.

Los efectos mutagénicos que las quinolonas de uso antibiótico producen en bacterias han sido estudiados en profundidad mediante la aplicación de tests basados en diferentes cepas bacterianas (Sierra et al., 2005). Sin embargo, se desconocen los posibles efectos mutagénicos del grupo de quinolonas de uso coccidiostático. El presente trabajo aporta pruebas de la posible aparición en *Eimeria* de gametos de dotación genética desequilibrada como consecuencia de translocaciones cromosómicas asociadas a la utilización de decoquinato en las dosis habitualmente empleadas en la profilaxis coccidiostática. Las translocaciones pueden dar lugar a la larga a gametos estériles, lo que podría explicar, al menos en parte, el efecto de estos medicamentos alterando el proceso de esporulación (Arakawa et al., 1991). Debe tenerse en cuenta que la proporción de trivalentes y tetravalentes observados probablemente subestime la proporción real de reorganizaciones cromosómicas existentes en las células. No obstante, las otras teorías acerca del modo de acción de las quinolonas sobre el parásito no pueden descartarse.

Hasta la fecha, uno de los mecanismos más conocidos de la acción de las quinolonas de uso antibiótico es la inhibición de las topoisomerasas II bacterianas, responsables de la reparación de las roturas del DNA acaecidas durante su replicación. Recientemente se ha descrito el papel de las topoisomerasas II en el emparejamiento meiótico de las cromátidas (Iwabata et al., 2005). La presencia de alteraciones cromosómicas en las meiosis de *Eimeria* asociada a la administración de una quinolona, aún diferente de las de uso antibiótico, podría deberse a alteraciones hasta ahora desconocidas de las funciones de las topoisomerasas eucarióticas, que sería necesario estudiar en profundidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Arakawa A, Tanaka Y, E. Baba E, Fukuta T. (1991), Effects of clopidol on sporulation and infectivity of *Eimeria tenella* oocysts, *Vet. Parasitol.* 38, pp. 55–60.
- Canning EU, Anward M. (1968) Studies on meiotic division in coccidial and malarial parasites, *J. Protozool.* 15, pp. 290–298.
- del Cacho E, Gallego M, Monteagudo L, López-Bernad F, Quílez J, Sánchez-Acedo C. (2001). A method for the sequential study of Eimerian chromosomes by light and electron microscopy, *Vet. Parasitol.* 94, pp. 221–226.

del Cacho E, Pages M, Gallego M, Monteagudo L, Sánchez-Acedo C. (2005) Synaptonemal complex karyotype of *Eimeria tenella*. *Int. J. Parasitol.* 25, pp. 1445–1451.

Fry M, Williams RB. (1984), Effects of decoquinato and clopidol on electron transport in mitochondria of *Eimeria tenella* (Apicomplexa: coccidian), *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984), pp. 229–240.

Iwabata K, Koshiyama A, Yamaguchi T, Sugawara H, Hamada FN, Namekawa SH, Ishii S, Ishizaki T, Chiku H, Nara T, Sakaguchi K. (2005) DNA topoisomerase II interacts with Lim15/Dmc1 in meiosis. *Nucleic Acids Res.*, 33: 5809–5818.

Raether W, Hofmann J, Uphoff M, (1995) Biotechnology. In: J. Eckert, R. Brown, M.W. Shirley and P. Coudert, Editors, *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*, European Commission, Brussels, pp. 79–84.

Sierra JM, Cabeza JG, Ruiz Chaler M, Montero T, Hernandez J, Mensa J, Llagostera M, Vila J. (2005). The selection of resistance to and the mutagenicity of different fluoroquinolones in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol. Infect* 11, pp.750-758.

Williams RB. (1995). The mode of action of anticoccidial quinolones (6-decyloxy-4-hydroxyquinolina-3-carboxylates) in chickens. *International Journal for Parasitology*, 27, pp.101-111.

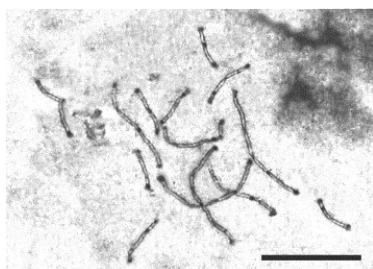


Figura 1. Dotación normal de *E. tenella*

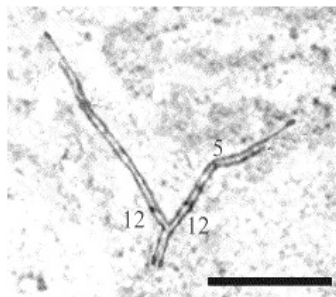


Figura 2. Trivalente formado por dos cromosomas 12 y un cromosoma 5

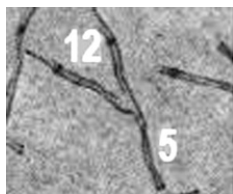


Figura 3. Se muestra un cuadrivalente resultado de sinapsis entre los cromosomas 5 y 12.

Tabla I: trivalentes y tetravalentes observados en ejemplares alimentados con pienso conteniendo diferentes proporciones (p/p) de decoquinato.

Origen de los ooquistes	meiosis	trivalentes	tetravalentes
lote no medicado	200	0	0 (0%)
lote 0,001% decoquinato	200	7 (3,5%)	1 (0,5%)
lote 0,003% decoquinato	200	24 (12%)	3 (1,5%)
lote 0,009% decoquinato	200	37 (18,5%)	5 (2,5%)