

11281
lej
①

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

Efectos Genotóxicos de Drogas
Antiparasitarias

T E S I S

Que para obtener el título de:
Doctor en Ciencias Biomédicas.

Especialidad: Farmacología

Presenta: Patricia Ostrosky de
Wegman .

FALLA DE CR.GEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de
Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. con
la Asesoría de la Dra. Cristina Cortinas de Nava.

I N D I C E

I PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II ANTECEDENTES

1. ENFERMEDADES IATROGENICAS Y SU RELACIÓN CON EL ADN
2. ANATOMIA DE LA MUTACION
3. MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA MUTACION
 - A) MUTACIONES EN CÉLULAS GERMINALES
 - B) INFERTILIDAD Y ABORTO
 - C) MUTACIONES EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y CÁNCER
 - D) MUTACIONES EN CÉLULAS EMBRIONARIAS, TERATOGENESIS Y CARCINOGENESIS
4. EL LINFOCITO COMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGO GENOTÓXICO
5. TIPOS DE ALTERACIONES GENETÓXICAS
 - A) ABERRACIONES CROMOSÓMICAS
 - B) INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS
 - C) CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR
6. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA INTERACCIÓN CÉLULA-MUTÁGENO
 - A) PROCESOS FARMACOCINÉTICOS
 - B) MODO DE INTERACCIÓN DEL AGENTE CON EL ADN
 - C) SUSCEPTIBILIDAD DE LA CÉLULA
7. FUNDAMENTACIÓN PARA LA ELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS EVALUADOS Y SUS CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS
 - A) QUIMIOTERAPIA DE INFECCIONES POR PROTOZOARIOS
 - B) QUIMIOTERAPIA DE HELMINTIASIS
 - C) QUIMIOTERAPIA DE MICOSIS

III MATERIALES Y MÉTODOS

IV RESULTADOS

V DISCUSIÓN

VI CONCLUSIONES

VII REFERENCIAS

* * *

SIGNOS Y ABREVIATURAS

- I.C.H. = Intercambio de cromátidas hermanas en 25 células en 2a. división.
- N.S.M. = No suficientes mitosis
- DIC = Cromosoma dicéntrico
- I.R. = Índice de replicación
- 1a = Primera división "In vitro"
- 2a = Segunda división "In vitro"
- 3a = Tercera división "In vitro"
- A.C. = Falló el cultivo
- ROMP = Rompimiento cromosómico
- RA = Rearreglo cromosómico
- T = Translocación
- TR = Tetrarradial
- R = Anillo cromosómico
- P = Pulverizaciones
- D.S. = Desviación Estándar
- +S9 = Sistema de activación metabólica mediado por homoge_nizado de hígado de rata más cofactores.
- DMSO = Dimetilsulfóxido
- S = Significativo $p < .05$

I. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

En México las infecciones por protozoarios, helmintos y hongos son consideradas como un problema de salud pública por su alta frecuencia (). Estos datos aunados a algunas estadísticas del consumo de medicamentos (), - indican que las drogas antiparasitarias tienen un uso ampliamente difundido en México.

La administración al hombre de sustancias biológicamente activas como son las drogas antiparasitarias no está desprovista del riesgo de que se produzcan efectos adversos. Entre éstos, es causa de preocupación la posible interacción de los medicamentos antiparasitarios con el ADN por el peligro potencial de que se generan mutaciones que puedan afectar la salud de los individuos expuestos o la de sus descendientes, a través de incrementar la frecuencia de padecimientos de origen genético (al producirse mutaciones en las células germinales) o de favorecer el desarrollo de cáncer (al interactuar el fármaco con el ADN de las células somáticas).

El estudio epidemiológico de las poblaciones expuestas podría considerarse como el más apropiado para valorar el riesgo que un medicamento representa para el hombre, sin embargo, en lo que se refiere al daño genético y al cáncer - es difícil establecer con certeza una asociación entre la ex

posición a un factor dado y la elevación en la frecuencia de padecimientos hereditarios o de tumores malignos en la población afectada.

Uno de los problemas mayores estriba en definir la contribución de un medicamento en la producción de un efecto adverso que se pone de manifiesto mucho tiempo después del tratamiento, cuando se ha estado expuesto a muchos otros factores. Este problema es especialmente crítico en el cáncer, cuyo periodo de latencia puede prolongarse hasta 55 años - -

) y aún más en el caso de las mutaciones génicas recesivas ya que pueden transcurrir varias generaciones hasta que se manifiesten.

Otras complicaciones con las que se enfrentan estos estudios en particular, son: la falta de seguimiento de los pacientes y la carencia de registros médicos precisos en los que se indique la historia clínica, tanto previa como posterior al tratamiento con los medicamentos antiparasitarios. Cabe mencionar que aún en el caso de que algunos de estos fármacos sean capaces de inducir alteraciones hereditarias, cáncer y teratogénesis, es probable que no se llegue a establecer esta capacidad en forma inequívoca, sobre todo, si sólo incrementan ligeramente la frecuencia de padecimientos que son comunes en la población.

En virtud de lo anterior se ha considerado imprescindible recurrir a modelos experimentales que provean en forma más rápida y confiable la información para estimar el riesgo potencial asociado al consumo de productos químicos.

Diversas pruebas que utilizan diferentes sistemas biológicos han sido diseñadas para la evaluación de factores capaces de interactuar con el material hereditario (Tabla 1). Los experimentos con sistemas biológicos no humanos son útiles en la evaluación de los efectos genéticos de agentes químicos por su reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y corta duración. Sin embargo, se ha discutido la validez de los resultados generados en estos sistemas para la determinación del riesgo que constituye la exposición del hombre a compuestos químicos, ya que, si bien es cierto que los seres vivos comparten algunas características como son la casi universalidad del código genético y los mecanismos de transcripción de la información hereditaria, existen diferencias acentuadas en los que se refiere a permeabilidad, transporte y metabolismo que influyen sobre la mutagenicidad de las sustancias químicas. Por lo tanto la extrapolación de datos es cada vez menos confiable, a medida que los organismos en que se realizan las pruebas están más alejados funcionalmente del hombre.

TABLA 1. DIFERENTES SISTEMAS DE PRUEBA DE MUTAGENOS
IN VIVO E IN VITRO

CELULAS SOMATICAS		CELULAS GERMINALES
"IN VITRO"	"IN VIVO"	"IN VIVO"
<u>Mutaciones génicas</u>		
Pruebas en:		
1. Bacterias	1. Prueba de la mancha en <u>ra</u> tón	1. Recessivos letales en drosophila
2. Levaduras	(spot test)	2. Prueba de locus específico en ratón
3. Hongos		3. Anomalías en el espermatozoide en F ₁
4. Células de mamífero		
<u>Mutaciones cromosómicas</u>		
1. Fibroblastos de mamífero	1. Micronúcleos en rata y ratón	1. Dominantes letales y pérdida del X en drosophila
2. Linfocitos humanos	2. Citogenética en médula ósea en rata y ratón	2. Translocaciones heredables en ratón
		3. Dominantes letales en rata y ratón
		4. Citogenética en espermaticitos de rata y ratón
		5. No - Disyunción
<u>Indicadores de efecto biológico</u>		
1. Síntesis de ADN no programada	1. Síntesis de ADN no programada hepatocitos y otros tejidos	1. Síntesis de ADN no programada, aductos y rupturas de ADN, intercambio de cromátidas hermanas en ratón.
Células de mamífero		
2. Aductos y rupturas del ADN	2. Aductos y rupturas del ADN	
Células de mamífero	Diferentes tejidos	
3. Intercambio de cromátidas hermanas en células de mamífero	3. Alquilación hemoglobina	
4. Conversión génica y recombinación en levadura	4. Intercambio de cromátidas hermanas en tejidos	

El cultivo de linfocitos humanos representa uno de los sistemas de prueba adecuado para la evaluación de los efectos genotóxicos de medicamentos tanto en uso como en desarrollo. Esto obedece a que permite la determinación del daño ocurrido In vitro, en condiciones controladas que permiten obtener relaciones dosis-respuesta; asimismo porque hace posible el estudio de los efectos In vivo en los linfocitos de pacientes que han estado en tratamiento:

La evaluación previa en nuestro laboratorio de diversos medicamentos antiparasitarios en el sistema de prueba de Ames, que utiliza Salmonella typhimurium, mostró que la dehidroemetina que es un amebicida y la niclosamida que es un antihelmíntico, al ser activados con enzimas hepáticas inducen mutaciones de corrimiento de bases. Mientras -- que ni el Ketoconazol que es un antimicótico ni el difosfato de cloroquina (amebicida) mostraron actividad en el sistema de prueba estándar de Ames, el segundo sin embargo, sí produjo mutaciones de corrimiento en la prueba de fluctuación en cultivo líquido.

Existe una amplia información acerca de la capacidad de la cloroquina de unirse al ADN (), también se ha reportado que induce la aglutinación de cromatina, así como anomalías cromosómicas con una línea linfoblastoide - - (). Por el contrario no se encontró información acer

ca de la actividad genotóxica de la emetina, de la niclosamida y del Ketoconazol.

Ante estos datos se consideró de interés evaluar los efectos genotóxicos producidos In vitro en linfocitos humanos por las siguientes 4 drogas antiparasitarias: difosfato de cloroquina, dehidroemetina, niclosamida y ketoconazol. - Para evaluar los efectos In vivo se eligieron como modelos la niclosamida y el Ketoconazol, la primera por su administración subaguda, mientras que la segunda se eligió por su posología de larga duración.

Mediante estos estudios nos propusimos:

1. Valorar la genotoxicidad de los medicamentos mencionados.
2. Analizar el papel del metabolismo en su genotoxicidad.
3. Determinar el tipo de estudio más apropiado para la evaluación de los efectos de medicamentos In vivo.
4. Evaluar la relación que existe entre los datos obtenidos In vivo e In vitro, así como determinar el valor predictivo de la prueba In vitro.
5. Determinar la utilidad de los estudios de seguimiento en la evaluación de efectos genotóxicos.
6. Evaluar la utilidad del linfocito humano como sistema de prueba en la determinación de los efectos genotóxicos de medicamentos.

II ANTECEDENTES

1.- Enfermedades Iatrogénicas y su Relación con el ADN.

El uso de agentes terapéuticos no está exento del riesgo de efectos adversos; se conoce como enfermedad iatrogénica a las reacciones adversas que son consecuencia de la exposición a los agentes terapéuticos (). Ya desde el siglo XVI Paracelso afirmó que la diferencia entre un remedio y un veneno es la dosis; hoy en día sabemos que no existen sustancias atóxicas y que la administración de un medicamento puede producir efectos indeseables. El término efecto indeseable es un concepto relativo, sin embargo la Organización Mundial de la Salud lo ha definido como el efecto que es nocivo y no intencionado, pero que ocurre con dosis usadas en el hombre para profilaxis, diagnóstico ó terapéutica.

El efecto iatrogénico en última instancia es el resultado del daño a la célula provocado por sustancias que pueden afectar su estructura ó su funcionamiento.

La lesión de la arquitectura celular puede derivar de cambios más o menos profundos en las estructuras, que conducen a la destrucción de la célula, es así que el daño a la membrana causa la salida del contenido citoplásmico y el daño a los lisosomas libera las enzimas lisosomales. dota

das de capacidad lítica.

La alteración del funcionamiento celular ocasionada por los fármacos puede deberse principalmente a modificaciones en la:

- i) Permeabilidad de la membrana, lo que altera la entrada y salida de nutrientes, excreciones y desde luego de los medicamentos.
- ii) Actividad enzimática, lo que puede alterar cualquiera de las funciones fisiológicas como son la respiración y nutrición.
- iii) División celular, al incidir sobre el ARN, lo que altera la síntesis proteica, ó a nivel de ADN, lo que se puede traducir en mutaciones e inhibición de la replicación.

2.- Anatomía de la Mutación.

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN). Este cambio puede ocurrir en los genes o en los agrupamientos de genes denominados cromosomas (tabla 2). Las alteraciones intragénicas pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento. La primera ocurre ya sea por una transición, reemplazo de una base por otra del mismo tipo, ó por una transversión, en la que una

TABLA 2. ALTERACIONES GENÉTICAS

NIVEL DE LA MUTACION	TIPO DE MUTACION	DESCRIPCION
Alteraciones en la frecuencia de bases intragénica	Sustitución de bases	Cambio de una base por otra: a) Transición Purina → Purina Pirimidina → Pirimidina b) Transversión Purina → Pirimidina, ←
	Desfasamiento	Corrimiento de bases por pérdida o adición
Anomalías en el arreglo de los genes	Inversión	Cambio de orientación del gen, manteniendo su posición relativa respecto de los otros genes
	Translocación	Cambio de posición de un gen con relación a otros genes
Anomalías en el número de genes	Eliminación	Pérdida de un gen
	Duplicación	Adquisición de una copia extra de un gen
Aberraciones cromosómicas estructurales	Rearreglos: Translocaciones, inversiones, anillos	Cambio en el número, posición u orientación de grupos de genes
Modificación del número de cromosomas	Aneuploidia: a) Monosomía b) Polisomía	Segregación cromosómica defectuosa que resulta en pérdida o adquisición de uno o más cromosomas
	Poliploidia	Aumento de juegos completos de cromosomas

bases de un tipo es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento de la secuencia de bases ocurre a su vez por eliminación ó adición de bases. Las anomalías que se refieren a grupos de genes pueden deberse a rearrreglos estructurales (tales como inversiones, transposiciones y translocaciones) o numéricos (eliminaciones o adiciones de genes o cromosomas).

El término mutagénesis se emplea para designar al proceso que conduce a la alteración genética o mutación. Un mutante se refiere a la célula o al organismo portador de la mutación y un mutágeno es el agente inductor de modificaciones genéticas.

Los agentes químicos pueden causar mutaciones al interactuar con el ADN o sobre otros componentes celulares ligados a él, como los que participan en la división celular (centríolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a su duplicación o reparación (Fig. 1). Sin embargo, para producir una mutación, el daño ocurrido en cualquiera de los componentes mencionados tendrá que traducirse en alteraciones estructurales o numéricas en el material genético.

Otro tipo de rearrreglo lo constituye el intercambio de cromátidas hermanas (I.C.H.) que implica la recombinación

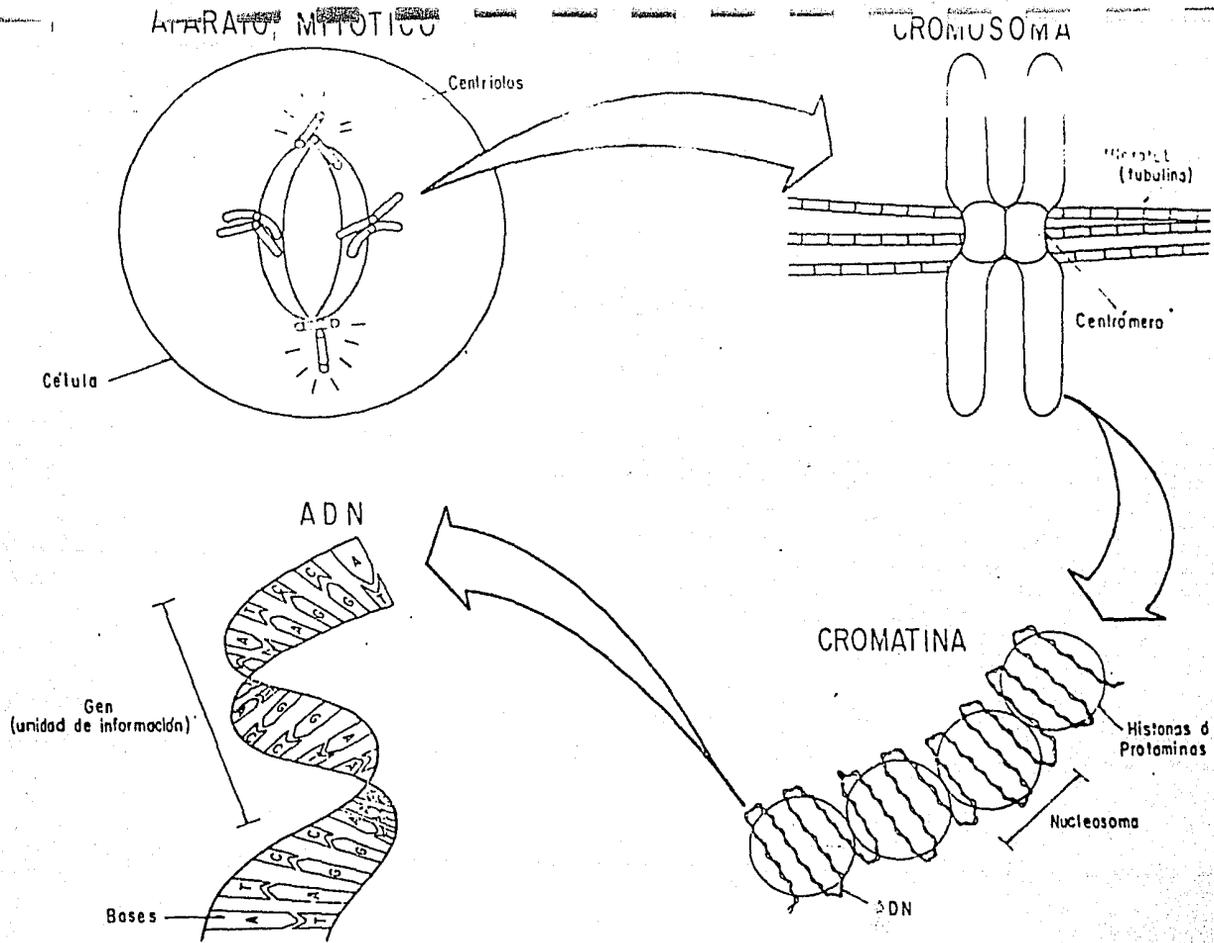


FIG. 1 COMPONENTES CELULARES SUSCEPTIBLES A LOS PROCESOS MUTAGENICOS

de material hereditario contenido en locus homólogos. La frecuencia basal de este proceso es baja, sin embargo algunos de los agentes capaces de inducir mutaciones la incrementan notablemente. Aún no se conoce el significado del intercambio de cromátidas aunque se ha planteado que puede ser favorecido por la alteración estructural del ADN.

3.- Manifestaciones Clínicas de la Mutación.

En ^{lo figura 2} ~~el esquema 1~~ se presentan algunas de las posibles manifestaciones patológicas de las mutaciones.

Mutaciones en células germinales

Se han identificado a la fecha más de tres mil enfermedades hereditarias () y se sabe que cerca de un 20% de los embarazos terminan en abortos espontáneos de los cuales un 50% están asociados a la presencia de aberraciones cromosómicas, sospechándose que algunos de los restantes sean debidos a mutaciones génicas dominantes (tabla 3) (). Se considera asimismo que una gran parte de las anomalías genéticas descritas en los abortos consisten en mutaciones frescas, ya que sólo una pequeña fracción de las aberraciones cromosómicas observadas se han identificado en algunos de los progenitores, habiéndose reportado que alrededor del 0.6% de los niños nacidos vivos presentan anoma-

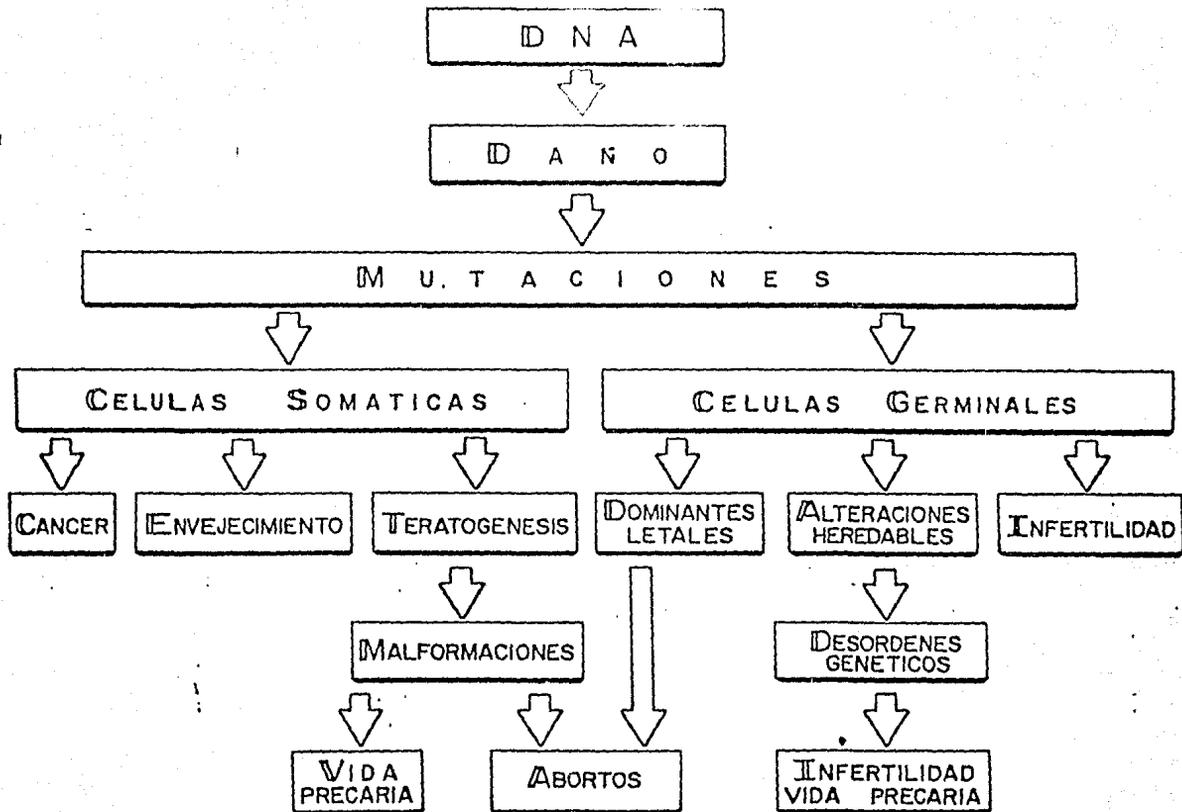


Fig. 2 Posibles manifestaciones de eventos mutagénicos en el hombre.

TABLA 3.

TIPOS Y FRECUENCIAS RELATIVAS DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS
OBSERVADAS EN TEJIDOS FETALES DE ABORTOS ESPONTANEOS ()

ANOMALIA CROMOSOMICA	NUM. OBSERVADO	PORCENTAJE
Aneuploidia	1,400	32.7
Poliploidia	456	10.7
Rearreglos estructurales	62	1.4
Mosaicismo	41	0.95
Total observado	1,959	45.8
Total analizado	4,274	100.0

Las congénitas debidas a aberraciones cromosómicas (tabla 4) ().

La evaluación de la contribución de mutaciones génicas a la patología humana es aún imprecisa y subestima el número total de mutaciones recesivas cuyas consecuencias en la salud de los heterocigotos se desconocen. Sin embargo, se calcula que acerca del 10% de todos los nacidos vivos presentan un padecimiento genético severo que se expresa al nacimiento o durante la vida del individuo (Tabla 5) ().

Se desconoce la etiología de estas patologías, aunque se considera que agentes ambientales están involucrados como factores causales. Cabe hacer notar sin embargo, que hasta el momento no existe evidencia de que la frecuencia de las enfermedades hereditarias se haya elevado como consecuencia de la exposición a fármacos u otros agentes ambientales. Aun los estudios realizados en Hiroshima y Nagasaki para evaluar los efectos genéticos de la bomba atómica, no han mostrado incrementos significativos en la frecuencia de alteraciones hereditarias (). A pesar de ello, existen muchos agentes que a través de estudios realizados In vitro y en organismos inferiores han mostrado ser capaces de inducir mutaciones (). También existen datos obtenidos de modelos animales que indican que al

TABLA 4.

ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN NACIDOS VIVOS POR 1,000

Numéricas	Aneuploidias o <u>Mo</u>	
	saicos de cromoso	2.69
	mas sexuales	
	Autosomas	1.45
	Triploidia	0.02
ESTRUCTURALES	Balanceadas	1.93
	No balanceadas	0.28
NO CLASIFICADAS		0.52
TOTAL		6.88

gunos agentes son capaces de producir alteraciones génicas y cromosómicas transmisibles ().

Evidencias adicionales de daño genético inducido en las células reproductoras son: las alteraciones en la morfología y número de espermatozoides, el incremento en la frecuencia de abortos y la esterilidad de individuos expuestos a mutágenos.

B) Infertilidad y aborto.

Referente a estos parámetros, se ha reportado que la exposición de trabajadores a cloruro de vinilo y óxido nitroso empleado como anestésico disminuye la cuenta espermática en ambos casos e incrementa la aparición de anomalías en la morfología del espermatozoide en los primeros. -- También se ha reportado un incremento en la incidencia de abortos en las esposas de individuos expuestos a las 2 sustancias así como también al cloropreno y dibromocloropropeno o los que realizan barnizado de cobre (). En 3 de estas exposiciones ocupacionales se ha evaluado la producción de malformaciones congénitas (anestésicos, barnizado de cobre y cloruro de vinilo) (). A pesar de que no se ha corroborado directamente la existencia de un mutágeno germinal en los seres humanos, los datos mencionados hacen pensar que parte de las enfermedades hereditarias son causa

das por agentes ambientales (tabla 6).

C) Mutaciones en células somáticas y cáncer.

Se ha propuesto que la ocurrencia de mutaciones en células somáticas juega un papel importante en la etiología del envejecimiento, () la diabetes, la arterioesclerosis y el cáncer (216).

El papel que pudieron tener las mutaciones en el desarrollo del cáncer ha sido el más estudiado y se han propuesto diversas teorías a partir de la de Boveri publicada en 1900. (), Los datos epidemiológicos y de laboratorio que se han obtenido en este campo han llevado a proponer - que el cáncer producido por la exposición a sustancias químicas es un proceso multicausal que se lleva a cabo en varias etapas que involucran interacciones entre factores hereditarios y no hereditarios. Los estudios realizados en piel de ratón han mostrado que la conversión de una célula normal en una célula neoplásica requiere de 2 etapas: la iniciación, que involucra cambios irreversibles que por sí mismos no causan el crecimiento neoplásico, y la promoción que comprende cambios permanentes en la proliferación de la célula que originan un patrón de crecimiento neoplásico y la formación de un tumor.

TABLA 6. DAÑO GENETICO EN LA DESCENDENCIA DE VARONES EXPUESTOS POR
CAUSAS OCUPACIONALES_x

OCUPACIÓN Y/O SUSTANCIA	ABORTOS ESPONTÁNEOS	MALFORMACIONES CONGÉNITAS	CÁNCER
GASES ANESTÉSICOS	+ (¹⁰⁷ / ²⁰ 115)	+ (¹⁰⁷ / 113)	- (105)
CLOROPRENO	+ (⁷¹ / 121)		
ESMALTE DE COBRE	+ (122)	- (⁷³ / 123)	
DIBROMOCLOROPROPANO	+ (¹⁰⁰ / 133)		
DIBROMURO DE ETILENO	+ (⁸⁵ / 125)		
HIDROCARBURÓS			+ (142)
PLOMO			+ (145)
SOLVENTES			+ (102)
CORURO DE VINILO	+ (⁷⁰ / 140)	+ (102)	+ (102)

(+) AUMENTO EN LA INCIDENCIA, (-) INCIDENCIA NORMAL

La iniciación tiene un carácter irreversible y se considera que deriva de la ocurrencia de mutaciones que permanecen sin expresarse hasta que bajo la acción de promotores se desencadena el proceso de transformación maligna (/ -). El proceso de carcinogénesis implica no sólo la exposición a un agente sino su interacción con el ADN, la reparación eficiente o ineficiente de la lesión, la fijación tras la replicación del ADN y el desarrollo progresivo de la lesión fijada para dar origen a una célula maligna.

Diversas evidencias ponen de manifiesto el que la alteración del ADN es un evento crítico en la iniciación de la carcinogénesis:

- 1.- La transmisión de las características de malignidad de una generación celular a la subsecuente.
- 2.- La transformación maligna de las células puede ser inducida In vitro por radiaciones, sustancias químicas y virus; estos 3 factores son inductores de mutaciones.
- 3.- Existen síndromes de herencia mendeliana que tienen una mayor propensión al cáncer y que muestran una tendencia inherente a la inestabilidad cromosómica (tabla 7); las personas afectadas tienen una frecuencia mayor de

TABLA 7

ENFERMEDADES GENÉTICAS ASOCIADAS A INESTABILIDAD CROMOSÓMICA (12)

ANEMIA DE CÁNCONI*

ATAXIA TELANGIECTASIA*

SÍNDROME DE BLOOM*

SÍNDROME DE WERNER

SÍNDROME DE CHEDIAK-HIGASHI

AGRANULOCITOSIS DE KOSTMANN

ANEMIA DEFICIENTE EN REDUCTASA DE GLUTATIÓN

SÍNDROME DE BLACKFAN-DIAMOND

SÍNDROME DE FRIERREICH

DISKERATOSIS CONGENITA

INCÓ^NIN^NETIA PIGMENTOSA*

SCLERODERMA

ANEMIA PERNICIOSA

rompimientos y rearrreglos cromosómicos, así como también una susceptibilidad anormal al rompimiento de cromosomas y a la inducción de I.C.H. por agentes físicos y químicos (tabla 8) (1²). Una entidad patológica cromosómica condicional, *el síndrome de Papentesim*, ya que no tiene una frecuencia espontánea de daño genético elevada, mas sí presenta una alta susceptibilidad a la inducción de aberraciones cromosómicas por luz U.V. y una alta incidencia de cáncer de piel, asociadas a deficiencias en el mecanismo de reparación del ADN por escisión. Cabe señalar que si bien estos síndromes no son muy frecuentes y no contribuyen significativamente en la incidencia de cáncer de la población como un todo, sí indican la importancia de las alteraciones cromosómicas en el desarrollo de cáncer así como la importancia de los mecanismos de control genético de la interacción ADN-mutágeno y su consecuencia biológica.

- 4.- Existen varias familias descritas en que la propensión a padecer cánceres diversos es superior a la población general. Se ha propuesto que los heterocigotos para los síndromes de inestabilidad cromosómica pueden contribuir a la agregación familiar del cáncer. De hecho, hay algunas indicaciones de que las células de heterocigotos difieren de las células normales en su respuesta a mutágenos. Las células de algunos heterocigo

TABLA 8. INESTABILIDAD CROMOSOMICA EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN VARIOS PADECIMIENTOS (188)

ENFERMEDAD	Frecuencia espontánea		Susceptibilidad relativa al rompimiento *						
	aberraciones I.C.H. cromosómicas		cromosómico						
			Rayos X	U.V	4NQO	DCMMC	MMC	MMS	MMNG
Xeroderma Pigmentosa	0.17	10.92	0.9	<u>16.6</u>	<u>8.7</u>	<u>15.6</u>	0.9	1	1.2
Anemia de Fanconi	<u>1.10</u>	8.2	1.1	2.8	1.1	2.9	<u>32.3</u>	1.1	1
Ataxia Telangiectasia	<u>0.30</u>	11.59	<u>2.2</u>	—	1.1	—	1	1	—
Síndrome de Werner	0.10	—	0.8	1	1.0	—	0.9	0.8	—
Progeria	0.10	—	1.1	—	1.1	—	1.3	0.9	—
Incontinentia pigmenti	<u>0.26</u>	7.88	—	—	3.2	—	0.7	3.7	—
Disqueratosis congenita	0.10	7.60	1.1	1	1	—	1	—	—
Control	0.06	8.24	1	1	1	1	1	—	1

4NQO 4-nitroquinoleína
 DCMMC decarbomyl mitomicina
 MMC mitomicina
 MMS metilmetano^Sulfonato
 MMNG N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguanidina.

*la susceptibilidad relativa es la razón obtenida entre las aberraciones inducidas por el mutágeno en células del paciente y las aberraciones producidas en células de individuos normales. Los valores subrayados son los anormales significativos.

tos de Ataxia telangiectasia muestran hipersensibilidad a los rayos X (151) y heterocigotos de anemia de Fanconi mostraron ser hipersensitivos a la inducción de I.C.H. por mostaza nitrogenada (152).

5.- Existen padecimientos premalignos que se heredan en forma dominante (tabla 9), como es la poliposis familiar múltiple que se caracteriza por la presencia de pólipos adenomatosos en el colon y recto que aparecen en las jóvenes y con el tiempo se malignizan (53). - En estos padecimientos no se observan alteraciones cromosómicas específicas en el individuo y, sin embargo, se ha reportado que en cultivos de sus fibroblastos de piel se desarrollan alteraciones cromosómicas que usualmente son del tipo de translocaciones e inversiones. Estas observaciones indican que algunas mutaciones dominantes promueven los rearrreglos cromosómicos.

6.- La asociación entre los padecimientos con alteraciones cromosómicas congénitas y los padecimientos malignos es más frecuente que en la población general. En niños menores de 10 años con Síndrome de Down se ha descrito una frecuencia de leucemias 11 veces mayor que en niños normales de la misma edad (54). En pacientes con deleciones de la banda q14 del cromosoma 13 se observa muy frecuentemente retinoblastoma. La

TABLA 9 ENFERMEDADES AUTOSOMICAS DOMINANTES CON
PREDISPOSICION AL CANCERx

POLIPOSIS FAMILIAR

SÍNDROME DE GARDNER

SÍNDROME DE PEUTZ - JEGHER

CARCINOMA DE CÉLULAS NEVOIDES BASALES (sÍNDROME)

PROQUERATOSIS DE MIBELLI

RETINOBLASTOMA

CÁNCER MEDULAR DE TIROIDES TIPO 2B (sÍNDROME)

CARCINOMA COLORECTAL HEREDITARIO

LEUCEMIA INFANTIL FAMILIAR

delección de la banda p13 del cromosoma 11 se asocia con la aniridia-asociada al tumor de Wilm's (198).

Estas observaciones indican que la alteración en el equilibrio del material hereditario (adiciones o delecciones) puede llevar a la producción de tumores específicos.

7.- Las células tumorales, en general, presentan alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, no específicas. En algunos padecimientos malignos se han descrito alteraciones cromosómicas específicas (tabla 10). La primera alteración descrita fue en la leucemia mieloide crónica, en la que en la mayoría de los casos se encuentra un cromosoma 22 con los brazos largos más cortos; a este cromosoma se le llamó "Filadelfia". Al principio se pensó que se debe a una translocación de la porción distal del brazo largo del cromosoma 22 al brazo largo del cromosoma 9.

Recientemente se ha descrito que esta translocación es recíproca y que una porción pequeña del cromosoma 9 se transloca al cromosoma 22 (1). Esta translocación, -
aunada a la detectada en el linfoma de Burkitt, ha llevado recientemente a la proposición de que la translocación de ciertos oncogenes puede alterar su regulación, proveyendo un nuevo elemento que los activa (2) o alternativamente, puede alterar su secuencia codifi-

ALTERACION CROMOSOMICA		NEOPLASIA
46,	22q ⁻ 9q ⁺	Leucemia Mieloide Crónica
46,	13q ⁻ Trans. (13,18), Trans. (13,10)	Retinoblastoma
46,	14q ⁺ Trans. (8,14), Trans. (8,22) Trans. (8,2)	Linfoma de Burkitt
46,	14q12 y 14q32	Ataxia Telangiectasia
47,	21 ⁺	Leucemia Aguda
47,	XXY	Cáncer de Mama
45,	XO, Trans. (6,14)	Cáncer de Ovario
46,	Translocación (8q 21q)	Leucemia Aguda no Linfocítica
46,	Translocación (15q,17q)	Leucemia Promielocítica Aguda
46,	Translocación (8,22)	Meningioma
46,	20q ⁻	Anormalidad en Mieloproliferación
46,	11p ⁻	Aniridia de Willms
46,	12q ⁻	Neurofibromatosis Intestinal
46,	12q ⁻	Neurofibromatosis Intestinal

cante, cambiando su producto proteico de una forma benigna a una forma maligna (10). Como se sabe, los oncogenes constituyen genes normales de las células que tienen un comportamiento anormal al: a) expresarse en el momento inadecuado; b) en las células inapropiadas; c) dar lugar a una cantidad anormal de la proteína codificada por ellos, o d) al propiciar la síntesis de una proteína anormal cuando han sufrido una mutación (11). La activación de genes que son inapropiados para un estado dado de diferenciación celular, se ha puesto en evidencia en tumores inducidos con --- sustancias mutagénicas así como también con virus; - las células afectadas expresan juegos específicos de genes identificables que están inactivados en las células parentales, no transformadas. (12)

Cabe señalar que en la actualidad se está analizando la posibilidad de que la inserción, la transposición y la recombinación de oncogenes estén involucrados en el proceso de la iniciación de la carcinogénesis, *

La relación existente entre mutagénesis y carcinogénesis ha llevado a proponer que las pruebas que detectan mutágenos sean utilizadas para el monitoreo de carcinógenos, considerándose que esas pruebas sirven para identificar los agentes capaces de producir el evento iniciador de la carcinogénesis, es decir la lesión mutagénica, o para detectar -

* (102) así como la activación de oncogenes por carcinógenos (106)...

agentes capaces de producir cáncer por un mecanismo predominantemente genotóxico. Los promotores tumorales escapan de la detección de ensayos convencionales de mutagénesis. El valor predictivo de las pruebas de mutagenicidad para detectar carcinógenos potenciales se ha establecido a partir de estudios de validación en los que se determina la actividad mutagénica de sustancias cuya actividad carcinogénica ya ha sido evaluada mediante estudios de largo plazo en animales de laboratorio o se ha identificado a través de estudios epidemiológicos en poblaciones humanas (principalmente trabajadores expuestos laboralmente o pacientes tratados en forma continua con medicamentos).

Diversas comparaciones de este tipo han sido llevadas a cabo con el sistema bacteriano de Salmonella acoplado a enzimas de la fracción microsomal de células hepáticas. Tales estudios han revelado que existe una coincidencia entre la capacidad de los agentes químicos de producir mutaciones y cáncer en un 60 a 90% de los casos, dependiendo entre otros factores de la naturaleza de las sustancias químicas seleccionadas para el estudio (130).

La inducción de aberraciones genéticas estructurales es también una propiedad común a muchos carcinógenos químicos (132) y recientemente se ha demostrado que algunos carcinógenos que no inducen mutaciones en sistemas bacterianos -

son capaces de causar daño cromosómico en cultivos de células de mamíferos (13), por lo que una combinación entre los sistemas bacterianos y los ensayos cromosómicos es considerada con un valor predictivo para carcinogenicidad mayor que cualquiera de las pruebas aisladas. (13). Una revisión reciente de la International Agency for Research on Cancer (IARC) acerca de la evaluación del riesgo carcinogénico de las sustancias químicas para el hombre concluye que siete procesos industriales y exposiciones ocupacionales y 23 sustancias químicas están asociadas con el cáncer en humanos (tabla 11). De acuerdo con el reporte de la Environmental Mutagen Society (EMS), seis de estas sustancias han mostrado ser inductoras de aberraciones cromosómicas y 6 producen I.C.H. En realidad otros de estos carcinógenos han sido evaluados sin embargo no fueron incluidos por los comités de citogenética de la EMS por considerar que los experimentos no tienen todas las características que deben considerarse para la evaluación de una sustancia. (14)

D) Mutaciones en células embrionarias, teratogénesis y carcinogénesis

La ocurrencia de mutaciones en células embrionarias puede conducir tanto a la muerte embrionaria o perinatal, a productos con anomalías congénitas, así como al cáncer (Esquema 1). Cabe señalar que las alteraciones en el desarrollo (teratogénesis) pueden producirse por la acción de agentes exó

TABLA 11. ACTIVIDAD CLASIFICACION E INTERACCION DE I.C.H.
 POR CARCINOGENOS EVALUADOS EN LINFOCITOS
 HUMANOS. **

COMPUESTO	A.C.	I.C.H.
AFATOXINA	+	+ ^b
4 AMINOBIFENILO		
COMP. ARSENICALES		
ASFESTO		
AURAMINA		
BENCENO	±	-
BENCIDINA		
1 ISCLOROMETIL ETER		
CADMIO	±	
CLORANFENICOL		
CLOROMETIL ETER		
CROMO	+	-
CICLOFOSFAMIDA	+ ^b	+ ^b
DIETILESTILBESTROL		
ISOPROPILOS DERIVADOS DE PETROLIO		
MELFALAN		+
GAS MOSTAZA	+	+
2 NAFTILAMINA		
NIQUEL		
n-N-DISCLOPONAFILAMINA		
OXIMETALONA		
FENACITINA		
FENITOLINA		
RADON		
HOLLIN		
CLORURO DE VINILO	+	

b Con activación metabólica
 + Inductor
 - No inductor
 ± Datos contradictorios

* Reporte IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; Supplement 4, IARC, France p.292,1982.
 ** Report EMS. Environmental Mutagen Society. Se incluyeron en este reporte sólo aquéllos compuestos que fueron evaluados con los criterios establecidos por la misma Sociedad.

genos sobre el ADN (mutagénesis), sobre los procesos de transcripción y traducción del mensaje contenido en él, o sobre los procesos que participan en la diferenciación. Si bien los agentes químicos pueden interferir con el desarrollo normal del embrión a través de la inducción de mutaciones, se ha encontrado que una alta proporción de estos agentes no son mutagénicos y actúan a través de mecanismos no genéticos. (23).

Algunos especialistas consideran que ante el hecho de que no todos los teratógenos son mutágenos, las pruebas de mutagenicidad no son útiles en la detección de teratógenos. Sin embargo, otros autores consideran que ciertas pruebas específicas pueden ser utilizadas en la detección de los teratógenos, como son la inducción de asimetría lateral en las bandas cromosómicas (24) o la inducción de micronúcleos transplacentarios (25).

En cuanto a la posibilidad de inducción de cáncer en embriones, en teoría cualquier sustancia que es capaz de causar cáncer en un adulto y que cruza la placenta puede ser carcinogénica para el embrión. Hasta la fecha el único carcinógeno transplacentario para humanos que ha podido identificarse es el dietilestilbestrol que es una hormona sintética utilizada en la prevención del aborto así como complicaciones por diabetes mellitus; cuando el embrión fe-

menino es expuesto a él durante etapas tempranas del desarrollo puede inducir un adenocarcinoma de vagina durante su ^{f.} juventud y que se detectó por ser un cáncer atípico (de mujeres jóvenes). (84) x En animales de experimentación se han identificado un número importante de agentes que producen cáncer transplacentario (84).

La exposición in utero puede resultar en cáncer e edad temprana; otros dos candidatos a carcinógenos transplacentarios son la difenilhidantoína ^(D.F.H.) y el melfalán. (83) x - Se ha planteado también que la exposición de los padres a sustancias mutagénicas puede ser causante del cáncer en los hijos y de hecho existe evidencia experimental en ratón que muestra que la exposición del ratón a sustancias mutagénicas puede incrementar la frecuencia de cáncer en los descendientes siguiendo una herencia dominante (146) ₂₁₅.

Se ha propuesto que en general los agentes que tienden a causar defectos congénitos tienden a causar cáncer y en uno u otro sistema tienden a ser mutagénicos (). Al respecto cabe señalar que se ha reportado que la D.F.H. es teratogénica inductora de un síndrome característico, -- (78) es carcinogénica en ratones (--), y se ha asociado su administración con la inducción de linfoma en los adultos tratados con la droga Δ y con la inducción de neuroblastoma. (66) (33), mientras que su acción mutagénica ha sido muy discutida. (35) (55)

4.- El Linfocito como Modelo para la Evaluación de Riesgo Genotóxico.

El cultivo de linfocitos humanos como sistema de prueba para evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas ha sido ampliamente utilizado, mostrando ser un sistema adecuado para detectar aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas. Los estudios realizados en los últimos años por Albertini y cols. (3) indican que pronto podrá ser utilizado en la evaluación de mutaciones génicas. Además en el cultivo de linfocitos pueden también determinarse los efectos de las sustancias en la proliferación celular (2, 4, 3)

La ventaja del cultivo de linfocitos como sistema de prueba para la detección de mutágenos se debe a:

1) La facilidad con la que se pueden obtener un gran número de células humanas, ya que cada ml de sangre contiene de $1-3 \times 10^6$ linfocitos.

2) La sencillez de la técnica de cultivo, fijación y obtención de mitosis para análisis.

3) El hecho de que el cultivo de linfocitos constituye un cultivo primario de células humanas, con caracterís

ticas similares a las de las células normales del organismo. A diferencia de lo que ocurre con los cultivos de líneas celulares "permanentes" que adoptan comportamientos de células "transformadas".

4) La población mayoritaria de linfocitos en la sangre se encuentra sincronizada en G_0 y en cultivo ^{a/en} entre división ante el estímulo de agentes mitogénicos.

5) La frecuencia basal de aberraciones e intercambio de cromátidas hermanas en los cultivos de linfocitos es relativamente baja.

6) Ofrece la posibilidad de realizar estudios in vitro en condiciones controladas, en los que se valora el efecto de las sustancias en función de la dosis y el tiempo de exposición.

7) En condiciones de exposición accidental laboral o médica puede valorarse el efecto mutagénico de las sustancias in vivo.

8) Puede utilizarse para determinar aspectos cualitativos y cuantitativos de la interacción del mutágeno con la célula, tanto in vivo como in vitro.

9) Una vez que se ha detectado que una sustancia es mutagénica en una población expuesta, puede ser posible determinar qué niveles de exposición no producen efectos en los cromosomas.

10) Puede utilizarse el linfocito humano para monitorear a las personas expuestas a mutágenos por razones laborales ó accidentales, a dosis que representan un riesgo; ó bien a los individuos que pudieran presentar una mayor - - susceptibilidad al daño genotóxico producido por un determinado compuesto.

El cultivo de linfocitos para la detección de mutágenos presenta también desventajas como son:

1) El linfocito no representa a todas las células del organismo, de hecho normalmente el linfocito no se divide por lo que se ha señalado que los agentes dependientes de la fase "S" del ciclo celular para producir daño, no lo producirán en el linfocito In vivo y así en otras células de proliferación activa (165). También se ha señalado la posibilidad de que el linfocito repare invivo el daño cromosómico mientras no se estimule su división ó In vitro durante la fase G₀ (97, 166). Estas observaciones se ven apoyadas por los estudios de Sasaki y cols. (186) que muestran que la mitomicina y la proflavina producen más aberraciones cuando -

más cerca de la fase "S" se expone a ellas a los linfocitos y menos daño cuando más cerca está el linfocito de G_0 al tiempo del tratamiento.

-> 2) Las células muy dañadas no se dividirán y por lo tanto el daño genético no podrá ser detectado.

-> 3) Una vez en cultivo la población de linfocitos pierde su sincronización y las diferentes subpoblaciones de células pueden presentar una respuesta variante a los mutágenos en los estudios in vitro o seleccionarse el crecimiento de ciertas subpoblaciones menos dañadas, cuando la exposición ocurrió in vivo.

-> 4) Las condiciones en cultivo no reproducen fielmente las condiciones in vivo. Por ejemplo el linfocito transformado tiene una mayor capacidad de reparación ($1/8\phi$) y la exposición a la sustancia in vitro es casi directa, mientras que in vivo los procesos farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) influyen en la biodisponibilidad de la sustancia.

5.- Tipos de Alteraciones Genotóxicas.

A) Aberraciones cromosómicas

La alteración en el número o en la estructura de los cromosomas se conoce como aberración numérica o estructural, respectivamente. Cada tipo de alteración cromosómica tiene a su vez una designación característica. La mayo-

ría de los estudios citogenéticos evalúan el daño en cromosomas mitóticos en metafase. En la tabla 12 se presenta un glosario de los términos y descripciones usados en la definición de aberraciones cromosómicas.

Las aberraciones cromosómicas estructurales se clasifican además de acuerdo al período ⁱ del ciclo celular en el que se forman (tabla 13). En un cromosoma metafásico, se dice que existe un rompimiento cromatídico cuando tiene una cromátida normal y una cromátida rota, mientras que si se habla de un rompimiento cromosómico las dos cromátidas están rotas en el mismo sitio. El mismo tipo de consideración interviene en la descripción de los rearrreglos cromatídicos y cromosómicos. La producción de aberraciones cromosómicas o cromatídicas por un agente dado, depende de la naturaleza del clastógeno y el período ⁱ del ciclo celular en que la célula blanco se encuentra al ser expuesta.

B) Intercambio de cromátidas hermanas.

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es una prueba que ha adquirido importancia recientemente, aunque todavía no se conoce su significado biológico.

El ICH se considera como el intercambio recíproco de ADN entre dos cromátidas a nivel de loci aparentemente homólogos y es fácilmente observable en los cromosomas en metafase (109).

TABLA 12

DEFINICION DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS

- BRECHA CROMATIDICA.**-Es una región acromática en una cromátida y ~~el tamaño de este~~ puede ser igual o más pequeño que el grosor de la cromátida.
- ROMPIMIENTO CROMATIDICO.**-Es una región acromática - en una cromátida y el tamaño ~~de la~~ cual es igual o más grande que el grosor de la cromátida; puede estar alineado o desalineado.
- BRECHA CROMOSOMICA.**-Es una región acromática de ambas cromátidas y ~~el tamaño de este~~ es igual o más pequeño que el grosor de la cromátida.
- ROMPIMIENTO CROMOSOMICO.**-Es una región acromática en ambas cromátidas, pero es más grande que el -- grosor de la cromátida y puede estar alineado o desalineado.
- FRAGMENTO.**-Es una o dos cromátidas sin centrómero - evidente.
- TRANSLOCACION.**-Es una transferencia obvia del material entre dos o más cromosomas.
- TRIPRADIADO.**-Es un desarreglo anormal del conjunto de cromátidas dando por resultado una configuración de tres brazos.
- CUADRIRRADIADO.**-Arreglo en el que un par de crosomas (homólogos o heterólogos) aparecen con sus cromátidas apareadas en una configuración con - cuatro brazos.
- PULVERIZACION DE UN CROMOSOMA.**-Cromosoma con apa- - riencia parcial o totalmente fragmentada.
- PULVERIZACION DE CROMOSOMAS.**-Dos o más cromosomas en una metafase que aparecen total o parcialmen- te fragmentados.
- PULVERIZACION CELULAR.**-^{NUCLEO}Metafase en la cual todos - los cromosomas están totalmente fragmentados.
- REARREGLOS COMPLEJOS.**-Translocaciones que involu- - cran a las cromátidas de muchos cromosomas.
- ANILLOS.**-Cromosomas circulares por la unión de los extremos de sus cromátidas.
- MINUTA.**-Cromosoma de tamaño inferior al de los cromosomas menores del cariotipo normal.
- POLIPLOIDIAS.**-Metafases en las cuales el número - cromosómico es mayor que $2N$, por exceso de lotes de cromosomas iguales o superiores al número - haploide (N).
- ENDORREDUPLICACION.**-Metafase poliploide en las que los cromosomas aparecen apareados.
- HIPERPLOIDIAS.**-Metafase en la cual el número cromosómico es mayor que $2N$ pero no es múltiplo de - N.
- CROMOSOMAS DICENTRICOS.**-Cromosomas provistos de - dos centrómeros.

TABLA 13

SENSIBILIDAD CELULAR A LA ACCION GENOTOXICA DE MUTAGENOS Y OCURRENCIA DE ABERRACIONES EN FUNCION DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR (6)

FASE	"G ₁ "	"S"	"G ₂ "	"M"
EVENTOS	Síntesis Proteica	Replicación del ADN	Síntesis Proteica	Segregación Cromosómica
CONTENIDO RELATIVO DE ADN	1	1 -- 2	2	2 -- 1
TIPOS COMUNES DE ABERRACIONES OBSERVADAS *	-Rompimientos Cromosómicos -Anillos -Translocaciones -Delección -Dicéntricos -Fragmentos	Mixtos	-Rompimientos Cromatídicos -Cuadrirradiados -Trirradiados -Fragmentos	Mitosis multipolares
SENSIBILIDAD RELATIVA HACIA LOS EFECTOS GENOTOXICOS	Baja	Alta	Moderada	Baja

* Estas aberraciones son los tipos observados en G₁, S y G₂ y se cuentan en la primera metafase (M₁), Si las células se cuentan en M₂ ó M₃ el tipo de aberraciones observadas son mixtos.

El proceso de intercambio involucra probablemente - rompimientos, recombinación y reunión del ADN, aunque se sa be poco acerca de sus bases moleculares. A pesar de ésto, el ICH se ha empleado en el estudio de la estructura del - cromosoma y de los sistemas de reparación del ADN mediante el empleo de células de pacientes afectados por síndromes en los que se encuentran deficiencias en dichos sistemas (27).

Este método se basa en la obtención de cromosomas con cromátidas químicamente diferentes, lo cual se logra in corporando 5-bromodeoxiuridina (BrdU), que es un análogo de la base nitrogenada ^r Timina a la que sustituye en la molécula de ADN durante la replicación semiconservativa.

Si las células se cultivan en presencia de BrdU, du rante el primer ciclo celular cada cadena de la doble hélice del ADN sintetiza su cadena complementaria incorporando esta base. Durante la primera mitosis, las cromátidas hermanas no se distinguen entre sí por tener la misma composición química, o sea, un filamento parental no substituido y uno que sí contiene BrdU. Después del segundo ciclo celular, y por lo tanto de una segunda síntesis de ADN, cada ca dena de ADN de un cromosoma servirá a su vez de molde a copiar con lo que se obtendrán dos tipos de cromátidas: en - una existirán, como en la mitosis previa, dos cadenas quími

camente distintas, mientras que en la otra ambas cadenas tendrán BrdU en lugar de timina. En esta metafase las cromátidas hermanas del cromosoma serán químicamente diferentes, lo que se puede poner de manifiesto por la tinción que dan ambas cromátidas - cuando se agrega fluorocromo Hoechst 33258. Los cromosomas teñidos de esta manera muestran una cromátida con fluorescencia más intensa o más oscura si se usa la tinción de Giemsa y que corresponde a la que tiene sólo un filamento remplazado con BrdU mientras que la otra, en la que la fluorescencia es menor (más clara con Giemsa), es la que contiene BrdU en ambos filamentos. (107)

Los estudios realizados por diversos grupos (¹⁴² 203) muestran que varios clastógenos fuertes son capaces de inducir un incremento en el ICH por lo que esta técnica se empezó a utilizar en la detección de mutágenos tanto in vivo (170) como in vitro - (171). Los primeros estudios indicaron que la prueba tenía un alta sensibilidad, ya que se requerían concentraciones mucho menores de una sustancia para inducir ICH que para producir aberraciones cromosómicas. Estudios posteriores han mostrado que esta alta sensibilidad, se presenta en la mayoría de los casos cuando se usan agentes alquilantes, mas no para otros agentes. En la Tabla 14 se presentan algunos de los agentes cuya actividad inductora de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas ha sido valorada en linfocitos humanos expuestos ya sea in vivo o - en cultivo (in vitro) al agente.

TABLA 14

AGENTES INDUCTORES DE I.C.H. Y A.C. EN LINFOCITOS
HUMANOS (62)

Inductor potente de I.C.H. Inductor regular de I.C.H. Inductor débil o no inductor

Inductor potente de A.C.	C.C.N.U. Ciclofosfamida Metil - C.C.N.U.			IN VIVO
	Ciclofosfamida Busulfán Thiotepa-trinemom-cloram- bucil Estireno Oxido de estireno	Cromato de plomo Adriamicina Mostaza nitrogenada	Bleomicina Citosina arabinosa Furazolidona Sulfato de Hidroxiquina- leína	IN VITRO
Inductor Regular de A.C.		Arsénico Cistianina Epiclorhidrina Metoxipsoralen + UV	Solvente de goma	IN VITRO
Inductor débil o no Inductor de A.C.		Glutati6n Tremetoxipsoralen + UV Khellin + UV		IN VITRO

U.V. Luz ultravioleta
C.C.N.U. 1-(2 cloroetil 3-ciclohexil 1-nitrosourea)
Potente Frecuencia observada 5 veces mayor que el valor basal
Regular Frecuencia observada 2 veces mayor que el valor basal
Débil Frecuencia observada 2 veces menor que el valor basal,
pero que el autor reporta como significativo.

g) Cinética de Proliferación Celular.

El desarrollo de la técnica de tinción diferencial, basada en la incorporación de BrdU en el ADN, ha permitido la identificación de células en metafase que han replicado una, dos o más veces haciendo posible el examen de la cinética de poblaciones celulares en división. En el cultivo de linfocitos ha podido demostrarse la presencia de subpoblaciones y determinarse el tiempo del ciclo celular (40), el cual puede variar en función de: las condiciones de cultivo (41), la edad de los donadores (41) y la adición de ciertos agentes químicos (42).

Estudios recientes indican que la cinética de la proliferación celular en los cultivos in vitro puede también ser alterada por la exposición de los linfocitos in vivo a fármacos administrados experimental o terapéuticamente. Es así que Du Frain ^{et al.} ^{col} (45) reportan un ligero alargamiento del ciclo celular en linfocitos de conejos tratados con ciclofosfamida y Gebhart ^{et al.} (46) encuentran que en cultivos de linfocitos de pacientes antes de que reciban terapia con agentes citostáticos hay un 25% de metafases en primera división y el 75% restante corresponde a segundas o subsecuentes generaciones. Mientras que después de la terapia se encontró un 60% de metafase en primera división.

Se ha reportado también que la alteración de la duración del ciclo celular altera la frecuencia de I.C.H. (47) por lo -

IV RESULTADOS

A) Valores Basales observados en Cultivos de Individuos Control.

Las tablas 16 y 17 muestran la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas en las células en metafase procedentes de cultivos de linfocitos de 17 donadores sanos - (véase material y métodos); 11 mujeres en la tabla 16 y 6 hombres en la tabla 17. Se observó una frecuencia promedio de 2.79 ± 2.0 células aberrantes en los 17 individuos, de 3.04 ± 1.59 en las 11 mujeres y de 2.08 ± 2.15 en los 6 - hombres. Fundamentalmente se observaron rompimientos cromatídicos y algunos isocromatídicos; también encontramos 5 rearreglos, 2 dicéntricos (en 2 individuos), traslocación (en 1 individuo) y 2 tetrarradiados (en 1 individuo).

En las tablas 16 y 17 también se presenta el promedio de intercambio de cromátidas hermanas (I.C.H.) en cada individuo control. El valor promedio de todos los individuos estudiados fue $5.57 \pm .005$, de 5.58 ± 1.27 en las mujeres y de 5.57 ± 1.48 en los hombres. Con respecto a aberraciones 2 individuos mostraron valores estadísticamente diferentes a los demás ($p < 0.05$). En los individuos en los que se hi

TABLA 16. AÑO TOC EN NÚMERO DE CONTROLES

INDIVIDUO	FECHA	TIEMPO DE CULTIVO	% CELULAS ABERRANTES	Nº DE ROMP/ 100 CELS.	Nº DE REARREGLOS/ 100 CELS.	\bar{X} I.C.H.
P.O.	9/III/81	72 HRS.	3	3	0	5.28 ± 2.3
P.O.	18/V/81	48 HRS.	3	2	1	4.7 ± 3.6
P.O.	28/VI/82	72 HRS.	5	5	0	7.6 ± 2.8
P.O.	13/IX/82	72 HRS.	4	4	0	6.4 ± 2.6
P.O.	30/VII/84	48 HRS.	2	2	0	4.08 ± 1.1
P.O.	14/IX/84	48 HRS.	3	0	0	6.0 ± 2.6
L.A.	28/IX/81	48 HRS. 72 HRS.	4 3	0	0	5.6 ± 2.0 3.6 ± 1.4
L.A.	16/XI/81	72 HRS.	2	2	0	5.8 ± 2.0
L.A.	8/II/82	48 HRS. 72 HRS.	5 3	0	0	5.0 ± 1.6 6.0 ± 1.9
R.G.	28/VI/82	72 HRS.	4	4	0	6.9 ± 1.8
R.G.	10/IX/82	72 HRS.	3	3	0	4.4 ± 2.4
L.T.	18/V/81	48 HRS.	1	1	0	3.6 ± 1.7
R.E.	18/V/81	48 HRS.	2	1	1	4.72 ± 1.7
T.A.	10/VIII/81	48 HRS.	1	1	0	5.6 ± 2.4
T.A.	24/VIII/81	48 HRS.	2	2	0	5.96 ± 2.6
C.C.N.	1/XII/81	48 HRS. 72 HRS.	2 1	2 1	0 0	3.8 ± 2.0 3.8 ± 3.5
M.D.	28/VI/82	72 HRS.	8	8	2 R.A.	7.0 ± 3.5

M.D.	11/IX/82	72 HRS.	5	5	0	7.8 ± 3.4
M.A.	19/XI/84	48 HRS.	4	3	T	5.80 ± 2.6
M.C.	12/II/85	48 HRS.	2	1	Dic.	5.48 ± 1.9
M.C.	25/VI/85	72 HRS.	-	-	-	6.3 ± 1.4
M.C.	6/III/85	48 HRS.	3	3	0	5.5 ± 2.0
R.M.	31/I/85	48 HRS.	-	-	-	8.4 ± 1.9

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.

TABLA 17 DADO CITOGENETICO EN HOMOBRES-CONTROLADO

INDIVIDUO	FECHA	HRS CULTIVO	% CELS ABERRANTES	No. ROMP/ EN 100 CELS.	No REARRE GLOS/100 CELS.	\bar{X} ICH.
J.E.	4/8/80	48 HRS. 72 "	1 5	1 5	0 0	8.32 ± 2.2 4.2 ± 3.2
J.E.	20/7/81	48 HRS.	1	1	0	8.45 ± 4.0
J.E.	9/II/82	48 HRS. 72 HRS.	1 2	1 2	0 0	5.8 ± 2.4 5.6 ± 2.2
J.E.	16/XI/82	72 HRS.	2	1	DIC	5.25 ± 2.0
G.G.	18/V/81	48 HRS	2	2	0	5.4 ± 2.2
S.M.	20/X/81	48 HRS	3	3	0	5.4 ± 2.6
H.N.	1/XII/81	48 HRS. 72 HRS.	3 2	3 2	0 0	3.6 ± 1.8 4.3 ± 4.4
A.V.	10/V/82	72 HRS.	3	3	0	4.0 ± 2.3
P.A.	6/V/85	72 HRS.	9	9	0	5.0 ± 2.1

* VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.

cieron varios muestreos no se encontraron diferencias intraindividuales significativas. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas por el tiempo de cultivo, ni entre sexos.

Para los valores de I.C.H. no se encontraron diferencias entre individuos en los tiempos de cultivo, ni tampoco entre sexos. En las tablas 18 y 19 se presentan los datos de cinética celular y el índice de replicación obtenido a partir de los datos de dicha cinética (63^a). La tabla 18 corresponde a 48 horas de cultivo, mientras que la tabla 19 corresponde a 72 horas. A 48 horas de cultivo los valores promedio de la cinética de proliferación celular fueron 55% 1^{as}, 42.6 2^{as} y 2.41 3^{as} divisiones, mientras que a 72 horas de cultivo se obtuvieron 30.7% 1^{as}, 29.1% 2^{as} y 40.2% 3^{as} divisiones; los índices de replicación fueron $1.39 \pm .098$ y $1.82 \pm .42$ respectivamente. Los datos individuales de proliferación son variables y se detectan diferencias individuales estadísticamente significativas.

B) Efectos Genotóxicos de la Dehidroemetina.

Esta droga adicionada a los cultivos de linfocitos mostró

TABLA 18. CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN DEFECTOS HOMÓLOGOS

EN CULTIVOS DE 48 HRS. DE INDIVIDUOS CONTROLES.

INDIVIDUO	FECHA	SEXO	DIVISION CELULAR (%)			I.R.
			1a.	2a.	3a.	
P.O.	30/VII/84	F	54	44	2	1.48
P.O.	14/IX/84		81	18	1	1.20
L.A.	28/IX/81	F	76	24	-	1.24
L.A.	8/II/82		71	27	3	1.34
M.C.	12/II/85	F	58	42	-	1.42
M.C.	6/III/85		58	42	-	1.42
R.M.	31/I/85	F	66	34	0	1.34
CCN	1/XII/81	F	63	29	8	1.45
J.E.	4/VIII/80	M	58	39	3	1.45
M.N.	1/XII/81	M	35	57	0	1.49
S.M.	20/X/81	M	58	32	10	1.52
M.A.	19/XI/84	F	66	32	2	1.36

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.

TABLA 19. CINETICA DE LA PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCITOS
HUMANOS EN CULTIVOS DE 72 HRS. DE INDIVIDUOS CONTROLES

INDIVIDUO	FECHA	SEXO	DIVISION CELULAR (%)			I.R.
			1as.	2as.	3as.	
P.O.	28/VI/82	F	48	29	23	1.75
P.O.	13/IX/82		12	48	40	2.28
P.O.	6/V/85		17	25	56	2.35
L.A.	28/IX/81	F	21	32	47	2.26
L.A.	16/XI/81		27	27	56	2.49
L.A.	8/II/82		19	27	56	2.41
R.G.	28/VI/82	F	38	32	30	1.92
R.G.	10/IX/82		48	26	26	1.78
M.D.	28/VI/82	F	49	26	25	2.26
M.D.	11/IX/82		35	34	31	1.96
M.C.	25/VI/85	F	48	35	17	1.69
R.M.	14/V/85	F	45	35	23	1.84
C.C.N.	1/XII/81	F	14	18	68	2.54
J.E.	4/VIII/80	M	20	28	49	2.23
H.N.	1/XII/81	M	8	17	65	2.37
A.V.	10/V/82	M	39	40	21	1.82
P.A.	6/V/85	M	20	28	52	2.32

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.

ser clastogénica observándose una relación dosis-respuesta (tabla 20). La actividad clastogénica fue mayor cuando la exposición a la dehidroemetina fue de 72 horas. La dosis mínima capaz de producir aberraciones estadísticamente significativas fue de $2.2 \times 10^{-11} \text{ M}$ ($0.012 \text{ } \mu\text{g/ml}$).

El medicamento mostró ser muy tóxico ya que inhibió la proliferación celular lo que se refleja en un incremento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de células en primera división. Concentraciones de alrededor de 10^{-10} M fueron capaces de inhibir totalmente la capacidad proliferativa de los linfocitos in vitro, mientras que concentraciones de $1.1 \times 10^{-11} \text{ M}$ ($.006 \text{ } \mu\text{g/ml}$) son inhibitoras en un 50% de la división celular (tabla 21).

En la dosis en las que aún se obtuvieron células en 2a. división, indispensables para la evaluación de I.C.H. no se observó una inducción de intercambios.

C) Efectos Genotóxicos del Difosfato de Cloroquina.

Este medicamento incrementó ligeramente la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales.

TABLA 20. EFECTOS CITOGENETICOS DE LA DEHIDROEMETINA EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.

TIEMPO DE EXPOSICION		A DE CELULAS ADERRANTES			\bar{x} DE I.C.H.			
DONADOR								
CONCENTRACION								
MX10 ⁻¹⁰	ug/ml							
0	0.1	1.0	1.0	2.5	0.3 ± 3.5	5.3 ± 2.05	5.9 ± 2.86	
.054	0.003	1.0	1.0	-	8.6 ± 3.6	-	-	
.11	0.006	3.0	3.0	5.0	9.2 ± 3.1	5.4 ± 1.57	5.5 ± 1.6	
.22	0.012	5.0	6.0	11.0 ^a	10.7 ^a ± 2.2	N.S.M.	6.5 ± 1.87	
.43	0.024	6.0	N.S.M.	14.0 ^a	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	
.86	0.048	12.0 ^a	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	
1.0	0.06	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	

* Promedio sobre 17 células

VER CUADRO DE SIGNOS Y APREVIATURAS.

TAJZA 21.

EPICTO DE LA DEHIDROMETINA EN LA CINETICA DE LA
PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCIDOS HUMANOS EN CULTIVO.

TIEMPOS DE CULTIVO		48 horas				72 horas				72 horas											
TIEMPOS DE EXPOSICION		48 horas				24 horas				72 horas											
DONADOR		J.E.		J.E.		P.A.		P.C.		J.E.											
PROLIFERACION CELULAR		las.	2as.	3as.	I.R.	las.	2as.	3as.	I.R.	las.	2as.	3as.	I.R.								
CONCENTRACION																					
M X 10 ⁻¹⁰ ug/ml																					
0	0.000	72	28	0	1.23	42	54	4	1.62	20	28	52	2.32	17	25	56	2.35	15	72	72	2.6
.054	0.003	86	14	0	1.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.11	0.006	90	10	0 ^B	1.10	67	32 ^B	1	1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	26	42	32 ^B	2.1
.22	0.012	94	6	0 ^B	1.06	100	0 ^B	0	1.00	29	30	41	2.12	28	32	40	2.12	30	25	41 ^B	2.1
.43	0.024	99	1	0 ^B	1.01	N.S.M.	-	-	0.0	41	45	14 ^B	1.73	45	45	10 ^B	1.65	100	0	0	0.0
.86	0.048	47	0	0 ^B	0.47*	N.S.M.	-	-	0.00	N.S.M.	-	-	0.0	N.S.M.	-	-	0.00	N.S.M.	-	-	0.0
1.0	0.06- ₀	-	-	-	0.0	N.S.M.	-	-	0.0	N.S.M.	-	-	-	-	-	-	-	N.S.M.	-	-	0.0

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABBREVIATURAS

* S61o ne obtuvieron 47 mitosis

En las cinco ocasiones en que fue evaluado se observaron relaciones dosis-respuesta que mostraron significancia estadística sólo en uno de los estudios a 48 hrs y en las 2 evaluaciones a 72 hrs ($p < .05$), (tabla 2¹). La dosis mínima que produjo aberraciones con significancia estadística fue de $1.7 \times 10^{-8} M$ ($6.2 \mu g/ml$).

En un individuo muestreado en 2 ocasiones con exposiciones hasta de $6.3 \times 10^{-8} M$ ($20 \mu g/ml$) de cloroquina durante las 72 horas de cultivo no se detectó alteración de la cinética de proliferación celular, sin embargo, en los cultivos del mismo individuo con 48 horas de exposición, y en los demás individuos evaluados, dosis promedio de $3 \times 10^{-8} M$ ($10 \mu g/ml$) inhiben la proliferación de las células, (tabla 2³ y 2⁴).

Aún en las dosis más altas en las que se obtuvieron células en 2a. división no se detectó inducción de I.C.H. - - tabla 2¹).

D) ~~Niclosamida~~ ^a Efectos Genotóxicos de la Niclosamida.

La niclosamida adicionada al iniciarse los cultivos y mantenida en ellos hasta su cosecha a las 72 horas, mostró

TABLA 22. EFECTOS CITOGENETICOS DEL DIFOSFATO DE CLOROQUINA
EN LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO.

TIPO DE EXPOSICION	DE ABERRACIONES						X I.C.H./METAFASE				
	48 horas			72 horas			48 horas		72 horas		
	L.A.	L.A.	H.C.	L.A.	L.A.	L.A.	L.A.	H.C.	L.A.	L.A.	
CONCENTRACION $\times 10^{-8}$ ug/ml											
-	0	4.0	9.5	3.0	1.0	3.0	6.0 ± 1.3	4.2 ± 1.07	5.5 ± 1.6	3.0 ± 1.8	6.0 ± 1.5
.062	0.2	4.0	6.0	-	3.0	5.0	4.0 ± 1.6	5.5 ± 1.8	-	6.5 ± 2.3	5.3 ± 1.73
.62	2.0	7.0	8.0	-	6.0	6.0	H.S.M.	4.32 ± 2.1	-	6.7 ± 2.1	5.0 ± 1.4
1.7	6.2	-	-	9.0 ^B	-	-	-	-	5.8 ± 1.3	-	-
3.1	10.0	-	9.0	-	-	11.0 ^B	-	4.66 ± 1.9	-	-	5.9 ± 2.3
3.9	12.4	-	-	9.0 ^B	-	-	-	-	7.12 ± 1.2	-	-
5.1 ^A	18.6	-	-	10.0 ^B	-	-	-	-	6.7 ± 1.4	-	-
6.3	20.0	8.0	10.0	-	12.0 ^B	12.0 ^C	-	5.0*	-	5.0 ± 1.8	0.30 ± 2.1

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABBREVIATURAS.

*Valor obtenido en 17 células

TABLA 20. EFECTO DEL DIFOSFATO DE CLOROQUINA EN LA CINÉTICA DE PROLIFERACION CELULAR DE LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVOS DE 48 HORAS.

DONADOR		1				2				3				4							
PROLIFERACION CELULAR		1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.				
CONCENTRACION																					
$\text{Mx}10^{-8}$	ug/ml																				
0	0.0	76	24	0	1.24	65	34	1	1.36	83	16	1	1.16	66	34	0	1.34	58	42	0	1.42
.062	0.2	78	22	0	1.22	46	52	2	1.56												
0.62	2.0	100	0	0 ^s	1.00	38	60	2 ^s	1.64												
1.9	6.2															66	34	0	1.34		
3.1	10.0					44	52	4 ^s	1.60												
3.9	12.4									80	11	0	1.11	94	6	0 ^s	1.06	87	11	2 ^s	1.15
5.8	18.6																	87	3	0 ^s	1.13
6.3	20.0	50	0	0	0.50	90	6	1 ^s	1.05												
7.8	25.0									97	3	0 ^s	1.03	29	1	0 ^s	0.31	91	0	1 ^s	1.10
11.7	37.5									79	1	0	0.81		N. H.		0.0 ^s				
15.6	50.0									39	0	0	0.39								

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS

Tabla 24. Efecto del difosfato de cloroquina en la cinética de proliferación celular de linfocitos humanos en cultivos de 72 hrs.

DONADOR	I.F.				I.A.				D.F.				J.F.			
	1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.	1as.	2as.	3as.	I.R.
PROLIFERACION CELULAR																
CONCENTRACION: N $\times 10^{-8}$ / μ g/ml																
0	15	24	61	2.40	17	27	56	2.39	42	35	23	1.81	21	26	54	2.35
.002	0.2	7	22	2.69	12	31	57	2.45	-	-	-	-				
.62	2.0	0	20	2.62	13	26	61	2.5								
1.0	6.2								42	35	23	1.81	23	20	42	2.25
3.1	10.0				14	32	54	2.4					20	13	38	2.09
3.0	12.4								27	11	2 ^{II}	0.55				
5.8	18.6								N.F.H.			0.60				
6.3	20.0	14	34	51	2.61	17	31	52	2.35				42	29	29 ^{II}	1.67

VER CUADRO DE UNOS Y ABBREVIATURAS.

ser muy citotóxica y no se obtuvo ninguna mitosis, por lo que no se describe este tratamiento en material y métodos. Pulsos de 2 horas de la droga adicionada 24 horas después de iniciada la incubación indujeron un leve efecto clastogénico en una de las muestras de sangre (donador R.G.). La dosis más alta que aún permitió la proliferación celular fue de $1.2 \times 10^{-8} \text{M}$ (4 $\mu\text{g/ml}$). En otras dos muestras de sangre (donadoras P.O. y M.D.) la misma dosis inhibió las mitosis y fue citotóxica (tabla 28). En presencia de la fracción metabólica "S9" la droga antihelmíntica mostró un aumento, en relación con la dosis, en su clastogenicidad en 2 muestras de sangre (donadoras L.A. y R.G.). La respuesta en los linfocitos de los otros 2 donadores varió; en el donador P.O. no se observó ningún efecto, mientras que en el donador M.D. sólo una dosis [$1.8 \times 10^{-8} \text{M}$ (6 $\mu\text{g/ml}$)] produjo un incremento en células anormales (tabla 25). Las lesiones inducidas predominantemente por la niclosamida fueron rompimientos cromatídicos; también se observaron aberraciones más severas como son pulverizaciones, principalmente en las dosis máximas toleradas (tabla 26). El análisis estadístico de regresión (r^2) mostró que el ligero aumento obtenido en la muestra de R.G. en ausencia de la mezcla "S9", es estadísticamente negativo ($p < 0.05$)

TABLA 25.

% CELULAS ABERRANTES EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS
DESPUES DE 2 HORAS DE EXPOSICION A NICLOSAMIDA
Y CICLOFOSFAMIDA.

Donador		% CELULAS ABERRANTES			
Tratamiento		L.A.	R.G.	P.O.	M.D.
Mx 10-8	ug/ml				
0	0	2	3	4	5
.61		-	4	3	N.S.M.
1.2	Niclosamida	4	6	N.S.M.	N.S.M.
1.8		6	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.
.61		2	4	6	3
1.2	Niclosamida	4	12 ^S	7	6
1.8	+	6	33 ^S	11 ^S	5
2.4	S9	8	49 ^S	23 ^S	2
Ciclofosfamida					
.72	+	4	N.S.M.	16	15
	S9				10

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS

TABLA 26. TIPOS DE ABERRACIONES EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS DESPUES DE 2 HRS. DE EXPOSICION A NICLOSAMIDA Y CICLOFOSFAMIDA.

DONADOR		L.A.			R.G.			P.O.			M.D.			
Mx10 ⁻⁸	Tratamiento	ROMP.	Ra	P	ROMP.	Ra	P	ROMP.	Ra	P	ROMP.	Ra	P	
	µg/ml													
-		0	2	0	0	3	0	0	4	0	0	6	0	0
.61	Niclosamida	2	-	-	-	5	0	0	3	0	0	N.S.M.	N.S.M.	N.S.
1.2		4	-	-	-	6	0	0	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.M.	N.S.
1.8		6	-	-	-	N.S.M.	N.S.							
.61	Niclosamida	2	3	1	0	6	0	0	4	0	0	5	0	0
1.2	+	4	8	0	4	8	0	0	9	0	0	6	0	0
1.8	S9	6	27	0	6	13	0	0	5	0	0	6	3	4
2.4		8	40	0	9	10	0	15	2	0	0	4	0	0
Ciclophosphamida.														
.72	⁺ S9	4	F.C.	F.C.	F.C.	11	1	4	24	1	0	12	2	0

VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS

al igual que los datos de P.O. y M.D. en presencia de "S9". Mientras que los datos obtenidos con la sangre - de L.A. y R.G. muestran una curva dosis-respuesta estadísticamente significativa.

Sólo en los linfocitos del donador L.A. (tabla 27) se observó una débil inducción en relación a la dosis de I.C.H. significativa en el análisis de varianza de la curva de regresión (β'). En las demás muestras la ni closamida no indujo I.C.H.

Los resultados de los cultivos expuestos a ciclofosfamida, que fue el control positivo en nuestros experimentos, mostraron un incremento notorio en células aberrantes y en I.C.H. Sin embargo, se observó cierta variabilidad con respecto a la magnitud de los efectos en las diferentes muestras de sangre, con un rango de 2 a 5.3 veces las frecuencias basales de aberraciones y de 3.5 a 6 los valores basales de I.C.H., significativos estadísticamente en todos los casos.

En cuanto a la cinética de proliferación celular, el -- efecto fue muy drástico ya que dosis de $2.4 \times 10^{-8} M$ (8 $\mu g / ml$) no permitieron la proliferación celular, lo que se

TABLA 27. FRECUENCIA DE I.C.H. EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS
DESPUES DE 2 HRS. DE EXPOSICION A NICLOSAMIDA Y
CICLOFOSFAMIDA

Tratamiento	Donador	L.A.		R.G.		P.O.		M.D.	
		\bar{X}	I.C.H. rango	\bar{X}	I.C.H. rango	\bar{X}	I.C.H. rango	\bar{X}	I.C.H. rango
$M \times 10^{-8}$	ug/ml								
0	0	6.0	\pm 2.7 2-16	4.4	\pm 2.4 1-9	6.4	\pm 4.3 3-14	7.8	\pm 3.9 3-19
	niclosamida								
.61	2	-		4.1	\pm 2.1 3-10	6.5	\pm 3.3 3-11	N.S.M.	
1.2	4	-		6.1	\pm 3.2 1-11	N.S.M.		N.S.M.	
1.8	6	-		N.S.M.		N.S.M.		N.S.M.	
	niclosamida								
.61	2 + S9	8.5	\pm 2.6 4-17	5.1	\pm 2.3 1-10	6.1	\pm 2.3 1-15	6.5	\pm 3.6 2-16
1.2	4	9.0	\pm 3.8 2-18	4.8	\pm 2.2 2-11	8.9	\pm 3.2 4-17	6.5	\pm 3.4 2-16
1.8	6	12.2	\pm 5.4 5-23	5.0	\pm 2.1 1-9	8.2	\pm 3.9 2-14	12.6	\pm 6.8 3-19
2.4	8	14.7	\pm 6.0 3-30	*7.8	\pm 2.9 1-17	8.4	\pm 3.6 5-18	9.3	\pm 4.6 3-19
	ciclofosfamida								
.72	4 +S9	F.C.		26.5	\pm 9.3 9-50	29.8	\pm 9.4 15-48	27.8	\pm 12.4 10-50

* En 18 células

TABLA 28. EFECTOS DE LA NICLOSAMIDA + S9 EN LA
 GENETICA DE PROLIFERACION CELULAR DE
 LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO DE 72
 HORAS.

DONADOR	L.A.				R.G.				P.O.W.				M.D.				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.	
PROLIFERACION CELULAR	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.R.	1 ^a	2 ^a	3 ^a	I.	
TRATAMIENTO	27	27	56	2.5	30	32	30	1.9	40	29	23	1.75	49	26	15	1	
DMSO + S9	30	37	33	2.03	34	43	23	1.9	50	31	19	1.7	55	32	13	1	
NICLOSAMIDA																	
M X 10 ⁻⁸ ug/ml																	
0.61	2	37	32	31	1.94	28	41	31	2.03	37	39	24	1.63	55	27	18	1
1.24	4	68	26	6 ^S	1.38	31	33	36	2.05	33	36	31	1.77	60	25	15 ^S	1
1.8	6	58	38	4 ^S	1.46	44	44	12	1.7	42	36	22	1.8	46	30	24	1
CICLOFOSFAMIDA																	
+ S9	-	-	0		77	14	9	1.23	48	29	23	1.75	66	22	12	1	
1.1 X 10 ⁻⁸ M 6 ug/ml																	

*VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS

reflejó en el hecho de que en ninguno de los individuos se obtuvieron suficientes mitosis para el análisis. Sin embargo, dosis un poco menores de $1.8 \times 10^{-8} M$ (6 μ g/ml) no alteraron notoriamente la proliferación de las células: en 2 donadores (R.G. y P.O.) sólo se observa un retraso en el ciclo, significativo ($p < .05$) en el caso de L.A. y en el de M.D.; ^(Tabla 28) pero en este último, la dosis inhibidora de la proliferación es una dosis intermedia y la dosis siguiente que es mayor muestra un ciclo muy similar al control, lo que pone en duda el que haya un efecto real.

"In vivo". En la mayoría de los cultivos de linfocitos de los 5 pacientes infestados con Hymenolepis nana, fue difícil obtener un número suficiente de buenas metafases, sin embargo, como se hicieron varios cultivos, en 4 de los pacientes fue posible identificar 100 metafases, analizables. El porcentaje y el tipo de aberraciones observadas en 4 de los pacientes antes del tratamiento (tabla 29) fue similar a los valores obtenidos en cultivos de individuos controles. (tablas 1⁶ y 1⁷). Uno de los pacientes R.R.G. sin embargo, mostró una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas antes del tratamiento, descubriéndose que un mes antes el sujeto había estado hospitalizado por una severa intoxicación. En 3 de los pacientes después de haber terminado el tratamiento, se observó

TABLA 29. PORCENTAJE DE CELULAS ABERRANTES EN LINFOCITOS HUMANOS ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO DE NICLOSAMIDA

Paciente	ANTES DE TRATAMIENTO					DESPUES DEL TRATAMIENTO			
	Metafases	3 Celulas				Metafases	3 Células		
	Evaluadas	Aberrantes	Romp.	Ra	P	Evaluadas	Aberrantes	Romp	Ra
R.R.G.	100	11	13	1	0	53	15	7	0
R.M.S.L.	100	3	3	0	0	100	11 ^S	12	2
J.H.C.	100	2	3	0	0	100	8 ^S	9	0
L.A.	100	5	5	0	0	100	10 ^S	10	1
M.T.S.L.	100	2	1	1	0	100	3	4	0

* VER CUADRO DE SIGNOS Y ABREVIATURAS.

TABLA 30. FRECUENCIA DE I.C.H. EN LINFOCITOS HUMANOS ANTES
Y DESPUES DE TRATAMIENTO CON NICLOSAMIDA

Paciente	Antes de Tratamiento		Después de tratamiento	
	\bar{X} ICH/Metafase	Rango	\bar{X} ICM/Metafase	Rango
R.R.G.	6.0 \pm 4.6	1-12	5.8 \pm 2.6	2-12
R.M.S.L.	6.3 \pm 4.8	1-15	4.5 \pm 5.3	0-8
H.C.	3.4 \pm 5.1	1-10	4.4 \pm 2.3	2-8
L.A.	5.7 \pm 4.1	2-11	5.1 \pm 3.0	2-12
T.S.L.	N.S.M.		5.0 \pm 3.4	1-14

*VER CUADRO SIGNOS Y ABREVIATURAS.

un aumento significativo en las células aberrantes que fluctuó entre 2 a 4 veces los valores antes del tratamiento.

No se observó un aumento en los otros 2 pacientes (R.R. G y M.T.S.C.).

Los valores de I.C.H. antes del tratamiento están dentro de el rango de los controles (tabla 17 y 18), no observándose un incremento en sus valores después del tratamiento (tabla 3^o).

E) *Efectos Genotóxicos del*
Ketoconazol.

Los linfocitos de 2 donadores expuestos "in vitro" a ^k Ketoconazol en diferentes ocasiones mostraron que dosis de $2 \times 10^{-4} M$ (.100 mg/ml) inhiben totalmente la proliferación de los linfocitos, dosis de $6.0 \times 10^{-6} M$ (.003 mg/ml) muestran la acumulación significativa de células en primera división. Llama la atención la producción de aberraciones cromosómicas tan solo en uno de los donadores. Se detecta una clastogenicidad altamente significativa de la droga desde dosis de $6.0 \times 10^{-6} M$ (.003 mg/ml) que se incrementa con $12 \times 10^{-6} M$ (.006 mg/ml), sin embargo ^{se} mantiene más o menos estable con las dosis sucesivas (tabla

EFFECTOS GENOTÓXICOS DEL KETOCONAZOL EN LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS EN CULTIVOS DE 48 HORAS

DONADOR	CELULAS ABERRANTES		X I.C.H./METAFASE ± D.S.		PROLIFERACION CELULAR								
	E.O.	P.O.W.	E.O.	P.O.W.	E.O.			IR	P.O.W.			IR	
TRATAMIENTO					1a	2a	3a		1a	2a	3a		
H ($\times 10^{-4}$)	mg/ml												
0	0	9	2	4.7±2.2	4.1±1.92	24	74	2	1.78	54	44	2	1.48
.06	.003	20 ^S	-	6.3±2.6	—	53 ^S	47	0	1.41				
.12	.006	36 ^S	4	4.5±2.2	5.0±2.1	55 ^S	45	0	1.45	51	49	-	11.54
.25	.012	26 ^S	3	6.7±2.64	5.3±2.36	56 ^S	44	0	1.44	56	41	-	1.38
.52	.025	30 ^S	-	6.3±2.5	7.8±2.4	84 ^S	16	0 ^S	1.16	63	37	-	1.31
1.04	.050	26 ^S	6	—	—	100 ^S	-	S	1.0	100	-	- ^S	1.0
2.08	.100	-	N.S.M.	—	N.S.M.	-	-	-	-	59	1	- ^S	.61

VER CUADRO DE SIGNOS Y ACRONIMOS

31). En ninguno de los donadores se detecta inducción de I.C.H.

El Dimetilsulfóxido (DMSO) que fue el solvente utilizado para diluir la niclosamida y el Ketoconazol, por lo que también se evaluó su efecto genotóxico, para ello se hicieron cultivos de linfocitos de diferentes donadores a los que se les adicionó diferentes cantidades de DMSO. En la tabla 32 se observa que en 2 de los casos hay una inducción de aberraciones en relación a la dosis que no muestra significancia estadística excepto en la dosis de 0.5% en un donador, (M.A.U.); llama la atención que dosis superiores no muestran efectos clastogénicos aunque sí ejercen efectos citotóxicos lo que se pone en evidencia al disminuir el número de células en 2a. división y acumularse el número de primeras (dosis de 1-1.6%). Dosis de 1.0% inhiben en un 50% la proliferación celular (tabla 33).

En 2 de los casos se detecta un ligero efecto inductor de I.C.H., además de una relación dosis-respuesta; sólo la dosis de 1.6% en uno de los donadores mostró significancia estadística.

V DISCUSION

Aspectos Metodológicos

El análisis citogenético de linfocitos humanos constituye uno de los sistemas recomendados por los grupos de expertos internacionales para la identificación de los efectos genotóxicos de agentes químicos. (10, 22, 104, 124).

La gran ventaja de este sistema en la evaluación de los efectos genotóxicos de medicamentos radica en que los estudios pueden llevarse a cabo in vitro, evaluando la relación dosis-respuesta del medicamento, así como in vivo antes y después del tratamiento. El sistema también permite evaluar los efectos genotóxicos tras la administración aguda, subaguda o crónica del medicamento.

La primera fase del presente trabajo consistió en la obtención de los valores basales de aberraciones cromosómicas (A.C.), intercambio de cromátidas hermanas (I.C.H.) y cinética de proliferación en individuos sanos (véase material y método). El alto costo del suero fetal de ternera (que normalmente se adiciona a los cultivos) y la necesidad de importar suero libre de micoplasmas, aunado al hecho de

que en nuestra experiencia y en la de otros autores (1, 11). La no adición del mismo no altera más que ligeramente el índice mitótico, nos llevó a prescindir de su uso y a adicionar a los cultivos exclusivamente la pequeña cantidad del suero autólogo presente en la muestra de sangre que se siembra (0.3 ml de sangre en 5 ml de medio).

Cabe mencionar que existen reportes de que el suero es un factor que influye en los valores basales de anomalías que se encuentran en los cultivos de linfocitos y por lo general se reportan un número mayor de anomalías espontáneas en cultivos con suero heterólogo con respecto a aquéllos en los que se usó suero autólogo (15, 16). Nuestros cultivos controles muestran un promedio de frecuencia basal de aberraciones de 2.79, valor menor a los referidos en otros estudios (2, 11). Cabe señalar que las brechas no se incluyeron en nuestras evaluaciones. En cuanto a los valores de I.C.H. también nuestro promedio (5.57) es menor al reportado por otros autores. Pudiera considerarse que estas diferencias se deben al suero, sin embargo, no se hicieron los experimentos comparativos que pudieran confirmar o rechazar esta hipótesis.

Se desconoce la influencia del suero en la mutageni-

ciudad inducida, sin embargo, existen evidencias de que en presencia de suero la degradación de proteínas producto de la exposición de células a medio exento de aminoácidos de fosfato o de glucosa, es mucho mayor (133) y desde luego, es importante considerar que algunos medicamentos puedan unirse a las proteínas del suero tanto in vivo como in vitro, lo que disminuye las dosis del medicamento que llega a las células. La ausencia de suero puede representar una ventaja cuando lo que se desea evaluar es el efecto de la dosis real de la sustancia.

La cinética de proliferación celular promedio en cultivos de 48 y 72 horas en nuestras condiciones en ausencia de suero, fue similar a la reportada por otros autores (140), - que utilizan condiciones de cultivo semejantes a las nuestras y que en un estudio expofeso señalan que la cinética del ciclo celular no es alterada por la ausencia de suero. Sin embargo, estudios recientes señalan que en ausencia de suero y antibióticos el ciclo celular es más rápido (141). No encontramos datos de la interacción que pudiera existir entre el suero y las sustancias genotóxicas y sus efectos sobre la cinética de la proliferación celular.

Ahora bien, una de las desventajas de la valoración de

substancias en el cultivo de linfocitos in vitro es que si - bien existen algunas amilasas y esterásas, el sistema carece de la mayoría de las enzimas que llevan a cabo la biotransformación de substancias en el organismo. ~~()~~.

Ya que algunas drogas evaluadas previamente en bacterias mostraron ser activas sólo en presencia de sistemas de transformación metabólica, se integró al estudio y estandarizó el uso de la fracción microsomal "S9" obtenida de hígado de rata y que es ampliamente utilizada en la prueba de Ames, (7) pero que ha sido poco utilizada en el cultivo de linfocitos.

Para valorar el uso de la mezcla "S9" en el cultivo de linfocitos se utilizó la ciclofosfamida, ya que es un medicamento cuya genotoxicidad deriva de la actividad de los metabolitos que se forman en presencia de enzimas hepáticas. Los datos obtenidos mostraron que los efectos de la ciclofosfamida en presencia de la fracción microsomal en el cultivo de linfocitos son reproducibles en diferentes individuos y experimentos, a lo largo del tiempo (59).

Efectos Genotóxicos de Drogas Antiparasitarias.

Se evaluaron 4 drogas: dos amebicidas (dehidroemetina

y difosfato de cloroquina), un antihelmíntico (niclosamida) y un antimicótico (Ketoconazol).

Los dos amebicidas mostraron ser clastogénicos "per se" sin necesidad de biotransformación, ninguno de los dos indujo I.C.H. y ambos alteraron la proliferación celular.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio usando los sistemas de prueba de Salmonella typhimurium Uvr⁻ (sistema de Ames), Salmonella typhimurium Uvr⁺, el sistema de genoletalidad Pol A⁺/Pol A⁻ de Escherichia coli y el ensayo rec⁺/rec⁻ de Bacillus subtilis mostraron que tanto la cloroquina como la dehidroemetina son inductores de mutaciones de corrimiento, pero la primera sólo en el ensayo de fluctuación (modificación del sistema de Ames) y la segunda, sólo en presencia de la fracción microsomal "S9"⁽³¹⁾. En el ensayo con la cepa de Salmonella poseedora del sistema de reparación por escisión Uvr⁺ el efecto de la emetina y cloroquina disminuyó considerablemente, lo que indica que las lesiones producidas por ellas en el ADN son reparadas - (51).

En B. subtilis (rec⁻/rec⁺) ambos medicamentos no mostraron actividad mientras que en E. coli (Pol A⁻/Pol A⁺). - ambas drogas fueron genotóxicas aun en ausencia de la frac-

ción microsomal (11) al igual que en el cultivo de linfocitos en el que las dos drogas fueron clastogénicas (tabla 33).

La actividad positiva de la dehidroemetina en el sistema de Ames sólo en presencia de "S9" es contrastante con la actividad positiva de la droga por sí sola en los linfocitos y en E. coli. No sabemos a qué se deban estas diferencias, pero podría ser que el ensayo de suspensión facilita la interacción de la droga con la célula, puesto que el cultivo de linfocitos y la prueba de E. coli se realizan en suspensión no así el ensayo habitual de S. typhimurium que se lleva a cabo en medio semisólido. Esto implicaría, sin embargo, que el metabolito de la droga generado en el sistema de S. typhimurium fuera o más activo que el medicamento original, o más difusible. Lo primero se descarta si se considera que en E. coli la adición del sistema de transformación metabólica no incrementó la genotoxicidad del compuesto; aunque esto, como se verá más adelante, puede tener diversas explicaciones. También podría considerarse la posibilidad de un mecanismo de acción específico y de hecho la dehidroemetina es capaz de inhibir la síntesis de proteínas tan sólo en células de eucariontes y no en procariontes, lo que permitiría especular sobre los efectos en linfocitos mas no en E. coli. Por otro lado, habría que considerar que los tres sistemas de

TABLA 34. EVALUACION GENOTOXICA DEL DIFOSFATO DE CLOROQUINA Y LA DEHIDROEMETINA.

SISTEMA DE PRUEBA	DROGAS ANTIAMIBIANAS	CLOROQUINA	DEHIDROEMETINA
PRUEBAS BACTERIABAS	S. TYPHIMURIUM (PRUEBA DE AMES)	+	+ *a
	B. SUBTILIS REC ⁻ / REC ⁺	-	-
	E. COLI POL A ⁻ / POL A ⁺	+	+
LINFOCITOS HUMANOS EXPOSICION "IN VITRO"	ABERRACIONES CROMOSOMICAS	+	+
	I.C.H.	-	-
	ALTERACIONES EN LA CINETICA DE LA PROLIFERACION CELULAR	+	+

* SOLO EN PRESENCIA DE "S9".

prueba miden efectos distintos y que a pesar de que hay datos de que las mutaciones génicas correlacionan con I.C.H. (2A) y con aberraciones cromosómicas (18), se han encontrado muchas excepciones, es decir, agentes que producen sólo uno de los tres efectos (13). A pesar de las discrepancias en los resultados, la genotoxicidad del medicamento en cualquiera de las tres pruebas indica su riesgo potencial.

La cloroquina es un agente intercalante y la dehidroemetina, como produce mutaciones de corrimiento, puede pensarse que también es un agente intercalante. Se ha planteado el que este tipo de agentes son productores de I.C.H., sin embargo ni la cloroquina ni la dehidroemetina produjeron I.C.H. en nuestras evaluaciones y tampoco mostraron actividad en el ensayo rec^+/rec^- de B. subtilis. Arumir y Meza (12) han planteado que si ambos fármacos son genotóxicos en E. coli mas no en B. subtilis podría pensarse, por las características de los sistemas de prueba, que en el daño producido está involucrada la polimerasa "I" mas no la reparación por recombinación. Este hecho nos llamó la atención en vista de que ambas sustancias no son inductoras de I.C.H. lo que pudiera apoyar el que la producción de intercambios no es una manifestación de los sistemas de reparación por recombinación como ha sido propuesto (13). Cabe señalar que la fal-

ta de genoletalidad en el ensayo "rec" pudiera deberse - - simplemente a que la droga no penetra en el bacilo y a que éste, a diferencia de S. typhimurium, no tiene alteraciones en la pared celular que faciliten el paso de los compuestos; algo similar ocurre sin embargo en E. coli cuya pared no está alterada y sin embargo la droga se penetra.

La inhibición de la proliferación celular por la dehidroemetina era de esperarse, ya que inhibe la unión del ARN de transferencia (tARN-aa) (70). Su efecto inhibitor de la proliferación es superior a su efecto clastogénico ya que concentraciones de $1.1 \times 10^{-11} M$ fueron suficientes para inhibir el 50% de la proliferación celular mientras que la dosis menor inductora de aberraciones fue de $2.2 \times 10^{-11} M$.

La cloroquina es menos citotóxica que la dehidroemetina; se requirió una dosis de $1.2 \times 10^{-7} M$ para inhibir el 50% de la proliferación y es más clastogénica que citotóxica ya que $1.7 \times 10^{-8} M$ fue la concentración mínima inductora de aberraciones. Existen pocos conocimientos acerca de la farmacocinética de la dehidroemetina, sin embargo, es reconocida su amplia toxicidad y su lenta excreción in vivo. Este mismo hecho hace que posiblemente su capacidad genotóxica in vivo sea poco significativa, ya que si la célula deja de dividirse

no podrá transmitir las alteraciones en el ADN que la droga pueda producir (55).

De la cloroquina se conoce ampliamente su metabolismo y existen datos de que en las dosis recomendadas se logra una concentración plasmática de $\approx 125 \mu\text{g/ml}$ (56), una dosis equivalente a ésta no mostró ser clastogénica en nuestros estudios in vitro. Sin embargo, dosis superiores sí lo fueron; estos datos aunados al hecho de que es citotóxica y más clastogénica que citotóxica nos lleva a considerar que la cloroquina debería ser evaluada más extensamente.

Al revisar la literatura nos encontramos con que - - ciertas alteraciones producidas por la cloroquina durante terapias prolongadas semejan algunas alteraciones que presenta el Síndrome de Waardenburg, como son los disturbios pigmentarios en el pelo y los ojos (57), así como la sordera coclear (58). También se ha descrito que el Síndrome de Chediak Higashi tiene alteraciones similares a las de la terapia prolongada con cloroquina (59). Cabe señalar que ambos síndromes son hereditarios por lo que sería interesante evaluar si no existen antecedentes de tratamientos de cloroquina en los ancestros de los pacientes que sufren de los síndromes descritos o si existe algún gen en común

alterado en los casos descritos.

La evaluación de la actividad genotóxica de la niclosamida puso de manifiesto que tanto in vivo como in vitro la respuesta a la droga no fue homogénea: la niclosamida indujo aberraciones cromosómicas en ciertos individuos mientras que otros fueron insensibles a su efecto; si bien, pequeñas diferencias pueden explicarse como producto del método o de las sustancias que se utilizan en el cultivo de células (~~X~~). Dado lo cual para la evaluación de los efectos comparativos de la niclosamida en 3 de los donadores (M.D., P.D. y R.G.) se utilizó el mismo método y lote de sustancias, además de que los experimentos se realizaron en paralelo. Los resultados obtenidos, aunados a la variabilidad en la respuesta obtenida con otras de las drogas estudiadas nos llevó a pensar en la influencia de la susceptibilidad individual a los efectos mutagénicos de agentes químicos.

Otros autores han reportado diferencias en la respuesta genotóxica individual a sustancias químicas (174) o han realizado estudios para determinar la sensibilidad individual a los agentes que dañan el ADN (2,61, 154). Se ha señalado además que los individuos propensos a sufrir daño cromosómico -

tienen un riesgo elevado de Cáncer (41) considerándose que la existencia de estos individuos en un grupo dado de sujetos indica un riesgo mayor de cáncer en esa población como un todo. (44)

También ha sido propuesto que la determinación de la sensibilidad individual a los agentes citostáticos podría ser de gran utilidad en la selección de los tratamientos más apropiados para el cáncer, ya que los individuos que muestran resistencia a un determinado agente probablemente recibirán menos beneficio de la terapia con dicho agente (42).

Lo mencionado ilustra el interés que existe en el uso de las pruebas citogenéticas para identificar a los individuos susceptibles a la acción genotóxica de los agentes químicos en el ambiente.

Una investigación más a fondo de la susceptibilidad individual podrá permitir la identificación de los mecanismos responsables de estos efectos y en los que sin duda juegan un papel importante la farmacocinética de los compuestos químicos y la capacidad de reparación del ADN de los individuos expuestos a ellos.

Estudios recientes que evalúan la reparación del ADN,

a través de medir la síntesis no programada del ADN (S.N.P) en linfocitos humanos expuestos a N-acetoxi-2-acetilamino-fluoreno (3H-NA-AAF) han puesto en evidencia que existen diferencias individuales en la inducibilidad de S.N.P. y que ésta depende de la cantidad de NA-AAF que se une al ADN. - También el mismo grupo ha mostrado que en ciertos pacientes con cáncer la inducción de S.N.P. es menor que en controles, sin embargo, la diferencia observada no se debe a que se unan al ADN menos moléculas de NA-AAF, lo que sugiere una disminución en la reparación. Estudios con análogos del --NA-AAF mostraron que existe un alto grado de especificidad lo que implica la existencia de receptores específicos para la molécula (155)

Estas diferencias posiblemente ^{nos} permitan explicar ofrezcan explicación al por qué ^{de} 15 personas que se exponen al asbesto sólo - una muere de mesotelioma o ~~es~~ por qué ⁹ de 10 individuos que fuman excesivamente ⁹ no mueren de cáncer pulmonar (195).

El ketoconazol disuelto en DMSO en los estudios in vitro mostró ser clastogénico en una muestra de linfocitos (E.O.) mas no en otra (P.O.), y ser citotóxico y no inductor de I.C.H. ^{en} las células de ambos individuos. Dosis de 0.5×10^{-4} M ^{que} mostraron ser inhibitorias de aproximadamente el 50% de la -

proliferación de los linfocitos, mientras que $6.2 \times 10^{-6} M$ fue la concentración menor que indujo un incremento significativo de aberraciones cromosómicas y al igual que la cloroquina, fue más clastogénica que citotóxica.

Llama la atención el que después de alcanzarse un máximo de aberraciones con $1.2 \times 10^{-5} M$ dosis más elevadas de la droga continuaran produciendo el mismo efecto. Este tipo de comportamiento se observa cuando se presenta un proceso limitante como es solubilidad de la droga o restricciones en la permeabilidad. También podría pensarse en saturación de receptores específicos.

El Ketoconazol en ninguna de las concentraciones evaluadas indujo intercambios de cromátidas, tampoco produjo mutaciones génicas en el sistema de Ames con y sin activación metabólica, aumentando así la lista de sustancias capaces de inducir aberraciones mas no intercambios, ni tampoco mutaciones génicas (tabla-), Buscando una explicación nos enfocamos en el mecanismo de acción de la droga.

Una de las vías que se han propuesto por la cual las células (fungales sean destruidas por el Ketoconazol, es a través de la acumulación intracelular de peróxido de hidró

geno en concentraciones tóxicas, que es consecuencia del incremento de la oxidasa dependiente de NADH en la vacuola central y en las mitocondrias; así como de la inhibición de peroxidasas y catalasas (152).

Este exceso de peróxido de hidrógeno podría ser - - también el causante de las aberraciones cromosómicas observadas en los linfocitos ya que se ha reportado que el H_2O_2 es capaz de alterar y liberar las bases del ADN y de romper la cadena, reaccionando con las pirimidinas causando el que se abra el doble enlace 5,6 dando origen a hidroperoxipirimidinas. Las pirimidinas alteradas no son capaces de formar puentes de hidrógeno normales con ninguna base complementaria, ya que la abertura de la doble cadena destruye la planaridad del anillo e imposibilita el tener 2 uniones de hidrógeno en un plano además de que la pirimidina alterada se sigue descomponiendo. Estas alteraciones en las bases inactivan el ADN, mas no inducen mutaciones puntuales. El H_2O_2 también rompe la unión ^{N-C} N/C entre la base y la desoxirribosa, dando origen al ácido desoxirribónico que es inestable y - rompe la cadena de ADN por una reacción de eliminación con el grupo 5-fosfato (55).

El peróxido de hidrógeno inactiva rápidamente el ADN

transformante, así como a fagos, mas no produce prácticamente mutaciones puntuales. Se ha reportado asimismo que las bacterias deficientes en catalasas son inactivadas rápidamente por el H_2O_2 y la ocurrencia de rompimientos cromatídicos en cultivos de células de Hamster (CHO) que tienen cantidades reducidas de catalasas (201).

En linfocitos humanos no se ha observado la inducción de aberraciones por H_2O_2 , posiblemente porque el linfocito posee niveles elevados de catalasas y peroxidasas que normalmente inactivan el H_2O_2 que se produce en la célula (24). Sin embargo, existe evidencia indirecta ya que en el caso de ciertas enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso y esclerosis sistémica progresiva, ^{en el} en las que ~~en su~~ suero se encuentra factor clastogénico, (capaz de producir aberraciones) ~~que~~ que en el cultivo de linfocitos puede ser antagonizado por la adición de superóxido desmutasa; ⁽⁴⁴⁾ esta enzima forma parte de lo que se considera el equipo defensivo contra los efectos tóxicos de radicales libres como O_2 y H_2O_2 (56).

[Los datos descritos nos llevan a postular que las aberraciones cromosómicas producidas por el ^k Ketoconazol son producto de un mecanismo similar al que afecta a las células fungales. >

En base a este mismo mecanismo puede explicarse el que el Ketoconazol no produzca mutaciones puntuales ya que como mencionamos, el H_2O_2 no induce mutaciones puntuales. (55).
see indice.

En vista de la relación entre mutagénesis y carcinogénesis cabe señalar que el H_2O_2 ha sido involucrado como un agente causal en el cáncer ().

En un estudio piloto, en el que evaluamos los efectos genotóxicos del Ketoconazol en 2 pacientes (madre de 44 años e hijo de 10 años de edad a los que se administró 200 y 100 mg de Ketoconazol diariamente durante 16 y 7 meses respectivamente para combatir una micosis en las uñas provocada por Tricophyton rubrum y en el que se tomaron muestras de sangre de ambos pacientes antes (control), durante y una vez finalizada la terapia) encontramos que el Ketoconazol produjo un ligero incremento en el porcentaje de aberraciones que no mostró significancia estadística, no indujo I.C.H. ni tampoco alteró la cinética de proliferación de los linfocitos (11).

La diferencia de efectos in vitro e in vivo de las dos drogas que evaluamos en ambas condiciones (Ketoconazol y Niclosamida) nos llamó la atención. Estas diferencias han sido reportadas previamente para varias sustancias () y pue-

den tener diversas explicaciones como las que se refieren a continuación.

1. La concentración que alcanza la droga en la sangre es menor a la utilizada en los cultivos in vitro. En pacientes tratados con 200 mg de Ketoconazol los niveles máximos que alcanza la droga en el suero son de 1.54 - 3.12 mg/ml (1/44). Dado que uno de nuestros pacientes fue tratado con 200 mg y el otro con 100 mg, es de esperarse que los niveles séricos de la droga hayan sido similares a los mencionados en el tra bajo citado, o aún menores ya que tomaban su dosis de ^kKetoco nazol con jugo de naranja y se sabe que la vitamina C puede antagonizar al ^kKetoconazol. Cabe señalar que las drogas in vivo pudieron unirse al suero, mientras que in vitro no, puesto que no se adicionó a los cultivos. La dosis mínima que evaluamos in vitro fue 3 mg/ml y encontramos con ella un incremento apreciable de aberraciones cromosómicas.

2. En los pacientes se lleva a cabo la detoxificación metabólica del medicamento lo cual no ocurre en los cultivos de linfocitos expuestos in vitro a ^kKetoconazol, lo cual es poco probable ya que los datos que existen no indican que el Ketoconazol sea metabolizado in vivo (1/22). Además se ha reportado que dosis de hasta 160 mg/kg (dosis tóxica para ratas)

no son capaces de inducir las enzimas microsomales y mas aún que dosis de 58.8 mg/kg (20 veces la dosis terapéutica) son capaces de inhibir dichas enzimas. A su vez, los estudios en el sistema de Ames muestran que la actividad de Ketoconazol no es alterada al adicionar a los cultivos la fracción microsomal "S9". Por lo tanto, la actividad genotóxica del Ketoconazol no parece depender de su transformación metabólica in vivo o in vitro.

En cuanto a la Niclosamida carecemos de los datos de su farmacocinética por lo que no podemos analizar estos aspectos, sin embargo, otros factores que dependen del sistema de prueba pueden analizarse para las dos drogas mencionadas.

3. La fase del ciclo en el que se encuentra el linfocito al ser tratado. En el caso de las sustancias genotóxicas "S" dependientes, se requiere como se mencionó en la introducción, que el linfocito se divida para que se fije el daño, si el linfocito no se divide el daño puede ser reparado o no hacerse manifiesto. En condiciones normales in vivo el linfocito no se está dividiendo por lo que las aberraciones sólo se manifestarán al ser estimulado el linfocito a dividirse durante el cultivo in vitro, teniendo aún suficiente tiempo para reparar cualquier daño que pudo haber sido producido in vivo. Ya que tanto la Niclosamida como el Ketoconazol produjeron fundamen-

talmente rompimientos cromatídicos es probable que funcionen como drogas "S" dependientes y pudiera ser ésta la causa del menor efecto "in vivo".

4. El solvente para ambas drogas fue el dimetilsulfóxido - (DMSO) el cual podría facilitar la entrada de los medicamentos a los linfocitos expuestos in vitro o potenciar su acción (1)

Se conoce que el DMSO aumenta la permeabilidad celular (202), además se ha reportado que la mutagenicidad en el sistema de Ames de ciertos agentes como el 2-aminoantraceno (10) y la tricloroacetona (145) es mayor cuando se disuelven en DMSO que en acetona, mientras que las soluciones de tetra- o pentacloroacetonas en DMSO o en acetona tienen efectos similares y la hexacloroacetona es mutagénica disuelta en DMSO mas no lo es cuando está disuelta en acetona (145).

En nuestra experiencia el DMSO solo, en las concentraciones en las que se usó en la evaluación del Ketoconazol y la Niclosamida (.2%), no produjo aberraciones cromosómicas ni I.C.H., y tampoco alteró la cinética de proliferación. Sin embargo, concentraciones superiores de DMSO (.5% - 1.0%) sí son ligeramente clastogénicas, inductoras de I.C.H. e inhibidoras de la proliferación. Estos datos plantean la posibili-

dad de un efecto sinérgico entre las drogas y el DMSO. Sin embargo, no descartan el que la presencia de DMSO contribuya a incrementar su paso a través de la membrana del linfocito. En el caso del Ketoconazol la saturación del efecto pudiera deberse a que independientemente de la concentración, la permeación por el DMSO de la membrana tenga un límite y tan solo permite la entrada hasta una concentración dada por arriba de la cual ya no ingresa más droga a la célula.

Interpretación de los Resultados y su Significado en la Evaluación de Riesgo.

Los resultados obtenidos en las pruebas a "corto plazo" entre las que se incluye al cultivo de linfocitos, contribuyen a detectar dos tipos de riesgos: el de la ocurrencia de un cáncer o de alteraciones congénitas como consecuencia de daño genético inducido, ya sea en las células somáticas o en los gametos. Las pruebas a "corto plazo" sirven para medir indirectamente los 2 tipos de daño, pero es muy importante estar concientes de que no existe una prueba infalible que por sí sola permita determinar los distintos tipos de alteraciones genéticas tanto en células somáticas como germinales. Por lo que los grupos de expertos han recomendado el uso de una batería de pruebas que incluya diferentes tipos de daño en distintas clases de células. Es importante hacer hincapié -

además, en que los datos obtenidos en sistemas in vitro, aún el cultivo de linfocitos con activación metabólica, pueden ser completamente distintos a los que se obtienen en un organismo tan complejo como el hombre.

Un resultado positivo en cualquier sistema es tan solo una llamada de alerta que indica que la substancia puede representar un riesgo, pero requiere de un conocimiento integral de sus efectos.

A pesar de ser linfocitos humanos la extrapolación de los datos que se obtienen in vitro a la situación in vivo debe manejarse con mucho cuidado ya que únicamente sirven como guía del posible efecto in vivo del mutágeno sospechoso. Estudios comparativos han mostrado que la actividad mutagénica es mayor in vitro que in vivo, es decir, 1 µg/ml es más efectivo in vitro que 1 mg/Kg in vivo (24). Las razones de este fenómeno son muy variadas, entre ellas las más obvias son la farmacocinética del compuesto, su accesibilidad al tejido que se está estudiando y su reactividad con las proteínas del organismo fundamentalmente las proteínas séricas. } *equivalo*

En el cultivo el linfocito está expuesto directamente a la substancia mientras que en el organismo ésta tiene que

pasar a través de una multitud de mecanismos de protección.

Una droga puede ser mutagénica para los linfocitos que se encuentran flotando en una solución que contiene la misma, sin embargo, si esta misma droga no se absorbe^b en el intestino y es eliminada directamente, no representará un riesgo, o en todo caso nada más lo constituirá para las células del tracto intestinal. Este es el caso del pirvinio, que resultó ser mutagénico en el sistema de Ames (27). Sin embargo, no mostró mutagenicidad en un estudio realizado por Hernández y Mutchinick (26) en 5 pacientes antes y después del tratamiento. La cafeína es un caso interesante ya que ha mostrado ser mutagénica en todos los sistemas en los que se ha estudiado y adicionada in vitro a cultivos de linfocitos humanos muestra una alta capacidad clastogénica (28), observándose que dosis mínimas de 250 µg/ml son inductoras de aberraciones. In vivo, sin embargo, en voluntarios que ingirieron 800 mg diarios de la droga durante 1 mes, no se encontraron aberraciones en los linfocitos y la mayor concentración de cafeína encontrada en su sangre fue de 30 µg/ml. La cafeína es rápidamente metabolizada y eliminada por la orina, por lo tanto, a menos que haya una diferencia en los procesos farmacocinéticos, la cafeína no llegará a las concentraciones capaces de producir aberraciones. (28)

Otro ejemplo clásico es la Ciclofosfamida; estudios in vitro en ausencia de un sistema de transformación metabólica, no mostraron actividad mutagénica (77, 136), sin embargo, estudios in vivo () indican que es un clastógeno e inductor de I.C.H. potente (18, 112), lo que sucede es que son los metabolitos producidos por la acción de las enzimas hepáticas los genotóxicos y no la droga "per se". (170)

La ciclofosfamida in vitro puede ser metabolizada por la fracción S9 razón por la cual la usamos como control positivo. (59)

La unión de los fármacos a las proteínas séricas interfiere en la determinación de dosis reales mutagénicas de un medicamento y también en sus efectos. Se sabe por ejemplo, que 50% de la cloroquina que se administra, se une a la albúmina y además también a ciertos tejidos en donde puede quedarse hasta más de 5 años (122) lo que incide en el riesgo que representan los efectos indeseables del medicamento. El hecho de que una droga sea muy citotóxica permite inferir que probablemente no sea mutagénica ya que al inhibir la división de las células no transmitirá las alteraciones producidas. Este es el caso de la dehidroemetina, sin embargo, cabe señalar que una droga muy citotóxica puede indirectamente causar la promoción de células transformadas como resultado de un mecanismo de compensación en el

que la muerte de unas células puede estimular la división de otras, portadoras ^{de} mutaciones previas producidas por otros - - agentes o bien originadas "espontáneamente" (27).

Posiblemente las sustancias más peligrosas desde el punto de vista de riesgo genotóxico son las poco citotóxicas y sin embargo, mutagénicas (tabla ²⁵34 y ²⁶35).

Si comparamos los efectos de la dosis genotóxica de cada uno de los medicamentos más próxima a la dosis de ciclofosfamida usada como control positivo en este estudio (tabla ⁵3A), se observa que tanto la dehidroemetina como el ^kKetoconazol muestran una clastogenicidad similar a la de la ciclofosfamida, sin embargo, los efectos de la dehidroemetina se - - obtuvieron a dosis 10 veces menores en comparación con la de ciclofosfamida y fueron mucho más citotóxicas, ya que la dehidroemetina inhibe la proliferación mientras que la ciclofosfamida no la alteró.

El ^kKetoconazol, contrariamente, requirió dosis mucho mayores que la utilizada de ciclofosfamida, pero fue más citotóxica que la ciclofosfamida y mucho menos que la dehidroemetina; siendo dichas dosis equivalentes a las que se alcanzan en la sangre (.003 µg/ml) tras la administración terapéutica del ^kKetoconazol.

TABLA 34. POTENCIA CLASTOGENICA DE LOS MEDICAMENTOS EVALUADOS
 EN COMPARACION CON LA POTENCIA DE UN CONTROL POSITI
 VO~~X~~.

MEDICAMENTO	DOSIS (M X 10 ⁻¹⁰)	No. CELULAS ANALIZADAS	% DE ABERRACIONES*
Ciclofosfamida	72	300	10.0
Dehidroemetina	.86	100	11.0
Cloroquina	62	500	2.6
Niclosamida	61	400	0.6
Ketoconazol	62574.3	100	11.0

* Se sustrajo el valor basal del control en cada experimento.

TABLA 35. POTENCIA CLASTOGENICA Y CITOTOXICA DE LOS
MEDICAMENTOS EVALUADOS.

MEDICAMENTO	CONCENTRACION MUTAGENICA MINIMA (M)	CONCENTRACION QUE INHIBI EN UN 50% LA DIVISION C LULAR. (M)
Dehidroemetina	2.2×10^{-11}	1.1×10^{-11}
Niclosamida	1.7×10^{-8}	1.8×10^{-8}
Cloroquina	1.2×10^{-8}	1.2×10^{-7}
Ketoconazol	6.2×10^{-6}	1.0×10^{-4}

La cloroquina y la niclosamida, en dosis similares a la ciclofosfamida, no mostraron ser clastogénicas lo que indicaría poca potencia. En cuanto a niclosamida desafortunadamente no tenemos datos de su farmacocinética, sin embargo, en lo que se refiere a cloroquina las concentraciones en la sangre después de dosis terapéuticas pueden alcanzar niveles libres de $125 - 250 \mu\text{g/ml}$, siendo las dosis clastogénicas en este estudio de $6 \mu\text{g/ml}$. Cabe recordar que in vivo el 50% de la droga se une al suero, mientras que en la evaluación realizada in vitro no se utilizó suero, lo que implica que para determinar el daño real de la cloroquina es importante considerar la presencia de suero y la posible interacción con otras drogas que por presentar mayor afinidad por los receptores del suero hacen que se libere la cloroquina, elevándose su concentración en la sangre, sólo en estos casos podría representar un riesgo.

Lo mencionado nos lleva a considerar la influencia del sistema de prueba en la evaluación de riesgos toxicológicos.

Consideramos que la revisión de la literatura, aunada a nuestra propia experiencia, señalan que si bien el cultivo de linfocitos puede ser un buen indicador de daño al ADN ocasionado por agentes químicos, presenta en la actualidad algunas

deficiencias propias del sistema, es decir, los resultados de un estudio pueden ser influenciados por factores relacionados con la exposición. Estos factores deben ser identificados e incorporados en el diseño del estudio. Diversos autores han discutido los factores técnicos que pueden influir en los datos generados en este sistema como son: el tiempo de cultivo; el tiempo entre la recolección de la muestra y la siembra; el lote de sustancias; el tipo de suero y su presencia o ausencia en el cultivo (6, 15, 16)

En nuestro estudio la ausencia de suero si bien nos permite evaluar la dosis real de sustancias, en algunos casos suponemos fue causante de un bajo rendimiento en mitosis aunque éstas fueron suficientes para el análisis, sin embargo, cabe preguntarse si la disminución en la proliferación de los linfocitos no influye en los datos de daño citogenético obtenidos.

Cambios pequeños en el pH, en la osmolaridad, y en la temperatura también influyen en la cantidad de daño que se observa.

Teniendo conocimiento de la influencia de estos factores, pueden incorporarse en el diseño del estudio y con ello

eliminar sus efectos.

Sin embargo, existen otros factores difíciles de eliminar como es el que el donador de la muestra haya estado expuesto a virus, sin evidencia clínica (10, 11). Factores sinérgicos que derivan de: la forma de vida del individuo (fumar, beber alcohol, comer alimentos con sustancias mutagénicas; desmutágenos, exposición laboral a mutágenos); (57) efectos circunuales (30, 113); y muy importantemente de la susceptibilidad del individuo, que va a estar dada por su capacidad de metabolizar las sustancias y de reparar el daño ocasionado al ADN.

Cualquier valoración ya sea in vitro o in vivo debe por lo tanto contar con una técnica estandarizada, con controles negativos y positivos históricos y paralelos que permitan valorar los efectos de las sustancias utilizadas en el cultivo y con el suficiente número de individuos (tamaño de muestra) que permitan in vivo descartar los efectos individuales e in vitro, la obtención de curvas dosis-respuesta reproducibles.

Un problema muy importante es la selección de una prueba para el análisis estadístico apropiado de los datos

que permita detectar significancia biológica.

Los datos in vivo no pueden tener el mismo valor que los datos in vitro ya que las múltiples barreras disminuirán incontablemente la dosis y los efectos. De ahí la necesidad de poseer suficientes herramientas para entender y establecer cuándo un efecto es real.

La evaluación de efectos mutagénicos, hoy en día requiere establecer una relación entre los efectos inducidos en linfocitos humanos in vitro y los efectos a nivel salud en poblaciones humanas. Ya que el estudio epidemiológico de los efectos mutagénicos incluye individuos que responden de manera diferente, no se pueden lograr correlaciones claras, por lo que pensamos que si se pudiera enfocar exclusivamente a los individuos que demuestren susceptibilidad citogénica en estudios prospectivos en los que se evalúe teratogénesis y carcinogénesis, se lograría posiblemente una mejor identificación de los agentes causales y de sus efectos a nivel salud.

Considero finalmente, que los estudios de mutagénesis desarrollados hasta el presente están muy lejos de atribuir un riesgo preciso a las mutaciones que detectan, en términos

de incremento en efectos biológicos indeseables como el cáncer o los padecimientos hereditarios en el hombre.

Es así que, no se puede excluir que una substancia, que no ha mostrado efectos genotóxicos en los diversos sistemas de prueba, constituya un peligro potencial para la salud. Como tampoco se puede atribuir un significado biológico definido para el humano, a los resultados positivos obtenidos en pruebas de mutagenicidad efectuadas en otros organismos.

A pesar de lo anterior, y de la imprecisión en la evaluación de riesgos genotóxicos a través de sistemas experimentales, es sumamente importante el hacer uso de la información generada en ellos para establecer medidas que prevengan daños a la salud. Sin duda es mejor el establecer márgenes de seguridad en la exposición de los seres humanos a compuestos químicos, con base en aproximaciones de las concentraciones que pueden ser peligrosas, que esperar a corroborar el riesgo a través de estudios epidemiológicos que en lugar de prevenir, constatan la ocurrencia de un daño probablemente irreversible.

de incremento en efectos biológicos indeseables como el cáncer o los padecimientos hereditarios en el hombre.

Es así que, no se puede excluir que una substancia, que no ha mostrado efectos genotóxicos en los diversos sistemas de prueba, constituya un peligro potencial para la salud. Como tampoco se puede atribuir un significado biológico definido para el humano, a los resultados positivos obtenidos en pruebas de mutagenicidad efectuadas en otros organismos.

A pesar de lo anterior, y de la imprecisión en la evaluación de riesgos genotóxicos a través de sistemas experimentales, es sumamente importante el hacer uso de la información generada en ellos para establecer medidas que prevengan daños a la salud. Sin duda es mejor el establecer márgenes de seguridad en la exposición de los seres humanos a compuestos químicos, con base en aproximaciones de las concentraciones que pueden ser peligrosas, que esperar a corroborar el riesgo a través de estudios epidemiológicos que en lugar de prevenir, constatan la ocurrencia de un daño probablemente irreversible.

VI CONCLUSIONES

El riesgo genotóxico derivado del consumo de medicamentos antiparasitarios: amebicidas, antihelmínticos y antimicóticos, como se mencionó a lo largo de este trabajo, depende de múltiples factores. Es un hecho que la corroboración del riesgo a través de la demostración de un incremento en la frecuencia de cáncer o padecimientos hereditarios en los individuos expuestos a los fármacos, o en sus descendientes, es prácticamente imposible a través del método epidemiológico. De ahí que se estime la magnitud aproximada de dicho riesgo tomando en consideración entre otros:

1. La capacidad de los fármacos de interaccionar con el ADN, si tienen acceso a él.
2. El tipo de daño que ocasionen al material genético.
3. La potencia mutagénica de los medicamentos.
4. La relación entre mutagenicidad y toxicidad (vista como inhibición del 50% de la división celular y acumulación de células en primera división).

5. La influencia de los procesos de biotransformación en su actividad mutagénica.
6. La influencia de los sistemas de reparación del ADN en su mutagenicidad.
7. Su capacidad de inducir daño en células expuestas en cultivo ó in vivo.

Se sabe además que existen diferencias en susceptibilidad individual a los efectos de los fármacos. Por lo que el riesgo potencial derivado de su exposición diferirá en los sujetos que los consumen.

Con base en los criterios anteriores, el estudio de los medicamentos amebicidas, antihelmínticos y antimicóticos, mostró que:

1. Dehidroemetina y cloroquina (amebicidas), niclosamida (antihelmíntico) y ^kKetoconazol (antimicótico) fueron capaces de producir alteraciones en el ADN de linfocitos y se tienen datos acerca de la mutagenicidad de los tres primeros en bacterias, mientras que ^kKetoconazol no fue mutagénico en ese sistema.

2. Los cuatro medicamentos indujeron rompimientos cromosómicos y no (o muy débilmente la niclosamida) intercambio de cromátidas hermanas. Además todas ellas afectaron el ciclo celular.
3. La potencia mutagénica de los fármacos difirió y pueden clasificarse del más al menos potente, tomando en cuenta la dosis menor a la que se obtuvo una respuesta de la siguiente manera:

FARMACO	CONCENTRACION MOLAR MINIMA MUTAGENICA
Dehidroemetina	2.2×10^{-11}
Niclosamida con "S9"	1.2×10^{-8}
Cloroquina	1.7×10^{-8}
Ketoconazol	6.2×10^{-6}

4. Hubo diferencias en la capacidad tóxica de las cuatro drogas manifestándose ésta, de mayor a menor, a las siguientes concentraciones:

FARMACO	CONCENTRACION MOLAR QUE INHIBE EN UN 50% LA DIVISION CELULAR
Dehidroemetina	1.1×10^{-11}
Niclosamida con "S9"	1.8×10^{-8}
Cloroquina	1.2×10^{-7}
Ketoconazol	1×10^{-4}

5. Los dos amebicidas dehidroemetina, cloroquina y el anti micótico Ketoconazol fueron genotóxicos "per se", mientras que el antihelmíntico niclosamida requirió de activación metabólica. Se desconoce la influencia que puedan tener las enzimas hepáticas en la actividad mutagénica de los amebicidas y el antimicótico en el sistema de linfocitos ya que no se evaluó su efecto. Se sabe - sin embargo que, en bacterias dehidroemétina requirió de activación metabólica para producir mutaciones y que cloroquina las indujo sin activación; mientras que ketoconazol dió resultados negativos en uno y otro caso.

6. Los estudios realizados en bacterias en nuestro labora torio indican que el sistema de reparación por escisión (Uvr) es capaz de disminuir el efecto mutagénico de dehidroemetina, cloroquina y niclosamida. El linfocito posee la capacidad de reparar por escisión mas no sabe mos el papel que esta capacidad haya tenido en nuestros datos.

7. Los fármacos en los que se realizó el estudio comparati vo in vitro e in vivo, niclosamida y ketoconazol tuvieron un efecto mayor en los linfocitos expuestos en cultivo. Por ahora no se puede excluir que dicho efecto -

publica a través de la cual se ha empleado (Dibachil-sulfato) por la concentración de 100 mg/ml en la dosis de 10 mg/kg.

En cuanto a la variabilidad de los resultados en la inducción cromosómica de los fármacos, ya que los estudios no fueron diseñados para valorar esta variable, se observó que en el caso de todos los medicamentos existen diferencias en la magnitud del efecto de individuo a individuo. Esto hace evidente la necesidad, en el estudio de la capacidad mutagénica de agentes químicos, de realizarlos en un mínimo de 3 individuos.

Contrariamente a lo señalado por otros autores, en el sentido de que el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es una prueba más sensible que el análisis de rompimientos cromosómicos y detecta efectos a dosis menores, nuestro estudio reveló rompimientos en ausencia de I.C.H.

La comparación de los resultados obtenidos con las mismas drogas en nuestro laboratorio, en bacterias y linfocitos, indica además que no coincide necesariamente la inducción de mutaciones génicas con la de rompimientos cromosómicos o I.C.H. Aunque tratándose de sistemas bio

lógicos distintos, esta discrepancia puede obedecer a - factores diversos; quedaría por realizar un estudio comparativo en el mismo linfocito en el que se evaluara la capacidad de estos medicamentos de inducir mutaciones g_en_ecas.

De lo anterior deriva la importancia de efectuar en paralelo la evaluación de los distintos efectos potenciales de los fármacos: mutaciones g_en_ecas, rompimientos crom_osómicos e intercambio de cromátidas, de ser posible en un mismo sistema de prueba.

Allondandolo, A.S., Bonatti, S., Corsi, G., Fiorio, C., Leporini, C., Mazzaccaro, A., y Nieri, R. (1980). The use of organic solvent in mutagenicity testing. Mutat. Res. 79: 141-150

Abdallah, A. and Saif, A. (1961) The efficacy on N-2' chloro -4' nitrophenyl 5- chlorosalicylanide in the treatment of taeniasis. J. Egypt. Med. Assoc 44: 379-381.

Albertini, R. (1980). Drug resistant lymphocytes in man as indicator of somatic cell mutation. Teratog. Carcinog. and mutagen. I: 25-48.

* Alvarez, Ch. R., (1980). Algunos aspectos importantes de la parasitosis en México. En: Cortinas, N.C., Posibles fuentes de riesgo en el consumo de amebicidas y antihelmínticos. -- p.p. 35-41 I.I.B.H. U.N.A.M. MEXICO.

Alving, A.S., Eichlberger, L. Craig, B.JR., Jones, R. JR.-Whorton, C.M. y Pullman, T.R. (1963). Studies on the chronic toxicity of chloroquine. J. Clin. Invest. 27: 60-65

AMA division of drugs (1983). "AMA drug evaluations", in cooperation with the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Fifth edition p.p. 1779-1789, Distributed by the american medical association.

Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31: 347-364

Ames, B.N., Lee, F.D. y Durston, W. (1973). An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 762-766.

Ames B.N. y McCann J. (1976) Carcinogens are mutagens: A simple test system. En: Screening tests in chemical carcinogenesis, Montesano R., Bartsch H. y Tomatis L. (eds). 12: 493-504. Lyon, Francia: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC).

Anderson, B. y Mac Gregor, D. (1980). The effects of the solvents on the yield of revertants in the Salmonella activation mutagenicity assay.

Carcinogenesis: 1: 363-366

Arellano, C.L., (1985). "Estudio citogenético de pacientes tratados con Ketoconazol". Tesis profesional, Fac. de Ciencias, U.N.A.M. México.

Arumir, E.C. y Moza, M.T. (1984). "Evaluación de la genotoxicidad de antimicrobianos y antihelmínticos en sistemas bacterianos". Tesis profesional. Fac. de Química. Cuatitlán Izcalli, Edo. de México.

Asbhy, J., Serres, F.J., Draper, M.H., Ismidate, J.M., Margolin, B.H., Matter, B.E., and Smelby, M.D. (1985). Evaluation short-term tests from carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety Collaborative Study "in vitro" Assays. Progress in mutation research vol. 5. Elsevier Science publisher North Holland.

Beckman, L., Nordstom, S. (1982). Occupational and environment risk in and around a smelter in Northern Sweden. IX. Fetal mortality among wives of smelter-workers. Hereditas, 97: 1-7.

Bedoya Victor. (1970). Effect of chloroquine on malignant lymphoreticular and pigmented cells in vitro. Cancer research 30: 1262-1275.

Bender, M.A. (1980). Relationship of DNA lesions and their repair to chromosomal aberration production. En: DNA repair and mutagenesis in Eukaryotes. (Eds) Generoso, W.M., Shelby, M.D. and Serres, F.J. p.p. 245-265.

Beremblum, I. (1978). Mechanisms of tumor promotion and co carcinogenesis. Historical perspective. Slaga, J.T. Sivak, R.K. Boutwell, Eds. Raven Press. New York.

Berenson, R.J., Francke, U., Dolnick, B.J. and Bertino, J.R. (1981). Karyotypic analysis of methotrexate-resistant and sensitive mouse L5178 y cells. Cytogenet. Cell. Genet 29: 143-152.

Betancourt, M. y Frias, S.
Comunicación personal.

Board of Scientific Counselor National Toxicology Program (1984). Report of the NTP Ad Hoc Panel on Chemical Carcinogenesis Testing and Evaluation. U.S. Department of Health and human service. Public. Health Service.

Bochkov, N.P. (1982). The role of cytogenetics of human genetic risk. En: Environmental Mutagens and Carcinogens (Eds) Susimura, T., Kunad, S. and Takebe, M. University of Tokyo Press, Tokyo Alan, R. Liss Inc., New York. p.p. 423-430.

Bostock, C.V. y Summer, A.T. (1980). The Eukaryotic Chromosome. Elsevier North Holland Biomedical Press p.p. 437-473.

Boveri, T. (1914) "Zur frage der entstehung malignen Tumoren. G. Fischer Jena. (The Origin of Malignant Tumors, M. Boveri, Trans., William and Wilkins, Co., Baltimore, 1929).

Brewen, A.V. (1980). Somatic and germ cell cytogenetic studies on mutagenesis testing. I Simposium Latinoamericano de mutagénesis, teratogénesis y carcinogénesis ambiental. Puebla, Puebla.

Brown, W.H. (1977) Parasitología clínica.
Editorial Interamericana. 4a. Edición México.

Burnet F.H. (1974). Intrinsic-mutagenesis. A Genetic Approach to Acainq. Medical and technical publishing, Lancaster; England.

Carrano A.V. Thomson L.M. Lind P.A. y Minkler J. (1978). -
SCE as an indicator of mutagenesis. Nature (London) 271: -
551-553.

Carrano T., Minkler J., Steka D. y Moore D. (1980). Varia-
tion in the Baseline SCE Frequency in Human Lymphocytes. -
Environmental Mutagenesis, 2: 325-337

Chesney H.W., Conway W.F., Earls W., Rogers E. y Shekosky
(1965). "Studies of the Metabolism of some compounds of the
4-amino-7- chloroquinoline series. Journal of Pharmacology
and experimental therapeutics, 51: (3): 182-191.

Cobo A., y Lisker R. (1976). Estudio longitudinal sobre la
frecuencia de aberraciones cromosómicas en un grupo de ra-
diólogos y técnicos en radiología. Rev. Invest. Clín., Méx.,
25: 161-165.

Cohen, S.N. and Yielding, K.L. (1965) Inhibition of DNA - and polymerase reactions by chloroquine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 521-527.

Cohen, S.N. y Yielding, K.L. (1965) Spectrophotometric studies of the interaction of chloroquine with DNA. J. Biol. Chem. 240: 3123 ,

Cohen E.N. Gift H.C., Brown B.W., (1980). Occupational Disease in Dentistry and Chronic-Exposure to Trace Anesthetic Gases. J. Am. Dent. Assoc. 101: 21-31

Cole R.J. and Taylor N.A. (1979). Transplacent effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. Nature Vol. 277: 317-318

Colín A.M. (1965). "Aberraciones cromosómicas e I.C.H. en individuos con farmacoterapia a base de difenilhidantoína". Tesis profesional. Fac. de Ciencias. UNAM, México.

Cortinas de Nava C. (1980). "Posibles fuentes de riesgo en el consumo de ampicilinas y antihelmínticos". Instituto de - Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México.

Cortinas de Nava C., Espinoza. J. García, L., Zapata A.M. and Martínez E.. (1983). Mutagenicity of Antiamoebic and -anthelmintic drugs in the Salmonella typhimurium microsomal test system. Mutat. Res. 117: 79-91

Cleaver J.E. (1969). Xeroderma pigmentosum. A human disease in which an initial stage of DNA repair is defective.- Prue. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63: 428-435

Craig- Holmes A.P. y Shaw W.M. (1976). Cell cycle analysis in asynchronous cultures using the Eudr-Hoechst-Technique. Exp. Cell Res. 99: 79-87

Craig-Holmes A. y Shaw M. (1977). Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. Mutat.Res. 46: 375-384

Crossen P. y Morgan W. (1977). Analysis of human lymphocytes cell cycle time in culture measured by SCE differential staining. Exp. Cell. Res. 104: 453-457

Crossen P. E. (1982). "Variation in the sensitivity of human lymphocytes to DNA-Damaging agents measured by sister chromatid exchange frequency". Human. Genet. 60: 19-23

Dalla Favera, R.M., Eregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C. and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene - is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79: 7824-7827

D'arcy, P.F. and Griffin, J.P. (Eds) (1979) "Preface to the first edition". Iatrogenic diseases. Oxford Medical Publication.

Du Frain, R., Littlefield, G. and Wilmer, J. (1979). Cyclophosphamide induced sister chromatid exchange in rabbit - lymphocytes. Environmental Mutat. 1: 283-286

Eber K.J., Kotlarek F., Habsdank M. y Mulher J. (1981). -- Chromosomal Investigation in children long term therapy - with Human. Genet. 56: 345-348

Eddy N. B. (1955) The phenomena of tolerance. In: Origins of resistance to toxic agents, H.G. Seaway, R.D. Reid & O.E. Reynolds (Eds), New York Academic.

Edmond L. D. Falk H., Nissim J.E. (1975). "Congenital malformation and vinyl chloride. Lancet 2: 1098

Emerit I., Michelson A.M., Levy A., Canus J.P. y Emerit. J. (1980) Chromosome breaking agent of low molecular weight in human systemic Lupus erythematosus. Human Genet. 55: 341-344.

Epstein S.S., Andrea J., Bass W. y Bishop. I. (1972). Detection of Chemical mutagens by dominant lethal assay in mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23: 282-325.

Espinosa A.J., Comunicación personal.

Evans H.J. (1982). Genetic Factors in response to environmental mutagens". Tomado de: Sugimura T. y cols. (1982). Environmental mutagens and carcinogens. Alan R. Liss Inc. New York. p.p. 589-601

Fabia J., Thy T.D., (1974). Occupationally of fathers at time of birth of children dying of malignant disease. Br. J. Prev. Med. 2E: 93-100

Fraumeni J.F., Jr., Manning, M.D. and Mitus, W.J. (1971). Acute childhood leukaemia : Epidemiologic study by cell type of 1263 cases at the Children's Cancer Research Foundation. J. - Nat. Cancer Inst. 46: 461-470

Freese, E. (1971). Molecular Mechanisms of mutation. in: Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Hollaender, A. (Ed.) (1971), p.p. 1-56. Plenum Press.

Fridovich, I. (1983). Superoxide Radical: an Endogenous Toxicant. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 239-257.

Funes - Cravioto, E.B. Cambert, J. Lindsten, L. Ehrenberg, A.T. Natarajan y S. Osterman (1976) Chromosome aberrations in workers exposed to vinyl chloride. Lancet 1: 459.

Galloway, S.M., Bloom, A.D. Resnick, M., Margolin, B.H., Nakamura, F., Archer, P., and Zeiger (1985). Development of a Standard Protocol for in vitro cytogenetic testing with chinese hamster ovary cells. Comparison of results for 22 compounds in two laboratories. Environmental mutagenesis 7(1).

García, G. (1984) "Reproducibilidad de los efectos genotóxicos de la ciclofosfamida en linfocitos humanos en cultivo". Tesis Profesional, Fac. de Ciencias., U.N.A.M., México.

Gaudin, D., Yielding, K.L., Stabler, A. and Brown John. (1971) The effect of DNA repair inhibitors on the response of tumors treated with X-ray and alkylating agents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 202-206.

Gebhart, E., Wildolph, B., y Wopftier, F. (1980). Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. Hum. Genet. 56: 156-167.

Gebhart, E. (1981). Sister chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. Human Genet. 58: 235-254.

Gebhart, E.J., Losing, R.J., Mueller, B. and Wildolph, B. (1982) Interindividual variation of cytogenetic damage by cytostatic therapy. En: Mutagens in our Environment. Alan. R. Liss Inc. N.Y. p.p. 89-98.

Generoso, W.M. (1973). Evaluation of chromosome aberration effects of chemical in mouse germ cells. Environ. health perspec. Exp. Issue No. 6.

Ghosh, K.P., y Nand, R., (1979). Reduced frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured with autologous serum. Human Genet. 51: 167-170.

Gonnert, R. y Schraufstatter, E. (1960). Experimentelle untersuchongen mit N-(2'-chlor 4-nitrophenyl) 5-chlorsalicylamid, einen neuen bandwurmmittel. I. mitterlug. Chemotherapeutische Versuche Arzneim Forsch (10: 881-884).

González, O.A. (1981). Panorama de las micosis en México. Salud Pública de México 23: 213-216.

Griffin, P.J. (1979). Drug-induced neoplasia. in Iatrogenic Diseases, Second Edition. D'Arcy P.F.D. and Griffin, J.P. (Eds). Oxford University Press.

Griffin, P.J. (1979). Disturbance of porphyrin metabolism. in: Iatrogenic Diseases, D'arcy, P.F. y Griffin, J.P. (EDS) p.p. 200-210. Oxford University Press.

Grollman, P.A. (1966). Structural basis for inhibition of protein Synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. Biochemistry 56: 1867-1972.

Guilford, J.P. (1956). Fundamental Statistics in Psychology and Education. Mc Graw Hill Book Co. N.Y. p.p. 234.

Gutiérrez, G., Ludlow, A., Espinosa, G. (1976). National Serologic Survey, II. Search for Antibodies against Entamoeba Histolytica in México. En: Proceeding of the international conference on amebiasis. Mexico City. Inst. Mex. del Seguro Social. (Edit.) Sepúlveda, B., Diamond, L.S.

Habedank, M., Eber, J., Brull, D. y Stumpf, C. (1982). Increased SCE in epileptics children during long term therapy with phenytoin. Human Genet. 61: 71-72.

Hahn, F.E. (1968). Interaction of antimalarials with DNA. Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem. 349: 955-956.

Hakulinen, T., Salonen, T., Teppo, L. (1976). Cancer in the offspring of fathers in hydrocarbon-related occupations. Br. J. Prev. Med. 30: 138-140.

Hampel, K., Kober, D., Rosch, H., Gerhartz, H., y Meining, K. (1966). The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes, in vitro. Blood 27: 816-823.

Hampel K.E., Lackner G., Schulz G. y Busse V. (1971). Chromosomenmutationen durch azatioprim bei menschlichen leucocyten in vitro. Z. Gastroenterologie 9: 47-51

Hanson J.W. and Smith D.W. (1975). The fetal hydantoin syndrome. Journal Pediatric 87: 285

Harden D. (1964). Cytogenetic studies on patients with virus infection and subjects vaccinated against yellow fever. Amer. J. Hum. Genet. 16: 204

Hart, C.W. and Naunton, R.F. (1964). The ototoxicity of chloroquine phosphate. Arch. Otolaryngol. 80: 407-412

Hartmut, L., Parada, F.L. y Weinberg, A.R. (1983). cellular oncogens and multistep carcinogenesis. Science 22: 771-778

Hayward, W.S., Neel, B.G. y Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALU-induced. Nature (London) 290: 475-480

Herbst, L.A., Scully, E.R., Welch, R.W. y Cole, P. (1977). Abnormal development of the human genital tract following prenatal exposure to diethylestilbestrol. En: Origins of human cancer. Hiatt, M.H., Watson, J.D. and Winsten, A.J. p.p. 399-412. Cold Spring Harbor Laboratory.

Henkind, P. y Rotlfield, N.F. (1963). Ocular abnormalities in patients treated with synthetic antimalarial drugs" New England J. Med. 269: 433-439.

Herha, J. and Obe, G. (1976). Chromosomal damage in epileptics on monotherapy with carbamazepine and diphenylhidantoin. Human Genetics 34: 255-263

Hernández, G.A. y Mutchinick, O. (1984). "Efectos mutagénicos de medicamentos antiparasitarios". Presentación mensual de la asociación de genética. Méx. D.F.

Homewood, C.A., Warmust, D.C., Peters, W. y Dasgaley V.C. (1972). Lysosomes pH and the anti-malarial action of chloroquine. Nature, 235: 50-52. *Lucas*

ICPEMC (1984). "Report of ICPEMC, Task Group 5, on the differentiation between genotoxic and non-genotoxic carcinogens". Mutat. Res. 133: 1-49

Infante, F.P. (1976). "Oncogenic and mutagenic risks in - communities with polivinyl chloride production facilities. En: Annals of the New York Academy of Sciences, 271: 49-57

Infante, P.F., Wagoner, J.K., Wan-Weller, R.J. (1976) Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic Risks Associated with Vinyl Chloride. Mutat. Res. 41: 131-142

Infante, P.F. (1980). Chloroprene adverse effects on reproduction. En: Infante, P.F., Legator, R.S., (Eds.) Proceedings of a workshop on methodology for assessing reproductive hazard in the workplace. DHHS (NIOSH) Publication -- 81-100 U.S. Government Printing Office. WA D.C. p.p. 87-102.

International Agency for Research on Cancer Monographs on The Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Human. (1982). Supplement 4, IARC France p. 292.

Iskandar, O. y Vijayalakshmi, E. (1980). The enhancement of the effect of AFB by metabolic activation with rat-liver - microsomes on human lymphocytes assayed with the micronucleus test. Mutat. Res. 91: 63-66

Ivette, J.L. y Tice, R.R. (1981). Diethylstilbestrol diphosphate induces chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges in murine bone marrow cells in vivo. Environmental Mutagenesis. 3: 445-452

Jondorf, W.R., Maickel, R.P., y Brodie, B.B. (1959). Inability of newborn mice and guinea pigs to metabolize drugs. Biochem. Pharmacol 1: 353-355.

Jorgensen, J.H., Alexander, A.G., Graybill, R.J. y Drutz, J.D. (1981). Sensitive bioassay for ketoconazole in serum and cerebrospinal fluid. Antimicrobial agents and chemotherapy. 20(1): 59-62.

Karran, P., Stevens, S. and Sedgwick, B. (1982). The removal of O⁶-methylguanine from DNA is not dependent on DNA polymerase. Mutat. Res. 104: 67-73.

Kato, R., Chiesara, E. y Vasanelli, P. (1962). Metabolic differences of strychnine in the rat in relation to sex. Jap. J. Pharmacol. 12: 26-33.

Keeling, J.E.D. (1968). The chemotherapy of cestode infections. Advances in Chemotherapy 3: 109-152.

Kharrazi, M., Potasnik, G., y Goldsmith, G. (1980). Reproductive effects of dibromochloropropane. Israel, J. Med. Sci. 10: 403-406.

Kimball, R.F. (1977). The mutagenicity of hydrazine and some of its derivatives. Mutat. Res. 39: 111-126.

Klein, G. (1983). Specific chromosomal translocation and the genesis of B cell derived tumors in mice and man. Cell 32: 311-315.

Knill-Jones, R.R., Newman, B.J., y Spence, A.A., (1975). Anesthetic Practice and Pregnancy. *Lancet* 2: 807-809.

Kram, D., Bynum, D.G., y Tice, R. (1981). Bromodeoxiuridine labeling of mammalian chromosomes for the analysis of S.C.E. and cell replication kinetics. En: *Current Trend in Morphological Techniques*. J.E. Johnson, (Ed.) CRC Press, Inc. Chapter 8.

Kucerova, M., Polivkova, Z., y Batora, J., (1979). Comparative evaluation of the frequency of chromosomal aberrations and SCE numbers in peripheral lymphocytes of workers occupationally exposed to vinyl chloride monomer. *Mutat. Res.* 67: 97-100.

Ladik, J.J., (1985). Physical mechanisms of the activation of oncogenes through carcinogens. En: *Molecular Basis of Cancer. Part A: Macromolecular Structure, Carcinogens and Oncogenes*. p.p. 343-356.

Ladu, B.N. (1983). Pharmacogenetics. En: *Essentials of pharmacology*. Bevan, J.A. and Thompson, J.H. (Eds). 3a. Edición. p.p. 62-68.

Lambert, B., Linblad, A., Holmberg, K. and Francesconi, D. (1982). The use of sister chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. Tomado de: Sister Chromatid Exchange. Sheldon - Wolff. (Ed.) Cap. 6, p.p. 149-182.

Latt S., Allen J., Bloom S., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B., and Wolff S. (1981). SCE: A report of gene-tox program. Mutat. Res. 87 (1): 17-62.

Leder P., Battey J., Lenoir G., Moulding C., Murphy N., Potter H., Stewart T., and Taub R. (1983). Translocation among antibody gene in human cancer. Science 222: 765-771.

Legator M.S., Connor H.T., and Stocckel M. (1974). Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body of human and mice. Science 188: 1118-1119.

Levine, B.B. (1966). Immunóchemical mechanisms of drug allergy. Annu. Rev. Med. 17: 23.

Levine, R.R. (1978). Pharmacology: drug actions and reactions. Little Brown and Company, Boston; p.p. 241-297.

Littlefield, G.L., and Goh K-O (1973). Cytogenetics studies in control men and women. Cytogenetic Cell Genet. 12: 17-34.

Littlefield, G.L., Colyer, P.S., and Dufrain, R.J. (1981). Physical, chemical and biological factors affecting SCE in induction in human lymphocytes exposed to mitomycin C prior to culture. 81: 377-386.

Loprieno, N. (1982). Mutagenic hazard and genetic risk evaluation on environmental chemical substance. In: Sugimura, T., Kondo, S. and Takebe, H. (1982). Environmental mutagens and carcinogens. Alan, R. Liss, inc. New York. p.p. 259-281.

Lutsch, E.F. and Morris R.W. (1967). Circadian periodicity in susceptibility to lidocaine hydrochloride. Science 156: 100.

Macomber P.B., O'Brien R.L., and Hahn F.E. (1966). Chloroquine physiological basis of drug resistance in Plasmodium berghei. Science 152: 1374.

Mac Phee, D.G. and Pudger D.M. (1977). Mutagenicity test on anthelmintics: microsomal activation of Viprynjium embonate to a mutagen. Mutat. Res. 48: 307-312.

Maddle, S., Westphal, D., Milbing, V., and Obe, G. (1978). Testing in vitro of an indirect mutagen (CP) with human leukocytes culture. Activation by liver perfusion and by incubation with crude liver homogenate. Mutat. Res. 51: 95-99.

Maddle, S. (1981). Evaluation of experimental parameters in an S9/human leukocytes SCE test with cyclophosphamide. Mutat. Res. 85: 347-356.

Marcel, B. (1980). Mechanism of action of antifungal drugs with special reference to the imidazole derivatives. Review of infectious diseases 2: 520-533.

Margolin, B.H. (1985). Communication 'Personal.

Martuchelli, Q.A. (1967). Frecuencia de parásitos intestinales en niños en la República Mexicana. Rev. Mex. Pediatría 36: 111.

Matsunaga, E. (1980). Retinoblastom most resistance and 13q chromosomal deletion. Human. Genet. 56: 53-58.

Matz, G.J. and Naunton, J. (1968) Sototoxicity of chloroquine. Arch. Otolaryngol. 88: 370.

Mazel, P. (1971). General principles and procedures for drug metabolism in vitro. En: La Du, B.N., Mandel, H.G. and Way, E.L. (Eds). Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. p.p. 527-545. The Williams & Wilkins Co.

Mc Cann J., Choi E., Yamasaki E., and Ames B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella microsome test: assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 5132-5139.

X Mc Chesney, W.E., Fasco, J.M. and Banks, F.W. (1967). The metabolism of chloroquine in man during and after repeated oral dosage. Journal Pharm. and Exp. Therap. 158: 323-331.

McKusick V.A. (1967). Mendelian inheritance in man. Catalogue of autosomal dominant autosomal recessive and X linked phenotypes. 5th. Ed. ✓

Chesney

McFee, A.F., Sherrill, M.N. (1981) Mitotic response and S.C.E. in lymphocytes cultured in sera from different sources. Experientia, 37: 27-29.

Medoff, G., Kobayashi, G.S. (1980). "Strategies in the treatment of systemic fungal infections" *sequido*
N. Engl. J. Med. 302: 145-155.

Miller, W.R. (1977). Prenatal factors. En: Origins of human cancer *sequido*
Hiatt, R.H., Watson, J.D. and Winsten, A.J. p.p. 381-398
Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller, E.C. and Miller, J.A. (1980). The mutagenicity of chemical carcinogens: correlation, problems and interpretations *sequido* (Eds)
En: Hollander, A. and Serres, J. (Eds) Chemical mutagens.
Plenum Press. Publishing corporation 1: 83-119.

Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. cell. Res. 20: 613-616.

Morad, M., and Zawahri, M. (1977). Non random distribution of cytophosphamide induced chromosome break^{ts} *→ sequels*
Mutat. Res. 42: 125-130.

Moyed, H.S. (1964). Biochemical mechanisms of drug resistance. Ann. Rev. Microbiol. 18: 347.

Mulvihill, J.J. (1982). Towards documenting human germinal mutagens: epidemiologic aspects ^{of} ~~of~~ ecogenetics in human mutagenesis. p.p. 625-637 *→ sequels*

Tomado de Sugimura, T. y cols. (1982). Environmental mutagens and Carcinogens. Alan, R. Liss, Inc. New York.

Musilova, J., Michalova, K., and Urban, J. (1979). "SCE and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics". Mutat. Res. 67: 289-294

Mutchinik, O., Ruz, L., Oasa, L. (1980). Time of first generation metaphases. I. The effect of various cultures media and fetal calf serum in human lymphocytes cultures. Mutat. Res. 72: 124-134.

Nagaratnam, V.J., Chetiyawar Dana, A.D. y Rajiyam, (1977)
Aplasia and leukemia following chloroquine therapy.
Post grad. Med. J. 54: 118-112.

Matarajan, A., Taste, A., Van Bull, P., Mijers, M., and y
Voguel, D. (1976) Cytostatic effects of mutagens carcino-
gens after activation in microsomal system "in vitro". In
duction of ^{of} chromosome aberrations and ^{SOE by} sec ~~of~~ ^{by} diacetylnitro-
samine ^{and} DMN in CHO cell in the presence of rat-liver mi-
crosomes *siguido*
Mutat. Res. 37: 83-90.

Neel, J.V., Schull, W.J. and ^y Otake, M. (1982). Current
status of genetic follow-up studies in Hiroshima and Maga-
saki. Progr. Mutation Res. 3: 59-51.

Negrori, R., Robles, A., Arenchaerala, A., Tuculet, M.
~~and~~ ^y Galemberti, R. (1980). Ketoconazole in the treatment
of paraoccididomycosis and histoplasmosis *siguido*
Review of infectious diseases 2: 643-643.

Nestmann, R.E., Douglas, R.G., Kowbel, J.D. and ^{of} Harring-
ton, R.T. (1985). Solvent interaction with test compounds
and recommendation for testing to avoid artifacts *siguido*.
Environmental Mutagenesis. 7: 163-170.

Nomura, T. (1982). Parental exposure to X rays and ^ychemi-
cal induces heritable tumour and anomalies in mice *siguido*
Nature 296: 575-577.

Ober, G., Beck, P., and ^y Dudin, G. (1975) The human leuko-
-

* cyte test systems Human genetic PG: 205-302.

Okoyama, S. and Kitao, Y. (1981). "Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hydrazide on chromosome damage induced by mitomycin C in human lymphocytes" *Seguido*
Mutat. Res. 81: 75-80.

Parker, W.C., (1965). "The biochemical basis of allergic drug response". Ann. N.Y. Acad. Sci. 123: 55.

Paterson, M.C., Smith, P.H.M., Ichman, Anderson, A.K., and Fishman L., (1976). "Defective excision repair of γ -Ray damaged DNA in human (Ataxia Telangiectasia) fibroblasts" *Seguido*
Nature. 260: 444.

(En:

Paterson, M.C., et al. (1978). "DNA repair mechanisms". Hanawalt P.C. et al. (eds) Academic Press, New York: p.p. 207-213.

Paterson, M.C., Anderson B.P., Smith B. and Smith P.J. (1979). "Enhanced radiosensitivity of cultured fibroblasts from Ataxia Telangiectasia heterozygotes manifested by defective colony forming ability and reduced DNA repair replication after hypoxic γ -irradiation" *Seguido*
Cancer Res. 39: 3725-3734.

Pelayo C., Arias S, Perés-Tarayo, J.R. y Carbonel. L.H., (1970). "Texto de Patología". Ed. Fournier. México.

Pero R.W., Nyngelsson G., Mitelman F., Kornfeldt R., Thulin T. and Norden A., (1978). "Interindividual variation in the response of cultured human lymphocytes to exposure from DNA damaging chemical agents" *Seguido*
Mutat. Res. 53: 327-341.