

Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

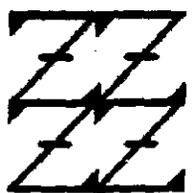
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFECTO DEL LEVAMISOL SOBRE LA FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN MEDULA OSEA DE RATONES MACHO CD-1



S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
CARLOS MANUEL ZUÑIGA PALENCIA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARIO A. ALTMIRANO LOZANO



LO HUMANO JE DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27 10 93



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.

A LA MEMORIA DE MI MADRE ELVIA ROSA PALENCIA. MARTELL

A LA MEMORIA DE MI HERMANO FRANCISCO ZUÑIGA PALENCIA

A MIS HERMANOS Y PADRE.

A LA FAMILIA CASTELLANOS CHAVEZ.

CON AMOR A MIS HIJOS

ROSALIA EDGAR PAVEL FRANCISCO MANUEL Y

CARLOS ALBERTO

A MARIA DE LA PAZ POR SU AMOR Y COMPRENSION

A TODOS LOS AMIGOS Y COMPAÑEROS

ACADEMICOS Y ADMINISTRATIVOS EN PARTICULAR A

MARIANO Y ARMANDO.

**CON MI PROFUNDO AGRADECIMIENTO A LOS
INTEGRANTES DEL JURADO POR SUS VALIOSAS OPINIONES..**

**A TODOS LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE
CITOGENETICA MUTAGENESIS Y TOXICOLOGIA REPRODUCTIVA**

**CON RESPETO Y ORGULLO A LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

**CON RESPETO Y AGRADECIMIENTO AL DR. MARIO
ALTAMIRANO LOZANO POR SU VALIOSO TIEMPO DESTINADO A
LA ASESORIA DE ESTA TESIS Y POR SU CALIDAD ACADEMICA Y
CALIDEZ HUMANA.**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
PARASITISMO EN MÉXICO	1
AGENTES ANTIPARASITARIOS	4
ANTECEDENTES DEL LEVAMISOL	4
SISTEMA INMUNE Y LOS IMIDAZOLES	9
TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	9
TIPOS DE CONTAMINACIÓN	10
SUSTANCIAS AMBIENTALES ANTROPOGÉNICAS	11
CARCINOGENÉISIS AMBIENTAL	12
SISTEMAS DE EVALUACIÓN	15
SISTEMAS DE PRUEBA <i>IN VIVO</i>	17
MÉDULA ÓSEA COMO SISTEMA DE PRUEBA	18
INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS	18
ÍNDICE MITÓTICO	26
TASA DE GENERACIÓN PROMEDIO	27
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50

RESUMEN

El levamisol es un compuesto con gran actividad antihelmíntica e inmunomoduladora, sin embargo posee además otras actividades farmacológicas como son la estimulación de los ganglios simpáticos y parasimpáticos, efecto que v acompañado de una inhibición de la reabsorción de la norepinefrina. Por su lado el tetramisol, el dexamisol y en menor medida el levamisol poseen actividad psicotónica y antidepresiva pero una dosis fuerte de levamisol es convulsionante.

Grupos de 4 ratones macho CD-1 fueron tratados por vía intraperitoneal (ip) con 0,14.5 mg/kg, 29.0mg/kg y 58.0 mg/kg de peso de levamisol y BrdU, 24 horas después los animales fueron sacrificados y partir de médula ósea se realizaron las preparaciones. El análisis de los resultados se realizó de la siguiente manera: en 1000 células se determino el índice mitótico (im), mientras que para establecer la tasa de generación promedio se evaluó el número de células en primera, segunda y tercera división. La frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) se estableció en un mínimo de 40 segundas metafases de rátón.

El análisis del índice mitótico encontrado en la médula ósea de los ratones tratados con el levamisol, observando que en todos los tratamientos hubo un incremento estadísticamente significativo de este parámetro (3.62 % para la dosis de 14.5, 5.08 % para la dosis de 29.0 μ g/g y de 3.49 % para la dosis más alta en comparación con el testigo negativo y el grupo tratado con el vehículo; $p < 0.05$ con prueba de diferencia de proporciones).

Cuando se analizó la tasa de generación promedio, los resultados obtenidos mostraron que en ninguna de las dosis aplicadas este compuesto modificó estadísticamente dicho parámetro aunque en los tres tratamientos hubo una disminución en el tiempo de generación celular, esto es, las células se estaban dividiendo más rápido.

A pesar de que en la dosis de 14.5 $\mu\text{g/g}$ de peso hay un leve incremento en la frecuencia de ICH's, esta no es estadísticamente significativa (3.09 vs 1.91 del testigo), mientras que en las dosis mas altas no se observa este comportamiento.

Los resultados obtenidos al evaluar el índice mitótico muestran que el levamisol induce proliferación celular, aunque en concentraciones más elevadas tiende a presentar un efecto citostático, retrasa la velocidad de división celular y que en nuestro caso no existe relación entre el índice mitótico y la cinética de proliferación celular.

El análisis de las frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas muestra que el levamisol en las dosis probadas no es genotóxico.

A pesar de que a nivel poblacional el levamisol no mostró efectos evidentes, se pudo establecer que existen individuos más susceptibles a la acción del levamisol.

INTRODUCCIÓN

PARASITISMO EN MÉXICO

Las parasitosis son importantes por su repercusión en la salud de la población en general, ya sea como causa de enfermedades o muerte. Estas forman parte de las enfermedades transmisibles y no siempre sintomáticas, lo que facilita este proceso (Tay, 1991).

Generalmente estas enfermedades son susceptibles de control y erradicación y no solo afecta la salud sino también la economía. En los países en vías de desarrollo, incluyendo México, las parasitosis que con mayor frecuencia se presentan son las siguientes:

AMIBIASIS

GIARDIASIS

TRICOCEFALOSIS

ASCARIASIS

UNCINARIASIS

Las parasitosis ocurren con mayor frecuencia en los núcleos de población más pobres, carentes de recursos materiales, higiénicos, educativos, etc., los cuales son además influenciados por malos hábitos alimenticios, fecalismo al aire libre y proliferación de plagas. Debido a esto en la mayoría de los casos la diarrea aguda es la mas frecuente y representa la segunda causa de la morbilidad en toda la población y la segunda causa de consulta medica en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Rodríguez M, *et al.*, 1989).

TIPOS DE PARÁSITOS MAS FRECUENTES EN MÉXICO

AMIBIASIS:

Es la infección producida por el parásito *Entamoeba histolytica*, su distribución es mundial con prevalencia estimada del 12%. Se le considera la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias después del paludismo y la esquistomiasis. (Rodríguez, M., et al., 1989).

La *E. histolytica* es una de las 7 cepas del género *entamoeba* que habitan en el humano, encontrando que de todas solamente esta es patógena en el humano (Rodríguez M., et al., 1989). Este parásito puede estar presente en el cuerpo humano sin signos ó síntomas, presenta 3 fases de desarrollo importantes que son: el prequiste, quiste y trofozoito.

En México la mortalidad por amibiasis disminuyó de 4.7/100,000 habitantes en 1972 a 2.3/100,000 habitantes en 1981 y se atribuye esta disminución no a las mejores medidas de prevención, sino a la mayor disponibilidad actual de mejores métodos diagnósticos y terapéuticos (Rodríguez, M., et al. 1989).

Para el tratamiento de la *Entamoeba*, generalmente se utilizan los siguientes medicamentos: Metronidazol, dehidroemetina y la emetina (Tay, 1991).

GIARDIASIS:

Fue observada por primera vez en 1681 por Lewenhoeck de sus propias heces fecales. Este parásito en su forma adulta tiene dos núcleos en forma oval y el quiste es ovalado con 2 ó 3 núcleos pequeños y redondos localizados en los polos los cuales se encuentran rodeados por flagelos pudiendo teñirse los quistes de amarillo ó azul con lugol.

Los quistes ingeridos por el hombre pasan sin lesión por el estómago y al llegar al duodeno ocurre la liberación de los flagelados que inician su multiplicación.

Se ha observado cierta relación entre giardiasis y sujetos del grupo sanguíneo A lo que sugiere la presencia de fenómenos inmunológicos por los cuales los antígenos de los parásitos y los del huésped impiden reconocer al protozoo por el sistema inmunológico de defensa del huésped.

Para tratar este tipo de enfermedades, los medicamentos recomendados son: Metronidazol, otros compuestos imidazólicos (secnidazol) y la furazolidona (Tay, 1991).

ASCARIASIS:

Es una geohelminthiasis cosmopolita que se observa con mayor frecuencia en zonas templadas y en lugares donde las condiciones de higiene y socioeconómicas son precarias. En México el 33% de la población está parasitada y de estos el 6% en forma masiva, a tal grado que en 1981 el IMSS reportó que de 3,571,189 casos diarreicos 370,850 fueron causados por ascariasis. Este parásito es capaz de presentarse en todas las edades, principalmente en la infancia y su forma de transmisión es fecal-oral con lo que se adquiere al ingerir huevecillos (Rodríguez M., *et al.*, 1989).

Para tratar esta parasitosis se utilizan de manera regular los siguientes medicamentos: Piperazina, mebendazol y el albendazol (Rodríguez M., *et al.*, 1989).

OXIURIASIS:

Es una helmintiasis cuyo agente causal es el oxiuro *Enterobius vermicularis* llamado comúnmente "alfilerillo" en México. El verme adulto tiene forma fusiforme, es de color blanco amarillento y su hábitat es el ciego. La cabeza se fija a la mucosa de la pared intestinal siendo el hombre el único huésped de este parásito.

En 1981 el IMSS reportó que de 3,571,189 casos diarréicos el 4% corresponde a oxiuriasis, los cuales causan gran morbilidad en México a nivel de lactantes y preescolares y esto debido principalmente a la contaminación de los alimentos suelos y aguas por heces fecales. Su transmisión es por vía ano-mano-boca. El tratamiento recomendado para esta enfermedad es: Pamoato de piruinio.

AGENTES ANTIPARASITARIOS

El problema principal de las parasitosis es casi siempre la dificultad que existe para poder controlarlas y eliminarlas. Este hecho a provocado que al igual que existen un gran número de organismos responsables de enfermedades, existan igual número de medicamentos.

A pesar de que la lista de agentes terapéuticos es muy grande, los principales agentes antiparasitarios, usados de manera específica se encuentran listados en la tabla 1.

ANTECEDENTES DEL LEVAMISOL

Fue desarrollado en 1960 por los laboratorios Janssen al investigar un nuevo medicamento luego de la síntesis de la sustancia 2721 ineficiente para

OXIURIASIS:

Es una helmintiasis cuyo agente causal es el oxiuro *Enterobius vermicularis* llamado comúnmente "alfilerillo" en México. El verme adulto tiene forma fusiforme, es de color blanco amarillento y su hábitat es el ciego. La cabeza se fija a la mucosa de la pared intestinal siendo el hombre el único huésped de este parásito.

En 1981 el IMSS reportó que de 3,571,189 casos diarréicos el 4% corresponde a oxiuriasis, los cuales causan gran morbilidad en México a nivel de lactantes y preescolares y esto debido principalmente a la contaminación de los alimentos suelos y aguas por heces fecales. Su transmisión es por vía ano-mano-boca. El tratamiento recomendado para esta enfermedad es: Pamoato de piruinio.

AGENTES ANTIPARASITARIOS

El problema principal de las parasitosis es casi siempre la dificultad que existe para poder controlarlas y eliminarlas. Este hecho a provocado que al igual que existen un gran número de organismos responsables de enfermedades, existan igual número de medicamentos.

A pesar de que la lista de agentes terapéuticos es muy grande, los principales agentes antiparasitarios, usados de manera específica se encuentran listados en la tabla 1.

ANTECEDENTES DEL LEVAMISOL

Fue desarrollado en 1960 por los laboratorios Janssen al investigar un nuevo medicamento luego de la síntesis de la sustancia 2721 ineficiente para

OXIURIASIS:

Es una helmintiasis cuyo agente causal es el oxiuro *Enterobius vermicularis* llamado comúnmente "alfilerillo" en México. El verme adulto tiene forma fusiforme, es de color blanco amarillento y su hábitat es el ciego. La cabeza se fija a la mucosa de la pared intestinal siendo el hombre el único huésped de este parásito.

En 1981 el IMSS reportó que de 3,571,189 casos diarréicos el 4% corresponde a oxiuriasis, los cuales causan gran morbilidad en México a nivel de lactantes y preescolares y esto debido principalmente a la contaminación de los alimentos suelos y aguas por heces fecales. Su transmisión es por vía ano-mano-boca. El tratamiento recomendado para esta enfermedad es: Pamoato de piruinio.

AGENTES ANTIPARASITARIOS

El problema principal de las parasitosis es casi siempre la dificultad que existe para poder controlarlas y eliminarlas. Este hecho a provocado que al igual que existen un gran número de organismos responsables de enfermedades, existan igual número de medicamentos.

A pesar de que la lista de agentes terapéuticos es muy grande, los principales agentes antiparasitarios, usados de manera específica se encuentran listados en la **tabla 1**.

ANTECEDENTES DEL LEVAMISOL

Fue desarrollado en 1960 por los laboratorios Janssen al investigar un nuevo medicamento luego de la síntesis de la sustancia 2721 ineficiente para

TABLA 1.- Principales drogas utilizadas contra parásitos intestinales.

DROGA	NEMATODOS	CESTODOS	TREMATODOS
LEVAMISOL	Uso Clínico	X	Uso Clínico
PIRANTEL	Uso Clínico	X	X
THIABENDAZOL	Uso Clínico	X	Alguna actividad reportada
MEBENDAZOL	Uso Clínico	Uso Clínico	Alguna actividad reportada
NICLOSAMIDA	X	Uso Clínico	Alguna actividad reportada
PRAZIQUANTEL	X	Uso Clínico	Uso Clínico
OXAMNIQUINA	X	X	Uso Clínico

(Nanah y Gilles, 1985)

ellos, obtuvieron un derivado del Amino-thiazol el R6438 dotado de cierta eficiencia. Al estudiar metabolitos de esta substancia se obtuvo un compuesto activo el R8141 que después de una serie de investigaciones encaminadas a disminuir los costos y aumentar la estabilidad en el agua originó el R8299 que fue bautizado como **Clorhidrato de tetramisol**.(Godman y Gilman 1991).

El tetramisol es un derivado imidazólico y thiazólico de fórmula condensada $C_{11}H_{12}N_2S$ con peso molecular 204.75 que es TETRAHIDRO 2,3,5,6 FENIL-6 IMIDAZOL(2-1-6) THIAZOL (figura 1). Es un compuesto racémico que posee un carbono alfa asimétrico. Los dos isómeros son separables en una forma levógiro ó LEVAMIZOL y en la forma dextrógiro ó DEXAMIZOL. De estos compuestos el levamizol es más activo que el dexamizol sin ser más tóxico.

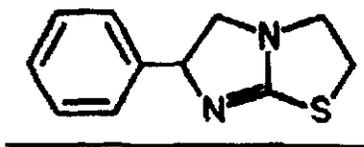


Figura 1.- Estructura química del Levamisol.

En su estado base es un polvo fino blanco, inodoro muy estable en agua y muy estable en medio ácido y acuoso, en solución alcalina la hidrólisis genera productos insolubles tales como el OXO 2 (MERCAPTO-2 ETIL) 3 FENIL-5 IMIDAZOL ó OMPI que es uno de los principales metabolitos obtenidos por rompimiento del ciclothiazol.

FARMACOCINETICA

ABSORCIÓN:

Es de acción rápida y se absorbe a partir del tracto gastrointestinal ó del punto de inyección (ya sea intramuscular o parenteral), los valores sanguíneos máximos son obtenidos entre 1 y 6 horas. La droga generalmente es rápidamente distribuida y puede detectarse en todos los tejidos y líquidos incluyendo lagrimas y mucosa bronquial.

En bovinos el clorhidrato de tetramisol racémico en una dosis oral de 20 µg/Kg de peso de muestra los siguientes resultados en su retención:

Después de 24 hrs el tetramisol se fija principalmente en el hígado y riñones y disminuye en corazón, músculos, cerebro y sangre. Al paso de 72 hrs. se nota una eliminación muy clara del tetramisol en todos los órganos, el hígado y el riñón retienen ciertas cantidades (alrededor de 0.33 μg y 0.18 $\mu\text{g}/\text{gr}$. respectivamente), teniendo que después de 7 días la eliminación es total.

En ratas los resultados son similares, Bernard y Col. notaron que este compuesto se fijaba sobre los tejidos que contenían melanina, en el tracto urinario, en la piel, y en los folículos pilosos. Esta fijación es importante y declina al pasar 4 días.

En seres humanos adultos al administrar una dosis oral de 150 mg. el levamisol es rápidamente absorbido alcanzando una concentración pico en el plasma de unas 0.7 μg / ml en el curso de 1 ó 2 horas.(Goodman y Gilman 1991).

La droga es completamente metabolizada en el hígado y eliminada totalmente en la orina y en las heces en un curso de 48 horas.

La vida media del levamisol es de alrededor de 4 horas, mientras que la de sus metabolitos es una media de 16 horas (Symoens y Rosenthal, 1977).

ELIMINACIÓN Y TOXICIDAD

El levamisol y sus metabolitos son eliminados por vía urinaria (5%) y fecal. La toxicidad aguda del tetramisol racémico y sus isómeros izquierdo y derecho son comparables con una intoxicación aguda por el levamisol y se observan los fenómenos de lagrimación, salivación, defecación con contracciones musculares y problemas nerviosos.

La toxicidad crónica del levamisol tiene una apariencia reducida, al administrar diariamente durante 120 días (35mg/Kg peso), ocurrió lo mismo que con la aplicación de 100 mg/Kg peso no provocando en la rata ningún cambio. Al administrar 25 mg/Kg en ratón durante un mes no altera los parámetros hematológicos pero disminuye la respuesta a mitógenos y antígenos.

En borregos al aplicarles una dosis de 20 mg/kg una vez cada 4 semanas durante un periodo de 6 meses no se observaron efectos carcinogénicos ni hematológicos. De manera similar después de 12 a 18 meses de tratamientos en ratas y perros tampoco se observaron efectos (JEFCA, 1992).

PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Además de la actividad antihelmítica y de las actividades inmunomoduladoras se han encontrado otras actividades farmacológicas presentes para el levamisol, como son que estimula los ganglios parasimpáticos y simpáticos, observando que el efecto sobre de estos va acompañado de una inhibición de la reabsorción de la norepinefrina. (Holcombe *et al.*, 1994).

El tetramizol, el dexamizol y en menor medida el levamisol poseen actividad psicotónica y antidepresiva pero una dosis fuerte de levamisol es convulsionante. A bajas dosis (1×10^{-6} M) inhibe a la fosfatasa alcalina de la mayor parte de los tejidos de mamíferos y las iso-enzimas del perro y del hombre, así como en las isoenzimas placentarias de los humanos, el levamisol aumenta la producción de interferones.

EL SISTEMA INMUNE Y LOS IMIDAZOLES

En 1972 Renoux y Renoux descubrieron que el levamisol aumentaba la protección de la vacuna contra la Brucella. Además observaron que animales tratados con esta droga, debido a infecciones provocadas por nemátodos, eran menos susceptibles a adquirir otras enfermedades de tipo infeccioso. A partir de aquí, se estudió con más detalle sus posibles propiedades inmuno-regulatorias. Se observó que aumentaba la respuesta de los linfocitos humanos a mitógenos ó antígenos *in vitro* (Sunshine *et al.*, 1977), la síntesis de ADN en timocitos (Merluzzi *et al.*, 1975) y la producción de linfocinas (Whitcomb *et al.*, 1976). Estos efectos en la proliferación de linfocitos también son provocados por el imidazol u otros agentes que incrementen los niveles de Guanosinmonofosfato ciclico (GMPc) como lo hace el levamisol (Hadden y Coffey, 1975). Se ha propuesto que el levamisol actúa sobre el nucleótido ciclico fosfodiesterasa, incrementando el rompimiento de AMPc y disminuyendo el rompimiento del GMPc. Este efecto al menos no es mediado por la inhibición de la liberación de la histamina en preparaciones de linfocitos mediante el incremento en la producción del AMPc (Lichtestein y Margolis, 1968), el isoproterol a través de receptores B-adrenérgicos y la teofilina al inhibir a la AMPc fosfodiesterasa.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL:

Para la OMS y la EPA en 1990, las sustancias químicas de uso cotidiano en el mundo son aproximadamente 73,000 con un incremento anual entre 1000 y 2000 sustancias, de las cuales bien estudiadas únicamente son 5000 (Rochelle, 1993).

En la actualidad debido al gran aumento en la cantidad de sustancias que entran en el ambiente en muchos casos se ha rebasado la capacidad de los

EL SISTEMA INMUNE Y LOS IMIDAZOLES

En 1972 Renoux y Renoux descubrieron que el levamisol aumentaba la protección de la vacuna contra la Brucella. Además observaron que animales tratados con esta droga, debido a infecciones provocadas por nemátodos, eran menos susceptibles a adquirir otras enfermedades de tipo infeccioso. A partir de aquí, se estudió con más detalle sus posibles propiedades inmuno-regulatorias. Se observó que aumentaba la respuesta de los linfocitos humanos a mitógenos ó antígenos *in vitro* (Sunshine *et al.*, 1977), la síntesis de ADN en timocitos (Merluzzi *et al.*, 1975) y la producción de linfocinas (Whitcomb *et al.*, 1976). Estos efectos en la proliferación de linfocitos también son provocados por el imidazol u otros agentes que incrementen los niveles de Guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) como lo hace el levamisol (Hadden y Coffey, 1975). Se ha propuesto que el levamisol actúa sobre el nucleótido cíclico fosfodiesterasa, incrementando el rompimiento de AMPc y disminuyendo el rompimiento del GMPc. Este efecto al menos no es mediado por la inhibición de la liberación de la histamina en preparaciones de linfocitos mediante el incremento en la producción del AMPc (Lichtestein y Margolis, 1968), el isoproterol a través de receptores B-adrenérgicos y la teofilina al inhibir a la AMPc fosfodiesterasa.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL:

Para la OMS y la EPA en 1990, las sustancias químicas de uso cotidiano en el mundo son aproximadamente 73,000 con un incremento anual entre 1000 y 2000 sustancias, de las cuales bien estudiadas únicamente son 5000 (Rochelle, 1993).

En la actualidad debido al gran aumento en la cantidad de sustancias que entran en el ambiente en muchos casos se ha rebasado la capacidad de los

sistemas para transformar las sustancias naturales, ó bien los sistemas carecen de la capacidad para asimilar, transformar ó eliminar las sustancias sintéticas; por lo tanto se ha alterado el equilibrio ambiental y debido a la acumulación de materia y energía se da la contaminación (Ortiz *et al.*, 1987). A las formas de materia que exceden las concentraciones naturales en un momento y en un sistema dado, causando efectos adversos en el se les considera "contaminantes tóxicos".

TIPOS DE CONTAMINACIÓN

Los tipos de contaminación existentes en el ambiente podemos clasificarlos en tres grandes grupos:

BIOLÓGICA: Como los Virus, las Bacterias, los Protozoarios, los Hongos y algunos Vegetales.

FÍSICA: Como el Calor, el Ruido y las Radiaciones.

QUÍMICA: Los Hidrocarburos, los Metales, los Plaguicidas, los Medicamentos, etc.

CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA:

La contaminación biológica propiamente dicha requiere que un microorganismo se encuentre en un sustrato al que no pertenece ó en uno al que si pertenece pero en concentraciones que exceden a las naturales (Albert, 1988).

En los países en desarrollo son muy amplios los ejemplos de este tipo de contaminación debido a las características de condiciones de higiene que son muy deficientes. La contaminación biológica se puede evitar ó controlar con

sistemas para transformar las sustancias naturales, ó bien los sistemas carecen de la capacidad para asimilar, transformar ó eliminar las sustancias sintéticas; por lo tanto se ha alterado el equilibrio ambiental y debido a la acumulación de materia y energía se da la contaminación (Ortiz *et al.*, 1987). A las formas de materia que exceden las concentraciones naturales en un momento y en un sistema dado, causando efectos adversos en el se les considera "contaminantes tóxicos".

TIPOS DE CONTAMINACIÓN

Los tipos de contaminación existentes en el ambiente podemos clasificarlos en tres grandes grupos:

BIOLÓGICA: Como los Virus, las Bacterias, los Protozoarios, los Hongos y algunos Vegetales.

FÍSICA: Como el Calor, el Ruido y las Radiaciones.

QUÍMICA: Los Hidrocarburos, los Metales, los Plaguicidas, los Medicamentos, etc.

CONTAMINACIÓN BIOLÓGICA:

La contaminación biológica propiamente dicha requiere que un microorganismo se encuentre en un sustrato al que no pertenece ó en uno al que si pertenece pero en concentraciones que exceden a las naturales (Albert, 1988).

En los países en desarrollo son muy amplios los ejemplos de este tipo de contaminación debido a las características de condiciones de higiene que son muy deficientes. La contaminación biológica se puede evitar ó controlar con

relativa facilidad si se analiza la contaminación de suelos, agua, aire y sus efectos adversos en el tiempo y en el espacio lo que permite su identificación y el remedio en un tiempo razonable (Albert, 1988).

La contaminación biológica causa una alta tasa de mortandad que puede ser controlable por medio de higiene, ingeniería sanitaria, etc.

SUSTANCIAS AMBIENTALES ANTROPOGÉNICAS

Se llama así a todas las sustancias que se pueden encontrar en el ambiente como resultado de las actividades del hombre, dentro de las que quedan las contaminaciones físicas y químicas. Por su origen se clasifican en naturales y en sintéticas ó xenobióticas.

SUSTANCIAS XENOBIÓTICAS

Las sustancias sintetizadas por el hombre han aumentado de una manera casi exponencial, así en 1960 se habían descrito 1,000,000 de sustancias químicas ó un poco más, mientras que en 1980 ya se conocían 5,000,000 de sustancias químicas (Albert, 1988). La gran mayoría de estas sustancias no tienen un uso posterior a su descripción, o bien, su uso esta limitado a laboratorios de investigación.

Para la EPA y la OMS se aceptaban en 1980 que las sustancias de uso cotidiano, 1,500 son principios activos de plaguicidas, 4,000 son fármacos, 10,000 se emplean en cosméticos y otras 10,000 se utilizan en productos para uso doméstico además de 5,000 en textiles y 9,000 en otros usos (Albert, 1988).

Debido a la gran cantidad de compuestos a los que el hombre se encuentra expuesto, ya sea de manera natural o de manera ocupacional, ha sido en los

relativa facilidad si se analiza la contaminación de suelos, agua, aire y sus efectos adversos en el tiempo y en el espacio lo que permite su identificación y el remedio en un tiempo razonable (Albert, 1988).

La contaminación biológica causa una alta tasa de mortandad que puede ser controlable por medio de higiene, ingeniería sanitaria, etc.

SUSTANCIAS AMBIENTALES ANTROPOGÉNICAS

Se llama así a todas las sustancias que se pueden encontrar en el ambiente como resultado de las actividades del hombre, dentro de las que quedan las contaminaciones físicas y químicas. Por su origen se clasifican en naturales y en sintéticas ó xenobióticas.

SUSTANCIAS XENOBIÓTICAS

Las sustancias sintetizadas por el hombre han aumentado de una manera casi exponencial, así en 1960 se habían descrito 1,000,000 de sustancias químicas ó un poco más, mientras que en 1980 ya se conocían 5,000,000 de sustancias químicas (Albert, 1988). La gran mayoría de estas sustancias no tienen un uso posterior a su descripción, o bien, su uso esta limitado a laboratorios de investigación.

Para la EPA y la OMS se aceptaban en 1980 que las sustancias de uso cotidiano, 1,500 son principios activos de plaguicidas, 4,000 son fármacos, 10,000 se emplean en cosméticos y otras 10,000 se utilizan en productos para uso doméstico además de 5,000 en textiles y 9,000 en otros usos (Albert, 1988).

Debido a la gran cantidad de compuestos a los que el hombre se encuentra expuesto, ya sea de manera natural o de manera ocupacional, ha sido en los

últimos años una gran preocupación, debido a los efectos que puedan causar estas sustancias a los organismos. Durante muchos años, se han desarrollado metodologías encaminadas al estudio de este tipo de interacciones, para lo cual se requiere tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- 1.-Información general de la sustancia.
- 2.-Información química.
- 3.-Información analítica.
- 4.-Rutas por las que llega al ambiente.
- 5.-Transporte y distribución en el ambiente.
- 6.-Modificaciones en el ambiente.
- 7.-Biotransformación e interacciones con los seres vivos.
- 8.-Efectos biológicos.
- 9.-Si se demostró que causa un problema ambiental se investigará la acumulación en el medio.

CARCINOGENESIS AMBIENTAL

En la actualidad el cáncer es una de las causas más importantes de mortandad en el mundo, a pesar de que la localización específica de los tumores varía de una región a otra y es diferente para cada sexo. Por esta causa se incrementa la preocupación por la presencia en el ambiente de sustancias de acción carcinógena que incluyen tanto productos naturales como productos sintéticos que, independientemente de su naturaleza y origen, son finalmente la mayoría creados por el hombre.

A través de numerosos estudios epidemiológicos se ha comparado la incidencia de distintos tipos de cáncer en grupos humanos y en diferentes países. Al encontrar lugares con incidencia muy baja de algunos tipos de cáncer

últimos años una gran preocupación, debido a los efectos que puedan causar estas sustancias a los organismos. Durante muchos años, se han desarrollado metodologías encaminadas al estudio de este tipo de interacciones, para lo cual se requiere tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- 1.-Información general de la sustancia.
- 2.-Información química.
- 3.-Información analítica.
- 4.-Rutas por las que llega al ambiente.
- 5.-Transporte y distribución en el ambiente.
- 6.-Modificaciones en el ambiente.
- 7.-Biotransformación e interacciones con los seres vivos.
- 8.-Efectos biológicos.
- 9.-Si se demostró que causa un problema ambiental se investigará la acumulación en el medio.

CARCINOGENESIS AMBIENTAL

En la actualidad el cáncer es una de las causas más importantes de mortandad en el mundo, a pesar de que la localización específica de los tumores varía de una región a otra y es diferente para cada sexo. Por esta causa se incrementa la preocupación por la presencia en el ambiente de sustancias de acción carcinógena que incluyen tanto productos naturales como productos sintéticos que, independientemente de su naturaleza y origen, son finalmente la mayoría creados por el hombre.

A través de numerosos estudios epidemiológicos se ha comparado la incidencia de distintos tipos de cáncer en grupos humanos y en diferentes países. Al encontrar lugares con incidencia muy baja de algunos tipos de cáncer

y al haber demostrado, además que los emigrantes tienden a presentar la incidencia probable de cáncer de un lugar imaginario en el cuál las incidencias fueron las mínimas posibles (Albert, 1988), se ha señalado que de un 70 a 80% de los cánceres que se observan en esta población se ven favorecidos por factores ambientales que afectan a los individuos independientemente de que estos tengan predisposición genética o no la tengan. Se calcula que aquellos cánceres exclusivamente de origen genético constituyen sólo el 2% mientras que los que ocurren en ausencia de influencias ambientales ó genéticas evidentes parecen representar alrededor del 20% . "Las sustancias que son capaces de inducir el desarrollo de tumores malignos se les considera carcinógenos químicos" (Albert, 1988).

Existen antecedentes históricos sobre los carcinógenos ambientales que datan de hace 200 años y parten de las observaciones de Percivall Pott en Inglaterra con relación a las elevadas frecuencias de cáncer escrotal en los deshollinadores, es decir los jóvenes dedicados a limpiar chimeneas. A partir de esta época , se han identificado muchas otras ocupaciones asociadas a un alto riesgo de desarrollar cáncer (Tabla 2).

Las observaciones clínicas son el mejor vehículo para comprender y poder atacar el problema por ser un medio insustituible. A partir de 1910 se introducen modelos experimentales logrando un importante avance en la identificación de numerosos carcinógenos entre ellos las radiaciones ionizantes, los rayos X y diversos agentes químicos además de identificar algunos factores que favorecen al desarrollo del cáncer (Doll,1980).

Es necesario señalar en esta reseña histórica los estudios realizados en 1924 que mostraban la acción carcinógena de los procesos de cicatrización en animales expuestos a alquitranes. Otros estudios permitieron identificar hormonas

y ésteres de forbol como carcinógenos y pusieron las bases para qué en 1942 se propusiera que el cáncer se desarrolla en dos etapas como iniciación (Rochelle,1993) y qué es de carácter irreversible y la segunda etapa llamada de promoción la cuál es susceptible de revertir antes de la aparición del tumor.

Tabla 2.- Grupos ocupacionales en los cuales se han encontrado incidencias elevadas de cáncer.

GRUPO OCUPACIONAL	LOCALIZACIÓN DEL CÁNCER	% EN EXCESO
Mineros de la hulla	Estómago	40
Químicos.	Páncreas	64 al 79.
Fundidores	Pulmón	50 al 150
Trabajadores textiles	Boca y faringe	77
Impresores de periódicos	Boca y faringe	125
Mineros metalúrgicos.	Pulmón	200
Trabajadores producción de hulla	Intestino grueso y páncreas	181 y 312
Trabajadores producción de cadmio	Pulmón y próstata	135 y 248
Industria hulera	Estómago y leucemia	80 y 140
Industria lantera.	Vejiga y cerebro	88 y 90
Reparación de llantas	Pulmón	61
Carpinteros	Cavidad y senos nasales	300 y 400
Zapateros	Cavidad, senos nasales y leucemia	700 y 100
Peleteros	Vejiga	150

Albert, 1988

En 1933 se realizó una etapa de estudio de la carcinogénesis química con la extracción del benzopireno a partir del alquitrán de hulla y los estudios realizados sobre su carcinogenicidad y biotransformación, destacando los realizados sobre inducción de transformación de células de cultivo, qué también son utilizados en estudios para evaluar la carcinogenicidad de los virus.

Mediante ensayos con animales de experimentación se han evaluado como carcinógenos alrededor de 1 500 agentes químicos (Albert, 1988). Al utilizar animales y para poder clasificar cómo agente carcinógeno un requisito necesario es que las pruebas se realicen con dos especies diferentes, se usen ambos sexos y que los tratamientos se lleven a cabo a lo largo de la vida de los animales, de 7 000 compuestos evaluados se tiene un reporte de que solo 750 dieron resultados positivos (Albert, 1988).

SISTEMAS DE EVALUACIÓN

Para poder establecer la relación entre el nivel de exposición a agentes químicos, físicos ó biológicos y el riesgo que estos representan para la salud del hombre se utilizan animales y plantas como modelos biológicos de prueba. La naturaleza de los efectos puede ser determinada como la proporción de daño causado por una dosis determinada en un periodo de tiempo dado. La ruta de exposición, el vehículo del tóxico, la edad, el sexo y las condiciones del modelo, el tiempo de exposición y el método empleado para determinar las alteraciones son muy importantes (William, 1982).

Los sistemas de pruebas (animales ó vegetales) utilizados para detectar los efectos mutagénicos de los agentes de tipo físico, químico ó biológico son numerosos y se han agrupado en cuatro categorías (Moutschen , 1985):

GRUPO I:Pruebas diseñadas para detectar lesiones a nivel molecular (Reacción de los compuestos con las moléculas del ADN).

GRUPO II:Sistemas diseñados para detectar mutaciones a nivel celular, utilizando organismos inferiores y algunos superiores como la Tradescantia, hámster y ratón.

Mediante ensayos con animales de experimentación se han evaluado como carcinógenos alrededor de 1 500 agentes químicos (Albert, 1988). Al utilizar animales y para poder clasificar cómo agente carcinógeno un requisito necesario es que las pruebas se realicen con dos especies diferentes, se usen ambos sexos y que los tratamientos se lleven a cabo a lo largo de la vida de los animales, de 7 000 compuestos evaluados se tiene un reporte de que solo 750 dieron resultados positivos (Albert, 1988).

SISTEMAS DE EVALUACIÓN

Para poder establecer la relación entre el nivel de exposición a agentes químicos, físicos ó biológicos y el riesgo que estos representan para la salud del hombre se utilizan animales y plantas como modelos biológicos de prueba. La naturaleza de los efectos puede ser determinada como la proporción de daño causado por una dosis determinada en un periodo de tiempo dado. La ruta de exposición, el vehículo del tóxico, la edad, el sexo y las condiciones del modelo, el tiempo de exposición y el método empleado para determinar las alteraciones son muy importantes (William, 1982).

Los sistemas de pruebas (animales ó vegetales) utilizados para detectar los efectos mutagénicos de los agentes de tipo físico, químico ó biológico son numerosos y se han agrupado en cuatro categorías (Moutschen , 1985):

GRUPO I: Pruebas diseñadas para detectar lesiones a nivel molecular (Reacción de los compuestos con las moléculas del ADN).

GRUPO II: Sistemas diseñados para detectar mutaciones a nivel celular, utilizando organismos inferiores y algunos superiores como la Tradescantia, hámster y ratón.

GRUPO III: Pruebas diseñadas para detectar el daño causado a nivel cromosómico (efecto clastogénico y mutagénico), ya sea *in vivo* ó *in vitro*, utilizando plantas ó animales.

GRUPO IV: Sistemas diseñados para observar los efectos en la progenie de los organismos completos, en plantas como la cebada y el maíz ó animales como la *Drosophila* y el ratón.

Dentro de las pruebas del grupo III se encuentran todos los análisis que involucran el estudio de las aberraciones cromosómicas que son visibles microscópicamente (Moutschen, 1985). Los efectos en la división celular y la inducción de anomalías cromosómicas forman un criterio importante para la identificación del daño en los sistemas genéticos inducidos por agentes mutagénicos (Sharma y Talukder, 1987), pudiéndose analizar dentro de estas alteraciones cromosómicas ya sea de tipo numérico, estructural ó ambas (Brinkley y Walter, 1975).

Las aberraciones estructurales de los cromosomas resultan del rompimiento y rearrreglo de isocromosomas completos en forma anormal (Carrano y Natarajan, 1988), lo cuál provee de evidencias inequívocas del daño genético (Tice, 1986).

Por su lado, las alteraciones numéricas son debidas principalmente a una disfunción del huso, aunque la fusión y la fisión centromérica también puede alterar el número cromosómico en ciertos casos.

SISTEMAS DE PRUEBAS *IN VIVO*

Los sistemas de prueba *in vivo* ofrece la ventaja de que al exponer al animal completo a un mutágeno conocido o potencial, muchos de los factores fisiológicos del metabolismo de los mamíferos son automáticamente incorporados en la prueba, y el daño cromosómico puede ser estudiado en más de un tejido en el mismo animal (Bartsch *et al.*, 1982). Pero es mas conveniente utilizar mamíferos en las pruebas para lograr la extrapolación de los resultados a los sistemas humanos (Ehling, 1976). Entre las evaluaciones que se pueden realizar en los ensayos de mamíferos *in vivo* empleando células somáticas se encuentran:

- 1.- Aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en médula ósea.
- 2.- Ensayos vía hospedero.
- 3.- Mutagenicidad microbiana por orina.
- 4.- Ensayo de mancha en ratón
- 5.- Aberraciones cromosómicas e ICH's en linfocitos de ratón.
- 6.- Ensayos en células de la granuloma de ratón.
- 7.- Ensayos en células resistentes a la toxina de la difteria

Mientras que en las células germinales se pueden estudiar:

- a) Ensayos de mutación genética en células germinales primarias.
- b) Sistemas de ensayo de mutación cromosómica , incluyendo letales dominantes, traslocaciones heredables y ensayos citogenéticos.
- c) La prueba de síntesis no programadas de ADN en espermatocitos y el ensayo de ICH's
(Oleson , 1990).

MEDULA ÓSEA COMO SISTEMA DE PRUEBA

Uno de los ensayos mutagénicos *in vivo* más versátil empleando células somáticas es el daño en médula ósea de ratón. La médula ósea es un importante componente del sistema inmunitario en organismos superiores (Krishna *et al.*, 1986) y esta formada por los precursores de las células sanguíneas, macrófagos, células adiposas, células y fibras reticulares (Fawcett, 1987). Las células madre, precursoras sanguíneas, están en constante división y diferenciación y van a dar origen a eritrocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas (Fawcett, 1987).

Debido a que la médula ósea es un tejido en proliferación, es ampliamente utilizado para identificar compuestos que son capaces de inducir cambios estructurales en los cromosomas (WHO, 1985; Moutschen, 1985; Krishna *et al.*, 1986). Dentro de las evaluaciones comúnmente realizados en este tipo de células se encuentran: las aberraciones cromosómicas, el índice mitótico, la cinética de división celular y los intercambios entre cromátidas hermanas entre otros.

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS, (ICH's) *IN VIVO*

Los intercambios de cromátidas hermanas son transposiciones simétricas equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma y representan un intercambio de doble banda entre las moléculas de ADN (Morales, 1984; Cruz, 1991).

En 1938 McClintock observó en cromosomas por primera la formación de cromosomas dicéntricos, que significaban el doble del tamaño inicial. Esto se sabe

MEDULA ÓSEA COMO SISTEMA DE PRUEBA

Uno de los ensayos mutagénicos *in vivo* más versátil empleando células somáticas es el daño en médula ósea de ratón. La médula ósea es un importante componente del sistema inmunitario en organismos superiores (Krishna *et al.*, 1986) y esta formada por los precursores de las células sanguíneas, macrófagos, células adiposas, células y fibras reticulares (Fawcett, 1987). Las células madre, precursoras sanguíneas, están en constante división y diferenciación y van a dar origen a eritrocitos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas (Fawcett, 1987).

Debido a que la médula ósea es un tejido en proliferación, es ampliamente utilizado para identificar compuestos que son capaces de inducir cambios estructurales en los cromosomas (WHO, 1985; Moutschen, 1985; Krishna *et al.*, 1986). Dentro de las evaluaciones comúnmente realizados en este tipo de células se encuentran: las aberraciones cromosómicas, el índice mitótico, la cinética de división celular y los intercambios entre cromátidas hermanas entre otros.

INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS, (ICH's) *IN VIVO*

Los intercambios de cromátidas hermanas son transposiciones simétricas equivalentes entre las cromátidas de un mismo cromosoma y representan un intercambio de doble banda entre las moléculas de ADN (Morales, 1984; Cruz, 1991).

En 1938 McClintock observó en cromosomas por primera la formación de cromosomas dicéntricos, que significaban el doble del tamaño inicial. Esto se sabe

en la actualidad corresponde a un intercambio de cromátidas hermanas. En 1957 se obtiene la primera evidencia directa de los Intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en células de *Bellevaria romana*, utilizando métodos autorradiográficos, que consistieron en la incorporación de la timidina tritiada (H^3), en la primera de dos divisiones obteniendo al final un cromátida marcada y la otra no, siendo esto evidencia de la duplicación semiconservativa y la presencia de una sola banda de ADN por cromátida. En estos cromosomas se observó la presencia frecuente de intercambios de fragmentos de una cromátida a la otra del mismo cromosoma, a lo cual se le llamó Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) (Taylor, 1958).

El método autorradiográfico tenía poca resolución por lo cual se desarrolló otro método basado en la incorporación de un análogo de base de la timidina, la 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), durante al menos el primero de dos ciclos replicativos del ADN y el uso de la tinción fluorescente con bisbenzimidida, Hoechst-33258. La tinción diferencial de las cromátidas hermanas por fluorescencia se basa en que la BrdU reduce la fluorescencia del colorante, por lo que al analizarlas en el microscopio de fluorescencia, una cromátida se encuentra bifilarmente sustituida por la BrdU la cuál se observa opaca y la otra unifilarmente sustituida se observa brillante. Aunque este método presentaba mayor resolución que el autorradiográfico, ya que los intercambios se detectaban más fácilmente, tenía la desventaja de que la fluorescencia se perdía fácilmente con el tiempo (Latt, 1974). Así surge el método llamado Fluorescencia mas Giemsa (FPG), el cual se desarrolló haciendo algunas modificaciones, que consistieron en dejar a las células durante dos ciclos de replicación en presencia de BrdU, exponerlas a luz para producir un reacción de fotólisis del ADN bifilarmente sustituido y teñirlas con Giemsa. con este método se obtiene una tinción pálida en la cromátida bifilarmente sustituida y la cromátida unifilarmente sustituida se tinte más oscura.

En estas preparaciones además de mayor resolución son permanentes (Perry y Wolff, 1974) (figura 2)

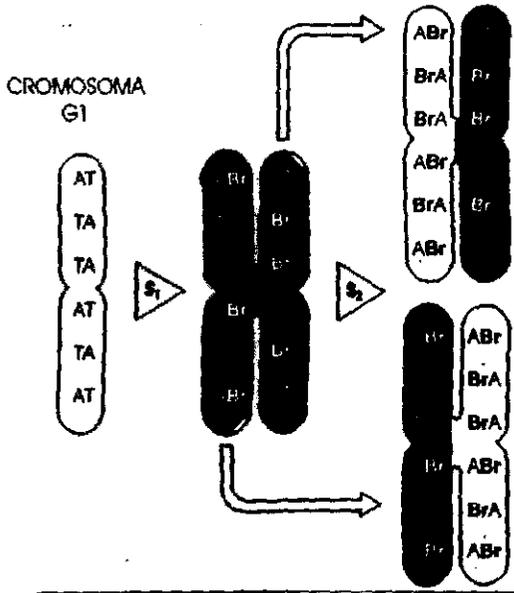


Figura 2.- Incorporación de la bromodesoxiuridina al ADN por dos ciclos de replicación

A partir de estas fechas se han desarrollado una serie de modelos *in vivo* basados en la incorporación de la BrdU; a través de inyecciones intraperitoneales múltiples (Allen y Latt, 1976), por infusiones subcutáneas (Per y Mattias, 1976) ó intravenosas (Schneider *et al.*, 1976), por la implantación de tabletas con BrdU pura (Allen *et al.*, 1977), cubierta de parafina (McFee *et al.*, 1983) o con agar (King *et al.*, 1982) y por una inyección intraperitoneal de la BrdU absorbida a carbón

activado qué fue el método utilizado en este trabajo y qué fue propuesto por Morales en 1984(Garcia,1992).

Actualmente existe gran cantidad de información e investigación acerca de los intercambios de cromátidas hermanas, aunque el significado biológico no ha sido claramente determinado. La inducción de los intercambios de cromátidas hermanas requiere del paso de las células por la etapa de síntesis del ADN ("S") (Wolff *et al.*, 1974), ya que los intercambios se producen durante o inmediatamente después de que se ha dado la bifurcación en la duplicación de ADN (Kato,1980), observando que la frecuencia de ICH's es mayor en "S" y decrece cuando la célula pasa a "G₂" (Schavartzman y Gutierrez,1980).

Los mecanismos de formación aun no han sido determinados, se cree que pueden ser inducidos por diversas causas como son: el daño directo al ADN (Perry y Evans,1975; Abe y Sasaki,1977; Nakanishi y Schneider,1979), por inhibición del proceso de síntesis del ADN (Ishii y Bender,1980), por inhibición de enzimas involucradas en la reparación (Oikawa *et al.*,1980; Morgan y Cleaver, 1982) ó por un agente promotor de cáncer no involucrado en la producción de lesiones sobre el ADN (Kinsella y Radman, 1978 y Schwarts *et al.*, 1982).

El proceso de inducción parece producirse de manera espontanea en células que no han sido tratadas ó cuando menos no de forma intencional por algún agente inductor de intercambios (McClintock,1938), esto ha sido demostrado *in vitro* (Kato,1974) e *in vivo* (Tice *et al.*,1976), al observar qué por debajo de determinadas dosis, la frecuencia permanece constante, lo cuál significa qué los valores son espontáneos.

Por otra parte, a dosis más altas estos valores se incrementan en forma dependiente de la concentración de la dosis de BrdU administrada. Esto se debe a que la BrdU que no se incorpora al ADN, induce los intercambios alterando probablemente las pozas metabólicas de los nucleótidos (Davidson *et al.*, 1980).

Se ha determinado mediante la técnica de tinción diferencial de cromátidas en tres tonos, que la frecuencia basal de ICHs se incrementa en tres divisiones sucesivas en la célula, lo que implica que la inyección de BrdU sí influye de manera importante en el valor basal de los intercambios, y que esta tinción implica la incorporación de cantidades crecientes de BrdU (Morales-Ramírez *et al.*, 1987).

El valor basal de los intercambios varía dependiendo de: a) el tipo celular, b) la forma de administración del BrdU, c) las condiciones del medio (temperatura, oxígeno, etc.) y d) la realización del experimento *in vivo* ó *in vitro* (Kato y Sandberg, 1977; Morgan y Crossen, 1981; Kato, 1980 y Verly *et al.*, 1973).

MECANISMOS DE INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS

Existen varios modelos propuestos para explicar la inducción de intercambios; como el basado en la recombinación bacteriana propuesto por Holliday en 1964, que explica los intercambios con una alternativa de recombinación de doble banda (Morales-Ramírez *et al.*, 1990). Otro modelo propuesto por Painter en 1980, explica la inducción de intercambios a través de daños que retardan la duplicación, que producen síntesis a diferentes tiempos y rompimientos a nivel de "cluster", para finalmente obtener asociaciones aleatorias entre bandas parentales e hijas, que corresponden a un intercambio entre doble banda. Finalmente Ishii y Bender en 1980 propusieron que la inducción de ICHs

consiste en la desviación replicativa, donde los intercambios espontáneos son el resultado de una ruptura ocasional de las bandas parentales durante la síntesis y su reasociación con las bandas hijas de igual polaridad, por lo tanto los ICH causados son debidos a que el daño provocado a una de las bandas, causa su ruptura a nivel de la bifurcación durante la síntesis, lo cual trae como consecuencia un cambio de vía durante la duplicación que permite llenar el espacio opuesto al daño (Morales,1984).

Por medio del bandeo cromosómico se ha podido determinar que la inducción de intercambios no es homogénea a lo largo del cromosoma y que existen zonas preferenciales, siendo las uniones entre bandas positivas y negativas, las que presentan una mayor frecuencia de intercambios (Latt,1974).

LOS INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS COMO INDICADORES DE DAÑO

La inducción de ICH por agentes mutágenos-carcinógenos, ha sido ampliamente demostrada tanto en sistemas in vivo (Stetka y Wolff,1976; Schreck *et al.*,1979; Schneider *et al.*,1976; Morales-Ramírez,1980), como in vitro (Perry y Evans, 1975; Nakanishi y Scheider,1979) como indirecta (Stetka y Wolff,1976 y Schereck *et al.*, 1979 y Morales-Ramírez,1980) y por agentes físicos como el calor (Kato,1980), luz Ultravioleta (Wolff *et al.*,1974; McRae *et al.*,1979), ultrasonido (Liebeskind *et al.*,1979) y Radiación ionizante (Abramovsky *et al.*,1978; Fornace,*et.al.*,1980; Morales-Ramírez *et al.*, 1983).

El grupo de ICH del programa GENE-TOX de los Estados Unidos de América (Latt *et al.*,1981) consideran el análisis de ICH como un método alternativo para detectar mutágenos químicos y físicos, además de presentar las siguientes ventajas:

- 1.- Es excelente para detectar agentes que producen aductos en el ADN
- 2.- Es mucho más sensible para detectar mutágenos químicos que el método basado en análisis de aberraciones cromosómicas.
- 3.- Hay ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para detectar mutágenos directos ó indirectos, es decir que requieran o no activación metabólica.
- 4.- Es un método relativamente rápido.
- 5.- Los sistemas *in vivo* permiten el análisis de tejidos diversos incluyendo células germinales.
- 6.- Existen sistemas en organismos diversos incluyendo plantas y animales no mamíferos, los cuales pueden ser usados como monitores ambientales de agentes genotóxicos.

Este ensayo puede ser usado en poblaciones humanas, y como principales desventajas se consideran únicamente

- A) Poco sensible para mutágenos que inducen rupturas dobles.
- B) El desconocimiento del significado biológico ,
- C) El desconocimiento de la correlación de ICH con el número de lesiones.
- D) El efecto sinérgico ó aditivo que puede tener a BrdU respecto al mutágeno

El mismo grupo propone que el análisis de ICH, tiene reproducibilidad de tal modo que basta el análisis de 25 células por dosis en los sistemas *in vitro* y para los sistemas *in vivo* se recomiendan tres dosis diferentes, con un mínimo de 4 animales por dosis y un análisis de 25 células por animal.

INDUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS POR AGENTES QUIMICOS Y FISICOS.

Se ha demostrado que algunos agentes químicos alquilantes producen enlaces cruzados en el ADN, que inducen intercambios de cromátidas hermanas, tal como a mitomicina C y la mostaza nitrogenada. Existen también los agentes monofuncionales que producen aductos, como la mostaza de quinacrina, la adriamicina, el fluorocromo Hoechst-33258, el metil metanosulfonato, el 4-nitroquinoline 1-oxide. También existen agentes como la ciclofosfamida (agente antineoplásico), que requiere activación metabólica para convertirse en un agente alquilante bifuncional activo y causar inducción de intercambios de cromátidas hermanas (Latt,1974; Perry y Evans,1975).

La producción de monoaductos también puede inducir intercambios de cromátidas hermanas y son producidos por agentes como a porfiromicina y la decarbamoil-mitomocina-C (derivado monofuncional de la mitomicina-C) (Carrano *et al.*,1977).

Los inhibidores de la síntesis de ADN como la hidroxurea, la 1-Darabinofuronasil citosina y la afidicolina incrementan los intercambios de cromátidas hermanas tanto basales como inducidos por otros agentes químicos o físicos (Morgan y Cleaver ,1982).

Se ha encontrado que agentes físicos como la temperatura, luz ultravioleta y el ultrasonido, son capaces de inducir intercambios de cromátidas hermanas, durante la fase de síntesis, lo cuál se asocia con un retraso en el curso de la replicación del ADN (Kato,1980; Wolff *et al* 1974; Mac Rae *et al.*,1979 y Liebeskind *et al.*,1979).

Existe controversia acerca de cuál es el daño responsable de inducir los intercambios de cromátidas hermanas. Ishi y Bender en 1980 proponen que los enlaces ADN-proteína son los más probables en la inducción de ICH. Kano y Fujiwara (1981) proponen que los enlaces cruzados son la lesión más eficiente en la producción de ICH, mientras que Latt y Cassel (1980), sugieren que tanto los monoadductos como los enlaces cruzados son los responsables de la producción de intercambios de cromátidas hermanas.

INDICE MITOTICO

El índice mitótico (IM), indica la proporción de células que se encuentran en división, considerándose únicamente las células en metafase y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$IM = \# \text{ de células en metafase} \times 100 / 1000$$

La división celular puede ser alterada por diferentes agentes químicos ó físicos y esto se manifiesta como inhibición, retraso ó aceleración en la división celular.

El retraso ó inhibición de la mitosis se presenta por una alteración al principio de la división celular, la cuál se da en la interfase de (síntesis), sin embargo las células en el estado posterior pueden continuar el ciclo mitótico.

La causa real del retraso mitótico no ha sido encontrado ya que hasta la siguiente división celular es cuando se pone en evidencia el daño. La inhibición mitótica puede ser completa y permanente. El (IM) es uno de los indicadores del

crecimiento celular y nos proporciona información para determinar la acción citotóxica de una sustancia (OSTROSKY, 1993).

TIEMPO DE GENERACION PROMEDIO

Este parámetro nos indica la velocidad con la cuál se dividen la células y es un parámetro genotóxico que nos permite detectar alteraciones en la velocidad de replicación de la célula; la cinética del ciclo celular puede ser referida como tiempo promedio generacional (TPG) la cual depende del número de células que se han dividido 1,2,3 ó más veces y la cinética del ciclo celular se puede identificar por tinción diferencial (Roldán, 1992)

JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración que existen varios reportes en los cuáles se describe que algunos agentes antiparasitarios como el albendazol y el metronidazol han mostrado ser agentes mutagénicos y carcinogénicos en linfocitos humanos en cultivo y de pacientes tratados con estos agentes (Ostrosky, 1986; Herrera *et al.*, 1994; Elizondo *et al.*, 1994; Elizondo, 1996), y dado que el levamisol es un agente ampliamente utilizado en la terapia contra el cáncer de colon, la artritis reumatoide, en el control de parásitos intestinales, además de que se a descrito una acción inmunoestimuladora, y de que existe poca información sobre sus posibles efectos genotóxicos y citotóxicos, en el presente trabajo se estudió el efecto del levamisol sobre la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y sobre el índice mitótico y la tasa de generación promedio de las células de médula ósea de ratón.

HIPÓTESIS

El levamisol al ser sintetizado originalmente mostró ser un antihelmíntico muy eficaz y actualmente es muy utilizado como coadyuvante en terapias contra el cáncer lo que posiblemente se deba a sus propiedades inmunoestimuladoras, sin embargo sus efectos genotóxicos y toxicológicos no han sido establecidos con claridad. Por otro lado, conociendo que compuestos que pertenecen a esta misma familia, como el metronidazol, es capaz de incrementar la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y alterar el índice mitótico de pacientes bajo tratamiento médico o en cultivos de linfocitos humanos, al tratar ratones macho de la cepa CD-1 por vía intraperitoneal con diferentes dosis de levamisol, este compuesto será capaz de modificar la tasa de generación promedio, el índice mitótico y la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas de las células de la médula ósea.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto genotóxico y citotóxico del levamisol en las células de la médula ósea de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la LD_{50} del levamisol en ratones CD-1

Determinar el efecto de diferentes dosis de levamisol sobre el índice mitótico de la médula ósea de ratón.

Analizar el efecto de diferentes dosis de levamisol sobre la tasa de generación promedio de la médula ósea de ratón.

Determinar el efecto de diferentes dosis de levamisol sobre la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en los cromosomas de la médula ósea de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES:

Se trabajó con ratones macho de la cepa CD-1, de 30-45 días de edad y de 25 a 30 gramos de peso, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio y con libre acceso al agua y al alimento (Purina Chow).

COMPUESTO QUÍMICO:

Se utilizó Levamisol (figura 1; DL,2,3,5,6,tetrahydro-6-phenil-imidazol (2,1 b) tiazol), elaborado por los laboratorios Parfarm, el cuál se disolvió en agua destilada para su aplicación.

TRATAMIENTOS:

Para establecer las dosis de trabajo, se determinó la dosis LD₅₀ trabajando lotes de ratones CD-1 con características de peso y edad similares a las características de los animales que fueron tratados posteriormente con el levamisol.

DETERMINACION DE LA LD₅₀

En un experimento generalmente se usan dosis determinadas entre las cuales no siempre queda incluida la que mata al 50% de los animales. Por tal motivo se traza una curva que incluye el porcentaje de mortalidad contra dosis y se busca por interpolación, la dosis a la cual mueren el 50% de los animales. También se puede utilizar un método matemático como es el de Reed Muench que es mucho más sencillo y exacto que el anterior debido a que utiliza un numero menor de animales y de dosis. Este fue el método utilizado para determinar la dosis LD₅₀ en este trabajo.

Establecida la LD₅₀ se trabajó con cinco lotes conteniendo cada uno de ellos cuatro ratones CD-1 a los cuales se trataron por vía intraperitoneal (ip) por 24 horas con las siguientes dosis:

- Grupo-I 50% de la LD₅₀ (58 µg/g)
- Grupo-II 25% de la LD₅₀ (29 µg/g)
- Grupo-III 12.5% de la LD₅₀ (14.5 µg/g)

Contando además con dos grupos mas:

- Grupo-IV Vehículo (máximo volumen aplicado junto con el tratamiento de levamisol).
- Grupo-V Testigo negativo.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El tratamiento con bromodesoxiuridina (BrdU) y la tinción diferencial se realizó siguiendo la técnica propuesta por Morales (1984), con algunas modificaciones.

Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip), una hora después de administrado el levamisol, con una solución que contenía 1.5 mg de BrdU (Sigma Chemical Co. St. Louis MO., USA), 0.1 ml de agua destilada por cada gramo de peso de ratón y 150 mg de carbón activado.

Transcurridas 21 horas y media después de la administración de la BrdU, a los ratones se les administró 0.1 ml /10 gr. de peso de una solución de colchicina al 0.1 % (Fisher Scientific Co. USA). Dos horas y media después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a extraer la médula ósea del fémur del ratón.

Para realizar la extracción de la médula ósea, con unas tijeras se disectó y se limpió el fémur adecuadamente, se cortaron las epífisis del hueso y utilizando una jeringa se lavó el interior con 5ml de solución salina hipotónica (cloruro de potasio al 0.075 M, precalentada a 37° C) para posteriormente recoger la médula ósea en un tubo de centrifuga. Finalmente, la médula se resuspendió

vigorosamente utilizando para ello un agitador vortex y se dejó reposar por un lapso de 40 minutos a 37° C.

Transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió, y en agitación, se le agregó 5.0 ml del fijador (metanol-ácido acético 3:1) dejándose reposar por 10 minutos. Este paso se repitió dos veces más agregando 5 y 3 ml de fijador respectivamente. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1500 r.p.m. durante 5 minutos y el botón fue resuspendido en 0.5 ml de fijador. A partir de esta suspensión las preparaciones se realizaron por goteo y se dejaron secar al aire.

Para realizar la tinción diferencial de cromátidas hermanas las preparaciones fueron teñidas con una solución de Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) (0.05 µg/ml) durante 20 minutos en la oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, las preparaciones fueron sumergidas en una solución de citrato-salina 2XSSC (NaCl, 0.30M + Citrato de sodio 0.03M) y se irradiaron por 20 minutos con luz ultravioleta y negra. Finalmente, las laminillas se colocaron en una solución de citrato-salina 2XSSC por 20 minutos a 55° C en baño María y se tñeron con una solución de Giemsa (1:10 en agua corriente) durante 5 minutos.

PARÁMETROS A EVALUAR :

ÍNDICE MITÓTICO :

Para calcular el índice mitótico (IM) se revisaron 4000 células al azar por ratón y se utilizó la siguiente fórmula para determinarlo:

$$IM = (\text{No. de células en metafase} / \text{No de células totales}) \times 100$$

Una vez obtenidos los datos del índice mitótico, estos fueron analizados mediante la prueba de diferencia de proporciones Z (Márquez , 1988).

TASA DE GENERACIÓN PROMEDIO :

Se observaron 100 células en metafase, por ratón, al azar y se cuantificaron las células en primera (Figura 3), segunda (figura 4), tercera (figura 5) o sucesivas divisiones, y a partir de estos datos se obtuvo la tasa de generación promedio (TGP) siguiendo la metodología propuesta por Ivett y Tice en 1982.

$$\text{TGP} = \frac{\text{Tiempo de presencia de la BrdU}}{1(I) + 2(II) + 3(III)} \times 100$$

donde I, II y III representan las proporciones de células en primera, segunda y tercera o subsecuentes divisiones respectivamente.

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS:

Se observaron un mínimo de 40 metafases en segundo ciclo por ratón y se cuantificaron el número y tipo de ICH's (terminales como un intercambio e intersticiales como 2 intercambios) . A los datos de ICH's se les aplicó la prueba de "t" de Student , para lo cuál se calculó la media aritmética de ICH's por célula y su desviación estándar.

En todos los casos las observaciones se realizaron en un microscopio óptico y a doble ciego.

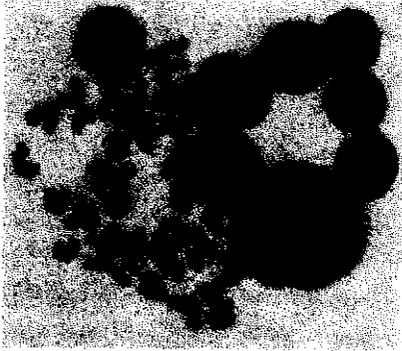


Figura 3. Metafase en primer ciclo.

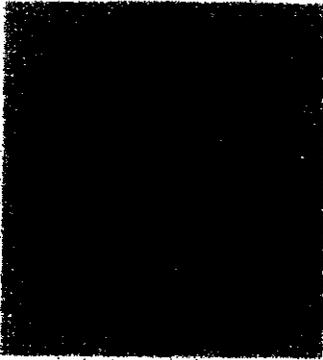


Figura 4. Metafase en segundo ciclo.

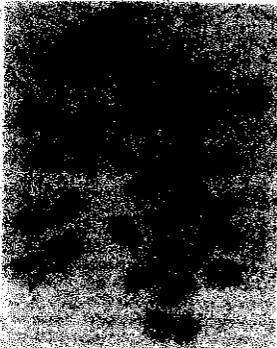


Figura 5. Metafase en tercer ciclo.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LA LD₅₀

Quando se realizó la metodología de Reed Muench para establecer la LD50 del levamisol aplicado por vía intraperitoneal, se encontró que fue de 116 mg/kg de peso. Los datos encontrados en la literatura mostraron que la LD50 reportada para ratón es de 112 mg/kg de peso (Tabla 3) (Merck Index, 1989).

Tabla 3. Dosis letal media (LD₅₀) para el levamisol (mg/kg) en rata y ratón (Merck Index, 1989).

Vía de tratamiento	Rata	Ratón
Intravenosa	24	22
Subcutánea	130	84
Oral	480	210
Intraperitoneal		112

ÍNDICE MITÓTICO

En la tabla 4 y en la figura 6 se muestra el análisis del índice mitótico encontrado en la médula ósea de los ratones tratados con el levamisol, observando que en todos los tratamientos hubo un incremento estadísticamente significativo de este parámetro (3.62 % para la dosis de 14.5, 5.08 % para la dosis de 29.0 µg/g y de 3.49 % para la dosis más alta en comparación con el testigo negativo y el grupo tratado con el vehículo; $p < 0.05$ con prueba de diferencia de proporciones). Aunque en los tres casos el IM fué más alto, en la dosis de 58.0 µg/g se observó una disminución con respecto a las dosis anteriores.

Tabla 4.- evaluación del índice mitótico (IM), células de la médula ósea de ratones macho testigos y tratados con diferentes dosis de levamisol.

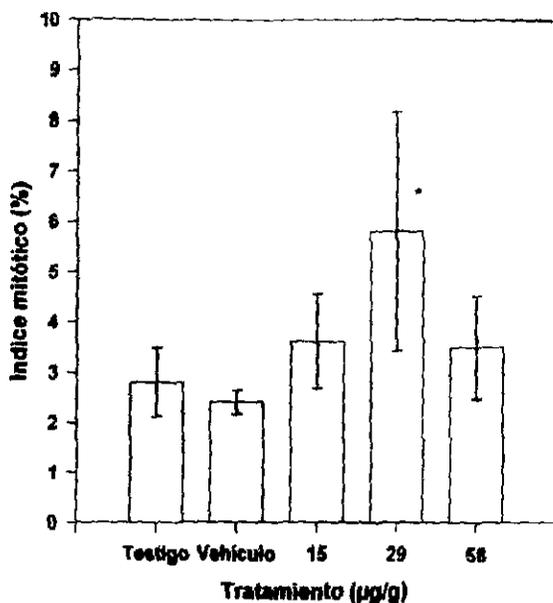
TRATAMIENTO	TESTIGO (-)	AGUA DESTILADA	14.5 $\mu\text{g/g}$	29.0 $\mu\text{g/g}$	58.0 $\mu\text{g/g}$
	IM (%)	IM (%)	IM (%)	IM (%)	IM (%)
RATON 1	2.71	2.13	2.64	7.07	3.06
RATON 2	2.16	2.43	4.29	6.40	5.02
RATON 3	3.54	2.70	3.00	5.11	3.01
RATON 4		2.34	4.56	1.72	2.87
PROMEDIO	2.80 \pm 0.69	2.40 \pm 0.24	3.62 \pm 0.94	5.08 \pm 2.37*	3.49 \pm 1.02

P<0.05 vs el testigo negativo y vs el vehículo con prueba de "Z" de diferencia de proporciones

TASA DE GENERACIÓN PROMEDIO

Cuando se analizó la tasa de generación promedio, los resultados obtenidos mostraron que en ninguna de las dosis aplicadas este compuesto modificó estadísticamente dicho parámetro (Tabla 5, Figura 7 y Figura 8), aunque en los tres tratamientos hubo una disminución en el tiempo de generación celular, esto es, las células se estaban dividiendo más rápido (17.3

Figura 6.- Índice mitótico en la médula ósea de ratones tratados con diferentes dosis de levamisol



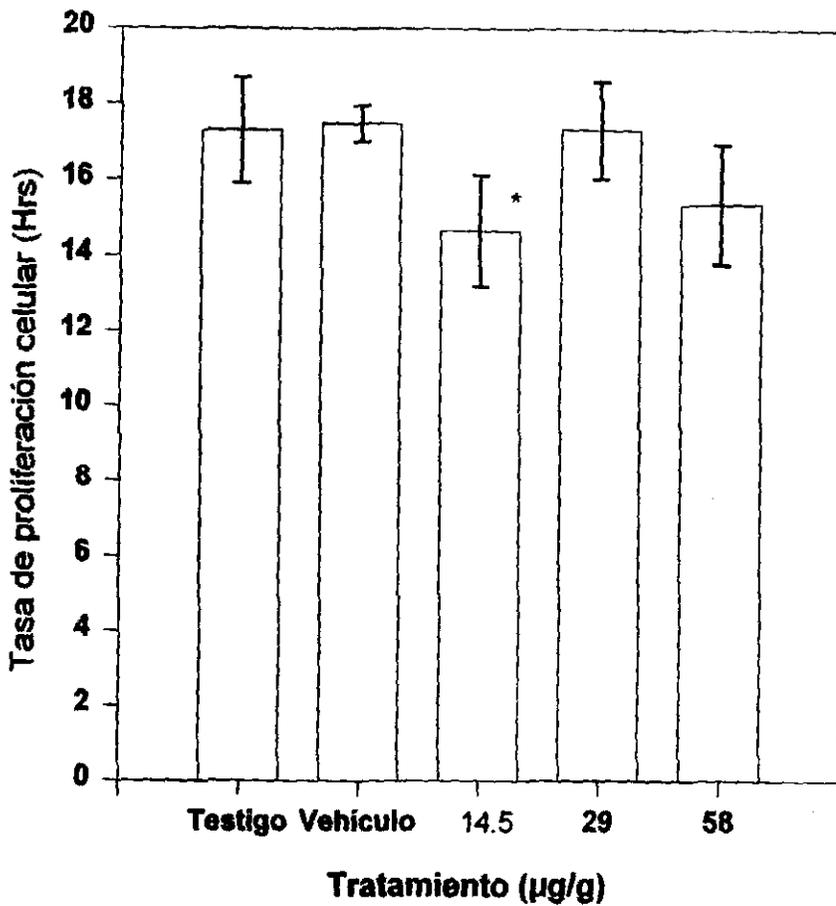
* $P < 0.05$ vs el testigo (-) y vs el vehículo; prueba de "Z" de diferencia de proporciones.

horas de división en el grupo testigo vs. 14.7 h para la dosis de 14.5 µg/g; 17.4 h para la dosis de 29.0 µg/g y 15.4 h para la dosis de 58 µg/g).

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

En la Tabla 6 y en la figura 9 se muestran los resultados de las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas obtenidos en los cromosomas de la médula ósea de los ratones tratados con el levamisol. En este caso se observa que a pesar de que en la dosis de 14.5 µg/g de peso hay un leve incremento en la frecuencia de ICH's, esta no es estadísticamente significativa (3.09 vs 1.91 del testigo), mientras que en las dosis mas altas no se observa este comportamiento.

Figura 7.- Tasa de proliferación celular en la médula ósea de ratones tratados con levamisol



* $P < 0.05$ vs el vehículo; prueba de t de Student pareada.

Figura 9.- Intercambio de cromátidas hermanas en los cromosomas de la médula ósea de ratones tratados con levamisol

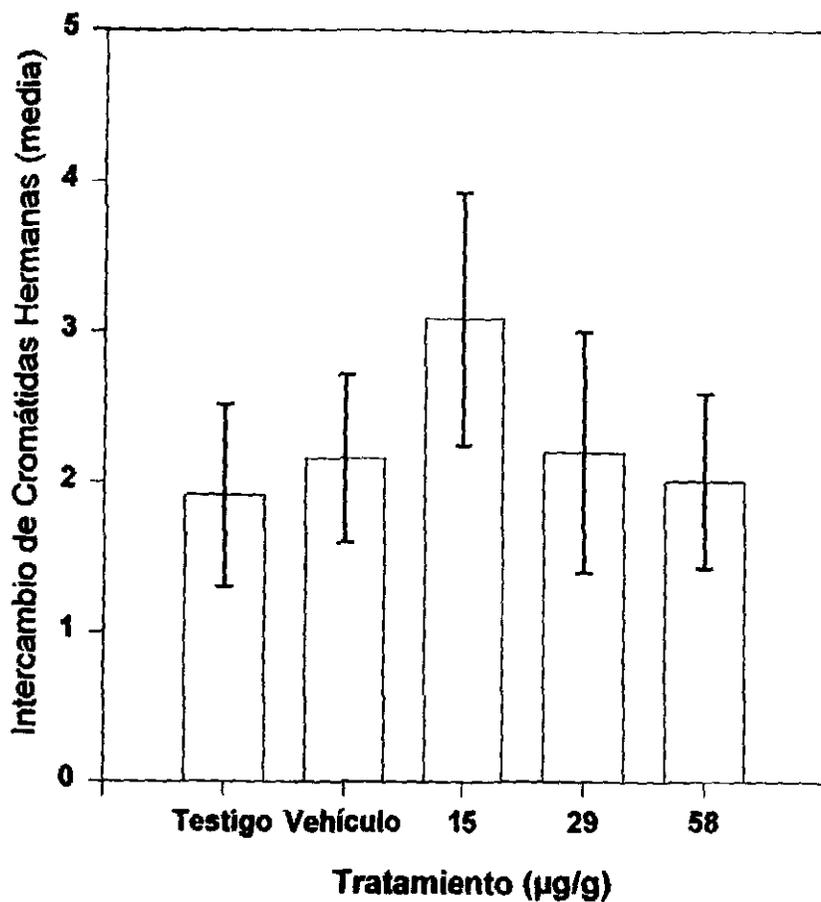


Tabla 6.- Frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en los cromosomas de las células de la médula ósea de ratones macho testigos y tratados con diferentes dosis de levamisol.

TRATAMIENTO	TESTIGO (-)	AGUA DESTILADA	14.5 µg/g	29.0 µg/g	58.0 µg/g
	ICH (X±D.E.)	ICH (X±D.E.)	ICH (X±D.E.)	ICH (X±D.E.)	ICH (X±D.E.)
RATON 1	1.96	2.42	3.14	2.17	1.96
RATON 2	2.50	1.32	3.55	1.60	1.84
RATON 3	1.28	2.42	1.89	1.70	1.44
RATON 4		2.50	3.79	3.35	2.83
PROMEDIO	1.91±0.61	2.16±0.56	3.09±0.84	2.20±0.80	2.01±0.58

DISCUSIÓN

El estudio de la exposición a fármacos, sus efectos, mecanismos de acción y las respuestas que estos provocan en el organismo es una area de amplia investigación cuya información es necesaria para la evaluación del riesgo a dichas exposiciones. La farmacogenética es el área que se dedica al estudio de los efectos de la variabilidad genética en la respuesta del organismo a fármacos, ya que la variabilidad genética puede influir en la biotransformación de un fármaco.

Al igual que diversos factores ambientales, tanto físicos como químicos, los medicamentos son susceptibles de inducir alteraciones genéticas, cuyos efectos pueden hacerse manifiestos a corto plazo ó tener una expresión diferida, de tal manera que las consecuencias de dichas alteraciones genéticas dependen de qué estas se produzcan en las células germinales ó en las células somáticas, ya que mientras en el primer caso puede afectar la salud de las generaciones futuras, en el segundo caso solo repercuten en la salud del individuo expuesto (Cortinas de Nava y Ostrosky, 1993).

Hasta ahora no se tiene evidencias directas, de que la frecuencia de enfermedades de origen genético se hayan elevado como consecuencia de la exposición a fármacos u otros agentes ambientales, pero dado que en muchos de los países en vías de desarrollo o en franco subdesarrollo, como el nuestro, se han incrementado este tipo de males es necesario la evaluación del posible daño que pueden generar estos agentes, analizando las frecuencias e incidencias de algunos tipos de cancer, así como daño a células germinales cuyas consecuencias son anomalías congénitas viables, mutaciones o infertilidad. Esta última alteración es muy común en nuestro país.

El levamisol es un antihelmíntico que en la actualidad ha tomado gran interés por su acción inmunomoduladora entre otras, ya que se ha encontrado que

éste ayuda a la vacuna contra la brucella. En otros estudios se ha observado qué cuando se tratan animales con levamisol, estos son menos susceptibles a adquirir otras enfermedades de tipo infeccioso (incluyendo nemátodos) (Elizondo 1996).

INDICE MITÓTICO

Los resultados de este trabajo mostraron qué el levamisol incrementa de manera estadísticamente significativa el Índice Mitótico (IM), cuándo se aplican dosis de 14.5 mg/kg y 29.0 mg/kg en comparación con los téstigos, mientras que la dosis de 58.5 mg/kg, a pesar de que el IM es más alto que los testigos, muestra una tendencia a disminuir conforme se incrementa la dosis (figura 6).

El índice mitótico es un parametro que se utiliza para evaluar la proliferación de linfocitos en niños, adultos y ancianos, tanto en estudios normales y tumorales ya que se considera este parámetro como un biomarcador temprano de citotoxicidad a la exposición de xenobioticos (Ostrosky,1993), mientras que Sharma y Talukder (1987), mencionan que los cambios provocados por un compuesto sobre el proceso de división celular son criterios importantes para identificar daños en sistemas genéticos, sin embargo en nuestro caso en todas las dosis utilizadas el índice mitótico fue mas alto que el observado en los animales de los grupos testigo (tabla 4).

El levamisol es un compuesto químico que al ser administrado junto con el 5-fluoracilo ha resultado ser un efectivo adyuvante en terapias contra el cáncer y en particular contra el cáncer de colon, con lo cuál se mejora el efecto anticancerígeno de este último compuesto, y además permite una recuperación más rápida de los pacientes sometidos a quimioterapia (Hayostek *et al.*, 1992; Goodrich,1993; Holcombe *et al.*,1994)

El principal efecto del levamisol es su alta toxicidad para un amplio espectro de nematodos gastrointestinales y sistémicos que infectan al ser humano y a los animales. De particular interés clínico en el hombre es la acción de la droga contra los ascaris, este compuesto también ejerce una actividad contra la uncinariasis, las larvas de *Strongyloides* y las microfiliarias; muestran una escasa acción en las infecciones por *Trichuris* y *Enterobius*.

La acción directa del levamisol es provocando la contracción de los nemátodos seguida por una parálisis tónica (Van Neuten, 1972, Coles y col., 1974). El Levamisol inhibe la fumatorreductasa a nivel del musculo del ascaris. Esta inhibición es compatible con la mayor potencia antihelmintica del levamisol y puede contribuir a sus efectos antiparasitarios. El levamisol también causa una inhibición estereoespecífica de las fosfatasa alcalinas humanas excepto las que se encuentran a nivel intestinal y de la placenta (Van Belle, 1976).

Como se ha mencionado uno de los efectos del levamisol es como inmunoestimulante tanto en los animales de experimentación como en el hombre. Se ha empleado como coadyuvante en ciertas infecciones crónicas y recurrentes, en artritis reumatoide y de los estados de inmunosupresión, incluyendo aquellos estados asociados con procesos malignos (Yaron y Yaron, 1976; Brugmans, 1978; Chirigos, 1978). Igualmente este compuesto actúa en la restauración de los mecanismos de inmunidad celular de los leucocitos periféricos, los linfocitos T precursores también son estimulados para diferenciarse en células T maduras (Symoens y Rosenthal 1977; Renoux, 1972). El levamisol sinergiza con mitógenos y antígenos en la proliferación de linfocitos e incrementa la quimiotaxis de monocitos y fagocitos.

Se ha descrito que el levamisol presenta tanto actividad citolítica, citostática y proliferativa, tanto en sistemas *in vitro* como en sistemas *in vivo* (Johnkoski et al., 1992). Al realizar estudios en células nonparenquimales (NPC), del hígado de

murinos, Cohen (1985) y otros autores (Janik *et al.*, 1997) han mostrado que debido a las propiedades inmunomoduladoras del levamisol la actividad citolítica, citostática y de proliferación se incrementa, lo que podría explicar el comportamiento que siguió el compuesto en las diferentes dosis probadas en este trabajo.

En el estudio realizado por este grupo de investigadores se demostró que el levamisol tiene la habilidad de incrementar la actividad citolítica de las células no parenquimales junto a las NK sensibles a YAC-1 lo que sugiere que las células son estimuladas por el levamisol, (Jonhkoski *et al.*, 1992), mientras que en experimentos realizados desde 1976 Lods confirmó que en los tratamientos en los que se utiliza el levamisol en terapias contra el cancer al aplicarlo durante el curso de la quimioterapia la restauración de la medula osea se favorecía debido a este compuesto.

La variación del índice mitótico nos indica que existe una relación entre la concentración y el numero de células que entran en metafase. Los resultados muestran un incremento en las primeras dos dosis aplicadas, mientras que en la dosis más alta (58.0 mg/kg de peso) desciende el índice mitotico lo que nos podría indicar que se este presentando muerte celular sin embargo los valores son inclusive superiores a los valores del testigo. Uno de las acciones del levamisol que se han descrito es la capacidad de detener la división sin matar a la célula (efecto citostático), propiedad comprobada por diferentes investigadores (Cohen *et al.*, 1992), en los cuales se adicionó levamisol a células MCA-38 dando como resultado un 80 % de reducción en la proliferación de estas líneas de células tumorales (Jonhkoski *et al.*, 1992) lo cual confirma la actividad citostática del levamisol, efecto que podríamos estar observando en los animales tratados.

CINÉTICA DE CICLO CELULAR

La tinción diferencial de cromátidas hermanas permite la identificación de células que han pasado por una, dos, tres o sucesivas divisiones, facilitando el examen de la cinética de poblaciones celulares en división (Craig-Holmes y Shaw, 1976).

Algunos estudios indican que la cinética de la proliferación celular, puede ser modificada por la exposición *in vivo* a fármacos administrados experimentalmente o terapéuticamente. Du Frain y Col.,(1979), reportan un ligero alargamiento del ciclo celular en células de conejos tratados con ciclofosfamida y Gebhart y Col.,(1980) 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 divisiones, mientras que después de la terapia, se encontró un 60% de metafases en primera división.

Al evaluar la cinética de proliferación celular los resultados mostraron que el tratamiento con levamisol no modificó de manera significativa el tiempo de división celular, aunque en todos los casos se observó un incremento promedio de dos horas aproximadamente en la duración del ciclo, sin embargo cuando se analizan de manera individual los resultados de las primeras, segundas o terceras metafases se puede observar que en la dosis más baja hay una notable disminución de las células en primera fase (64% a 41%) y un incremento de segundas divisiones (de 30% a 51%), lo que muestra un retraso en el tiempo de división, aunque en las dosis más altas no hay variaciones importantes (figura 8).

INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Los intercambios de cromátidas hermanas han sido desde hace muchos años una prueba de evaluación muy importante en la Genética Toxicológica, aunque su significado biológico aún no se conoce.

El analisis de la inducción de Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) en los animales tratados con levamisol mostró que, aunque para la dosis de 14.5 mg/kg se incrementó dicha frecuencia, no se observó variaciones estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos al compararlas con los téstigos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Elizondo (1996), ya que el encontró que el levamisol no causa daño genético en linfocitos humanos (figura 9).

Se ha observado también que la alteración de la duración del ciclo celular, altera la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (Schneider *et al.*, 1979) por lo que los cambios en la frecuencia no son necesariamente producto de una actividad mutagénica. Por tanto, cuando se usan a los ICH como un parámetro para evaluar la actividad genotóxica debe tomarse en cuenta la duración del ciclo celular en la interpretación de los resultados. Esto puede explicar el porque en el grupo de animales tratados con la dosis más baja hay un incremento en los intercambio(tabla 6).

Como lo muestran los resultados obtenidos en el presente trabajo, el levamisol a diferencia de otros antiparasitarios que pertenecen al mismo grupo como lo es el metronidazol, no tiene efectos genotoxicos al ser administrado a ratones por vía intraperitoneal.

MARCADORES BIOLÓGICOS:

El término marcador es comunmente usado por los toxicólogos para denominar a todas aquellas sustancias o parámetros medibles que nos permiten establecer de manera acertada que un organismo ha estado expuesto a un xenobiotico. Actualmente este término ha sido muy difundido por el uso que se ha dado en investigación en medicina, bioquímica, epidemiología y su relación en campos afines. El creciente interés por los marcadores biológicos se debe sobre todo a la evaluación del posible daño causado por la exposición a tóxicos ambientales.

El comité de marcadores biológicos define a los marcadores como indicadores de eventos ó condiciones en sistemas biológicos simples ó simplemente como indicadores de exposición, efecto o susceptibilidad.

MARCADORES DE EXPOSICIÓN:

Es un químico xenobiótico, sus metabolitos ó los productos de una interacción entre algún químico y algunas celulas blanco ó biomoléculas y los cuales pueden ser medidos. Más comunmente el indicador de la exposición son la concentración del material en orina, sangre y otros tejidos del cuerpo incluyendo pelo ó uñas.

MARCADORES DE EFECTO:

Es la medición de alguna modificación celular ó todas aquellas alteraciones químicas que tiene un organismo, las cuales dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidas y establecer una perdida potencial de la salud. Los marcadores de efecto definen los criterios para establecer cuándo y cuáles efectos ocurren.

MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD:

También llamados modificadores de efectos, pueden actuar en cualquier punto a lo largo del desarrollo de la exposición y en algunos casos estos factores causan exposición uniforme en poblaciones que exhiben diferentes efectos. La susceptibilidad puede ser el resultado de la contaminación, de la constitución genética de los individuos, del estilo de vida ó de una influencia bioquímica, pero cualquiera de estos tres factores puede influir en la magnitud del daño en una exposición a un agente químico.

Una de las necesidades actuales es la posible identificación de todos aquellos individuos que por alguna razón son susceptibles a daño genético en exposiciones terapéuticas, ocupacionales o ambientales a xenobióticos.

A pesar de que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el levamisol no es un agente genotóxico, que presenta un ligero efecto citostático y que no es citotóxico, el análisis de los datos de manera individual, ratón por ratón, podrían indicar otra cosa.

Dentro de los organismos utilizados en los experimentos se encontró que en todos los grupos tratados al menos uno de los animales respondió de manera diferente. Los resultados dan clara evidencia de las diferencias de respuesta individual a un mismo compuesto (susceptibilidad individual), la cual puede estar influenciada por la edad, balance hormonal, respuesta inmune, y la constitución genética (NCR, 1992). En nuestro caso esta última condición es la que queda de manifiesto en los tratamientos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al evaluar el índice mitótico muestran que el levamisol induce proliferación celular, aunque en concentraciones más elevadas tiende a presentar un efecto citostático.

Cuando se analizó la cinética de proliferación celular se encontró que el levamisol retrasa la velocidad de división celular.

Los datos antes mencionados muestran que en nuestro caso no existe relación entre el índice mitótico y la cinética de proliferación celular.

El análisis de las frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas muestra que el levamisol en las dosis probadas no es genotóxico.

A pesar de que a nivel poblacional el levamisol no mostró efectos evidentes, se pudo establecer que existen individuos más susceptibles a la acción del levamisol.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

ABE, S. Y SASAKI, M. (1977) Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:1635-1641.

ABRAMOVSKY, V.G. Y HIRSCHORN, K. (1978) Sister chromatid exchange induced by X ray of human lymphocytes and the effect of L-cysteine. *Mutation Res.* 50:93-100.

ALBERT, L. (1988) Curso Básico de Toxicología Ambiental. Centro Panamericano de la Salud, OMS Limusa.

ALLEN, J.W. Y LATT, S.A. (1976) Analysis of sister chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. *Nature* 260:449-451.

ALLEN, J.W., SHULER, C.F., MENDES, R.W. Y LATT, S.A. (1977) A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using 5-Bromodeoxyuridine tablets. *Cytogen. Cell. Genet.* 18:231-237.

BARTSCH, H., TOMATIS, L. Y MALAVEILLE, C. (1982) Qualitative and quantitative comparisons between mutagenic and carcinogenic activities of chemicals. *Mutagenic New Horizons in Genetic Toxicology*. Heddle A.J (ed) Academic Press New York.

BOSTOCK, C.J. Y CHRISTIE, S. (1976) Analysis of the frequency of sister chromatid exchange in different regions of chromosome of the kangaroo rat (*Dipodomys ordii*). *Chromosoma* 56:275-287.

BRINKLEY, B.R. Y WALTER, N.H. (1975) Ultrastructure of mammalian chromosome aberrations. *Internat. Rev. Citol.* 42:49-101.

BRUGMANS, J. (1974) Levamisole in infectious disease: a review of the literature. *J. Rheumatol.* 5 Suppl. 4:115-121.

CARRANO, A.V. Y WOLFF S. (1975) Distribution of sister chromatid exchanges in the eurochromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma* 53:361-369.

CARRANO, A.V. Y JOHNSTON, G.R. (1977) The distribution of Mytomicin C induced sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian Muntjac. *Chromosoma* 64:97-107.

CARRANO, A.V. Y NATARAJAN, A. (1988) Considerations for population monitoring using Cytogenetic Techniques. *Mutation Res.* 204:379-406.

CHIRIGOS, M.A, (ed). (1978) Immune modulation and control of neoplasia by adjuvant therapy. vol 7: *Progress in Cancer Research and Therapy*. Raven Press. New York USA.

CRAIG-HOLMES, H.A. Y SHAW, M. (1977) Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 46:375-384.

CROSSEN, P.E. (1983) DNA replication and sister chromatid exchange in 9 qh +. *Cytogenet. Cell. Genet.* 35:152-155.

CRUZ V.V. (1991) Reparabilidad durante G₁ de las lesiones inductoras de intercambios entre cromátidas hermanas producidas por mitomicina C en células de la glándula salival de ratón in vivo. Tesis Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM, México.

DAVIDSON, R.L., KAUFMAN E.R., DOUGHERTY, G.P., OVELLETTE, A.M., DIFOLCA, C.M. Y LATT, S.A. (1980) Induction of sister chromatid exchanges by BudR is largely independent of the BudR content of DNA. *Nature* 284:74-76.

DU FRAIN, R., LITTLEFIELD, G. AND WILMOR J. (1979) Cyclophosphamide induced sister chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Environment. Mutat.* 1:283-286.

DOLL, R. (1980) The epidemiology of cancer. *Cancer* 45:2475-2485.

EHLING, R.H. (1976) Mutagenicity testing and risk estimation with mammals. *Mutation Res.* 41:113-122.

ELIZONDO A.G. (1996) Susceptibilidad individual a los efectos inmunomoduladores del metronidazol: posibles mecanismos de acción. Tesis de maestría, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

FAWCET, D.W. (1987) Tratado de Histología. Ed Interamericana, México. pag.1985.

FORNACE A.J., NAGASAWA, H. Y LITTLE, J.B. (1980) Relationship of DNA repair to chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and survival during liquid holding recovery in x-irradiated mammalian cell. Mutation Res. 70:323-336.

GARCIA R.M.C. (1992). Efecto de la clorofilina sobre las frecuencias radioinducidas de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de la médula osea de ratón in vivo. Tesis de licenciatura FES-Zaragoza, UNAM, México.

GEBHART, E., WILDOLPH, B. Y WOPFTIER, F. (1980) Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. Human Genet. 56:156-167.

GOODRICH, K. (1993) Effect of levamisole on major histocompatibility complex class Y expression in colon rectal and brief carcinoma cell lines. Cancer 72:225-229.

HADDEN, J. Y COFFEY, R. (1975) Effects of levamisole and inimidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotid levels. Cell Immunology 20:98-103.

HAYOSTEK, CH.J. Y KOVAL, T.M. (1992) Radiosensitization of human cells with levamisole. Cancer Research 52:3228-3230.

HOLCOMBE, R.F., STEWART, R.M., BETZING, K.W. Y KANNAN, K. (1994) Alteration in lymphocyte associated with administration of adjuvant levamisole and 5-fluoracil. Cancer Immunology Immunotherapy. 34:394-398.

ISHII, Y. Y BENDER, M.A. (1980) Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light induced sister chromatid exchange in Chinese hamster cells. Mutation Res. 79:19-32.

IVETT, T. Y TICE, R. (1982) Average generation time a news method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetic. Environ. Mutagen. 4:358.

JANIK, J., KOPP, W.C., SMITH, J.W., LONGO, D.L., ALVORD, W.G. Y URBA, W.J. (1997) Levamisole-Induced Neopterin Synthesis. Annals of The New York Academy of Sciences 685:252-257.

- JEFCA (1992) Levamisole. WHO-FOOD ADDITIVES, Series 27:75-101.
- JOHNKOSKI, J.A., CHUNG-TSEN, H., DOERR, R.J. Y COHEN S.A. (1992) Augmentation of the immune response of the murine liver by levamisole. *The Am. J. Surgeri.* 163:202-207.
- KANO, Y. Y FUJIWARA, Y. (1981) Roles of DNA interstrand crosslinking and repair in the induction of sister chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells. *Mutation Res.* 81:350-375.
- KATO, H., Y SANDBERG, A.A. (1977) The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. *Exp. Cell. Res.* 109:445-448.
- KATO, H. (1980) Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2:69-77.
- KING, M.T. WILD, D. GOCKE, E. Y ECKHARDT, K. (1982) 5-Bromodeoxyuridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of sister chromatid exchange in bone marrow and spermatogonial cells. *Mutation Res.* 97-117-129.
- KINSELLA, A.R. Y RADMAN, M. (1978) Tumor promotor induces sister chromatid exchanges: Relevance to mechanism of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3544-3547.
- KRISHNA, G., NATH, J. Y ONG T. (1986) Murine bone marrow culture for cytogenetic analysis. *Mutation. Res.* 164:91-99.
- LABIANCA R., PESSI M.A. Y ZAMPARELLI G. (1997). Treatment of Colon rectal Cancer. *Drugs* 53:593-607.
- LATT, S.A. (1974) Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185:75-76.
- LATT, S.A. (1979) Sister chromatid exchanges. *Genetics* 92:83-85.
- LICHSTESTEIN, L.M. Y MARGOLIS, S. (1968) Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxanthines. *Science* 161:902-903.
- LIEBESKIND, D., BASES, R., MENDEZ, F., ELEGUIN, F. (1979) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes after exposure to diagnostic ultrasound. *Science* 205:1273-1275.

MARQUEZ, M.J. (1988) Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Ed. UNAM, México.

McCLINTOCK, B. (1938) The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23:315-376.

McFEE, A.F., LOWE, K.W., Y SAN SEBASTIAN, J.D. (1983) Improved sister-chromatid differentiation using paraffin-coated bromo-deoxyuridine tablets in mice. *Mutation Res.* 119:83-88.

MORAE, W.D., MACHINOU, E.A. Y STICH, H.F. (1979) The fate of uv induced lesions affecting SCEs chromosome aberrations and survival of CHO cells arrested by deprivation of arginine. *Chromosome* 72:15-22.

MERCK INDEX (1989) Eleventh Edition. Merck and Co. Pub.

MERLUZZI, V., BADGER, A., KAISER, C. Y COOPERBAND, S. (1975) In vitro stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. *J. Clin. Exp. Immunol.* 21:272-277.

MORALES, R.P. (1980) Analysis in vivo of sister chromatid exchange in mouse bone marrow and salivary gland cells. *Mutation Res.* 74:61-69.

MORALES, R.P. (1988) El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo* 14:65-72.

MORALES R.P. (1984) Efecto de los rayos gamma sobre la inducción y persistencia de intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) y otros eventos citogenéticos en células de médula ósea de ratón in vivo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

MORALES, R.P., VALLARINO, K.T. Y RODRIGUEZ, R. (1983) Effect of BrdU and low doses of gamma radiation on sister chromatid exchange, chromosome breaks, and mitotic delay in mouse bone marrow cells in vivo. *Environ. Mut.* 5:589-602.

MORALES, R.P., RODRIGUEZ R. Y VALLARRRINO K.T. (1987) Analysis of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo by three-way differentiation. *Mutation Res.* 60:329-337.

MORALES, R.P., RODRIGUEZ, R. Y VALLARINO, K.T. (1990) Fate of DNA lesions that elicit SCE. *Mutation Res.* 232:77-88.

MORGAN, W. Y CLEAVER, J. (1982). 3-Amino-benzamide synergistically increases sister-chromatid exchanges in cells exposed to methane sulfonate but not to ultraviolet light. *Mutation Res.* 104:361-366.

MORGAN, W.F. Y CROSSEN, P.E. (1981) Factors influencing sister chromatid exchanges rate in culture human lymphocytes. *Mutation Res.* 81:395-402.

MOUSCHEN, J. (1985) Introduction to genetic toxicology. John Wiley and Sons. New York.

NAKANISHI, Y. Y SHNEIDER, E.L. (1979). In vivo sister chromatid exchanges: a sensitive measure of DNA damage. *Mutation Res.* 60:329-337.

NCR (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) (1989) Immunodeficient Rodents: A guide to their immunobiology, husbandry, and use. Washington D.C. National Academy Press. 321 pp.

NCR (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) (1991) Human exposure assessment for airborne pollutants: Advances and opportunities. Washington D.C. National Academy Press. 321 pp.

NCR (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) (1992) Biologic markers in immunotoxicology. Washington D.C. National Academy Press. 321 pp.

OLESON, B.F. (1990) Overview of in vivo mammalian testing systems. *Mutation and the Environment* part B. Pag. 171-184.

OIKAWA, A., THODA, H., KANAI, M., MIWA, M Y GIMURA, T. (1980) Inhibitor of poli, (adenosine-diphosphate ribose) polimerase inducida sister chromatid exchanges. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97:1311-1316.

ORTIZ, M., CORTINAS, C. Y NAFFTES G. (1987) Manejo de desechos industriales peligrosos en México. Ed. Universo veintiuno, México.

OSTROSKY, W.P. (1986) Efectos genotóxicos de drogas antiparasitarias. Tesis doctoral Facultad de Ciencias, UNAM, México.

OSTROSKY, W.P. (1993) El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. 432-437.

PERRY, P Y WOLFF, S. (1974). New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 251:156-158.

PERRY, P Y EVANS, H.J. (1975). Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258:121-125.

RENOUX, G. Y RENOUX M. (1971) Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. *C.R. Seanc. Acad. Sci. Paris* 272:349-350.

ROCHELLE, W.T. (1993). *General and applied toxicology*. M.Stockton Press vol 2 pag:1021-1046.

RODRIGUEZ, L., MERINO, E., DIAZ, A. Y VALDEZ R. (1989) Parásitosis más frecuentes en México. *Medicina Práctica*. pag 9-31.

ROLDAN, R.E. (1992). Efectos mutagénicos y teratogénicos del pentóxido de vanadio. Tesis de maestría, FES-Zaragoza, UNAM, México.

SCHRECK, R.R, PAIKA. I.J. Y LATT, S.A. (1979) *In vivo* induction of sister chromatid exchange in liver and bone marrow cells by drugs requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 64:315-328.

SCHWARTS, J.L. BANDA, M.J. Y WOLFF, S. (1982) 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13 Acetate (TPA), induces sister chromatid exchanges and delays in cell progression in Chinese hamster ovary and human cell lines. *Mutation Res.* 92:393-409.

SCHVARTZMAN, J.B. Y GUTIERREZ , C. (1980) The relationship between the cell time available for repair and the effectiveness of damaging treatment in provoking the formation of sister chromatid exchanges. *Mutation Res.* 72:483-489.

SHARMA, A. Y TALUKDER G. (1987) Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environ. Mutation* 9:191-226.

SHENEIDER, E.L., CAILLET, J.R. Y TICE, .R. (1976) *In vivo* BrdU labeling of mammalian chromosomes. *Exp. Cell Res.* 100:396-399.

SHENEIDER, L.E., STERNBERG, H., TICE, R.R., SENULA, C.G., KRAM, D., SMITH, J., Y BYNUM, G. (1979) Cellular replication and aging .*Mech. Ageing Develop.* 9:313-324.

SPIEGEL, M.R. (1969) Teoría y Problemas de Estadística. Mc Graw Hill. Colombia. USA.

STETKA, D.G. Y WOLFF, S. (1976) Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage by mutagen-carcinogens. *In vivo* test for compounds requiring metabolic activation. *Mutation Res.* 41:343-350.

SUNSHINE, G.H., LOPEZ, C.E., HADDEN, E.M. Y COFFEY D.G. (1977) Modulation of host immune resistance in the prevention of treatment of induced neoplasia. *Fogarty Int. Proc. Washington* pp 38.

SYMOENS, J., Y ROSENTHAL, M. (1977) Levamisole in the immune response: the current experimental and clinical state. *J. Reticuloendothel. Soc.* 21:175-187.

TAY, Z.J. (1991) *Parasitología médica*. Mendoza editores 4ª reimpresión pp. 3-11, México D.F.

TAYLOR, J.H. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 45:515-519.

TICE, R. (1986) An overview of occupational studies directed at assessing genetic damage.

TICE, R., CHAILLET, J. Y SCHNEIDER, E.L. (1976) Demonstration of sister chromatid exchanges *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 102:426-429.

VAN BELLE, H. (1976) Alkaline phosphatase, kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin. Chem.* 22:972-976.

VAN NEWTEN, J.M. (1972) Pharmacological aspects of tetramisole in comparative biochemistry of parasites. *Academic Press.* 101-105.

VERLY, W.G., PAQUETTE, Y. Y TOBODEAU, C. (1973) Nuclease for DNA apurine site may be involved in the maintenance of DNA in normal cells. *Nature* 244:67-69.

WATSON, A.D.J., SANGSTER, N.C., CHURCH, D.B. Y VAN GOGH, H. (1988) Levamisole pharmacokinetics and bioavailability in dogs. *Res. Veterinary Sci.* 45:411-413.

WHITCOMB, M.E., MERLUZZI, V.J. Y COOPERBAND, S.R. (1976) The effect of levamisole on human lymphocyte mediated production in vitro. *Cell Immunol.* 21:272-277.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1985) Guide to short terms test for detecting mutagenic chemicals. *Environmental Health Criteria # 51*, Genova.

WILLIAM, V. (1982) *Health Risk and Exposure in Genetic Toxicology and Agriculture Perspective*. Plenum Press. New York.

YARON, M. Y YARON, I. (1976) Levamisole in arthritis reumatoid. *Lancet* february: 309.