

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

IS

**LA NEUROCISTICERCOSIS Y SU TRATAMIENTO
COMO FACTORES DE RIESGO PARA
LA INDUCCIÓN DE CÁNCER**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A :

Biólogo Luis Alonso Herrera Montalvo

MÉXICO, D.F., 2000

279813



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Gloria y Luis por su ejemplo, apoyo y cariño

A Julieta por estar siempre conmigo, con todo mi amor

A César Alonso con cariño

A Patricia Ostrosky por su empuje, amistad y enseñanzas

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Luis Benítez y Julio Sotelo por todas sus aportaciones durante el desarrollo de este proyecto.

A los doctores Ana Flisser, Alejandro Mohar, Fabio Salamanca, Juan Pedro Laclette, y Mariano Cebrián por sus comentarios y sugerencias.

LAH recibió becas del Conacyt, la DGAPA y la DGEP, así como apoyo para de la PAEP para la realización de este proyecto.

Índice

Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción y planteamiento de la investigación	9
Hipótesis	11
Desarrollo de la investigación	11
<i>Efecto de los fármacos utilizados en el tratamiento de la NCC en la inestabilidad cromosómica de linfocitos de sangre periférica de humano</i>	11
<i>Estudio epidemiológico de la posible asociación entre NCC y cáncer</i>	13
<i>Posibles mecanismos mediante los cuales la NCC induce neoplasias hematológicas</i>	14
Conclusiones y perspectivas	18
Referencias	22

ANEXO 1: Herrera LA, Benítez L, Sotelo J, Ostrosky P. (2000). La quimioterapia de la cisticercosis. Una revisión acerca de su farmacocinética y toxicología. Gaceta Médica, en prensa.

ANEXO 2: Herrera LA, Santiago P, Rojas G, Salazar P, Tato P, Molinari J, Schiffmann D, Ostrosky P. (1994). Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. Mutation Research 305, 223-228.

ANEXO 3: Herrera LA, Valverde M, Ostrosky P, Speit G, Rojas E. (1998). Analysis of the DNA damage induced by praziquantel in V-79 Chinese hamster fibroblasts and human blood cells using the single-cell gel electrophoresis assay. Teratogenesis, Carcinogenesis.

and Mutagenesis 18, 41-47.

ANEXO 4: Herrera LA, Ramírez T, Rodríguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, Ramos F, Verdorfer I, Gebhart E, Ostrosky P. (2000). Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94, 61-65.

ANEXO 5: Efectos in vitro del albendazol y sus metabolitos en la cinética de proliferación y frecuencia de células micronucleadas en linfocitos de humano.

ANEXO 6: Herrera LA, Benita A, Sotelo J, Chávez L, Olvera J, Rascón A, López M, Ostrosky P. (1999). Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. Archives of Medical Research, 30, 154-158.

ANEXO 7: Inducción de inestabilidad cromosómica y neoplasias experimentales por la neurocysticercosis y un factor soluble secretado por cisticercos de *Taenia solium*.

ANEXO 8: Herrera LA, Ostrosky P. (2000). The role of parasites in carcinogenesis. Parasitology Today, manuscrito en evaluación.

Abreviaturas

ABZ	albendazol
DNA	ácido desoxirribonucléico
FC	factor secretado por cisticercos
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IC 95%	intervalo de confianza al 95%
ICH	intercambios de cromátidas hermanas
NCC	neurocisticercosis
OR	razón de momios
PZC	prazicuantel
RNA	ácido ribonucléico
SOABZ	sulfóxido de albendazol
SO ₂ ABZ	sulfona de albendazol
SNC	sistema nervioso central

Resumen

La frecuencia alta de daño genético observada en linfocitos de animales y pacientes infectados con cisticercosis por *Taenia solium*, en comparación con individuos no infectados o con los mismos donadores después del tratamiento, sugirió que este parásito podría causar enfermedades con un componente genético, como el cáncer. En un estudio epidemiológico retrospectivo de mortalidad comparada se encontró una asociación entre enfermedades hematológicas malignas y la presencia de neurocisticercosis (NCC). Al investigar la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de pacientes con NCC, se observó una mayor frecuencia de alteraciones en los pacientes antes del tratamiento, retornando a valores normales después de la terapéutica. Las aberraciones fueron más frecuentes en cromosomas en los cuales se localizan genes que codifican a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y a receptores antigénicos de las células T. Este daño puede ser resultado de una estimulación antigénica persistente, así como de la interacción de factores solubles secretados por el parásito, como lo sugieren resultados de experimentos en los cuales un RNA de bajo peso molecular secretado *in vitro* por cisticercos indujo la formación de micronúcleos en linfocitos cultivados de humano. Esta misma molécula produjo una frecuencia baja de tumores en ratones jóvenes. Estos resultados muestran que la cisticercosis por *T. solium* debe considerarse un factor de riesgo para la aparición de neoplasias hematológicas en países donde esta parasitosis es aún endémica.

Abstract

An increased genetic damage has been previously reported in lymphocytes from animals and patients infected with *Taenia solium* cysticerci compared to that observed in uninfected or treated individuals. Since this DNA damage could be involved in the induction of diseases with an important genetic component, such as cancer, we decided to investigate cysticercosis as a risk factor for cancer development. A comparative mortality rate epidemiological study did show a significant association between neurocysticercosis (NCC) and hematological malignancies. Results from a molecular epidemiology study indicated a high frequency of chromosomal damage in NCC patients before treatment, returning to normal values after chemotherapy. The frequency of structural aberrations was higher in those chromosomes where genes codifying immunoglobulins and T-cell receptors, suggesting that a persistent antigenic stimulation may participate in the carcinogenic process induced by *T. solium* cysticercosis. Other events occurring during cysticercosis could also be involved in malignant transformation of host cells. For instance, a small RNA molecule secreted *in vitro* by cysticerci was capable to produce DNA damage in human lymphocytes and a low frequency of tumors in young mice. This results suggest that *T. solium* cysticercosis should be considered a risk factor for the development of hematological malignancies in endemic countries.

Introducción y planteamiento de la investigación

La cisticercosis en seres humanos es causada por la larva del céstodo *Taenia solium* que se adquiere mediante la ingestión de los huevos liberados por el parásito adulto alojado en el intestino de los seres humanos, actualmente se reconoce que los portadores de *T. solium* son una fuente importante de contagio de la cisticercosis (Del Bruto et al, 1998; Díaz et al, 1991; Flisser et al, 1997; Sarti et al, 1992). Las repercusiones que esta enfermedad tiene son muy importantes, sobre todo si el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central (SNC), dando origen a la neurocisticercosis (NCC) que ocasiona daños severos en la calidad de vida y productividad de los individuos infectados (Velazco et al. 1982). Esta enfermedad existe particularmente en países cuya infraestructura y educación sanitarias son deficientes, no obstante, debido a la movilización cada vez más frecuente de individuos de países en desarrollo hacia los más industrializados, no es raro que en estos últimos la NCC también sea la infección parasitaria más común del SNC (Sotelo et al, 1996; Tsang and Wilson, 1995; White, 1997). En México la NCC fue la causa de muerte en aproximadamente el 1% de las autopsias realizadas en hospitales públicos (Villagrán y Olvera, 1988). En hospitales de concentración se encontró NCC en alrededor de 10% de las autopsias llevadas a cabo (Velazco et al, 1982). Estudios seroepidemiológicos reportan que algunas poblaciones de la zona del Bajío mexicano presentan una frecuencia de anticuerpos anticisticerco hasta del 6% (Flisser et al, 1994). En términos generales este padecimiento es endémico en México, América Central y Sudamérica, en la región del Sub-Sahara de África y en algunas zonas del lejano Oriente incluyendo la India, Indonesia y China. De acuerdo a la ONU aproximadamente 2.5 millones de personas son portadoras de cisticerco de *T. solium* (Del

Bruto et al, 1998).

Uno de los fármacos utilizados en el tratamiento de la NCC es el praziquantel (PZC; ANEXO 1). Durante un estudio cuyo objetivo fue evaluar la actividad genotóxica del PZC en cerdos con cisticercosis, se encontró que la frecuencia de linfocitos poliploides era más elevada en los animales parasitados en comparación con los cerdos no infectados, y que este daño retornó a valores normales después del tratamiento con PZC (Flisser et al, 1990). De la misma manera, al investigar los efectos del PZC en la frecuencia de mutaciones en el locus que codifica a la enzima hipoxantina-fosforribosil-transferasa en linfocitos de pacientes con NCC, se encontró que en algunos individuos el número de células con mutaciones era más elevado que en personas sanas y que el observado después del tratamiento con PZC (Montero et al, 1994). Estos resultados sugerían que el parásito puede causar daño genotóxico en células del hospedero, por lo que en 1992 iniciamos un estudio con cuatro cerdos sanos, de los cuales a 3 infectamos con 100,000 huevos de *T. solium* por vía oral (ANEXO 2). Se obtuvieron muestras de sangre periférica cada semana durante 3 meses y se analizó la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos cultivados. A pesar de que el significado biológico de los ICH es desconocido, la determinación de su frecuencia en linfocitos de sangre periférica se ha empleado extensamente para evaluar la exposición de seres humanos y animales a agentes que inducen daño genético (Gebhart, 1981; Kato, 1977; Latt et al, 1980). Los resultados mostraron un incremento en la frecuencia de ICH a medida que transcurrió el tiempo de post-inoculación. Llama la atención que este efecto sólo se observó en los animales en los cuales se encontraron cisticercos al ser sacrificados (2 de 3), y no en el control ni tampoco en un animal que a pesar de haber sido inoculado no desarrolló cisticercosis.

Una de las repercusiones de la inducción de daño genético en células somáticas de los hospederos es el incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades con un componente genético importante como el cáncer. Actualmente se acepta que la carcinogénesis es un proceso a lo largo del cual las células afectadas acumulan múltiples cambios genéticos que les permiten pasar por alto los procesos que regulan y controlan la división, adaptación y muerte celulares (Loeb and Loeb, 2000; Rabbitts, 1994). Con estos antecedentes se planteó un proyecto que tuvo como objetivo investigar el posible papel de la cisticercosis por *T. solium* en la aparición de cáncer en los individuos parasitados.

La hipótesis de trabajo fue: durante el curso de la cisticercosis por *T. solium* se produce daño genotóxico que puede causar inestabilidad genética en células somáticas de algunos hospederos, por lo que esta parasitosis puede ser un factor de riesgo para la aparición de neoplasias malignas en los individuos parasitados.

Desarrollo de la investigación

Efecto de los fármacos utilizados en el tratamiento de la NCC en la inestabilidad cromosómica de linfocitos de sangre periférica del ser humano.

No obstante que el daño observado en los pacientes y animales con cisticercosis se redujo después del tratamiento con PZC (Flisser et al, 1990; Montero et al, 1994), y debido a que los estudios acerca de la genotoxicidad de este compuesto así como la del albendazol (ABZ), el segundo medicamento de elección en el tratamiento de la NCC, aún son controversiales (ANEXO 1), uno de los objetivos de este proyecto fue evaluar la posible influencia de estos medicamentos en la inducción de inestabilidad cromosómica en

Una de las repercusiones de la inducción de daño genético en células somáticas de los hospederos es el incremento en el riesgo de desarrollar enfermedades con un componente genético importante como el cáncer. Actualmente se acepta que la carcinogénesis es un proceso a lo largo del cual las células afectadas acumulan múltiples cambios genéticos que les permiten pasar por alto los procesos que regulan y controlan la división, adaptación y muerte celulares (Loeb and Loeb, 2000; Rabbitts, 1994). Con estos antecedentes se planteó un proyecto que tuvo como objetivo investigar el posible papel de la cisticercosis por *T. solium* en la aparición de cáncer en los individuos parasitados.

La hipótesis de trabajo fue: durante el curso de la cisticercosis por *T. solium* se produce daño genotóxico que puede causar inestabilidad genética en células somáticas de algunos hospederos, por lo que esta parasitosis puede ser un factor de riesgo para la aparición de neoplasias malignas en los individuos parasitados.

Desarrollo de la investigación

Efecto de los fármacos utilizados en el tratamiento de la NCC en la inestabilidad cromosómica de linfocitos de sangre periférica del ser humano.

No obstante que el daño observado en los pacientes y animales con cisticercosis se redujo después del tratamiento con PZC (Flisser et al, 1990; Montero et al, 1994), y debido a que los estudios acerca de la genotoxicidad de este compuesto así como la del albendazol (ABZ), el segundo medicamento de elección en el tratamiento de la NCC, aún son controversiales (ANEXO 1), uno de los objetivos de este proyecto fue evaluar la posible influencia de estos medicamentos en la inducción de inestabilidad cromosómica en

linfocitos de sangre periférica de seres humanos. En un primer estudio determinamos la capacidad del PZC para producir rompimientos en el DNA de linfocitos de individuos estimulados y no estimulados, mediante la técnica de electroforesis unicelular (ANEXO 3). Se encontró que el PZC indujo rompimientos del DNA sólo en linfocitos no estimulados, lo cual puede deberse a una mayor eficiencia en los sistemas de reparación del daño al DNA en las células que están en proliferación. En otros experimentos se determinó la frecuencia de células con micronúcleos en cultivos de linfocitos tratados con PZC (ANEXO 4). Los resultados indicaron que el PZC, administrado en dosis equivalentes a las encontradas en el plasma de pacientes con NCC, no incrementó la frecuencia de células con micronúcleos. Estos datos confirman la idea de que los rompimientos al DNA producidos por el PZC en células no estimuladas pueden repararse y no se traducen en daño persistente al DNA, por lo que se puede concluir que el PZC carece de potencial genotóxico en células humanas a dosis terapéuticas.

El ABZ es un benzimidazol que se emplea para el tratamiento de diversas enfermedades parasitarias incluyendo la NCC (ANEXO 1). Una vez que este compuesto es absorbido, se metaboliza rápidamente a sulfóxido (SOABZ) y sulfona (SO₂ABZ), y prácticamente no se detecta en el plasma de los individuos tratados, siendo el SOABZ su metabolito activo (ANEXO 1). El mecanismo de acción parasitocida del SOABZ involucra la inhibición de la formación de los microtúbulos, por lo que potencialmente podría causar inestabilidad cromosómica en células del hospedero al interferir con la segregación del material genético durante la división celular. Por estas razones se investigó la frecuencia de células micronucleadas así como la cinética de proliferación celular en linfocitos cultivados, inducidas por el ABZ y sus metabolitos utilizando dosis equimolares a las reportadas para

el SOABZ en el plasma de pacientes con NCC (ANEXO 5). Los resultados mostraron que el ABZ y el SOABZ detuvieron la proliferación celular, muy probablemente en la metafase, e incrementaron la frecuencia de células con micronúcleos, mientras que la SO₂ABZ no produjo ningún efecto significativo. Es necesario señalar que los efectos inducidos tanto por el ABZ como por el SOABZ, se observaron con dosis 2 órdenes de magnitud más altas que las encontradas en el plasma de pacientes con NCC.

Estudio epidemiológico de la posible asociación entre NCC y cáncer.

Los resultados de dos trabajos realizados en autopsias indicaron una mayor frecuencia de neoplasias malignas en individuos con NCC que en pacientes no infectados (Olvera y Villagrán, 1988; Ridaura, 1987). Otros estudios también han reportado la aparición de mieloma múltiple (Fain et al., 1956), y astrocitomas (Hautecoeur et al, 1987) en algunos casos de pacientes con NCC, sin embargo, los autores consideraron que los individuos se parasitaron como consecuencia de una inmunosupresión causada por la enfermedad neoplásica. Con el objetivo de investigar el posible papel de la cisticercosis por *T. solium* en el desarrollo de neoplasias malignas en los individuos infectados, se realizó un estudio de mortalidad comparada de tipo retrospectivo en colaboración con el Departamento de Patología del Hospital General de México y con el Instituto Nacional de Salud Pública (ANEXO 6). En este trabajo se determinó la frecuencia de NCC en individuos cuya causa de muerte fue cualquier enfermedad neoplásica maligna (casos) y se comparó con la observada en pacientes cuya causa de muerte fue cualquiera distinta a algún cáncer (controles), los casos fueron agrupados de acuerdo al sitio anatómico donde se desarrolló el cáncer. Tanto en casos como en controles, la NCC se diagnosticó en el momento de la

autopsia por 2 neuropatólogos. Los resultados indicaron una mayor frecuencia de NCC en pacientes cuya causa de muerte fue alguna enfermedad hematológica maligna (OR = 3.54, IC 95% = 1.17-9.79; p = 0.01). Es importante señalar que con excepción de uno, la NCC cursó de manera asintomática en los casos en los que se encontró la asociación entre la parasitosis y alguna enfermedad hematológica maligna, y de acuerdo con los datos histopatológicos, la NCC en todos los casos pudo haberse desarrollado antes que la neoplasia, ya que el estado de degeneración de los cisticercos encontrados indica que el tiempo de evolución de la NCC fue prolongado. Durante el curso de esta investigación se publicó un estudio epidemiológico realizado en Ecuador en el cual se encontró una asociación entre la presencia de NCC y tumores intracraneales, específicamente glioblastoma multiforme (Del Brutto et al, 1997). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que si bien existió una asociación entre la NCC y el desarrollo de tumores intracraneales, esta no fue estadísticamente significativa (OR = 1.68, IC 95% = 0.16-17.29).

Posibles mecanismos mediante los cuales la NCC induce neoplasias hematológicas.

En estudios epidemiológicos se ha encontrado una asociación entre frecuencias altas de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de seres humanos y un mayor riesgo para desarrollar enfermedades neoplásicas del sistema hematopoyético (Bonassi et al, 1995; Hagmar et al, 1998), por lo que decidimos determinar si la NCC activa (aquellos casos donde el cisticercos está vivo) está directamente involucrada en la producción de daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica, y así tratar de explicar la asociación entre NCC y enfermedades hematológicas malignas (ANEXO 4). La frecuencia de aberraciones cromosómicas se determinó en linfocitos de pacientes con NCC antes y después del

tratamiento con PZC mediante el uso de una técnica conocida como "chromosome painting" empleando sondas específicas para los cromosomas 1, 2 y 4, con las cuales se evalúa la frecuencia de aberraciones en más del 22% del genoma humano (Tucker et al, 1993, 1995). Además, se analizó la frecuencia de células con micronúcleos así como la cinética de proliferación linfocitaria. Los micronúcleos se deben a un tipo de daño al DNA que se produce tanto por el rompimiento del DNA como por la mala segregación de cromosomas completos y puede considerarse como un indicador de inestabilidad cromosómica (Fenech and Morley, 1985). Los resultados mostraron una mayor proporción de daño cromosómico, visualizado como aberraciones o como micronúcleos, en los pacientes con NCC antes del tratamiento que la observada en los mismos individuos después de la administración de PZC. De la misma manera, la cinética de proliferación de los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina durante 72 h fue más lenta en los pacientes con NCC, retornando a los valores normales después del tratamiento. Tanto la frecuencia de daño cromosómico como la cinética de proliferación celular encontradas en los pacientes con NCC después del tratamiento fueron similares a las obtenidas en un grupo de individuos no parasitados (ANEXO 4).

Estos datos apoyan la hipótesis que plantea que durante la cisticercosis por *T. solium*, el parásito puede inducir inestabilidad cromosómica en células somáticas de los individuos infectados. De acuerdo con los resultados del estudio epidemiológico que realizamos, la NCC puede estar asociada con la aparición de enfermedades linfoproliferativas, como los linfomas. Se sabe que uno de los mecanismos que da origen a la diversidad de anticuerpos y de los receptores antigénicos de las células T, necesarios para una respuesta inmunológica normal, es el rearrreglo constante en regiones del DNA donde

se localizan los genes que codifican a esas moléculas (Zhu and Roth, 1996). Para que esto ocurra, es necesario que la cromatina en estas regiones sea accesible para ciertas enzimas que participan en los eventos de recombinación mitótica (Zhu and Roth, 1996), lo cual también puede hacer más sensible el DNA a la acción de agentes mutagénicos a los que comúnmente estamos expuestos (Kirsch and Lista, 1996). Una vez que se produce alguna alteración en el DNA de las células del sistema inmune, un estímulo antigénico persistente, como ocurre durante la NCC, podría ser la señal que permitiera dividirse a las células afectadas e incluso formar clonas (Magrath, 1992). Por lo que decidimos evaluar la frecuencia de aberraciones en los cromosomas 7, 11 y 14 de linfocitos de individuos con NCC, ya que en ellos se localizan genes que codifican a algunos receptores de células T así como a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, y están involucrados en aberraciones asociadas frecuentemente con la aparición de enfermedades linfoproliferativas (Kirsch and Lista, 1996; Kluin and Schuurin, 1997). Además, comparamos esta frecuencia con la observada en los cromosomas 1, 2 y 4, de los mismos pacientes, y como control se utilizó un grupo de donadores no parasitados (ANEXO 7). Los resultados mostraron una mayor proporción de aberraciones en las células de los pacientes comparada con la observada en un grupo de individuos no infectados, independientemente de los cromosomas analizados. La frecuencia de aberraciones que involucró a los cromosomas 7, 11 y 14 fue mayor que la observada en los cromosomas 1, 2 y 4, sobretudo las translocaciones, las cuales representan un daño al DNA más estable que puede transmitirse de una generación celular a otra (Rabbits, 1994). De manera que mientras el parásito esté vivo y promueva una respuesta inmune persistente por parte del hospedero, se pueden generar clonas de células con daño genético en estos cromosomas el que finalmente daría origen a neoplasias malignas del

sistema linfoide.

Otra posibilidad plantea una participación más directa del parásito en el proceso de carcinogénesis, mediante la secreción de factores que modulan la respuesta inmune del hospedero. Los cisticercos de *T. solium* secretan varios factores que pueden interferir con este proceso (Flisser et al, 1980; Laclette et al, 1992; White et al, 1992), entre ellos se ha aislado un factor soluble que se cree es un RNA de bajo peso molecular. Este factor (FC) inhibe la proliferación inducida por mitógenos, las respuestas celular y humoral a antígenos del cisticercos, y la inflamación alrededor de cisticercos implantados subcutáneamente en ratones BALB/c (Arechavaleta et al, 1998; Molinari et al, 1998; Tato et al, 1995). En un estudio previo se demostró que el FC induce la transformación *in vitro* de fibroblastos de embriones de criceto sirio (ANEXO 2). De aquí surgió la pregunta si este FC puede tener un papel en la inestabilidad cromosómica observada en los individuos parasitados y finalmente en la inducción de un proceso carcinogénico, por lo que se realizaron experimentos en los cuales se evaluó la capacidad del FC para producir micronúcleos en cultivos de linfocitos de sangre periférica de humano (ANEXO 7). Los resultados indican que este factor soluble induce la formación de micronúcleos en linfocitos humanos cultivados, y sugieren que el FC contribuye a la inestabilidad del DNA de las células de los hospederos y representa un factor de riesgo en el proceso de la carcinogénesis. Es necesario resaltar que aún se necesitan más estudios para determinar si el FC se secreta en cantidades biológicamente significativas en pacientes con cisticercosis. Además se investigó el potencial carcinogénico de este factor inyectándolo en ratones BALB/c (ANEXO 7). Los resultados de un experimento mostraron que dosis repetidas del FC indujeron la formación de tumores en el 10% de los animales. Aunque el número de animales que desarrollaron

neoplasias malignas después del tratamiento con FC es bajo (≈ 20), el FC puede tener un potencial carcinogénico si consideramos que los tumores se observaron en animales relativamente jóvenes (de 8 meses de edad) de una cepa que raramente desarrolla neoplasias espontáneas a esa edad (Frith et al, 1981; Sheldon and Greenman, 1980). Los datos presentados apoyan la hipótesis de una participación directa del cisticerco en la inducción de inestabilidad cromosómica en células del hospedero y sugieren que algún(os) factor(es) secretado(s) por estos parásitos podría(n) promover la transformación maligna. El mecanismo mediante el cual esta molécula de RNA podría inducir la inestabilidad cromosómica y eventualmente la transformación maligna es desconocido. No obstante, otros estudios han reportado que U5, una molécula de RNA de bajo peso molecular, obtenido de células tumorales de ratón, produce aberraciones cromosómicas y la transformación de células en cultivo mediante un mecanismo que involucra la unión de la mitad 3' de U5 a regiones específicas del DNA deteniendo temporalmente la síntesis de DNA (Hamada et al, 1989; Hamada and Mizuno, 1992; Hamada and Yokoro, 1995).

Conclusiones y perspectivas

Nuestros resultados indicaron una asociación entre la cisticercosis por *T. solium* y la aparición de enfermedades hematológicas malignas, no obstante los datos aún son escasos, de manera que es importante continuar evaluando esta relación con estudios prospectivos que incluyan un mayor número de casos. De acuerdo con los datos obtenidos, la relación entre cisticercosis y neoplasias hematológicas puede ser el resultado de la inestabilidad cromosómica, influenciada por un estímulo antigénico persistente así como por la

neoplasias malignas después del tratamiento con FC es bajo (2/20), el FC puede tener un potencial carcinogénico si consideramos que los tumores se observaron en animales relativamente jóvenes (de 8 meses de edad) de una cepa que raramente desarrolla neoplasias espontáneas a esa edad (Frith et al, 1981; Sheldon and Greenman, 1980). Los datos presentados apoyan la hipótesis de una participación directa del cisticerco en la inducción de inestabilidad cromosómica en células del hospedero y sugieren que algún(os) factor(es) secretado(s) por estos parásitos podría(n) promover la transformación maligna. El mecanismo mediante el cual esta molécula de RNA podría inducir la inestabilidad cromosómica y eventualmente la transformación maligna es desconocido. No obstante, otros estudios han reportado que U5, una molécula de RNA de bajo peso molecular, obtenido de células tumorales de ratón, produce aberraciones cromosómicas y la transformación de células en cultivo mediante un mecanismo que involucra la unión de la mitad 3' de U5 a regiones específicas del DNA deteniendo temporalmente la síntesis de DNA (Hamada et al, 1989; Hamada and Mizuno, 1992; Hamada and Yokoro, 1995).

Conclusiones y perspectivas

Nuestros resultados indicaron una asociación entre la cisticercosis por *T. solium* y la aparición de enfermedades hematológicas malignas, no obstante los datos aún son escasos, de manera que es importante continuar evaluando esta relación con estudios prospectivos que incluyan un mayor número de casos. De acuerdo con los datos obtenidos, la relación entre cisticercosis y neoplasias hematológicas puede ser el resultado de la inestabilidad cromosómica, influenciada por un estímulo antigénico persistente así como por la

interacción de factores solubles secretados por el parásito durante el curso de la enfermedad. El tipo de daño al DNA que se evaluó, sin embargo, abarca un gran número de pares de bases, las translocaciones cromosómicas y la formación de micronúcleos pueden ser la punta de un iceberg en el que además deben estar involucrados cambios más pequeños en la estructura del DNA, que pueden modificar la expresión de oncogenes y de genes supresores de tumores, por lo que deben ser investigados. Por otro lado, existen varios factores que son excretados por los cisticercos de *T. solium*, a los que podrían estar expuestas las células de los hospederos (White et al, 1997; Laclette, 1992, Flisser, 1997), de los cuales sería necesario analizar su potencial genotóxico y carcinogénico.

Además de la estimulación antigénica persistente y la secreción de factores solubles con capacidad genotóxica, existen otros mecanismos mediante los cuales la cisticercosis por *T. solium* puede originar enfermedades neoplásicas malignas, que deben ser investigados en estudios futuros. La respuesta inflamatoria que se presenta en las infecciones parasitarias, como la NCC, es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer (Ohshima and Bartsch, 1994). Las células inflamatorias producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que pueden causar daño al DNA de las células que rodean el sitio de la inflamación (Ohshima and Bartsch, 1994), además las células inflamatorias pueden metabolizar agentes procarcinógenos y liberar compuestos carcinogénicos hacia los tejidos circundantes (Gentile and Gentile, 1994). El daño inducido al DNA por alguno de estos mecanismos puede ser fijado durante el incremento en la proliferación celular que se produce como respuesta para reparar los tejidos dañados en el proceso inflamatorio (Rosin et al, 1994). Sin embargo, estos eventos se relacionan más con la aparición de tumores cerca del sitio de la inflamación que con el desarrollo de neoplasias a nivel sistémico (IARC, 1994), por lo que

en el caso de la NCC estarían asociados con la generación de tumores intracraneales. Se sabe que la inflamación crónica es un proceso común en los pacientes con NCC (Escobar, 1983), de modo que es necesario investigar si se forman especies reactivas de nitrógeno y oxígeno que pudieran inducir inestabilidad genética en las células cercanas a la inflamación, también es importante determinar la formación de compuestos carcinogénicos, como las nitrosaminas, como resultado del proceso inflamatorio local. Si alguno de estos eventos ocurriera es probable que se induzcan alteraciones genéticas en células del hospedero que podrían fijarse durante la gliosis intensa que se presenta en pacientes con NCC y dar origen a células transformadas y eventualmente a tumores intracraneales.

La idea de que los parásitos pueden causar cáncer se propuso desde hace muchos años, de hecho Johanes Fibiger recibió el premio Nobel en 1926 por su trabajo acerca de la relación entre *Spiroptera carcinoma* y cáncer gástrico en ratas (Raju, 1998). A pesar de que posteriormente los datos de Fibiger fueron criticados severamente y su hipótesis rebatida y olvidada durante mucho tiempo (Stolley and Lasky, 1992), en la actualidad la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha encontrado evidencias suficientes para considerar a dos helmintos como agentes causales de cáncer en seres humanos: *Schistosoma haematobium* y *Ophistorchis viverrini*, (IARC, 1994). Los individuos que vivimos en países en desarrollo estamos expuestos constantemente a la posibilidad de entrar en contacto con alguna de las más de 340 especies de helmintos que pueden infectar al ser humano, de las cuales aproximadamente 30 son de gran importancia para la salud pública (Crompton, 1999), y que varias, si no es que la mayoría de estas especies, establecen relaciones crónicas con sus hospederos durante las que se presentan condiciones suficientes para la inducción de procesos carcinogénicos (ANEXO 8). De manera que es necesario

investigar si otras helmintosis pueden estar relacionadas con la transformación maligna de células de los hospederos.

Uno de los obstáculos más importantes para poder estudiar la asociación entre una enfermedad parasitaria y el desarrollo de neoplasias malignas en seres humanos es la historia natural tan prolongada de ambas enfermedades. El hecho de que la asociación se realice en el momento en que ya existe un tumor maligno impide un análisis correcto de los mecanismos moleculares que condujeron hacia la transformación maligna. Por lo que a pesar de que a lo largo de una infección parasitaria crónica existen varios eventos que pueden influenciar cualquiera de las fases del proceso carcinogénico (ANEXO 8), aún no se tienen las evidencias suficientes para demostrarlo. El empleo de modelos animales en los cuales se puedan generar neoplasias malignas mediante infecciones parasitarias, como *Spirocerca lupi* en perros o *Schistosoma mansoni* en ratones, es una buena opción para analizar el papel específico de las parasitosis en las distintas fases de la carcinogénesis.

Finalmente, es importante considerar que la carcinogénesis es un proceso en el cual intervienen distintos factores tanto endógenos como exógenos, por lo que también es necesario investigar la relación que tienen las enfermedades parasitarias con otros factores de riesgo para el desarrollo de cáncer, como diversos agentes xenobióticos y la desnutrición, a los cuales están normalmente expuestos los individuos parasitados.

Referencias

- Arechavaleta F, Molinari J, and Tato P. (1998). A *Taenia solium* metacestode factor non-specifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res*, 84, 117-122.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, Sbrana I, Vecchio D, and Puntoni R. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genet Cytogenet*, 79, 133-135.
- Crompton D. (1999). How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol*, 85, 397-403.
- Del Brutto O, Castillo P, Mena I, and Freire A. (1997). Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Arch Neurol*, 54, 1125-1128.
- Del Brutto O, Sotelo J, and Román G. (1998). *Neurocysticercosis: a clinical handbook*. Swets and Zeitlinger BV. Holanda, 207.
- Díaz S, Candil A, Suate V, Zazueta, M, Medina M, Lozano R, and Willms K. (1991). Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 45, 522-531.
- Escobar A. (1983). The pathology of neurocysticercosis. In: Palacios, E., Rodríguez, J., Taveras, J. (Editors). *Cysticercosis of the central nervous system*. Thomas, Springfield, IL, 27-54.
- Fain A, Duren P, et Fels P. (1956). Cysticercose généralisée et plasmocytose médullaire (myelome) associées chez une femme de race Muhutu. *Ann Soc Belge Med Trop*, 36, 239-246.

- Fenech M, and Morley A. (1985). Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*, 148, 29-36.
- Flisser A, Woodhouse E, and Larralde C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies, and non-responders. *Clin Exp Immunol*, 39, 27-37.
- Flisser A, Gonzalez D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Stephano A, and Correa D. (1990). Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol Res*, 76, 640-642.
- Flisser A, Plancarte A, y Avila G. (1994). Aplicación de métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniosis a estudios epidemiológicos. *Rev Fac Med UNAM*, 37, 82-91.
- Flisser A, Madrazo I, y Delgado H. (1997). *Cisticercosis Humana. El Manual Moderno*. México, 176.
- Frith C, Zuna E, and Morgan K. (1981). A morphologic classification and incidence of spontaneous ovarian neoplasms in three strains of mice. *J Natl Cancer Inst*, 67, 693-702.
- Gebhart E. (1981). Sister chromatid exchange (SCE) and structural aberration in mutagenicity testing. *Hum Genet*, 58, 235-254.
- Gentile J, and Gentile G. (1994). Implications for the involvement of the immune system in parasite-associated cancers. *Mutat Res*, 305, 315-320.
- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brogger A, Knudsen L, Norppa H, Reuterwall C, and the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58, 4117-4121.
- Hamada K, and Mizuno, K. (1992). Analysis of chromosome aberrations induced by U5 RNA. *Mutat Res*, 267, 97-104.

- Hamada K, and Yokoro, K. (1995). Blocking of DNA synthesis in vitro by a guanosine 2',3'-cyclic phosphate: a possible mechanism of chromosome aberrations induced by U5 snRNA. *Mutat Res*, 326, 71-82.
- Hamada K, Kumazaki T, Mizuno K, and Yokoro K. (1989). A small nuclear RNA. U5, can transform cells in vitro. *Mol Cell Biol*, 9, 4345-4356.
- Hautecoeur P, Gallois P, Brucher J, Ovelacq E, et Dereus J. (1987). Association d'une cysticerose cérébrale et d'un gliome multifocal: discussion des interactions. *Rev Neurol (Paris)*, 143, 844-849.
- International Agency for Research on Cancer. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 61, Lyon, France.
- Kato H. (1977). Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BrdUrd-labeling method. *Int Rev Cytol*, 45, 55-97.
- Kirsch I, and Lista F. (1996). Transrearrangements as biomarkers for risk of lymphoid malignancy. *Cancer Surv*, 28, 311-328.
- Kluin M, and Schuurin E. (1997). FISH and related techniques in the diagnosis of lymphoma. *Cancer Surv*, 30, 3-20.
- Laclette J, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, and Nicholson A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol*, 148, 165-172.
- Latt S, Schreck R, Loveday K, Daugherty C, and Shuler C. (1980). Sister chromatid exchanges. *Adv Hum Genet*, 10, 267-331.
- Loeb K and Loeb L. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, 21, 379-385.

- Magrath I. (1992). Molecular basis of lymphomagenesis. *Cancer Res (Suppl)* 52, 5529s-5540s.
- Molinari J, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M, and Sepúlveda J. (1998). Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res*, 84, 173-180.
- Montero R, Flisser A, Madrazo I, Cuevas C, Ostrosky P. (1994). Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutat Res*, 305, 181-188.
- Ohshima H, and Bartsch H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*, 305, 253-264.
- Rabbits T. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372, 143-149.
- Raju T. (1998). The Nobel chronicles. *Lancet*, 352, 1635.
- Ridaura C. (1987). Host response in childhood cysticercosis. *Child's Nerv Syst*, 3, 206-207.
- Rosin M, Saad El Din Zaki S, Ward A, and Anwar W. (1994). Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat Res*, 305, 283-292.
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez I, López A, Roberts J, and Flisser A. (1992). Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 46, 677-684.
- Sheldon W, and Greenman D. (1980). Spontaneous lesions in control BALB/c female mice. *J Environ Pathol Toxicol*, 3, 155-167.

- Sotelo J, Del Brutto O, and Roman G. (1996). Cysticercosis. In: Current Clinical Topics in Infections Diseases. Remington J, Swartz M (Eds)., pp 240-258.
- Stolley P and Lasky T. (1992). Johannes Fibiger and his Nobel Prize for the hypothesis that a worm causes stomach cancer. *Ann Intern Med*, 116, 765-769.
- Tato P, Castro A, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, and Molinari J. (1995). Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res*, 81, 181-187.
- Tsang V, and Wilson M. (1995). *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitol Today*, 11, 124-126.
- Tucker J, Ramsey M, Lee D, and Minkler J. (1993). Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol*, 64, 27-37.
- Tucker, J., Lee, D., and Moore, D. (1995). Validation of chromosome painting II: a detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Mutagenesis*, 9, 151-156.
- Velazco M, Bravo MA, and Quirasco F. (1982). Medical-Social implications and economic impact. In: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (Eds). Academic Press, New York, pp 47-51.
- Villagrán J, y Olvera JE. (1988). Cisticercosis humana. Estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. *Patología*, 26, 149-156.
- White C. (1997). Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infec Dis*, 24, 101-115.

- White C, Tato P, and Molinari J. (1992). Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Agents Dis*, 1, 185-193.
- Zhu C, and Roth D. (1996). Mechanism of V(D)J recombination. *Cancer Surv*, 28, 295-309.

ANEXO 1



DIRECTIVA 1998
PRESIDENTE
 Mauricio García Sainz
VICEPRESIDENTE
 Enrique Wolpert Barraza
SECRETARIO GENERAL
 José Emilio Exaire Murad
TESORERO
 Aquiles R. Ayala Ruiz
SECRETARIO ADJUNTO
 Rocio Chapela Mendoza
EDITOR
 Luis Benítez Brubiesca
COEDITOR
 Fabio Salamanca Gómez
CONSEJO EDITORIAL
 Leonelo Alarcón Segovia
 María Elena Anzures
 Hugo Aréchiga
 Carlos Campillo
 Alejandro Cravolo
 Juan Ramón de la Fuente
 Alberto Lifshitz
 Rubén Lisaker
 Jaime Sepúlveda
 Arturo Zárate
COMITÉ EDITORIAL
 José María Carril
 Manuel de la Liza
 Alfonso Escobar
 Ina Fisser Steinbruch
 Adolfo García Sainz
 David González Bárcena
 José Halebe Cherem
 Carlos Ibarra
 Roberto Kretschmer
 Fernando Martínez Cortés
 Julián Oñandía Videaneta
 Fidel Ramón
 Roberto Rivera Luna
 Guillermo Robles Díaz
 Guillermo J. Ruiz Argüelles
 Ramón Ruiz Maldonado
 Salvador Sald
 José Ignacio Santos
 Roberto Tapia Conyer
 Alfredo Ulloa Aguilar
 Fermín Valenzuela
 Enrique Wolpert Barraza
CORRECCIÓN
 Ingrida
 Maggie Brunner
REVISIÓN
 Silvia Rivas Vera
SECRETARÍA Y FORMACIÓN
 Oscar R. Fuentes Porras
 Diana Vega Guzmán
SECRETARÍA
 Carmen P. de la Calera

7 de octubre de 1999

**Dr. Luis Alonso Herrera M.
Presente**

Distinguido Dr. Herrera M.:

Por la presente le comunicamos que el artículo: "La quimioterapia de la cisticercosis. Una revisión acerca de su farmacocinética y toxicología.", ha sido aceptado y aparecerá en el número 5 del volumen 136, (2000) de la *Gaceta Médica de México*.

Atentamente,

Dr. Luis Benítez Brubiesca
Editor

Dr. Fabio Salamanca Gómez
Co-editor.

**LA QUIMIOTERAPIA DE LA CISTICERCOSIS. UNA REVISIÓN ACERCA DE SU
FARMACOCINÉTICA Y TOXICOLOGÍA.**

**CHEMOTHERAPY OF CYSTICERCOSIS. A REVIEW ON ITS PHARMACOKINETICS
AND TOXICOLOGY.**

Luis A. Herrera ^{1*}, Luis Benítez-Bribiesca ², Julio Sotelo ³ y Patricia Ostrosky-Wegman ¹.

**¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, ² Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, ³ Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía, SSA.**

*** Correspondencia: Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, D.F.,
México, D.F. MÉXICO.**

**Agradecimientos: LAH es becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la
Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.**

1.0 Introducción

La cisticercosis en humanos es causada por la larva del céstodo *Taenia solium* que se adquiere mediante la ingestión de los huevos liberados por el parásito adulto alojado en el intestino de los seres humanos, actualmente se reconoce que los portadores de *T. solium* son una fuente importante de contagio de la cisticercosis (1-5). Las repercusiones que esta enfermedad tiene son muy importantes, sobre todo si el cisticercos se aloja en el sistema nervioso central, dando origen a la neurocisticercosis (NCC) que ocasiona daños severos en la calidad de vida y productividad de los individuos infectados (6). Esta enfermedad existe particularmente en países cuya infraestructura y educación sanitarias son deficientes, no obstante, debido a la movilización cada vez más frecuente de individuos de países en desarrollo hacia los más industrializados, no es raro que en estos últimos la NCC también sea la infección más común del sistema nervioso central (7-9). En México la NCC fue la causa de muerte en

aproximadamente el 1% de las autopsias realizadas en hospitales públicos (10). En hospitales de concentración se encontró NCC en alrededor de 10% de las autopsias llevadas a cabo (6). Estudios seroepidemiológicos reportan que algunas poblaciones de la zona del Bajío mexicano presentan una frecuencia de anticuerpos anticisticercos hasta del 6% (11).

Hasta hace unos años la única opción terapéutica para la NCC era la cirugía. El uso del prazicuantel (PZC) y más recientemente del albendazol (ABZ) ha provisto a los médicos de un tratamiento farmacológico efectivo contra la NCC (8, 12-13). La quimioterapia de la NCC incluye tres tipos de medicamentos: los cestocidas, los corticosteroides para disminuir la inflamación y otros fármacos para el manejo de síntomas como la epilepsia, el dolor de cabeza o trastornos de comportamiento (revisado en la referencia 14). En 1979 se reportó el primer caso de NCC tratado exitosamente con PZC (13). A partir de esa

fecha se han llevado a cabo varios estudios para determinar la efectividad de diferentes esquemas de tratamiento con PZC o ABZ (15). El resultado de estas investigaciones ha situado al PZC y al ABZ como los medicamentos de elección contra la NCC.

El propósito de este artículo fue examinar la información existente acerca del PZC y el ABZ en relación a su farmacocinética en el humano, su toxicología, con especial énfasis en la toxicología genética, así como los mecanismos de acción cestocida propuestos.

2.0 Prazicuantel

La introducción de medicamentos antiparasitarios nuevos puede ser el resultado de la selección sistemática de productos naturales, del desarrollo específico de fármacos sintéticos, y en ocasiones del azar. Este último parece haber sido el caso del PZC cuya síntesis se llevó a cabo para un fin diferente a su aplicación actual (16). La síntesis del PZC surgió de la búsqueda de tranquilizantes con efectos secundarios leves durante la cual se desarrollaron las

pirazinoisoquinolinas que poseen una estructura química característica del grupo de los alcaloides opiáceos. Sin embargo, las dosis necesarias para poder alcanzar un efecto comparable al de los tranquilizantes existentes eran muy altas. Por esta razón no se lanzaron al mercado, pero se incluyeron en un programa de cooperación entre dos compañías farmacéuticas alemanas que tuvo como objetivo la búsqueda de compuestos antiparasitarios nuevos. El PZC fue el fármaco más promisorio (16; figura 1). El PZC, un derivado acilado de la pirazinoisoquinolina, es un sólido cristalino, casi incoloro, prácticamente insoluble en agua y con sabor amargo característico. Actualmente el PZC se emplea con éxito para el tratamiento de varias enfermedades parasitarias que afectan al ser humano (tabla 1).

2.1 Uso del PZC en la NCC

El PZC es un medicamento utilizado en el tratamiento de diversas infecciones parasitarias, principalmente causadas por tremátodos y céstodos (tabla 1). El PZC es

especialmente efectivo contra las formas larvianas de céstodos como la *T. solium*, el esquema inicial contra la NCC en humanos, 50 mg/kg/día durante 15 días (12-13), se escogió en base a la experiencia con cerdos (17); a partir de la comunicación de Robles y Chavarría en 1979 (13), en la cual describieron un caso con NCC parenquimatosa tratado con PZC, siguieron una serie de reportes acerca de la efectividad de este fármaco (18-23). Sin embargo, no fue hasta 1984 cuando se presentó el primer estudio controlado en donde se mostró la desaparición completa de la cisticercosis en más de un 60% de los casos (24). La confirmación de la efectividad del PZC se demostró en un estudio de seguimiento donde se evaluó la respuesta al tratamiento después de tres meses de terminada la administración de PZC (25). La quimioterapia con PZC está indicada para pacientes con cisticercos viables (15), sin embargo, la variabilidad en la respuesta clínica y una tendencia ocasional hacia la resolución espontánea de la NCC han contribuido a la existencia de una

incertidumbre acerca de las indicaciones precisas para su uso contra esta enfermedad e incluso a cuestionar su efectividad (26). El esquema de tratamiento de la NCC con PZC más comúnmente utilizado es de 50 mg/kg diarios durante 15 días (14-15); recientemente se propuso el uso de tres dosis de 25 mg/kg administradas cada dos horas durante un día (27), aunque este esquema de tratamiento no se ha hecho extensiva aun. En ambos casos se recomienda emplear agentes antiinflamatorios para prevenir la aparición de síntomas que en ocasiones son más severos que la propia enfermedad (14).

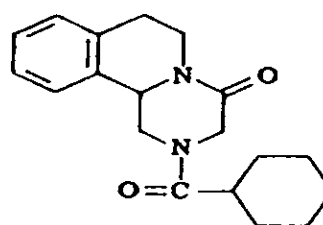


FIGURA 1. Estructura Química del PZQ

2.2 Farmacocinética del PZC

En el ser humano el PZC sufre una biotransformación de primera fase en el hígado que da como resultado la formación

de compuestos mono y dihidroxilados sin actividad antihelmíntica (28-29); dosis de 5, 10, 20 y 50 mg/kg producen concentraciones séricas de 0.15, 0.25, 0.80 y 4.22 mg/l, es posible que este metabolismo de primer paso tenga una saturación a concentraciones séricas entre 0.64 y 3.2 mM/l.

A pesar de los numerosos estudios en animales (revisado en la referencia 30), la información acerca de la farmacocinética del PZC y los niveles en plasma en humanos era limitada hasta hace algunos años (31-32). Los valores máximos de PZC no metabolizado se obtuvieron de 1 a 2 h después de la administración oral de 14 y 46 mg/kg de PZC marcado. Después de este tiempo comienza su metabolismo. La sustancia no metabolizada tiene una vida media de 1 a 1.5 h, mientras que sus metabolitos presentan una vida media de 4h; entre el 80 y 85% de la sustancia se desaloja por la orina en 4 días, el remanente se excreta con las heces, prácticamente no se excreta PZC sin metabolizar (28-29, 31).

A mediados de los años 80 y principios de los 90 se diseñaron métodos para detectar PZC en muestras biológicas utilizando cromatografía líquida de alta presión (33-34). Con esta metodología se han realizado estudios tanto en donadores sanos como en individuos infectados con distintos parásitos (35-36) en los cuales se han encontrado variaciones en los parámetros farmacocinéticos sobre todo en aquellos pacientes con insuficiencia hepática (35).

En pacientes con NCC (36), el PZC se absorbe rápidamente después de la administración oral con un tiempo de absorción promedio de 0.66 h. El pico de concentración en el plasma se obtiene entre 1.5 y 2 h. Los valores de C_{max} van de 3.9 a 8.9 $\mu\text{g/ml}$. Los tiempos medios de eliminación fueron similares a los reportados (1.7 a 2.7 h) sin encontrar diferencias entre mujeres y hombres (36).

La concentración plasmática de PZC se incrementa cuando se administra con alimentos ricos en carbohidratos aparentemente debido a la inhibición del

citocromo P450 (37). Se sabe que el PZC no metabolizado atraviesa la barrera hemato-cerebral, lo que explica su efectividad contra la NCC (38). El PZC cruza el espacio subaracnoideo por difusión pasiva, con rangos de 15 a 24% de la concentración en el plasma (31, 38). Se ha calculado que la concentración cestocida efectiva en líquido céfalorraquídeo es de 100 ng/ml y que los céstodos deben exponerse por lo menos una hora para ser destruidos (38)

2.2.1 Interacción con otros fármacos

El metabolismo hepático del PZC por enzimas de la familia del citocromo P450 se altera tanto por agentes antiinflamatorios como antiepilépticos, comúnmente utilizados durante la terapia contra la cisticercosis (14). La fenitoína y la carbamacepina, ambos agentes antiepilépticos, inducen a enzimas del citocromo P450 incrementando de esta manera el metabolismo hepático del PZC y reduciendo su biodisponibilidad (39).

En pacientes con NCC se ha encontrado que la administración simultánea de dexametasona (DMZ) y PZC reduce los niveles de este en el plasma en un 50% comparado con los niveles existentes cuando se administra únicamente PZC (40). Estos resultados se observaron en todos los pacientes con NCC tratados con PZC, sin embargo, el tiempo medio de eliminación no se modificó. En 1994 González y cols.(41), analizaron el efecto de la DMZ en la oxidación enzimática del PZC en homogenados de hígado de rata, y encontraron que la velocidad de degradación

Tabla 1- Usos del PZQ

Parasitosis	Dosis	Efectos adversos
Esquistosomiosis <i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. mekongi</i>	Durante un día: 20 mg/kg dos veces al día (120) 20 mg/kg tres veces al día (121)	Dolor de cabeza, mareo, malestar estomacal, somnolencia (30)
Tremátodos hepáticos <i>Clonorchis sinensis</i> , <i>Opistorchis viverrini</i>	Durante un día: 25 mg/kg tres veces al día (30, 75)	
Neurocisticercosis	Durante 15 días: 15-20 mg/kg tres veces al día (13,14) Durante un día: 25 mg/kg tres veces al día (c/2h) (27)	
Teniosis	Dosis única 5-10 mg/kg (122)	

del PZC se incrementó al adicionar DMZ. Se propone que la DMZ induce la oxidación del PZC mediada por el gene PCN1 de la familia P450III en roedores y seres humanos, el cual también es influenciado por el fenobarbital (42-43) por lo que se sugiere que el receptor de glucocorticoides puede estar involucrado en la regulación de este gene. Incluso se postula que los anticonvulsivos también inducen enzimas de la familia P450 en el hígado reduciendo la biodisponibilidad del PZC. Por lo que algunos esquemas de tratamiento, especialmente contra la esquistosomiosis y la NCC, han incluido algunas drogas inhibidoras del metabolismo del citocromo P450, como la cimetidina (44-46).

Con base en los estudios de la farmacocinética del PZC se ha sugerido la modificación del esquema de tratamiento contra la NCC hasta reducirse a 3 dosis de 25 mg/kg cada 2 horas durante un solo día (27). Los niveles de PZC en plasma se mantienen sobre 300 ng/ml durante 12 h y se pueden incrementar hasta un 100 % con la

administración simultánea de cimetidina (46). Comparado con otros regímenes, este parece ser ventajoso ya que prolonga la exposición de los parásitos al medicamento y el tratamiento puede reducirse de 2 semanas a un día conservando su efectividad terapéutica (46). Más aún, con este esquema se reduce el impedimento de administrar conjuntamente agentes desinflamantes como la DMZ ya que esta se puede emplear posteriormente al tratamiento con PZC. Es importante señalar que el uso y los beneficios de este esquema aun se encuentran en evaluación.

2.3 Toxicología

La dosis letal media de PZC administrado oralmente a ratones es de 2454 mg/kg, con estas dosis los animales reaccionan con vómito. En ratones hembra infectados con *S. mansoni*, la toxicidad aguda fue parecida a la de los animales sanos. La absorción y excreción de PZC marcado fue mas lenta en ratones infectados con *S. japonicum* ya que el valor sérico máximo fue menor que en los animales sanos (47).

No hay indicios de cambios patológicos en ratas o perros 4 y 13 semanas después de recibir hasta 1000 mg/kg (rata) y 180 mg/kg (perro) de PZC (47). Tampoco se encontraron alteraciones en la fertilidad de las ratas hembra y macho. Aún durante la organogénesis, el PZC administrado oralmente no tiene efectos embriotóxicos o teratogénicos en la descendencia de los animales tratados (47). Sólo con dosis muy altas se encuentran algunos efectos neurotóxicos y psicofarmacológicos (47). Al administrarse a voluntarios sanos prácticamente no hay datos de toxicidad del PZC en las funciones vitales. En el caso de pacientes con esquistosomiosis se presentaron algunos casos de vómito y náusea que desaparecieron rápidamente (48).

2.3.1 Toxicología genética

El potencial mutagénico del PZC se ha estudiado en una gran variedad de sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando diferentes parámetros de daño al ADN (revisado en la referencia 49). Los resultados son diversos. En general no se han

encontrado efectos positivos en los sistemas en los que se analizó su capacidad para inducir mutaciones génicas tanto en bacterias como en mamíferos y humanos (50-55). Tampoco se ha encontrado un incremento significativo en las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas ni de aberraciones cromosómicas estructurales (53, 56) aún a dosis considerablemente altas (1 mM). Sin embargo, se han reportado efectos sinérgicos del PZC con otros compuestos (55, 57) así como trabajos en los cuales el PZC reduce el daño genotóxico observado antes del tratamiento en individuos parasitados (56-58). Por lo que respecta a la exposición crónica al PZC, se han realizado estudios en varias especies de roedores, sin embargo, los resultados no son concluyentes debido a que las dosis utilizadas fueron mucho más altas que las encontradas en el suero de individuos tratados (59), o bien debido a que las frecuencias basales de tumores en las especies estudiadas fueron elevadas (60). En otro reporte se encontró un incremento discreto (3%) en la frecuencia de

colangiocarcinomas, cifra que los autores consideraron no significativa (61).

Un efecto del PZC que llama la atención es su potencial como agente aneuploidogénico, es decir que promueve la pérdida o ganancia de material genético y con ello representa un factor de riesgo para la transformación maligna en un modelo de células de criceto sirio (62). De acuerdo con los datos referentes a su mecanismo de acción antiparasitaria esta hipótesis podría ser válida ya que se sabe que el PZC afecta la permeabilidad del tegumento de *S. mansoni* a iones de calcio y que interfiere con el proceso de control de la integridad del citoesqueleto mediante la modulación de la citocinesis (63-64). No obstante, cabe mencionar que datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio con linfocitos de sangre periférica de pacientes con NCC tratados con PZC no muestran ningún incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni de micronúcleos (65)

2.4 Mecanismo de acción

Aunque el mecanismo mediante el cual el PZC daña al cisticerco no está totalmente claro, se puede decir que su efecto cestocida parece involucrar tanto mecanismos directos al producir daño en estructuras del cisticerco, así como la participación del sistema inmune del hospedero. Algunos estudios muestran que el PZC, administrado durante períodos de 1 o 15 días, produce un daño directo sobre los cisticercos de *T. solium* y que posteriormente las células inflamatorias continúan el proceso hasta ocasionar la desaparición de los restos de los cisticercos muertos, un proceso que puede durar hasta 2 o 3 meses (56, 66-67).

A partir de datos obtenidos en otros parásitos, principalmente del género *Schistosoma*, se considera que la acción antiparasitaria más notable del PZC es la modificación de la homeostasis del calcio intracelular (68). Este efecto desencadena la contracción muscular y un daño tegumentario que a su vez origina la exposición de antígenos del parásito que anteriormente

habrían permanecido ocultos (63, 69). Al exponerse estos antígenos, el parásito es atacado por el sistema inmune del hospedero lo que indica que existe una sinergia entre este y el efecto antihelmíntico del PZC (64, 70-71). El PZC tiene un efecto sobre el tegumento parasitario semejante al de la citocalasina B, que provoca un desarreglo en el citoesqueleto, específicamente inhibiendo la polimerización de la actina seguido por un incremento del calcio intracelular. El efecto del PZC sobre la exposición y liberación de antígenos del esquistosoma se puede atribuir al desarreglo tegumentario (63-64). El PZC también induce alteraciones metabólicas en los parásitos, efecto que puede resultar de los cambios tegumentarios provocados por el fármaco, ya que esta es la superficie primaria para la absorción de glucosa, afectando así las cantidades de ATP en el parásito (68). La contracción sostenida aunada al decremento en la absorción de glucosa disminuiría el contenido de glucógeno en el parásito.

3.0 Albendazol

El surgimiento del interés en el sistema de anillos del benzimidazol como un núcleo para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos se estableció en los años 50 cuando se encontró que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil) benzimidazol era parte integral de la estructura de la vitamina B₁₂. Uno de los campos que más se benefició con los resultados de esas investigaciones fue el de las enfermedades parasitarias. Con el descubrimiento del tiabendazol en 1961 se abrieron las puertas para el desarrollo de derivados del benzimidazol con actividad antiparasitaria (revisado en la referencia 72). De esos compuestos, una veintena salieron al mercado, y de ellos tres se usan en la práctica médica actual, el ABZ, el flubendazol y el mebendazol. El ABZ (figura 2) es muy efectivo para el tratamiento de las helmintiasis, y es uno de los medicamentos que se utilizan en campañas masivas de desparasitación sobre todo en niños escolares (73-74). Debido a su absorción limitada y metabolismo rápido, sólo dosis altas de ABZ

son efectivas en el tratamiento de infecciones sistémicas en seres humanos (72, 75).

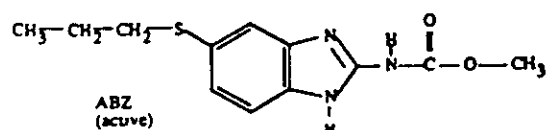


FIGURA 2. Estructura Química del ABZ

3.1 Uso del ABZ en la NCC

En 1987 se reportaron los primeros casos de NCC tratados con ABZ durante 30 días con dosis diarias de 15 mg/kg (76), con la cual se redujeron las lesiones quísticas en el parénquima cerebral hasta en un 76%, similar al efecto del PZC (77). Aunque el uso del ABZ contra la NCC está aún en evaluación, este medicamento se emplea en la mayoría de los casos en los que el tratamiento con PZC falla, incluso el ABZ resulta ser más efectivo que el PZC en los casos de cisticercosis subaracnoidea, llegando en ocasiones a evitar la intervención quirúrgica en individuos con cisticercosis ventricular, espinal, u orbital (78-80). Actualmente se recomiendan dosis de 15 mg/kg/día durante una semana (81), aunque algunos autores consideran que la

duración del tratamiento se puede reducir hasta un período de 3 días sin que se pierda su efectividad terapéutica contra la NCC (82).

Tabla 2. Usos del ABZ

Parasitosis	Dosis	Efectos adversos
Equinococosis	Durante 28 días: 400 mg dos veces al día (72, 75, 94)	Dolor abdominal, náusea, vómito, alopecia, neutropenia, incremento en la transaminasa sérica (94-97)
Neurocisticercosis	Durante 7 días: 5 mg/kg tres veces al día (81)	
Ascariosis, Triquiurosis	Dosis única: 400 mg (75)	
Teniosis	400 mg durante 3 días	
Enterobiosis, Estrogiloidosis	Dosis única: 400 mg (75) Durante tres días: 400 mg 2 veces al día (75)	

3.2 Farmacocinética del ABZ

El metabolismo del ABZ se caracteriza por la oxidación en el átomo de azufre (revisado en la referencia 83). Los metabolitos principales del ABZ tanto en el plasma como en la orina son el sulfóxido (ABZ-SO) y la sulfona (ABZ-SO₂), no obstante que su proporción varía de acuerdo con la especie. Sin embargo, el ABZ sólo se detectó como traza en todas las especies estudiadas. La excreción total

urinaria del ABZ marcado con carbono radioactivo varía de 20% en el ratón a 59% en los bovinos. El ABZ-SO es el metabolito más importante en la orina (23-27%), mientras que la ABZ-SO₂ constituye menos del 6% del total de los metabolitos excretados. La oxidación de la ABZ-SO₂ es la reacción metabólica primaria, pero una vez completada, otras rutas son igualmente importantes.

Cuando se incubaba ABZ con microsomas de hígado de oveja o rata se observa una oxidación rápida dependiente de NADPH que origina al ABZ-SO. La formación del ABZ-SO se inhibe con clorpromaxina, fenbendazol, y metimazol, substratos alternativos de una monooxigenasa microsomal que contiene flavina (MFMO) sin que se observen cambios con los inhibidores clásicos de P450 (84-85). Esos resultados sugieren que la conversión de ABZ al ABZ-SO no es catalizada por P450 sino por MFMO. Sin embargo, estudios acerca del metabolismo del ABZ (86) en los que se usaron microsomas de hígado de

cerdo, así como formas puras de P450 y MFMO, indican que ambos sistemas contribuyen a la oxidación inicial del ABZ. El papel de P450 se demostró cuando se adicionó un anticuerpo contra la P450 reductasa que dio como resultado una reducción del 37% en la formación del ABZ-SO.

A diferencia de la sulfoxidación del ABZ, la formación de la ABZ-SO₂ se le atribuye principalmente al citocromo P450 en hígado de rata perfundido (revisado en la referencia 83). La adición de octilamina, un compuesto que disminuye P450 pero que estimula MFMO, inhibe completamente toda actividad de sulfonación. Experimentos posteriores usando inductores específicos de P450 sugieren que la isoenzima P450c es la responsable principal de la sulfonación del ABZ (87). También mostraron algo importante e inesperado: el ABZ induce su propio metabolismo. El pretratamiento de ratas con ABZ durante 10 días incrementó al doble los niveles microsomales de P450 y hasta 30 veces la actividad de P450c. *In vivo*

estos resultados se manifiestan por el decremento en los niveles plasmáticos del ABZ-SO, con aumentos correspondientes de la ABZ-SO₂.

En general se ha encontrado que el ABZ se absorbe en poca cantidad en el ser humano, menos del 5% después de su administración oral. A la dosis de 6.6 mg/kg de ABZ la concentración en plasma del ABZ-SO alcanza un máximo de 0.25 a 0.30 µg/ml después de 2 h. La vida media del ABZ-SO en el plasma es de aproximadamente 8.5 h. El metabolito se elimina esencialmente por la orina. La administración del ABZ con comidas grasosas eleva su biodisponibilidad. Las concentraciones medias en plasma fueron 4.5 veces más altas cuando la droga se administró con el desayuno que en ayunas (88). Sin embargo, en estudios previos se encontró que si se administra junto con aceite de oliva y leche no hay grandes cambios en su absorción (89).

Jung y cols. (90) estudiaron la farmacocinética del ABZ en ocho pacientes con NCC que recibieron ABZ en dosis de 15

mg/kg por día durante 8 días. No se detectó ABZ en plasma pero sí el ABZ-SO. Los niveles máximos de ABZ-SO en plasma estuvieron en un rango de 0.45 a 2.96 µg/ml. La vida media de este metabolito fue de 10 a 15 h. Se encontró un pico doble en tres pacientes, lo que se ha tratado de explicar como un problema de absorción del ABZ, el cual posteriormente es solubilizado por las sales biliares, o bien porque la disolución *in vivo* del ABZ de la tableta administrada es lenta y errática. El ABZ-SO permanece en plasma entre 14 y 20 h. En el estado estacionario se encuentran niveles con gran variabilidad individual. Estos resultados sugirieron que el ABZ podía administrarse dos veces al día. Más adelante Sánchez y cols. (91) realizaron un estudio con 10 pacientes con NCC parenquimatosa para evaluar la efectividad de los dos esquemas de tratamiento contra la NCC (7.5 mg/kg dos veces al día o 5.0 mg/kg tres veces al día). A pesar de la gran variabilidad interindividual observada en ambos esquemas tanto en el área bajo la curva como en las

concentraciones mínimas detectadas en plasma en el estado estacionario, no se encontraron diferencias significativas en ambos parámetros. Este estudio tuvo como resultado que el régimen de administración del ABZ contra la NCC en adultos se cambiara a 7.5 mg/kg cada 12 h.

La farmacocinética del ABZ-SO en el plasma de niños con NCC también muestra diferencias individuales. Las concentraciones máximas del ABZ-SO en plasma varió desde 0.2 a 1.0 µg/ml. Se encontró un doble pico en cuatro niños. La vida media del ABZ-SO fue desde 2.3 hasta 8.3 h y el tiempo de permanencia en el plasma fue de 5.1 hasta 13.6 h. Esos valores son menores que en adultos. Los resultados sugieren que cuando se tratan niños con NCC el ABZ debe administrarse tres veces al día en lugar de dos como se sugiere para los adultos (92).

3.2.1 Interacción con otros fármacos

La interacción más importante del ABZ con otras drogas hasta hoy demostrada es con la DMZ. Al contrario de lo que ocurre con el PZC, el tratamiento simultáneo con ABZ y

DMZ incrementa los niveles del ABZ-SO en la mayoría de los pacientes, además de que en el plasma de algunos individuos se pudo detectar ABZ libre (93). En este trabajo el ABZ se administró a ocho individuos durante una semana (15 mg/kg al día) sin DMZ, e inmediatamente después junto con DMZ durante otra semana. Como ya se mencionó, el citocromo P450 está involucrado en el metabolismo del ABZ, por otro lado, se sabe que la DMZ induce la actividad de genes de esta familia de enzimas, por lo que al suministrar simultáneamente DMZ y ABZ, la DMZ puede promover la formación del ABZ-SO; otra explicación es que debido a que el ABZ puede inducir su propio metabolismo, el régimen previo de una semana con ABZ haya incrementado el metabolismo del fármaco durante la segunda semana de tratamiento cuando se administró junto con DMZ. Sin embargo, esto no explica el hallazgo de niveles mayores de ABZ libre en algunos sujetos ya que se esperaría lo contrario. Una posible explicación es que en estos pacientes el metabolismo total del ABZ

se encuentre desviado hacia una ruta más lenta como la formación de la ABZ-SO₂, y por lo tanto el tiempo de permanencia del ABZ en plasma sea más largo.

3.3 Toxicología

En más del 1% de los pacientes tratados con ABZ se reporta la aparición de síntomas como mareos, dolor de cabeza, vértigo, eosinofilia, pancitopenia, neutropenia, alopecia y prurito (94). También se ha observado la presencia de dolor abdominal, náusea, y vómito en pacientes con NCC. Otros efectos menos frecuentes son anorexia, constipación, dolor epigástrico y resequecedad bucal (95). En ocasiones existe una elevación reversible de las transaminasas séricas, aunque este es un efecto transitorio durante el tratamiento del quiste hidatídico o de la NCC (96-97), así como de la transpeptidasa sérica y la fosfatasa alcalina (98). En algunos casos se encontró ictericia durante la medicación con ABZ. en un 5% de estos pacientes este efecto puede ser serio, sin embargo, solo se ha observado esta complicación en pacientes

con quiste hidatídico tratados durante más de dos ciclos de 28 días (98).

3.3.1 Toxicología genética

Poco se sabe de la toxicología genética del ABZ. El dato más sobresaliente de los estudios reportados es su actividad teratogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (99). Con respecto a los estudios de mutagenicidad disponibles con otros derivados del benzimidazol, en especial del mebendazol, éstos indican que el suero de ratas a las cuales se les administró mebendazol oralmente ocasionó efectos mutagénicos en bacterias. Concentraciones de 10⁻⁴ a 10⁻⁷ M de mebendazol provocan efectos notorios en la médula ósea de la ratas, mientras que las células en cultivo expuestas al suero de animales tratados con este benzimidazol mostraron aberraciones mitóticas e inhibición de la mitosis (100). Leonard (101) evaluó la capacidad del mebendazol para inducir alteraciones cromosómicas en espermatocitos, efectos dominantes letales en la descendencia y translocaciones hereditarias en ratones. Las dosis (160, 320,

640 mg/kg) se administraron por vía oral. Los resultados indicaron que el mebendazol no incrementó la proporción de pérdidas prenatales durante las 8 semanas que duró la observación ni produjo anomalías cromosómicas en espermatozoides o en la descendencia de la primera generación. Delatour y Parish (102) reportaron una actividad antimitótica del mebendazol en cultivos de linfocitos de humanos y ovinos, así como en explantes primarios de riñón de puerco y en células tumorales (HeLa, KB y BHK).

Los benzimidazoles básicamente inhiben la polimerización de la tubulina y por lo tanto la formación de los microtúbulos (103-105). La inhibición de la actividad de los microtúbulos puede dar origen a aneuploidía (106). No obstante que hay varios reportes de inducción de aneuploidía por otros benzimidazoles, como el benomil y el tiabendazol (107-108) no hay estudios sobre la posible actividad aneugénica del ABZ. En experimentos recientes de nuestro grupo se encontró que *in vitro* el ABZ induce

el retraso de la cinética de proliferación de linfocitos de sangre periférica de humanos incluso con concentraciones semejantes a las encontradas en el plasma de pacientes con NCC. Además, datos preliminares de nuestro laboratorio indican que el ABZ provoca la formación de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica de humano aún a concentraciones del orden de 10^{-7} M.

3.4 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción parasitocida de los benzimidazoles se enfocó inicialmente en su capacidad para modificar el metabolismo de carbohidratos mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa (109), así como para impedir la captación de glucosa causando la disminución de las reservas de glucógeno (revisado en la referencia 110); sin embargo, se sabe que ambos efectos no son específicos de los benzimidazoles antihelmínticos ya que también los producen varias otras sustancias que carecen de actividad parasitocida (109, 110). Los benzimidazoles también inhiben la secreción de acetil colinesterasa en los helmintos;

debido a que la colchicina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, también impide la liberación de ese neurotransmisor, se sugirió que los microtúbulos podrían estar involucrados en la acción de los benzimidazoles (111). Actualmente se tienen evidencias suficientes para afirmar que la acción antihelmíntica de los benzimidazoles, incluyendo al ABZ, se debe a su afinidad de unión a la tubulina que impide la polimerización de los microtúbulos (105, 110, 112-116). En un principio esta hipótesis fue difícil de creer debido a que la tubulina es una proteína común tanto en las células del hospedero como del parásito, de modo que no se podía explicar su acción antiparasitaria altamente específica y sus limitados efectos tóxicos en las células del hospedero. Hasta el momento, se han planteado dos posibles explicaciones. Por un lado, existen diferencias en la afinidad de unión entre los benzimidazoles y la tubulina extraída de diferentes organismos, en general hay una mayor afinidad de los distintos benzimidazoles a la tubulina de los parásitos

que de las células de mamíferos (105, 110, 112, 114, 116). Además, mutaciones en la beta tubulina confieren resistencia a la acción antihelmíntica de los benzimidazoles en algunas especies de parásitos (revisado en la referencia 117). Las modificaciones estructurales de los microtúbulos inducida por los benzimidazoles parece ser diferente a la causada por otros inhibidores de la polimerización de la tubulina como la colchicina. Laclette y cols. (118) reportaron que al tratar *in vitro* cisticercos de *T. solium* con mebendazol la tubulina se ensambla formando haces paracrystalinos que no se produjeron con la colchicina aunque ambos tratamientos dieron como resultado la acumulación de vesículas secretoras en las células tegumentarias del cisticerco. La otra hipótesis que aún no ha sido lo suficientemente explorada es la posible diferencia en la farmacocinética del ABZ entre el parásito y el hospedero.

4.0 Conclusiones

Los datos presentados muestran que tanto el PZC como el ABZ son dos fármacos altamente efectivos contra la NCC. Los estudios de farmacocinética en seres humanos han permitido definir los protocolos de tratamiento de una manera más adecuada y precisa con ambos medicamentos logrando reducir considerablemente el tiempo de tratamiento. La quimioterapia de la NCC se ha acortado de casi un mes a sólo una semana (ABZ) e incluso un día (PZC). Además, de acuerdo con los datos toxicológicos, ambos medicamentos presentan efectos secundarios poco severos a corto plazo.

Los estudios relacionados con los posibles efectos a largo plazo del PZC muestran que este medicamento no representa un factor de riesgo para la inducción de daño genotóxico, aunque queda aún por explorar si en seres humanos podría ocasionar la pérdida de material genético como en las células de criceto sirio o bien su acción comutagénica como la reportada *in vitro*. Por lo que respecta al ABZ, los

resultados de estudios *in vitro* sugieren un posible efecto aneugénico cuyas repercusiones en la salud de los seres humanos deben ser evaluadas. Recientemente se publicó un estudio en el cual se sugiere que cuando se trata a niños ligeramente infectados con *Trichuris trichiura* con 400 mg de ABZ al día durante 3 días consecutivos (repetiéndose este esquema en tres ocasiones con intervalos de 4 meses), se puede provocar un retraso en el crecimiento corporal (119). Si bien estos datos no invalidan la gran utilidad de este medicamento para el control de diversas helmintosis en México y en muchos países donde estas enfermedades parasitarias son frecuentes, si replantea la necesidad de controlar el uso indiscriminado de los agentes antiparasitarios. Además hay que recordar que muchos de los efectos a largo plazo dependen en gran medida de la susceptibilidad individual, y del grado de exposición, el cual a su vez está influenciado por la farmacocinética del medicamento en cada individuo; y finalmente considerar que

si estos medicamentos se aplican de manera descontrolada e indiscriminada, su utilidad podría verse reducida con el surgimiento de especies resistentes.

REFERENCIAS

- 1- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis Humana. El Manual Moderno. México, 1997, 176.
- 2- Del Brutto O, Sotelo J, Román G. Neurocysticercosis: a clinical handbook. Swets and Zeitlinger BV. Holanda, 1998, 207.
- 3- Gilman R, García H, González A, Verástegui M, Dunleavy M, Evans C, Grupo de Trabajo en Cisticercosis en Perú. En: Teniasis/Cisticercosis por *T. solium*. García H, Martínez S (Eds). Editorial Universo, Lima, pp: 327-339.
- 4- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez I, López A, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 677-684.
- 5- Díaz S, Candil A, Suate V, Zazueta, M, Medina M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. Am J Trop Med Hyg 1991; 45: 522-531.
- 6- Velazco M, Bravo MA, Quirasco F. Medical-Social implications and economic impact. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (Eds). Academic Press, New York, 1982, pp 47-51.
- 7- Tsang V, Wilson M. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. Parasitol Today 1995; 11: 124-126.
- 8- Sotelo J, Del Brutto O, Roman G. Cysticercosis. En: Current Clinical Topics in Infections Diseases. Remington J, Śwartz M (Eds). ,1996, pp 240-258.
- 9- White C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. Clin Infec Dis 1997; 24: 101-115.
- 10- Villagrán J, Olvera JE. Cisticercosis humana. Estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. Patología 1988; 26: 149-156.

- 11- Flisser A, Plancarte A, Avila G. Aplicación de métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniosis a estudios epidemiológicos. *Rev Fac Med UNAM* 1994; 37: 82-91.
- 12- Robles C, Vargas N, Sedano AM. The chemotherapy of cisticercosis. The results of 10 years or more after follow-up. *Gac Méd Méx* 1997; 133: 127-139.
- 13- Robles C, Chavarría M. Presentación de un caso de cisticercosis cerebral tratado medicamente con un nuevo fármaco: Praziquantel. *Sal Púb Méx* 1979; 5: 603-618.
- 14- Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 503-515.
- 15- Sotelo J, Del Brutto O. Therapy of neurocysticercosis. *Child's Nerv Syst* 1987; 3: 208-211.
- 16- Seubert J, Pohlke R, Loebich F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia* 1977; 33: 1036-1037
- 17- Chavarría M, González D. Droncit en el tratamiento de la cisticercosis porcina. *Esp Vet (Méx)* 1987; 1: 159-165.
- 18- Botero D, Castaño S. treatment of cysticercosis with praziquantel in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 810-821.
- 19- Gómez J, Sánchez E, Pardo R. Treatment of cisticercosis with praziquantel. *Arch Neurol* 1984; 41: 1022.
- 20- Robles C. Tratamiento médico de la cisticercosis cerebral. *Gac Méd Méx* 1981; 117: 355-363.
- 21- Robles C. Resultados tardíos en el tratamiento de la cisticercosis cerebral con praziquantel. *Sal Púb Méx* 1982; 24: 625-627.
- 22- Spina-Franca A, de Rezende G. Alteraciones en el líquido cefalorraquídeo con el praziquantel. *Sal Púb Méx* 1982; 24: 633-636.
- 23- Brink G, Schenone H, Díaz V, Parra M, Corrales, M. Neurocysticercosis: tratamiento con praziquantel: estudio preliminar. *Bol Chileno Parasitol* 1980; 35: 66-72.

- 24- Sotelo J, Escobedo F, Rodríguez J, Torres B, Rubio F. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N Engl J Med* 1984; 310: 1001-1007.
- 25- Sotelo J, Torres B, Rubio F, Escobedo F, Rodríguez J. Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology* 1985; 45: 752-755.
- 26- Kramer L. Medical treatment of cysticercosis-Ineffective. *Arch Neurol* 1995; 52: 101-102.
- 27- Corona T, Lugo R, Medina R, Sotelo J. Single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 125.
- 28- Leopold G, Ungethüm W, Groll E, Diekmann H, Nowak H, Wegner D. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel a new drug against schistosomes and cestodes. *Eur J Clin Pharmacol* 1978; 14: 281-291.
- 29- Buhning K, Diekmann H, Muller H. Metabolism of praziquantel in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1978; 3: 179-190.
- 30- Groll E. Praziquantel. *Adv Pharmacol Chemother* 1984; 20: 219-238.
- 31- Spina-Franca A, Machado L, Nobrega J, Livramento J, Diekmann H, Groll E, de Rezende G. Praziquantel in the cerebrospinal fluid in neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr* 1985; 43: 243-259.
- 32- Patzschke K, Pütter J, Wegner L, Hörster F, Diekmann H. Serum concentrations and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel. Results of three determination methods. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1979; 4: 149-156.
- 33- Xiao S, Catto B, Webster L. Quantitative determination of praziquantel in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1983; 273 : 127-132.
- 34- González D, Morano C, Sánchez M, Sotelo J, Jung H. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for praziquantel in plasma, urine and liver homogenates. *J Chromatogr* 1993; 613: 174-178.
- 35- El Guiniady M, El Touny M, Abdel-Bary M, Abdel-Fatah S, Metwally A. Clinical and

pharmacokinetic study of praziquantel in Egyptian schistosomiasis patients with and without liver cell failure. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 809-818.

36- Jung H, Vázquez M, Sánchez M, Penagos P, Sotelo J. Clinical pharmacokinetics of praziquantel. *Proc West Pharmacol Soc* 1991; 34: 335-340.

37- Mandour M, El Turabit, Homeida M, el Sadig T, Ali H, Bennett J, Leahey W, Harron D. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 389-393.

38- Overbosch D, Van de Nes J, Groll E, Diekmann H, Polderman A, Mattie H. Penetration of praziquantel into cerebrospinal fluid and cysticerci in human cysticercosis. *Eur J Clin Pharmacol* 1987; 33: 287-292.

39- Bittencourt P, Gracia C, Gorz A, Mazaer S, Oliveira T. High-dose praziquantel for neurocysticercosis: efficacy and tolerability. *Eur Neurol* 1992; 30: 229-234.

40- Vázquez M, Jung H, Sotelo J. Plasma levels of praziquantel decrease when

dexamethasone is given simultaneously. *Neurology* 1987; 37: 1561-1562.

41- González D, Sánchez M, Sotelo J, Jung H. *In vitro* metabolic interaction between praziquantel and dexamethasone. *Pharmacol Communications* 1994; 4: 301-305.

42- González F. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1988; 40: 243-288.

43- Murray M, Reidy G. Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents. *Pharmacol Rev* 1990; 42: 85-101.

44- Dachman W, Adubofour K, Bikin D, Johnson Ch, Mullin P, Winograd M. Cimetidine-induced rise in praziquantel levels in a patient with neurocysticercosis being treated with anticonvulsants. *J Infect Dis* 1994; 169: 689-691.

45- Ebeid F, Metwally A, Botros S, Bennett J. Treatment of experimental schistosomiasis mansoni with praziquantel alone and combined with cimetidine. *Drug Res.* 1994, 44: 1268-1270.

- 46- Jung H, Medina R, Castro N, Corona T, Sotelo J. Pharmacokinetic study of praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. *Antimicrob Agents and Chemother* 1997; 41: 1256-1259.
- 47- Frohberg H, Shulze-Schencking M. Toxicological profile of praziquantel, a new drug against cestode and schistosome infections as compared to some other schistosomicides. *Drug Res* 1981; 31: 555-565.
- 48- Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J. Praziquantel. *Med Res Rev* 1983; 3: 147-200
- 49- Montero R, Ostrosky-Wegman P. Genotoxic activity of Praziquantel. *Mutation Res* 1997; 387: 123-141.
- 50- Obermeier J, Frohberg H. Mutagenicity studies with praziquantel a new anthelmintic drug: Tissue-, host-, and urine-mediated mutagenicity assays. *Arch Toxicol* 1977; 38: 149-161.
- 51- Bartsch H, Kuroki T, Malaveille C, Loprieno N, Barale R, Abbondandolo A, Bonatti S, Rainaldi G, Vogel E, Davis A. Absence of mutagenicity of praziquantel, a new effective, antischistosomal drug, in bacteria, yeast, insect and mammalian cells. *Mutation Res* 1978; 58: 133-142.
- 52- Machemer L, Lorke D. Mutagenicity studies with praziquantel, a new anthelmintic drug, in mammalian systems. *Arch Toxicol* 1978; 39: 187-197.
- 53- Bartsch H, Malaveille C, Camus A, Martel-Planche G, Brun G, Hautefeuille A, Sabadie N, Barbin A, Kuroki T, Drevon C, Piccoli C, Montesano R. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. thyphimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutation Res* 1980; 76: 1-50.
- 54- Bianchi V, Nuzzo F, Abbondandolo A, Bonatti S, Capelli E, Fiorio R, Giulotto E, Mazzaccaro A, Stefanini M, Zaocaro L, Zantedeschi A, Levis A. Scintillometric determination of DNA repair in human cell lines. *Mutation Res* 1982; 93: 447-463.

- 55- Billings P, Heidelberger C. Effects of praziquantel, a new antischistosomal drug, on the mutation and transformation of mammalian cells. *Cancer Res* 1982; 42: 2692-2696.
- 56- Flisser A, González D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero H, Stephano A, Correa D. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol Res* 1990; 76: 640-642.
- 57- Anwar W, Rosin M. Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. *Mutation Res* 1993; 298: 179-185.
- 58- Montero R, Flisser A, Madrazo I, Cuevas C, Ostrosky-Wegman P. Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutation Res* 1994; 305: 181-188.
- 59- Shirai T, Joong K, Hakoi K, Thamavit W, Pairojkul C, Hoshiya T, Hasegawa R, Ito N. Promotion of hepatocarcinogenesis by praziquantel. *JPN J Cancer Res* 1991; 82: 1085-1088.
- 60- Ketkar M, Althoff J, Mohr U. A chronic study of praziquantel in Syrian golden hamsters and Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1982; 24: 345-350.
- 61- Thamavit W, Moore M, Ruchirawat S, Ito N. Repeated exposure to *Ophistorchis viverrini*. *Carcinogenesis* 1992; 13: 309-311.
- 62- Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Rojas E, Gonsebatt M, Schiffmann D. Evaluation of the carcinogenic and genotoxic potential of praziquantel in the Syrian hamster embryo cell transformation assay. *Mutation Res* 1994; 305: 175-180.
- 63- Bricker C, Depenbush J, Bennet J, Thompson D. The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 1983; 69: 61-71
- 64- Linder E, Thors C. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced tegumental lesion exposes actin of surface spines and allows binding of actin depolymerizing factor, gelsolin. *Parasitology* 1992; 105: 71-79.

- 65- Herrera LA, Ramírez T, Rodríguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, Ramos F, Verdorfer I, Gebhart E, Ostrosky-Wegman P. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer. Increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; en prensa.
- 66- Flisser A, González D, Shkurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodríguez J, Cohen S, Rodríguez E, Collado M, Fernández B, Fernández F, Aluja A. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. I. Radiological, physiological and histopathological. Parasitol Res 1990; 76: 263-269.
- 67- Torres A, Plancarte A, Villalobos A, Aluja A, Navarro R, Flisser A. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 3. Effect of 1-day treatment. Parasitol Res 1992; 78: 161-164.
- 68- Day T, Bennett J, Pax R. Praziquantel: The enigmatic antiparasitic. Parasitol Today 1992; 8: 342-344.
- 69- Harnett W, Kusel, J. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. Parasitology 1986; 93: 401-405.
- 70- Brindley P, Sher A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. J Immunol 1987; 136: 215-220.
- 71- Flisser A, Delgado V, McLaren D. *Schistosoma mansoni* enhanced efficacy of praziquantel treatment in immune mice. Parasite Immunol 1989; 11: 319-328.
- 72- Horton R. Benzimidazoles in a wormy world. Parasitol Today 1990; 6: 106.
- 73- Nokes C, McGarvey S, Shiue L, Wu G, Wu H, Bundy D, Olds G. Evidence for an improvement in cognitive function following treatment of *Schistosoma japonicum* infection in Chinese primary schoolchildren. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 556-565.
- 74- Mascie G, Alam M, Montanari R, Karim R, Ahmed T, Karim E, Akhtar S. A study of the cost effectiveness of selective health

- interventions for the control of intestinal parasites in rural Bangladesh. *J Parasitol* 1999; 85: 6-11.
- 75- Liu L, Weller P. Antiparasitic drugs. *N Eng J Med* 1996; 334: 1178-1184.
- 76- Escobedo E, Penagos P, Rodríguez J, Sotelo J. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 738-741.
- 77- Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis: a controlled trial. *Arch Neurol* 1988; 45: 532-534.
- 78- Proano J, Madrazo I, García L, García E, Correa D. Albendazole and praziquantel treatment in neurocysticercosis of the fourth ventricle. *J Neurosurg* 1997; 87: 29-33
- 79- Puri P, Grover A. Medical management of orbital myocysticercosis: a pilot study. *Eye* 1998; 12: 795-799.
- 80- Corral I, Quereda C, Moreno A, López R, Martínez J, Guerrero A, Sotelo J. Intramedullary cysticercosis cured with drug treatment. A case report. *Spine* 1996; 21: 2284-2287.
- 81- Sotelo J, Del Brutto O, Penagos P, Escobedo F, Torres B, Rodríguez J, Rubio F. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 1990; 237: 69-72.
- 82- Alarcón F, Escalante L, Dueñas G, Montalvo M, Román M. Neurocysticercosis: short course of treatment with albendazole. *Arch Neurol* 1989; 46: 1231-1236.
- 83- Gottschall D, Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Today* 1990; 6: 115-124.
- 84- Ziegler D. Enzymatic Basis of Detoxication, Vol. 1, Jakoby E. (Ed), Academic Press, New York, pp 201-227.
- 85- Fargetton X, Galtier P, Delatour P. Sulfoxidation of albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes. *Vet Res Commun* 1986; 10: 317-324.
- 86- El Amri H, Fargetton X, Delatour P, Batt A. Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases from pig liver

- microsomes. *Xenobiotica* 1987; 17: 1159-1168.
- 87- El Amri H, Mothe O, Totis M, Masson C, Batt A, Delatour P, Siest, G. Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 758-764.
- 88- Lauge H, Eggers R, Bincher J. Increased systemic availability of albendazole when taken with a fatty meal. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 34: 315-317.
- 89- Marriner S, Morris D, Dickson B, Bogan J. Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30: 705-708.
- 90- Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina M, Sotelo J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J Clin Pharmacol* 1992; 32: 28-31.
- 91- Sánchez M, Suástegui D, González D, Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: 77-82.
- 92- Jung H, Sánchez M, González A, Martínez J, Suástegui R, González D. Clinical pharmacokinetics of albendazole in children with neurocysticercosis. *Am J Ther* 1997; 4: 23-26.
- 93- Jung H, Hurtado M, Medina T, Sánchez M, Sotelo J. Dexamethasone increases plasma levels of albendazole. *J Neurol* 1990; 237: 279-280.
- 94- Horton R. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 97-102.
- 95- Archibald L, Beeching N, Gill G, Bailey J, Bell D. Albendazole is effective treatment for chronic strongyloidiasis. *Q J Med* 1993; 86: 191-195
- 96- Teggi A, Lastilla M, de Rosa F. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1679-1684.
- 97- Cossetto D, Gruenewald S, Antico V, Little J. Albendazole treatment of recurrent hydatid disease: serial evaluation with ultrasound. *Aust N Z J Surg* 1989; 59: 933-936.

- 98- El-Mufti M, Kawag A, Ibrahim H, Taktuk S, Swaisi I, Zaidan A, et al. Albendazole therapy of hydatid disease: 2-year follow-up of 40 cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87: 241-246.
- 99- Delatour P, Parish R, Gyurik R. Albendazole: A comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Ann Rech Vet* 1981; 12: 159-167.
- 100- Styles, JA. Cytotoxic effects of various pesticides *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Res* 1973; 21: 50
- 101- Leonard A. Mutagenicity tests with mebendazole in the mouse. *Mutation Res* 1974; 26: 427-430.
- 102- Delatour P, Parish R. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: Toxicity and evaluation of residues. *En Drug Residues in Animals*. Rico A (Ed) Academic Press, New York 1986, pp 175-204.
- 103- Davidse L, Flach W. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochem Biophys Acta* 1978; 543: 82-90.
- 104- Lacey E, Watson T. Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 1073-1077.
- 105- Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; 6: 112-115.
- 106- Mailhes J, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in mammalian oocytes. *Mutation Res* 1994; 320: 87-111.
- 107- Mailhes S, Aardema M. Benomyl-induced aneuploidy in mouse oocytes. *Mutagenesis* 1992; 7: 303-309.
- 108- Mailhes J, Young D, Aardema M, London S. Thiabendazole-induced cytogenetic abnormalities in mouse oocytes. *Env Mol Mutagen* 1997; 29: 367-371.
- 109- Prichard R. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol* 1973; 3: 409-417.
- 110- Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to

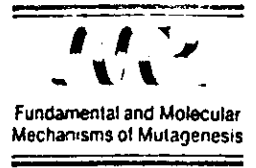
- benzimidazoles. *Int J Parasitol* 1988; 18: 885-936.
- 111- Watts D, Rapson E, Atkins A, Lee D. Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasiliensis* by benzimidazole anthelmintics. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3035-3040.
- 112- Lacey E, Brady R, Prichard R, Watson, T. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol* 1987; 23: 105-119.
- 113- Fetterer R. The effect of albendazole and triclabendazole on colchicine binding in the liver fluke *Fasciola hepatica*. *J Vet Pharmacol Ther* 1986; 9: 49-54.
- 114- Lubega G, Prichard R. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Exp Parasitol* 1991; 73: 203-213.
- 115- Jiménez A, De Armas C, Criado A, Casado N, Rodríguez F, Díez J. Preliminary characterization and interaction of tubulin from *Trichinella spiralis* larvae with benzimidazole derivatives. *Vet Parasitol* 1991; 39: 89-99.
- 116- Friedman P, Platzer E. Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. *Biochem Biophys Acta* 1980; 630: 271-278.
- 117- Roos M. The molecular nature of benzimidazole resistance in helminths. *Parasitol Today* 1990; 6: 125-127.
- 118- Lacleste J, Merchant M, Willms K, Cañedo L. Paracrystalline bundles in large tubules, induced *in vitro* by mebendazole in *Cysticercus cellulosae*. *Parasitology* 1981; 83: 513-518.
- 119- Forrester J, Bailar J, Esrey S, José M, Castillejos B, Ocampo G. Randomised trial of albendazole and pyrantel in symptomless trichuriasis in children. *Lancet* 1998; 352: 1103-1108.
- 120- Wegner D. Trial designs for multicentre clinical studies of investigational phases I B to III with praziquantel. *Arneimittelforschung* 1981; 31: 566-567.
- 121- Ishizaki T, Kamo E, Boehme K. Double-blind studies of tolerance to

praziquantel in Japanese patients with
Schistosoma japonicum infections. Bull
WHO 1979; 57: 787-791.

122- Pawlowski Z. Efficacy of low doses of
praziquantel in taeniasis. Acta Trop 1990; 48:
83-88.

ANEXO 2

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode

Luis A. Herrera ^a, Pilar Santiago ^b, Gloria Rojas ^c, Paz M. Salazar ^c, Patricia Tato ^d, José L. Molinari ^d, Dietmar Schiffmann ^e, Patricia Ostrosky-Wegman ^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, ^c Facultad de Medicina, ^d Instituto de Fisiología Celular, UNAM, P.O. Box 70228, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F., Mexico, ^b Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F., Mexico, ^e Institut für Toxikologie, Universität Würzburg, Germany

(Received 15 January 1993)

(Revision received 1 September 1993)

(Accepted 23 September 1993)

Abstract

In chronic helminthic infections such as cysticercosis, where the parasites live for years, profound modulation of the host immune response has been reported. To evaluate the genotoxicity of a drug used to treat cysticercosis, we observed the occurrence of genetic damage in cultured lymphocytes from cysticercotic swine and patients who had not been exposed to the drug. The human lymphocytes also showed a slower proliferation. These data suggested that the disease itself was promoting genetic damage in host lymphocytes which, in part, could explain the retardation of the lymphocyte proliferation observed in cysticercotic patients. Pigs infected with *Taenia solium* cysticerci showed an increased lymphocyte proliferation for 6-8 weeks post infection, followed by an impaired proliferation after this period. Significant induction of sister-chromatid exchanges was also observed in lymphocytes from infected pigs after the 6th week post infection. Additionally, it was found that a factor secreted by the cysticerci morphologically transformed primary fibroblasts in culture. The results strongly suggest that the parasite produces genetic instability in the host cells, which could result in immunosuppression and malignant transformation of target cells.

Key words: Parasite; Immunosuppression; Cancer; Cysticercosis

1. Introduction

The varied and unsuccessful immunological responses mounted by parasitized hosts frequently lead to immunopathological changes that correlate with the magnitude and duration of the in-

fection (Cox and Liew, 1992). Immunosuppression has been reported in several types of parasitic diseases, however, the reason for that change is still poorly understood.

Studies performed in pigs to analyze the genotoxic effect of praziquantel (PZQ), a drug widely used for treatment of cysticercosis, showed a higher number of polyploid lymphocytes in cysticercotic animals before treatment than in con-

* Corresponding author.

trois. After administration of PZQ for 15 days, a decrease in the number of polyploid cells to control levels was observed (Flisser et al., 1990). Measurements of mutations in the hypoxanthine-phosphoribosyl transferase (HPRT) locus, and lymphocyte proliferation kinetics (LPK) in neurocysticercotic patients, indicated an enhancement of HPRT mutations and LPK retardation in some patients. After 15 days of treatment with PZQ both parameters had returned to control values (Montero et al., 1993). These data suggested that the disease itself was promoting genetic damage in host lymphocytes which in part could explain the retardation of the LPK observed in neurocysticercotic patients.

In this paper we report on a longitudinal study designed to analyze the changes of the LPK and sister-chromatid exchange (SCE) frequency along with the development of cysticercosis in pigs. Although the full biological significance of SCE is unknown, the determination of the SCE frequency in peripheral whole blood lymphocyte cultures has been widely used for monitoring the exposure of humans and other mammals to agents which induce genetic damage (Kato, 1977; Latt et al., 1980; Gebhart, 1981). Furthermore, a soluble factor secreted by *Taenia solium* cysticerci, which depresses the incorporation of [³H]thymidine in mitogen-stimulated human lymphocytes, was tested for its carcinogenic potential in the Syrian hamster embryo cell transformation assay.

2. Materials and methods

2.1. Animals, inoculation and sampling scheme

Three York Landrace pigs from the same litter and age (2 months old) were inoculated orally with 1 ml isotonic NaCl solution containing 100,000 *T. solium* eggs. 5 ml whole peripheral blood was taken weekly for approximately 3 months, when cysticercosis has to have developed. A fourth non-inoculated animal, used as control, was venipunctured at the same time as the infected pigs. Heparinized blood samples were cultured for 48 h and harvested as described (Rojas et al., 1992). Metaphase preparations were

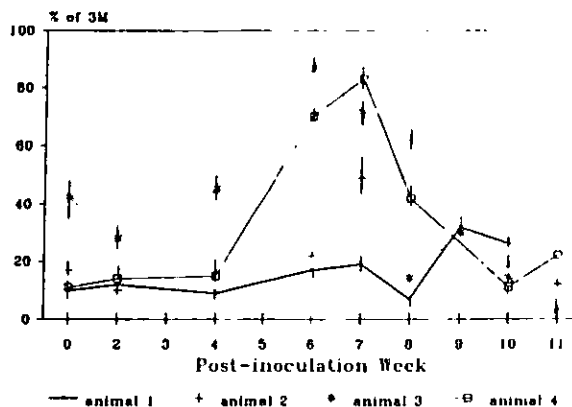


Fig. 1. Percentage of lymphocytes which divided three or more times (3M) in culture. Animal 1, control; animal 2, inoculated with *T. solium* eggs but non-cysticercotic; animals 3 and 4, developed cysticercosis upon inoculation with *Taenia* eggs. Bars at each point represent standard errors of two repeated cultures from the same pig.

stained with the fluorescence plus Giemsa technique (Perry and Wolff, 1974). Lymphocyte proliferation kinetics were evaluated in the first 100 metaphases determining the portions of cells which had divided once, twice and three or more times (3M) in culture according to the chromosome staining pattern (Perry and Wolff, 1974). The frequency of SCE per cell was scored in 25 cells which had divided twice in culture, according to the described criteria (Carrano et al., 1978). Student's *T*-test was performed for statistical analysis of pooled data from different, arbitrarily chosen, sampling intervals, chosen taking into account the inflexion points in Fig. 1, which we think may reflect major steps in the infection process.

2.2. Morphological transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by a cysticercus-secreted factor

500 target SHE cells were seeded onto a layer of 5×10^4 lethally irradiated (5000 R) homologous feeder cells in 10 cm diameter Petri dishes as previously reported (Stopper et al., 1992). After 24 h, two different batches of a cysticercus-secreted factor (CF 1 and 2) were rehydrated with culture medium, filtered and added to the

cells at a final concentration of 10 μg of ribose content per ml. The cells were incubated at 37°C in a humidified incubator with 12% CO₂ in air for 6 days. The medium was replaced by fresh culture medium and after 2 days the cells were fixed and stained as reported (Stopper et al., 1992). Samples were scored for cloning efficiency and morphological transformation according to the recommended criteria (Dunkel et al., 1991). It is important to point out that to determine that an agent transforms SHE cells, two transformed colonies have to be detected in at least one treated culture.

2.3. Isolation of a cysticercus-secreted factor

The studied cysticercus-secreted factor was isolated as reported (Molinari et al., 1990). Cysticerci dissected from meat of naturally parasitized pigs were washed and left to stand for 6 h in 500 ml of distilled deionized water (DDW) at room temperature. After centrifugation at 10,000 rpm for 15 min, the supernatant was lyophilized, resuspended in 5 ml of DDW and dialyzed in a Spectrapor 3 membrane (Spect. Med. Ind., USA, molecular weight cut-off 3500 Da) against 100 ml DDW at 4°C for 12 h. The material outside the bag was lyophilized and stored at 4°C until tested.

3. Results

An increase in the percentage of lymphocytes which had undergone three or more cell divisions (3M) after mitogenic stimulation in culture was observed from the 5th to 8th weeks in three swine after inoculation with *T. solium* eggs (Fig. 1). Between the 8th and 11th weeks post inoculation (PI), the proportion of 3M cells diminished in these animals. Antibodies against three cysticercus-antigenic fractions were detected only in two pigs (data not shown), which, after necropsy, were found to have developed cysticercosis. Interestingly, the lowest values of 3M at the 11th week PI with *T. solium* eggs were observed in the cysticercotic animals (Fig. 1 and Table 1, animals 3 and 4), while the proportion of 3M in the third inoculated swine, which showed antigenic response to

Table 1

Percentage of third division cells (3M) and sister-chromatid exchange (SCE) frequency in lymphocytes from cysticercotic and non-cysticercotic pigs

Animal	Interval ^a	3M \pm SE	SCE \pm SE
1 Control	1- 4	10.5 \pm 1.5	5.2 \pm 0.8
	5- 8	14.7 \pm 5.9	6.6 \pm 1.2
	9-10	30.0 \pm 4.7 **	5.9 \pm 1.6
2 Inoculated, non-infected	1- 6	12.2 \pm 6.5	6.9 \pm 1.0
	7- 8	55.5 \pm 8.6 **	8.8 \pm 0.5 **
	9-11	18.2 \pm 7.7	7.7 \pm 0.9
3 Inoculated, cysticercotic	1- 2	31.5 \pm 7.6	5.1 \pm 1.6
	4- 7	68.0 \pm 18.8 **	9.4 \pm 2.1 **
	8- 9	14.2 \pm 1.7 **	12.6 \pm 1.1 **
	10-11	3.0 \pm 1.4 **	13.6 \pm 1.4 **
4 Inoculated, cysticercotic	1- 4	13.4 \pm 2.4	8.8 \pm 1.1
	5- 8	63.3 \pm 17.8 **	13.6 \pm 1.6 **
	9-10	10.8 \pm 2.1 **	12.9 \pm 1.4 **
	11	2.5 \pm 0.7 **	11.6 \pm 0.9 *

The values are the mean of pooled data from different sampling weeks (1-11) or intervals.

^a Intervals were chosen on the basis of the inflexion points in the curves for each animal from Fig. 1, which probably reflect major changes in the infection process.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$ (Student's *t*-test) compared to the first sampling interval of each pig.

only one of the fractions tested (data not shown) and did not develop cysticercosis (Fig. 1 and Table 1, animal 2), returned to values observed previous to the infection. Some temporal variations of 3M lymphocytes were also observed in the non-infected control (Fig. 1, animal 1), however, they were not as pronounced as in the infected animals.

The frequencies of SCE varied as a function of time after inoculation (Fig. 2 and Table 1) and an increase in the number of SCE was observed only in the two animals that developed cysticercosis as the time after inoculation increased. No significant difference was detected between the frequencies of SCE of control and animal 2 (which was inoculated with *T. solium* eggs but did not develop cysticercosis). The values observed in these animals were within the reported range of 7.5 \pm 0.33 (McFee and Sherrill, 1979, 1983), and 6.86 \pm 0.39 (Larramendy and Reigosa, 1986; Bianchi et al., 1986); although the number of pigs used was small, the difference found in the ani-

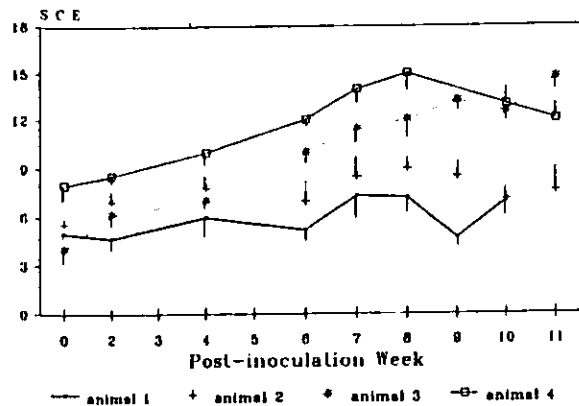


Fig. 2. Frequency of sister-chromatid exchanges (SCE) in peripheral blood lymphocytes. Animal 1, control; animal 2, inoculated with *T. solium* eggs, but non-cysticercotic; animals 3 and 4, developed cysticercosis upon inoculation with *Taenia solium* eggs.

imals which developed the illness compared to healthy animals is significant enough to consider this results important (Table 1).

3.1. Morphological transformation of SHE cells by a cysticercus-secreted factor

The results show that two different batches of the factor secreted by *T. solium* cysticerci morphologically transformed SHE fibroblasts in culture (Table 2). In both cases a total of approximately 1400 colonies was scored, the transformation frequencies (TF) were 0.28% and 0.33% for CF 1 and CF 2 respectively. 4-Nitroquinoline oxide (NQO, 10^{-8} M final concentration) was used as positive control since this compound is a

Table 2
Transformation frequency of Syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts induced by a *Taenia solium* cysticercus-secreted factor

Treatment	CE ^a (CEr ^b)	TF ^c (percentage)
Control	0.32 (1.00)	0/2442 (0.00)
NQO	0.40 (1.25)	2/2409 (0.10)
CF 1	0.36 (1.12)	4/1442 (0.28)
CF 2	0.33 (1.03)	5/1475 (0.33)

^a CE, total number of colonies/number of target cells.

^b CEr, CE (treated)/CE (control).

^c TF, number of transformed colonies/total number of colonies.

well-known carcinogen which induces transformation of SHE cells. The cell survival was not affected by any treatment as indicated by the cloning efficiency (CE).

4. Discussion

The reduction of the frequency of cells which had replicated three or more times in lymphocyte cultures from cysticercotic pigs observed 11 weeks after inoculation with *T. solium* eggs correlates with previous reports of immunosuppression induced by *T. solium* metacestodes in mice (Willms et al., 1980), pigs (Tato et al., 1987; Molinari et al., 1987) and humans (Flisser et al., 1980).

The reason for this depression in the immune response of cysticercotic animals remains unknown. However, one possibility could be the impaired response resulting from genetic damage occurring in the circulating host lymphocytes (Flisser et al., 1990).

Our results demonstrate a higher frequency of genetic damage (visualized as SCE) in lymphocytes from cysticercotic pigs after 11 weeks of inoculation than in cells from the control and even from the inoculated swine which did not develop cysticercosis. Moreover, the increase of SCE in the cysticercotic pigs is more evident as the frequency of cells which divided three or more times in culture decreases. Thus, the induction of genetic damage in circulating lymphocytes of infected animals correlates with a reduced capacity of these cells to divide after mitogenic stimulation.

How does cysticercus depress the immunological response of its host? One explanation could be the presence of factors secreted by the metacestode (Letonja et al., 1987). Molinari et al. (1990) have isolated a soluble factor secreted by *T. solium* cysticerci, and demonstrated that this factor can depress the uptake of [³H]thymidine in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Whether this factor is responsible for the immunosuppression observed in vivo, and also for the genetic damage presented in lymphocytes from infected animals, are questions which still remain unanswered.

Nevertheless, if this soluble factor is able to interact with lymphocytes producing genetic damage which results in an impaired immune response, it can also come into contact with other cells in host animals, and potentially be able to promote genetic damage and cellular dysfunction, such as malignant cell growth. In fact, gastrointestinal hyperplasia has been observed in rats infected with *Taenia taeniaeformis* (Blaies and Williams, 1983). Taking this into account, we have tested the carcinogenic potential of this factor in the SHE fibroblast transformation assay.

Since morphological transformation of SHE cells represents the first detectable change in a series of cellular alterations necessary for the neoplastic transformation of these cells (Barrett et al., 1985), our results suggest a carcinogenic potential for that factor. Further characterization of this soluble factor indicates that it has a molecular weight of less than 3500 Da, contains ribose, is sensitive to RNase digestion and is thermostable (Molinari et al., 1990). This suggests that the cysticercus-secreted factor may be an oligonucleotide of RNA. It is not surprising that an RNA molecule can transform SHE cells in culture since in vitro transformation and chromosome aberration formation in rodent cells by small RNA molecules has been previously reported (Hamada et al., 1989; Hamada and Mizuno, 1992).

These findings suggest a possible correlation between cysticercosis and cancer. The autopsy data in 18 cases of childhood neurocysticercosis taken from files of the National Institute of Pediatrics in Mexico City indicated that 22% of patients had developed leukemia or lymphoma. Interestingly, the disease in these patients was asymptomatic and associated with some kind of immunodeficiency (Ridaura, 1987). In a larger clinical and pathological study of 481 autopsy cases of cysticercosis performed at the Mexico City General Hospital, cysticercosis was found to be associated with malignant neoplasm in 20.9% of cases (Villagrán and Olvera, 1988).

Although more detailed epidemiological studies need to be carried out, the present data support a role for cysticercosis as a risk factor in neoplasia. Several explanations have been proposed for the association of some parasitic dis-

eases and cancer (Gentile, 1985). However, there is no direct evidence that a certain parasitic infection per se is carcinogenic (Gentile, 1985; Kramers et al., 1991). The precise role that the cysticercus-secreted factor(s) play in the pathogenesis of cancer in humans requires further analysis. However, it is possible that a predisposition for cancer development is mediated by chronic impairment of the immune response induced by the *T. solium* metacestode.

5. Acknowledgement

This work was partially supported by the GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Munich.

6. References

- Barrett, J., T. Hesterberg, M. Oshimura and T. Tsutsui (1985) Role of chemically induced mutagenic events in neoplastic transformation of Syrian hamster embryo cells, in: J. Barrett and R. Tennant (Eds.), *Carcinogenesis - A Comprehensive Survey*, 9. Mammalian Cell Transformation, Raven, New York, pp. 123–137.
- Bianchi, A.S., M.L. Tharramendy and N.O. Bianchi (1986) Mitomycin C-induced damage and repair in human and pig lymphocytes, *Mutation Res.*, 160, 27–32.
- Blaies, D.M., and J.F. Williams (1983) Gastrointestinal hyperplasia in chronically infected rats, *Exp. Parasitol.*, 55, 197–206.
- Carrano, A.V., L.H. Thompson, P.A. Lindl and J.L. Minkler (1978) Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis, *Nature*, 271, 551–553.
- Cox, F., and E. Liew (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections, *Parasitol. Today*, 8, 371–374.
- Dunkel, V., C. Rogers, S. Swierenga, R. Brillinger, J. Gilman and E. Nestmann (1991) Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: III. Cell transformation in C3H/10T1/2 mouse embryo cell, BALB/c3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures, *Mutation Res.*, 246, 285–300.
- Flisser, A., E. Woodhouse and C. Larraalde (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and nonresponders, *Clin. Exp. Immunol.*, 39, 27–37.
- Flisser, A., D. Gonzalez, A. Plancarte, P. Ostrosky, R. Montero, A. Stephano and D. Correa (1990) Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies, *Parasitol. Res.*, 76, 640–642.

- Gebhart, E. (1981) Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing, *Hum. Genet.*, 58, 235-254.
- Gentile, J.M. (1985) Schistosome related cancers: A possible role for genotoxins, *Environ. Mutagen.*, 7, 775-785.
- Hamada, K., and K. Mizuno (1992) Analysis of chromosome aberrations induced by US RNA, *Mutation Res.*, 267, 97-104.
- Hamada, K., T. Kumazaki, K. Mizuno and K. Yokoro (1989) A small nuclear RNA can transform cells in vitro, *Mol. Cell. Biol.*, 9, 4345-4356.
- Kato, H. (1977) Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BrdUdr-labeling method, *Int. Rev. Cytol.*, 45, 55-97.
- Kramers, P., J.M. Gentile, B. Gryseels, P. Jordan, N. Katz, K. Mott, J. Seed and H. Froberg (1991) Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology?, *Mutation Res.*, 257, 49-89.
- Larramendy, M.L., and M.A. Reigosa (1986) Variation in sister chromatid exchange frequencies between human and pig whole blood, plasma leukocyte, and mononuclear leukocyte cultures, *Environ. Mutagen.*, 8, 543-554.
- Latt, S.A., R.K. Schreck, K.S. Loveday, C.P. Daugherty and C.F. Shuler (1980) Sister chromatid exchanges, *Adv. Hum. Genet.*, 10, 267-331.
- Letonja, T., C. Hammerberg and G. Schurig (1987) Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*, *Parasitol. Res.*, 73, 265-270.
- McFee, A.F., and M.N. Sherrill (1979) Species variation in BrdUrd-induced sister-chromatid exchanges, *Mutation Res.*, 62, 131-138.
- McFee, A.F., and M.N. Sherrill (1983) Sister-chromatid exchanges induced in swine lymphocytes by chronic oral doses of dimethylbenzanthracene, *Mutation Res.*, 116, 349-359.
- Molinari, J.L., P. Tato and Y. Valles (1987) Helper T lymphocytes depressed by *Cysticercus cellulosae* in immunized and control hogs, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 29, 293-300.
- Molinari, J.L., P. Tato, O.A. Reynoso and J.M. León-Cázares (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 84, 205-208.
- Montero, R., M.E. Gonsebatt, L.A. Herrera, E. Rojas and P. Ostrosky (1993) The hprt short-term assay in monitoring individuals exposed to genotoxic agents, *Environ. Health Perspect.*, 103, in press.
- Perry, P., and S. Wolff (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatids, *Nature*, 251, 156-159.
- Ridaura, C. (1987) Host response in childhood neurocysticercosis. Some pathological aspects, *Child's Nerv. Syst.*, 3, 206-207.
- Rojas, E., R. Montero, L.A. Herrera, M. Sordo, M.E. Gonsebatt, R. Rodríguez and P. Ostrosky-Wegman (1992) Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?, *Mutation Res.*, 282, 283-286.
- Stopper, H., R. Pechman and D. Schiffmann (1992) 5-Azacytidine induces micronuclei in and morphological transformation of Syrian hamster embryo fibroblasts in the absence of unscheduled DNA synthesis, *Mutation Res.*, 283, 21-28.
- Tato, P., Y. Valles, and J.L. Molinari (1987) Effect of immunization in immunodepressed hogs naturally parasitized with *Cysticercus cellulosae*, *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 29, 67-71.
- Villagrán, J., and J.E. Olvera (1988) Cisticercosis humana, estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia, *Patología*, 26, 149-156.
- Willms, K., M. Merchant, L. Arcos, M. Sealey, S. Diaz and L. Diaz de León (1980) Immunopathology of cysticercosis, in: C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz and M. Seal (Eds.), *Molecules, Cells and Parasites in Immunology*, Academic Press, New York, pp. 145-162.



Analysis of the DNA Damage Induced by Praziquantel in V-79 Chinese Hamster Fibroblasts and Human Blood Cells Using the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay

Luis A. Herrera,¹ Mahara Valverde,¹ Patricia Ostrosky-Wegman,¹ Günther Speit² and Emilio Rojas del Castillo^{1*}

¹*Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico*

²*Department of Clinical Genetics, University of Ulm, Ulm, Germany*

The analysis of the genotoxicity of praziquantel, an effective antihelminthic widely used in countries where parasitic infections are still serious public health problems, has been extensively performed using diverse in vitro and in vivo assays and endpoints. However, results are not conclusive, since reports to date indicate either praziquantel is mutagenic, comutagenic, or even antimutagenic. In the present work, the clastogenic potential of praziquantel was investigated in V-79 Chinese hamster fibroblasts and human peripheral blood using a sensitive technique such as the single-cell electrophoresis assay. Results indicate that even though praziquantel induced DNA single-strand breaks both in V-79 cells and unstimulated human leukocytes, this effect was not translated into persistent DNA damage, since neither SCE nor HPRT mutations were induced. This suggests that the effect observed in the SCGE assay is an early event not closely related to praziquantel mutagenicity, because this DNA damage could be efficiently repaired. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen. 18:41-47, 1998.* © 1998 Wiley-Liss, Inc

Key words: praziquantel, clastogenicity, single-cell gel electrophoresis, SCE mutations, HPRT mutations

INTRODUCTION

Praziquantel (PZQ) is an isoquinoline derivative widely utilized in the treatment against most common human helminthic infections. In Mexico, PZQ repre-

Contract grant sponsor: BMBF, Germany.

*Correspondence to: Emilio Rojas del Castillo, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., P.O. Box 70228, Ciudad Universitaria, CP 04510 México.

sents one of the drugs of choice for the treatment of neurocysticercosis, a disease with grim repercussions in health and life quality of infected individuals. Its widespread use is due to its effectiveness and lack of severe immediate side effects [1,2], in fact, the World Health Organization does not restrict the massive utilization of PZQ in prevention programs for endemic areas. However, long-term effects such as mutagenesis and carcinogenesis can not be discarded, since the results of the studies performed to date are still controversial.

The mutagenic potential of PZQ has been studied in several systems both in vitro and in vivo using different endpoints to measure DNA damage (for review, see [3]). In general, no positive effects have been detected in gene mutations assays in bacteria, mammalian, and human cells [4–10]. Similarly, PZQ has no effects on the frequencies of sister chromatid exchanges (SCE) and structural chromosome aberrations [4,6,8], even at doses above the plasma concentrations found in treated patients. Some synergetic effects with other mutagenic compounds have been detected [10–13]; the permeation of the cell membrane by PZQ has been suggested as a possible explanation of those effects [12]. On the other hand, in studies with infected swine and human beings, the treatment with PZQ normalized the frequency of gene mutations, micronuclei, and the lymphocyte proliferation kinetics [4,12,14].

With respect to chronic exposure assays in rodents, PZQ does not increase the tumor rate; however, the results obtained cannot be taken as irrefutable, since either doses were higher than those used in human trials [15] or the basal tumor rates were elevated [16].

According to the antiparasitic mechanism of action of PZQ, this drug is capable of interacting with some cytoskeleton structures such as actin filaments [17], raising the possibility of errors of cell division as aneuploidy. In fact, in a study performed with Syrian hamster embryo cells, PZQ induced micronuclei formation, a high percentage of them containing whole chromosomes [18].

In this report we analyzed the effects of PZQ on the DNA of mammalian and human cells using the single-cell gel electrophoresis assay (SCGE). V-79 Chinese hamster fibroblasts were utilized, since it is possible to evaluate and compare different endpoints, such as SCE and gene mutations; besides, this cell line has been used in previous studies on PZQ genotoxicity [6–8,10].

MATERIAL AND METHODS

V-79 Cells for SCGE Assay

V-79 Chinese hamster fibroblasts (1.5×10^5) were seeded into Petri dishes with 5 ml MEM culture medium supplemented with 10% bovine fetal serum and antibiotics, and incubated in a CO₂ atmosphere at 37°C. After 24 h, cultures were treated with PZQ (dissolved in DMSO, 0.02 final concentrations) for 2 h, washed with Hank's solution, and trypsinized to obtain a cell suspension. Four independent experiments were performed.

V-79 Cells for SCE Assay

9.5×10^5 V-79 cells were plated in Petri dishes with 5ml MEM culture medium, bromodeoxyuridine (1.08×10^{-6} M final concentration), and antibiotics. They were incubated in a CO₂ atmosphere at 37°C. After 24 h, PZQ was added to cultures

and incubated 22 h further. Colcemid was added for 2 h and cells were harvested and chromosome preparations were made according to Speit in 1986 [19].

V-79 Cells for HPRT Assay

5×10^6 cells were treated in each experiment with S9 activation mix (for 2 h) and without S9 (for 24 h). S9 mix was prepared from S9 liver homogenate from Aroclor 1254-induced rats with an addition of cofactors. The treated cultures were transferred after a expression period of 7 days. 6-Thioguanine-resistant colonies were analyzed in 5 replicate Petri dishes with 2×10^5 cells each. Survival (relative plating efficiency) was determined by plating 200 cells into 4 replicate Petri dishes at the end of treatment (PE 1) and at the end of the expression period (PE 2).

Human Blood Cells

Leukocytes. Leukocytes were obtained by finger puncture. Twenty μ l of blood were mixed to 1 ml of RPMI-1640 medium in an eppendorf tube, treated with different concentrations of PZQ for 2 h. After centrifugation, the pellet was mixed with 75 μ l of low melting point agarose and put on a fully-frosted slide with a previous layer of normal agarose. Two independent experiments were performed using peripheral blood from 2 healthy donors (ages 23 and 28 years).

Lymphocytes cultures. 0.5 ml of heparinized blood was cultured in 6.3 ml of RPMI-1640 culture medium, stimulated with 0.2 ml of phytohaemagglutinin (Microlab, México). The culture time was 72 h and PZQ was added at 48 h at different concentrations. After treatment, cells were collected by centrifugation and placed in 75 μ l low melting point agarose. Two independent experiments were performed using peripheral blood from 2 healthy donors (ages 23 and 28 years).

SCGE assay. The SCGE was performed as described by Tice et al. [20]. Briefly, after lysis at 4°C for 1 h, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The DNA was allowed to unwind for 20 min in electrophoresis running buffer solution (300 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA, pH 13). Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. All technical steps were conducted using very dim, indirect light. After electrophoresis, the slides were gently removed and the alkaline pH was neutralized with 0.4 M Tris-HCL, pH 7.5. Ethidium bromide (75 μ l of a 20 mg/ml solution) was added to each slide and a coverglass was placed over the gel. DNA migration was analyzed with a fluorescence Nikon microscope (Filter G-2A), and measured with a scaled ocular as the total image length. For the evaluation of DNA migration, 25 cells were scored for each concentration. Viability was measured by trypan blue exclusion.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we analyzed the genotoxic effects of PZQ with the SCGE assay, a highly sensitive technique which detects at the pH tested DNA single-strand breaks and alkali-labile sites. We utilized a cell line used in several previous studies and in which no DNA damage has been detected with different experimental approaches (3, 6-8, 10).

An increment in DNA migration was observed in V79 cells (Fig.1). The effects in the SCGE assay was not very strong; however, it was dose-related and reproducible. To date, most of the experiments performed to determine whether PZQ is able

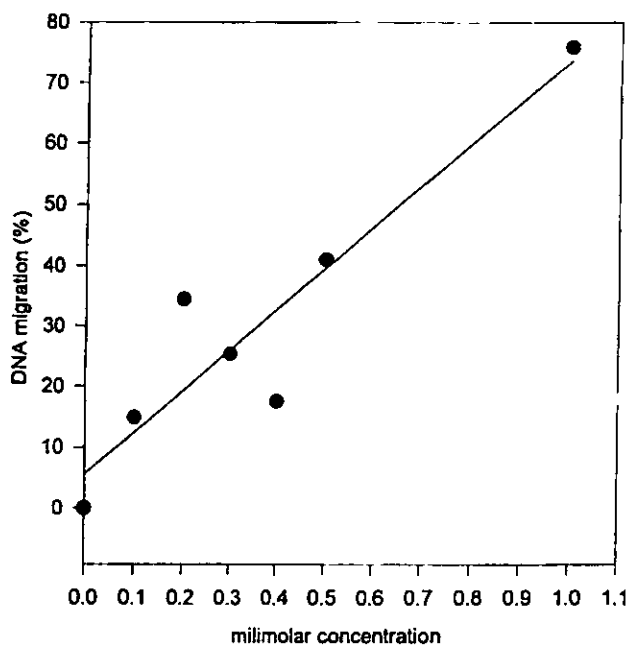


Fig. 1. Relative DNA migration from V-79 Chinese hamster treated with praziquantel and analyzed by the single cell gel electrophoresis assay.

to induce direct DNA damage have given negative results. In the same way, no DNA repair has been detected either in mammalian or human cells. Then, what is the meaning of a PZQ positive effect in the SCGE assay?

The biological relevance of this positive response is unclear, since the SCGE

TABLE Ia. Frequency of HPRT Mutant Colonies of V-79 Chinese Hamster Fibroblast Treated With Praziquantel (24 h) Without S9 Metabolic Activation Mix*

Treatment	PE 1 (%)	PE 2 (%)	Mutants/10 ⁶
Control	100	100	3
2.5 × 10 ⁻⁴ M	80	88	0
5.0 × 10 ⁻⁴ M	95	90	1
1.0 × 10 ⁻³ M	45	100	4
2.0 × 10 ⁻³ M	0	—	—

*PE 1. Cell viability (%) after treatment. PE 2. cell viability (%) after a 7-day expression period.

TABLE Ib. Frequency of HPRT Mutant Colonies of V-79 Chinese Hamster Fibroblast Treated With Praziquantel Plus S9 Metabolic Activation Mix (2h)

Treatment	PE 1 (%)	PE 2 (%)	Mutants/10 ⁶
Control	100	100	8
2.5 × 10 ⁻⁴ M	93	100	1
5.0 × 10 ⁻⁴ M	100	95	5
1.0 × 10 ⁻³ M	100	100	3
2.0 × 10 ⁻³ M	55	48	10

PE 1. Cell viability (%) after treatment; PE 2. Cell viability (%) after a 7-day expression period.

TABLE II. Frequency of Sister Chromatid Exchanges (SCE) in V-79 Chinese Hamster Fibroblast Treated With Praziquantel

Treatment	SCE/Cell	SE'
Control	3.98	1.02
DMSO	4.56	1.04
1.0×10^{-4} M	4.89	1.13
2.0×10^{-4} M	4.50	0.99
5.0×10^{-4} M	3.64	0.88

*SE. Standard error of 2 independent experiments.

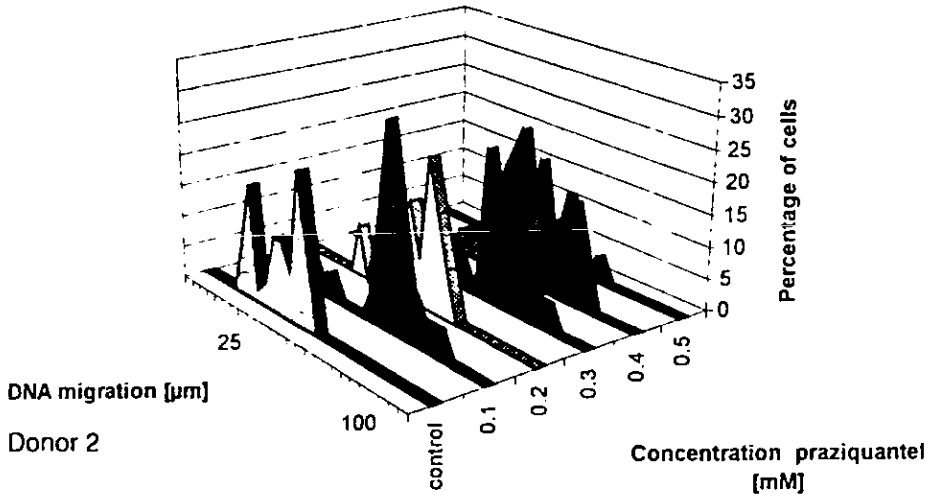
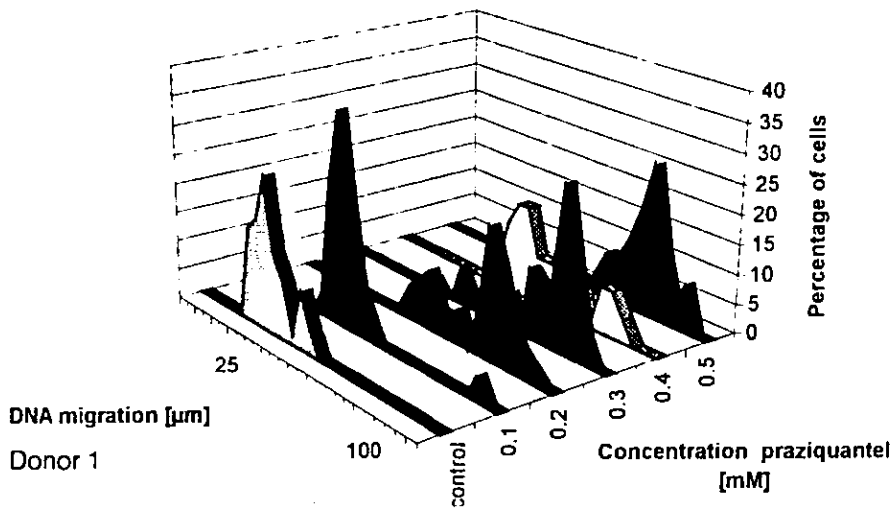


Fig. 2. Distribution of DNA migration from unstimulated human lymphocytes obtained from 2 donors, treated with praziquantel and analyzed by the single-cell gel electrophoresis assay.

TABLE III. DNA Migration in Human Lymphocytes Cultures Treated 24 h With Praziquantel*

Treatment	Donor 1	Donor 2	Viability
Control	34.8 ± 3.30	33.6 ± 3.47	100
DMSO	35.8 ± 2.50	38.4 ± 3.69	95
1.0 × 10 ⁻⁴ M	34.4 ± 2.08	43.9 ± 3.38	96
2.0 × 10 ⁻⁴ M	41.8 ± 4.10	30.9 ± 2.55	94
3.0 × 10 ⁻⁴ M	46.0 ± 6.80	49.9 ± 5.60	81
4.0 × 10 ⁻⁴ M	37.0 ± 4.40	46.6 ± 4.33	82

*Data in microns ± standard error of 2 different experiments.

assay detects early events of primary DNA damage, and the relationship of this DNA effect to mutagenesis is not yet understood. However, there are indications that some results in the SCGE are not closely related to mutagenesis because this DNA effect seems to be repaired rapidly and completely [21].

We investigated in more detail the mutagenic potential in the same cell line and found a clear negative response in the HPRT mutation assay, tested up to 2 mM concentration and treating cells in the absence of S9 mix for 24 h and in the presence of S9 mix for 2 h (Table I). None of these experiments gave a clear response of mutagenicity, and the same was true for the induction of sister chromatid exchanges (SCE). No induction of SCE was observed at all tested concentrations (Table II).

The effect of PZQ was also tested in human lymphocytes, both PHA-stimulated and unstimulated, using the SCGE assay. An increase in DNA migration was found in unstimulated lymphocytes; the response was small but reproducible (Fig. 2). On the other hand, no significant effects were detected when PZQ was added to stimulated lymphocytes, in spite of the fact that PZQ treatment was extended to 24 h (Table III).

Our results show that the effect observed in the SCGE assay is an early event that is not translated into a persistent DNA damage, since neither gene mutations nor SCE were induced, suggesting that this kind of event is not involved in the mutagenicity or genotoxicity of PZQ. Different responses have previously been observed in stimulated and unstimulated human lymphocytes in the SCGE assay [22]. A more efficient repair capacity of cycling cells or a different susceptibility of lymphocyte subpopulations may be involved in the observed differences. It should be mentioned that in a previous study on the induction of micronuclei in lymphocytes treated in vitro with PZQ, an increased micronuclei frequency was only observed in 2 of the 6 individuals evaluated, although it was not a dose-related effect [3].

Further investigations are being conducted to determine the repair kinetics of this early DNA damage, and also using other cell lines to exclude V79 sensitivity

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the BMBF, Germany. LAH and MV are recipients of a doctoral fellowship from CONACyT and DGAPA.

REFERENCES

1. Groll E: Praziquantel. *Adv Pharm Chem* 20:219-238, 1984.
2. Corona T, Lugo R, Medina R, Sotelo J: Single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *N Engl J Med* 334:125, 1996.

3. Montero R, Ostrosky-Wegman P: Genotoxic activity of praziquantel. *Mutation Res*, in press.
4. Montero R, Flisser A, Madrazo I, Cuevas C, Ostrosky-Wegman P: Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutation Res* 305:181-188, 1994.
5. Obermeier J, Froberg H: Mutagenicity studies with praziquantel, a new anthelmintic drug. Tissue-, host-, and urine-mediated mutagenicity assays. *Arch Toxicol* 38:149-161, 1977.
6. Bartsh H, Kuroki T, Malaveille C, Loprieno N, Barale R, Abbondandolo A, Bonatti S, Rainaldi G, Vogel E, Davis A: Absence of mutagenicity of praziquantel, a new, effective, antischistosomal drug, in bacteria yeast, insect and mammalian cells. *Mutation Res* 58:133-142, 1978.
7. Macherner L, Lorke D: Mutagenicity studies with praziquantel, a new anthelmintic drug, in mammalian systems. *Arch Toxicol* 39:187-197, 1978.
8. Bartsch H, Malaveille C, Camus A, Martel-Planche G, Brun G, Hauteville A, Sabadie N, Barbin A, Kuroki T, Drevon C, Piccoli C, Montesano R: Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. thymimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutation Res* 76:1-50, 1980.
9. Bianchi V, Nuzzo F, Abbondandolo A, Bonatti S, Capelli E, Fiorio R, Giulotto E, Mazzaccaro A, Stefanini M, Zaccaro L, Zantedeschi A, Levis A: Scintillometric determination of DNA repair in human cell lines. *Mutation Res* 93:447-463, 1982.
10. Billings P, Heidelberger C: Effects of praziquantel, a new antischistosomal drug, on the mutation and transformation of mammalian cells. *Cancer Res* 42:2692-2696, 1982.
11. Anwar W, AU W, Sadagopa V, Legator M: Enhancement of benzene clastogenicity by praziquantel in mice. *Mutation Res* 222:238-289, 1989.
12. Anwar W, Rosin M: Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. *Mutation Res* 298:179-185, 1993.
13. Batzinger R, Suh-Yuh L, Beuding E: Antimutagenic effects of 2(3)-tert-Butyl-4-hydroxyanisole and of antimicrobial agents. *Cancer Res* 38:4478-4485, 1978.
14. Flisser A, González D, Plancarte A, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Stephano A, Correa D: Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia Solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol Res* 76:640-642, 1990.
15. Shirai T, Joong K, Hakoi K, Thamavit W, Pairojkui C, Hoshiya T, Hasegawa R, Ito N: Promotion of hepatocarcinogenesis by praziquantel. *Jpn J Cancer Res* 82:1085-1088, 1991.
16. Ketkar M, Althoff J, Mohr U: A chronic study of praziquantel in Syrian golden hamsters and Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 24:345-350, 1982.
17. Bricker C, Deppenbush J, Bennet J, Thompson D: The relationship between tegumental disruption and muscle contraction in *Schistosoma mansoni* exposed to various compounds. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 69:61-71, 1983.
18. Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Rojas E, Gonsebatt M, Schiffmann D: Evaluation of the carcinogenic and genotoxic potential of praziquantel in the Syrian hamster embryo cell transformation assay. *Mutation Res* 305:175-180, 1994.
19. Speit G: The relationship between the induction of SCEs and mutations in Chinese hamster cells. Experiments with hydrogen peroxide and caffeine. *Mutation Res* 174:21-26, 1986.
20. Tice R, Strauss, GH, Peters W: High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer; preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res* 271:101-113, 1992.
21. Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P: Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutation Res* 359:77-84, 1996.
22. Anderson D, Yu T, Schmezer P: An investigation of the DNA-damaging ability of benzene and its metabolites in human lymphocytes, using the comet assay. *Env Mol Mutagen* 26:305-314, 1995.

ANEXO 4

Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients

Luis A. Herrera¹, Tzutzy Ramirez¹, Ulises Rodríguez², Tere Corona², Julio Sotelo², Marcelino Lorenzo³, Francisco Ramos³, Irmgard Verdorfer¹, Erich Gebhart¹ and Patricia Ostrosky-Wegman¹ ¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F., México; ²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud, México, D.F., México; ³Unidad de Neurología, Hospital General de México, México, D.F., México; ⁴Institut für Humangenetik der Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

Abstract

Helminths, particularly some *Schistosoma* species, have been associated with cancer in humans. Neurocysticercosis, produced by cysticerci of the helminth *Taenia solium*, has been associated with the emergence of brain tumours and haematological malignancies. Local tumours, such as glioblastoma, could be explained by the induction of DNA damage in cells surrounding the cysticercus and chronically exposed to an inflammatory host response. However, systemic effects such as haematological malignancies are not easy to understand. The present work was conducted in Mexico to find out whether DNA damage arises in peripheral lymphocytes in patients with neurocysticercosis. We utilized a highly sensitive technique to analyse chromosomal aberrations, in-situ hybridization with probes against chromosomes 1, 2 and 4, and in addition the blocked-cytokinesis technique was used to determine the formation of micronuclei, a peculiar form of DNA damage. The study was made in lymphocytes from 8 patients before and after the administration of praziquantel, 1 of the 2 drugs used for neurocysticercosis treatment. The frequencies of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes were higher in the infected patients as compared to those observed both in healthy donors and in the group of patients after praziquantel therapy. Our results suggest that chromosome aberrations induced in peripheral cells during neurocysticercosis could be associated with the development of haematological neoplasias.

Keywords: neurocysticercosis, *Taenia solium*, cancer, chromosome aberrations, Mexico

Introduction

Several infectious agents such as viruses, bacteria, and helminths have been implicated in the development of human cancer (IARC, 1994). Among helminths, *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, and *Opisthorchis viverrini* are associated with malignant neoplasms in urinary bladder, liver, and bile ducts (IARC, 1994). Neurocysticercosis (NCC), a frequent parasitic disease of the nervous system, is caused by cysticerci of the helminth *Taenia solium*; NCC has recently been associated with local malignant tumours, particularly glioblastoma multiforme (DEL BRUTTO *et al.*, 1997).

Studies to determine the possible mechanisms leading to carcinogenesis by *Schistosoma* have demonstrated a high frequency of DNA damage in urothelial cells near the infection site (ANWAR & ROSIN, 1993; ROSIN *et al.*, 1994). The local chronic inflammatory response, a feature frequently observed in helminthiasis, has been postulated as a mechanism to explain carcinogenesis by parasites (ISHII *et al.*, 1994; OHSHIMA & BARTSCH, 1994), by inducing either direct DNA damage, an altered metabolism to xenobiotics or an impaired proliferation of cells surrounding the parasite (GENTILE & GENTILE, 1994).

Our studies with NCC, however, suggest that, apart from the local effects produced by parasites, some systemic alterations also due to cysticerci could be found in cells from infected individuals. In fact, an epidemiological study has associated NCC with the emergence of neoplasias outside the nervous system, e.g., malignant haematological diseases (HERRERA *et al.*, 1999). In that study, 1271 autopsy files of a general hospital in Mexico City were reviewed. Files were separated into 2 groups: the cases group which included patients whose autopsies revealed any malignant neoplasia, and a control group consisting of all patients with no histopathological indication of cancer. NCC was more frequent in cases with malignant haematological diseases than in controls.

The odds ratio for this association was 3.5 with 95% confidence interval 1.2–9.8.

In the present work we determined whether active NCC (those cases where the cysticercus is alive) is directly involved in the production of chromosomal damage in peripheral lymphocytes. We measured the frequency of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from patients with active NCC before and after the administration of praziquantel (PZQ). In addition, we determined the lymphocyte proliferation kinetics (LPKs) since there are some indications that helminthiasis may also cause impairment of cell proliferation in the host (GENTILE & GENTILE, 1994).

In addition, since the genotoxicity of PZQ itself has been questioned and not totally discarded (for review see MONTERO & OSTROSKY, 1997), we evaluated the effects of PZQ on the frequency of micronuclei and on cell proliferation when added to cultured human lymphocytes at doses similar to plasma levels of PZQ observed in patients during treatment.

Material and Methods

In-vivo study

The study included 8 patients with NCC, 5 women and 3 men. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía in Mexico. All individuals were informed about the objectives of the present study and written consent was obtained before their incorporation in the trial. Median age was 37.5 years (range: 20–78). Only those patients without previous cestocidal treatment were selected. The treatment regimen with PZQ was decided according to the localization of cysticerci: 75 mg/kg in a single-day therapeutic schedule (CORONA *et al.*, 1996) for those patients presenting cysticerci within the brain parenchyma, and 50 mg/kg daily for 15 days for those patients with subarachnoid cysticerci (SOTELO & JUNG, 1998). Blood samples were obtained by venepuncture before and 1 week after PZQ therapy.

Blood samples from 11 uninfected healthy individuals, 5 women and 6 men, were used as controls. Median age was 29 years (range: 20–48). These individuals were asymptomatic and a computed tomography of the brain

Address for correspondence: Luis A. Herrera, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, UNAM, P. O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, 04510, México D.F., México; phone +525 622 38 46, fax +525 622 33 65, e-mail metil@hotmail.com

was used to discard the presence of any silent infection with cysticerci.

Chromosome aberrations were analysed using the chromosome in-situ suppression hybridization technique (CISS). CISS is an easy technique which can detect chromosome aberrations by allowing visualization of colour changes as shown in Figure 1 (LUCAS *et al.*, 1989; CREMER *et al.*, 1990); several laboratories have demonstrated that chromosome painting is a valid method of quantifying chromosome aberrations (NATARAJAN *et al.*, 1992; TUCKER *et al.*, 1993, 1995; ELLARD *et al.*, 1995). Whole blood (1 mL) was cultured in 9 mL of RPMI culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, and stimulated with phytohaemagglutinin (0.4 mL) during 48 h at 37°C. After 20 min of an 0.075 M KCl hypotonic treatment, cells were fixed with methanol:acetic acid (3:1), and chromosome preparations were made by the standard air-drying procedure. The slides were kept in 70% ethanol at -20°C before further use for in-situ hybridization. Specific labelling of the 3 selected chromosomes was performed with a cocktail containing DNA probes for chromosomes 1 (red), 2 (green) and 4 (yellow) as shown in Figure 1. Chromosome aberrations were analysed by a fluorescence microscope, determining the frequency of chromosome and chromatid breaks, as well as balanced and unbalanced translocations in at least 500 mitoses per individual (NEUBAUER *et al.*, 1996).

For the micronuclei assay, 0.5 mL of whole blood was cultured in 6 mL RPMI medium and stimulated with phytohaemagglutinin (0.2 mL) during 72 h. Cytochalasin-B (3 µg/mL) was added 28 h before harvesting. Cells were gently fixed with methanol:acetic acid (3:1) and dropped on to clean slides (FENECH & MORLEY, 1985). Slides were stained with methylene blue plus eosin (Wright's colorant), and the frequency of micronuclei was estimated in at least 1000 binucleated cells per donor.

The LPKs were measured in whole blood lymphocytes (0.5 mL) cultured in 6 mL RPMI containing bromodeoxyuridine (32 µM), and stimulated with phytohaemagglutinin during 72 h. Demecolcine was added to the cultures for the last 2 h and, after 30 min of a hypotonic treatment (KCl 0.075 M), cells were fixed with methanol:acetic acid (3:1). The cells were dropped on to slides and stained by the fluorescence plus Giemsa technique to differentiate sister chromatids (PERRY & WOLFF, 1974). The LPKs were determined in 100 consecutive metaphases as the frequency of cells which performed 1 (M1 cells), 2 or 3 and more mitotic divisions.

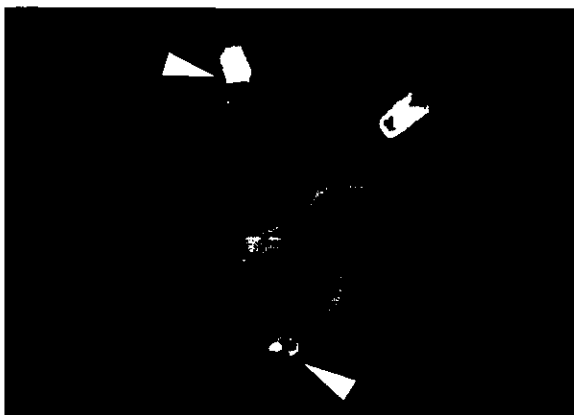


Fig. 1. Three-colour (red, chromosome 1; green, chromosome 2; yellow, chromosome 4) chromosome in-situ suppression hybridization of a lymphocyte metaphase showing a balanced translocation (arrows), which accounts for 2 breaks.

In-vitro analysis

In 3 independent experiments whole blood samples from 1 healthy donor were used to determine the frequency of micronuclei induced *in vitro* by PZQ. The PZQ doses utilized were within the range found in the plasma from patients with NCC: 10^{-7} – 10^{-6} M. Blood (0.5 mL) was cultured in 6 mL RPMI and stimulated with 0.2 mL phytohaemagglutinin during 72 h. Twenty-eight hours before harvesting, cytochalasin-B was added (3 µL/mL), and 4 h later cells were treated with PZQ dissolved in dimethylsulphoxide (0.001 v/v final solvent concentration). Cells were gently fixed with chilled methanol:acetic acid (3:1) and dropped on to slides. After 24 h, slides were stained with Wright's colorant. One thousand binucleated cells were analysed for the presence of micronuclei.

The LPKs were measured in whole blood (0.5 mL) cultured in 6 mL RPMI containing bromodeoxyuridine (32 µM), and stimulated with phytohaemagglutinin during 72 h. Treatment with PZQ was carried out during the last 24 h of culture. Harvesting and staining procedures were carried out as mentioned above. LPKs were determined in 100 metaphases as the frequency of cells which performed 1 (M1 cells), 2 or 3 and more mitotic divisions.

Statistical analysis

The frequencies of chromosomal aberrations, micronuclei and M1 cells of the infected individuals, both before and after treatment with PZQ, were compared to those of the control group with a Mann-Whitney test. The Wilcoxon test for paired samples was utilized to compare results observed in the group of patients with NCC before and after treatment with PZQ. Two-tailed *P* values of <0.05 were considered significant. An ANOVA was used for results from the study *in vitro*. *P* values <0.05 were considered as significant.

Results

In-vivo study

Total frequency of breaks (Fig. 2a) represents the sum of all breaking events observed as chromosome and chromatid breaks (1 break per aberration), or balanced and unbalanced translocations (2 breaks per aberration). A higher frequency of breaks was observed in NCC patients before PZQ treatment, median 8.75, range 3–17.5, when compared to the frequency obtained in healthy volunteers, median 2, range 0–5.2 (*P* = 0.02). Although after the administration of PZQ the total frequency of breaks in cells from NCC patients was higher, median 3.8, range 0–9, than in cells from control individuals, the difference was not significant (*P* = 0.4).

The quantification of binucleated cells containing micronuclei (Fig. 2b) revealed a significant difference between the frequency of damage detected in the group of patients before treatment, median 46, range 18–100, and in healthy donors, median 20, range 15–24 (*P* = 0.01). After treatment with PZQ, the occurrence of micronucleated cells returned to normal values, median 20.5, range 13–28; therefore, it was significantly different from that in patients before PZQ therapy (*P* = 0.03). A similar circumstance was observed in the analysis of LPKs (Fig. 2c). The percentage of M1 cells after 72 h of culture was higher in samples from patients prior to PZQ administration than the percentage obtained both in healthy donors (*P* = 0.008) and in patients after PZQ administration (*P* = 0.04).

In-vitro analysis

The mean frequency of micronucleated cells of 3 independent experiments using different concentrations of PZQ is shown in Figure 3a. Although there is an increase in the frequency of binucleated cells with micronuclei, at the higher concentration, the difference was statistically not significant, even at doses as high as 10^{-4} M (*P* = 0.65). With respect to LPKs, no change was

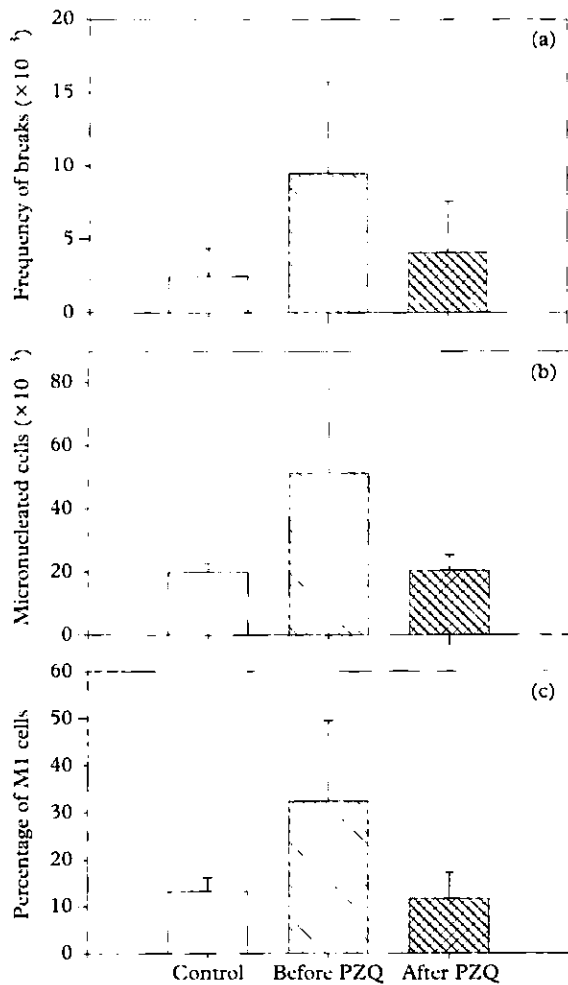


Fig. 2. Total frequency of breaks (a), micronucleated (b) and M1 cells (c) in lymphocytes from patients with neurocysticercosis before and after the administration of praziquantel (PZQ). The control group includes healthy volunteers who were not treated with PZQ. See the text for details of the treatment and methodology. The bars represent SD.

observed in the frequencies of M1 cells at different concentrations of PZQ tested ($P = 0.39$; Fig. 3b).

Discussion

Neurocysticercosis is the most frequent parasitic disease to affect the central nervous system. It is endemic in many parts of the world, particularly in Latin America, Africa, and Asia (FLISSER, 1994). It is also frequent in developed countries with high rates of immigration from endemic areas. NCC, as well as other helminthiasis, has been associated with the development of neoplasms in tissues surrounding the parasite (DEL BRUTTO *et al.*, 1997), and with the generation of malignancies outside the central nervous system (HERRERA *et al.*, 1999). The latter was an event anticipated by us in a previous study since lymphocytes from pigs infected with *T. solium* cysticerci presented a higher frequency of DNA damage as compared to lymphocytes from uninfected animals (HERRERA *et al.*, 1994). In the present study, we analysed the induction of chromosomal damage in peripheral lymphocytes of patients with NCC before and after the administration of PZQ, 1 of the 2 drugs indicated in the chemotherapy against NCC. To discard any genotoxic effect by PZQ itself, we determined the frequency of genetic damage induced by PZQ in cultured lymphocytes from a healthy donor at concentrations that

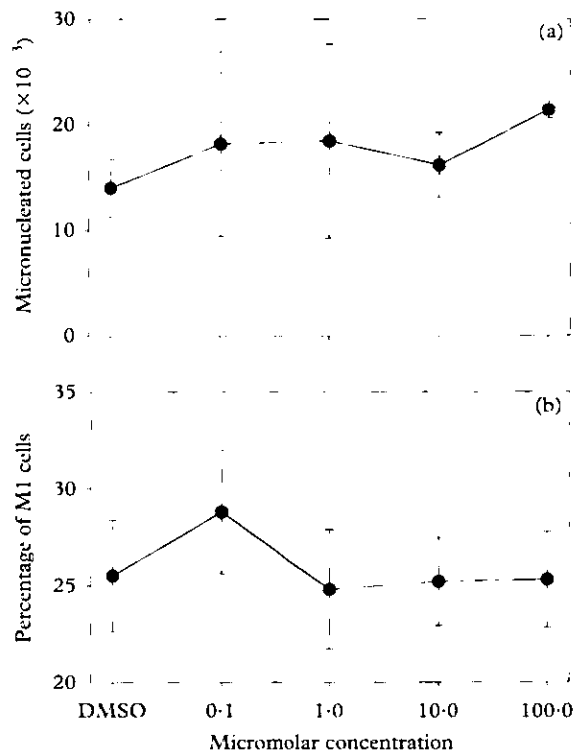


Fig. 3. Frequency of micronucleated (a) and M1 (b) cells from lymphocyte cultures treated with praziquantel. DMSO, dimethylsulphoxide. See the text for details of the methodology. The bars represent SD.

resemble PZQ plasma levels in patients with NCC (10^{-6} – 10^{-7} M; SOTELO & JUNG, 1998).

Results indicated that the rate of cells with DNA damage observed in patients with NCC, revealed either as micronuclei or chromosome aberrations, did not increase after the administration of PZQ, regardless of the therapeutic scheme. Moreover, both frequencies of damage were lower among patients after the treatment than before. Similarly, the response of lymphocytes to mitogen stimulation was slower in the cells from patients before treatment. The frequency of genotoxic damage found in the group of patients before therapy was significantly higher than that observed in healthy donors. The frequencies of micronuclei and chromosome aberrations in infected patients without treatment were significantly higher than those obtained in healthy volunteers.

The effects of addition of PZQ to cultures of lymphocytes from a healthy donor also suggest that PZQ lacks genotoxicity, and PZQ did not modify the LPK. We have reported that PZQ has no effect on the rate of hypoxanthine phosphoribosyl transferase mutations, and sister chromatid exchanges in mammalian cells, although it induced an increase in the proportion of cells with single-strand DNA damage (HERRERA *et al.*, 1998). These results suggest that PZQ is not genotoxic at the usual therapeutic doses, and point out the necessity of exploration on the potential mechanisms of parasites as inducers of genotoxic damage.

Some biological conditions frequently present during cysticercosis that could be responsible for the observed DNA damage and which could increase the risk for malignant neoplasms are shown in Figure 4. The inflammatory response present in chronic infections has been previously analysed as a possible cancer risk factor (OHSHIMA & BARTSCH, 1994). Chronic inflammation is present in most NCC patients (ESCOBAR, 1983);

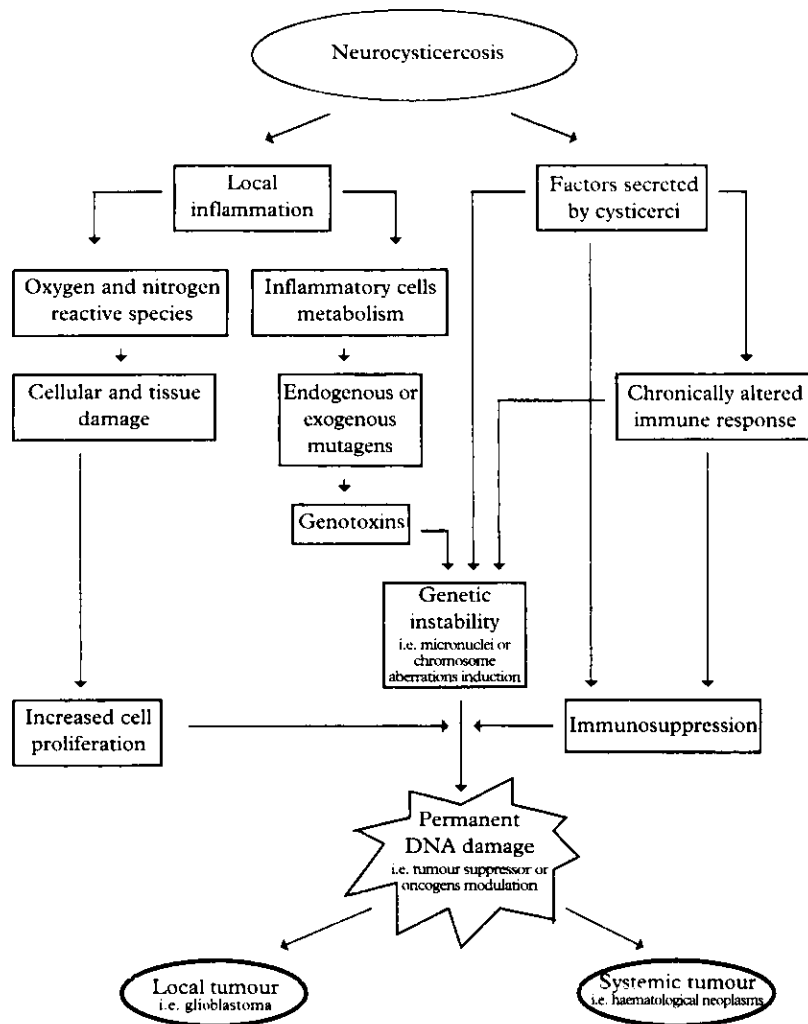


Fig. 4. Possible mechanisms by which neurocysticercosis could induce DNA damage and cancer development both locally and systemically.

inflammatory cells produce reactive oxygen and nitrogen species capable of causing significant damage to normal cells in tissues surrounding the site of parasitic infection, and this event could lead to genetic instability (OHSHIMA & BARTSCH, 1994). However, local accumulation of inflammatory cells could assimilate nearby mutagens, metabolize them, and release genotoxic agents that can cause damage in surrounding tissues (GENTILE & GENTILE, 1994). A cell proliferative process induced to repair the tissue and the cellular damage produced by the inflammatory response may result in an increased frequency of mutations (ROSIN *et al.*, 1994); some of these mutations could then lead either to oncogene activation or to the inactivation of suppressor genes thus increasing the risk for tumour formation.

Local inflammation might not be the only mechanism by which cysticerci could increase the risk for cancer development. NCC has also been associated with alterations in the immune response. In fact, it has been reported that *Taenia* cysticerci secrete several factors that can interact with host cells impairing the immune response (for a review see WHITE *et al.*, 1992). When these alterations are chronic, as is the case with NCC patients, they could ultimately generate either a systemic immunosuppression or a set of immune cells with genetic instability and chromosome aberrations. Epidemiological studies have found an indicative association between chromosome instability in lymphocytes and the

risk for lymphatic and haematopoietic malignancies (BONASSI *et al.*, 1995; HAGMAR *et al.*, 1998). Our results have shown that NCC patients present a higher frequency of chromosome damage in peripheral lymphocytes before treatment, suggesting an unstable status of their DNA which may cause a future development of diseases with a genetic component such as cancer.

Moreover, results from previous studies indicated that a factor isolated from in-vitro secretions of *T. solium* cysticerci cause morphological transformation of SHE cells (HERRERA *et al.*, 1994); recently we have found that this small RNA molecule induces micronuclei in human cultured lymphocytes at doses similar to, or even lower than, those able to transform SHE cells, indicating that DNA damage in host cells could be directly induced by molecules secreted by cysticerci.

Acknowledgements

We are grateful for the useful comments from Dr Ana Flisser and Dr Romeo González. L. A. H. is a doctoral fellow of the Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

References

- Anwar, W. & Rosin, M. (1993). Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. *Mutation Research*, **298**, 179–185.
- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prá, L., de Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C.,

- Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D. & Puntoni, R. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **79**, 133-135.
- Corona, T., Lugo, R., Medina, R. & Sotelo, J. (1996). Single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *New England Journal of Medicine*, **334**, 125.
- Cremer, T., Popp, S., Emmerich, P., Lichter, P. & Cremer, C. (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression *in situ* hybridization. *Cytometry*, **11**, 110-118.
- Del Brutto, O., Castillo, P., Mena, I. & Freire, A. (1997). Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Archives of Neurology*, **54**, 1125-1128.
- Ellard, S., Parry, M. & Parry, J. (1995). Use of multicolor chromosome painting to identify chromosomal rearrangements in human lymphocytes exposed to bleomycin: a comparison with conventional cytogenetic analysis of Giemsa-stained chromosomes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **26**, 44-54.
- Escobar, A. (1983). The pathology of neurocysticercosis. In: *Cysticercosis of the Central Nervous System*, Palacios, E., Rodriguez, J. & Taveras, J. (editors). Springfield, IL: Thomas, pp. 27-54.
- Fenech, M. & Morley, A. (1985). Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research*, **148**, 29-36.
- Flisser, A. (1991). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Progress in Clinical Parasitology*, **4**, 77-116.
- Gentile, J. & Gentile, G. (1994). Implications for the involvement of the immune system in parasite-associated cancers. *Mutation Research*, **305**, 315-320.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brogger, A., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C. & the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Research*, **58**, 4117-4121.
- Herrera, L. A., Santiago, P., Rojas, G., Salazar, P., Tato, P., Molinari, J., Schiffmann, D. & Ostrosky-Wegman, P. (1994). Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation Research*, **305**, 223-228.
- Herrera, L. A., Valverde, M., Ostrosky-Wegman, P., Speit, G. & Rojas, E. (1998). Analysis of the DNA damage induced by praziquantel in V-79 Chinese hamster fibroblasts and human blood cells using the single-cell gel electrophoresis assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **18**, 41-47.
- Herrera, L. A., Benita, A., Sotelo, J., Chávez, L., Olvera, J., Rascón, A., López, M. & Ostrosky-Wegman, P. (1999). Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. *Archives of Medical Research*, **30**, 154-158.
- IARC (1994). *Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*. IARC, Lyon: International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, no. 61.
- Ishii, A., Matsuoka, H., Aji, T., Ohta, N., Arimoto, S., Wataya, Y. & Hayatsu, H. (1994). Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutation Research*, **305**, 273-281.
- Lucas, J., Tenjin, T., Straume, T., Pinkel, D., Moore, D., Litt, M. & Gray, J. (1989). Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization. *International Journal of Radiation Biology*, **56**, 35-44.
- Montero, R. & Ostrosky, P. (1997). Genotoxic activity of praziquantel. *Mutation Research*, **387**, 123-139.
- Natarajan, A., Vyas, R., Darroudi, F. & Vermeulen, S. (1992). Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *International Journal of Radiation Biology*, **61**, 199-203.
- Neubauer, S., Gebhart, E., Schmitt, G., Birkenhake, S. & Dunst, J. (1996). Is chromosome *in situ* suppression (CISS) hybridisation suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients? *International Journal of Oncology*, **8**, 707-712.
- Ohshima, H. & Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research*, **305**, 253-264.
- Perry, P. & Wolff, S. (1974). New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, **251**, 156-158.
- Rosin, M., Saad El Din Zaki, S., Ward, A. & Anwar, W. (1994). Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutation Research*, **305**, 283-292.
- Sotelo, J. & Jung, H. (1998). Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics*, **34**, 503-515.
- Tucker, J., Ramsey, M., Lee, D. & Minkler, J. (1993). Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *International Journal of Radiation Biology*, **64**, 27-37.
- Tucker, J., Lee, D. & Moore, D. (1995). Validation of chromosome painting II: a detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Mutagenesis*, **9**, 151-156.
- White, C., Tato, P. & Molinari, J. (1992). Host parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infectious Agents and Disease*, **1**, 185-193.

Received 10 May 1999; revised 8 September 1999; accepted for publication 9 September 1999

Correction

G. Snounou *et al.* Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions*, **93**, 369-374. In Table 1, the primers 'M1-KF' and 'M1-KR' should both be referred to as 'K1 family-specific - Nest 2' in the 'Notes' column, whereas the primers 'M1-MF' and 'M1-MR' should both be referred to as 'MAD20 family-specific - Nest 2' in the 'Notes' column.

All the amplification reactions performed to amplify polymorphic regions of *msp1*, *msp2* and *glurp*, were performed in the presence of 1 mM MgCl₂.

Hyaluronate levels and markers of oxidative stress in the serum of Sudanese subjects at risk of infection with *Schistosoma mansoni*

Marion Pascal¹, Ould M. S. Abdallahi¹, Nasr-Eldin M. A. Elwali^{1,2}, Adil Mergani², Mohamed-Ali Qurashi¹, Mubarak Magzoub², Max de Reggi¹ and Bouchra Gharib¹ ¹INSERM U399, Université Méditerranée, Marseille, France; ²University of Gezira, Wad Madani, Sudan; ³Al Zaeim Al Azhari University, Omdurman, Sudan

Abstract

We showed previously that infection by *Schistosoma mansoni* not only triggers the production of reactive oxygen species in mouse liver but also leads to the alteration of antioxidant defences. To determine whether such events occur in humans, we measured the serum markers of oxidative stress, i.e., lipid peroxides and protein carbonyl, as well as hyaluronate levels in subjects in the Managil area of the Sudan. Grades of fibrosis were determined by ultrasonographic examination. Two groups were used as controls, one Sudanese and the other European. We found that Sudanese subjects in the endemic area differed from the control groups, both Sudanese and European, insofar as they had higher levels of the serum metabolites measured. The latter increased with the grade of fibrosis. Moreover, protein carbonyl and hyaluronic acid levels correlated positively with lipid peroxide levels. These findings indicate that oxidative stress might contribute to *S. mansoni*-associated pathology in man. The serum markers considered in our study, obtained by relatively simple techniques, may provide a useful biochemical index for the identification of almost asymptomatic patients who, however, are at risk of developing severe schistosomiasis.

Keywords: schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, oxidative stress, free radicals, malondialdehyde, protein carbonyl, hyaluronic acid, fibrosis, Sudan

Introduction

The tropical trematode *Schistosoma mansoni* settles in the mesenteric veins and some of its eggs migrate to the liver, inducing a delayed hypersensitivity response. Morbidity and mortality are due to a unique form of liver fibrosis ('pipestem' Symmers' periportal fibrosis) followed by portal hypertension as the main complication. An important aspect of schistosomiasis is that, in individuals having frequent contact with cercaria-infected waters, the intensity of the disease depends in large part on genetic factors: 60% of the population are resistant, 5% are susceptible and 35% show an intermediate level of resistance (ABEI *et al.*, 1991; MARQUET *et al.*, 1996). Resistant individuals may still develop fibrosis, however at a low rate.

The pathological mechanisms involved are not well understood. Using a murine model of the disease, we showed earlier that the parasite induces oxidative stress due to production of reactive oxygen intermediates in the liver (ABDALLAHI *et al.*, 1999) and to a decrease of the antioxidant defences in the organ (GHARIB *et al.*, 1999). The ultimate result is the killing of the parasite eggs; however, the event is potentially harmful for the host. The production of reactive oxygen intermediates may also initiate a fibrogenesis cascade in the liver (CASINI *et al.*, 1997; HOUGLOUM *et al.*, 1997; POLI & PAROLA, 1997), with a possible increase of serum hyaluronic acid, a glycosaminoglycan of the liver extracellular matrix (MCGARY *et al.*, 1989). An extensive study of a variety of liver diseases led to the consensus that serum hyaluronate is a meaningful marker in the diagnosis of hepatic fibrosis (OBERTI *et al.*, 1997). However, little is known regarding Symmers' fibrosis which is unique in several aspects.

Therefore, the aim of this pilot study was to evaluate, in a population at risk of infection, the circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis as non-surgical indicators of *S. mansoni*-associated disease. We determined serum levels of hyaluronic acid (HA), lipid peroxides (MDA) and protein carbonyl content (PCC). The study was performed on patients from a Sudanese village in the Managil irrigated area (Gezira province), a region endemic for schistosomiasis (OMER *et al.*, 1976). The data were compared with those on liver fibrosis obtained by ultrasonography.

Two other populations were studied as controls. One was in Wad Madani, a city outside the irrigated region; the other consisted of healthy French individuals. We found that subjects in the endemic area had higher serum concentrations of the 3 markers studied, as compared to both control groups. Moreover, in the endemic area only, PCC and HA levels correlated positively with lipid peroxide levels. Correlations with grade of fibrosis will be discussed with particular attention to patients suffering from mild fibrosis.

Materials and Methods

Subjects

Endemic area, Sudan. Thirty-five adults (20 men, 15 women) aged 18–50 years (mean: 34 years) were studied. The degree of fibrosis of the liver was documented by ultrasound imaging of periportal fibrosis, according to the classification described previously (DOEHRING-SCHWERDTFEGER *et al.*, 1989; DESSEIN *et al.*, 1999). Nineteen individuals had mild fibrosis (grades 0/I and I); the remainder were classified as having grades 0 ($n = 8$) or grades II and II/III ($n = 8$). Faecal egg counts were assessed as described elsewhere (ABEI *et al.*, 1991).

Controls. Sudanese control volunteers lived about 150 km east of the selected village; they had access to uncontaminated water and therefore usually had no contact with *S. mansoni*. There were 11 men and 16 women, aged 21–44 years (mean: 31 years). European control subjects comprised 10 men and 24 women aged 26–45 years. In both control groups, blood collection was part of a routine medical survey. All individuals had normal laboratory findings, and had no clinical evidence of schistosomiasis, malaria or hepatitis.

Subjects gave informed consent for this work. In the Sudanese village, consent was given by the village authorities. Blood samples (10 mL) were drawn from an antecubital vein directly into EDTA tubes. The blood was quickly centrifuged to separate the serum, which was stored at -80°C until processing. Patients in the village received appropriate medical care, when needed.

Methods

Carbonyl assay. The serum carbonyl concentration was determined using a colorimetric assay, after reacting the serum with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (LEVINE *et al.*, 1990). The serum was diluted 1:5 and proteins were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) and then collected by centrifugation for 3 min at 20 000 g. A solution of 10-mM DNPH in 2N HCl was added to the protein pellets of

Address for correspondence: Mrs Bouchra Gharib, INSERM U399, 27 Blvd Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France; phone +33 491 324 454, fax +33 491 796 063, e-mail bouchra.gharib@medecine.univ-mrs.fr

ANEXO 5

**EFFECTOS *IN VITRO* DEL ALBENDAZOL Y SUS METABOLITOS EN LA
CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN Y FRECUENCIA DE CÉLULAS
MICRONUCLEADAS EN LINFOCITOS DE HUMANO**

Introducción

El albendazol (ABZ) es uno de los fármacos utilizados en el tratamiento de la neurocisticercosis (Escobedo et al, 1987; Sotelo et al, 1988; Corral et al. 1996; Proano et al. 1997; Puri and Grover, 1998). Debido a su efectividad, baja toxicidad aguda y costo accesible, el ABZ también se utiliza ampliamente en programas de desparasitación en varios países en desarrollo, incluyendo México (Mascie et al, 1999; Nokes et al. 1999). En nuestro país se decidió aprovechar la infraestructura de las campañas de vacunación, y a partir de 1993 se administra, a todos los menores de edad, una sola dosis de 400 mg de ABZ junto con las vacunas correspondientes y una dosis de vitamina A. Estas semanas nacionales de salud se realizan 2, 3 e inclusive 4 veces al año (tabla 1).

Los datos toxicológicos muestran que el ABZ provoca limitados efectos secundarios a corto plazo (Cossetto et al, 1989; Horton, 1989; Archibald et al. 1993; El-Mufti et al. 1993; Teggi et al, 1993). Sin embargo, sus efectos adversos a largo plazo han sido poco estudiados. Se sugiere que el mecanismo de acción parasiticida del ABZ, al igual que otros benzimidazoles, está relacionado con su capacidad para provocar alteraciones en la polimerización de la tubulina (Davidse and Flach. 1978; Lacey and Watson, 1985; Lacey, 1990), el cual también puede estar involucrado en la modificación de la proliferación celular, así como en la pérdida del material genético en células de eucariontes (Mailhes and Aardema, 1992; Mailhes and Marchetti, 1994; Mailhes et al. 1997). Este mecanismo también puede ser responsable de algunos de los efectos tóxicos que se presentan en los individuos tratados, como alopecia, leucopenia, vómito y detención del crecimiento corporal (Horton, 1989; Forrester et al, 1998). El efecto aneugénico inducido por el ABZ en

células de eucariontes cultivadas no se ha evaluado en seres humanos. Las repercusiones que podría tener la generación de aneuploidía en humanos son severas. Si la pérdida de material genético ocurre en células somáticas ocasiona enfermedades como el cáncer, mientras que en células germinales puede dar origen a defectos congénitos (Pihan and Doxsey, 1999). Debido a que los pacientes con neurocisticercosis son tratados con ABZ durante períodos de una semana a un mes (Alarcón et al, 1989; Sotelo et al, 1990), y que la genotoxicidad de este compuesto no ha sido descartada en humanos, en este trabajo evaluamos los efectos genotóxicos *in vitro* del ABZ y sus metabolitos, el sulfóxido (SOABZ) y la sulfona de ABZ (SO₂ABZ), así como sus posibles efectos sobre la cinética de la proliferación de linfocitos de humano tratados a concentraciones similares a las encontradas en el plasma de pacientes con neurocisticercosis.

Los objetivos particulares del trabajo fueron:

- 1.- Determinar la posible interacción entre el ABZ o sus metabolitos con el solvente DMSO, mediante resonancia magnética nuclear (RMN).
- 2.- Determinar las posibles alteraciones provocadas por el ABZ y sus metabolitos sobre el ciclo celular, evaluando el índice mitótico y la cinética de proliferación en linfocitos cultivados.
- 3.- Determinar el efecto del ABZ, SOABZ y la SO₂ABZ sobre la frecuencia de células con micronúcleos en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

La hipótesis del estudio fue:

El ABZ interfiere con la polimerización de la tubulina durante la formación de los microtúbulos, por lo que los linfocitos tratados *in vitro* con diferentes dosis de ABZ o sus metabolitos, presentarán alteraciones en la cinética de proliferación celular, así como un incremento en la frecuencia de células micronucleadas.

Material y métodos

1.1 Evaluación de la posible interacción ABZ / SOABZ - DMSO.

Debido a que el ABZ y sus metabolitos son insolubles en agua, para poder administrarlos a los cultivos se disolvieron en DMSO, por lo que fue necesario evaluar si este solvente interaccionaba con el ABZ o con alguno de sus metabolitos formando un compuesto capaz de producir efectos sobre los parámetros a evaluar. Para descartar esta posibilidad, se realizaron pruebas de RMN, una para el ABZ-DMSO y la otra para SOABZ-DMSO. La RMN se realizó en colaboración con el laboratorio de Química Inorgánica del Dr. Raymundo Cea en el Instituto de Química de la UNAM. Se disolvieron 100 mg de la sustancia en DMSO deuterado, las muestras se colocaron dentro del aparato en capilares especiales para RMN. Se obtuvieron los espectros de cada solución y se analizaron mediante un sistema computarizado.

1.2 Donadores

Se obtuvieron muestras de sangre de dos varones sanos (edad promedio: 30 años), que no estuvieran tomando ningún tipo de medicamento por lo menos 15 días previos a la toma de la muestra, así como que no hubieran estado enfermos durante la semana anterior al

muestreo. Cada evaluación se realizó 2 veces por donador en experimentos independientes.

1.3 Evaluación del efecto del ABZ y sus metabolitos sobre la cinética de proliferación linfocitaria.

Se sembraron 0.5 ml de sangre entera en tubos de 15 ml (Falcon, EUA), a los que se adicionaron 6 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, EUA) suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, EUA) y glutamina (Sigma, EUA). Se agregaron 0.2 ml de fitohemaglutinina (PHA) (Gibco, EUA) y 0.3 ml de bromodesoxiuridina (concentración final: 32 μ M) en ausencia de luz. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h. Después de este período, los cultivos se trataron con ABZ, SOABZ o SO₂ABZ. Las dosis utilizadas fueron: 0.1, 1, 10 y 100 μ M, las dos primeras son similares a las concentraciones de SOABZ encontradas en el suero de pacientes con neurocisticercosis tratados con ABZ (Jung et al, 1992; Sánchez et al, 1993; Jung et al, 1997). Decidimos utilizar estas dosis debido a que el ABZ se metaboliza rápidamente a SOABZ, siendo este el metabolito que posee el efecto terapéutico (Gottschall and Wang, 1990). Como testigo negativo se adicionaron 7 μ l de DMSO, los cuales correspondieron al volumen empleado de solvente. Las células se incubaron a 37° C, durante 22 h mas y se adicionó Colcemid (0.2 μ g/ml; Gibco, EUA), para detener la polimerización de los microtúbulos y poder evaluar el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC). Dos h después. los cultivos se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, se extrajo el sobrenadante y se añadieron 5 ml de una solución hipotónica de KCl (0.075 M). los cultivos se incubaron durante 30 min. y al finalizar este tiempo se centrifugaron y se extrajeron 4 ml de sobrenadante. para fijar el resto de cada tubo en una solución de metanol y ácido acético (3:1). Nuevamente se

centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, y se continuó con los lavados en la solución fijadora hasta obtener un botón celular limpio. Una vez obtenido el botón celular limpio, este se resuspendió en 0.3 ml de fijador, se goteó sobre una laminilla bañada en etanol al 70%, y se secó a la flama. Después de 24 h se tiñeron las laminillas de acuerdo con el método diferencial de fluorescencia y Giemsa (Perry and Wolff, 1974). Para evaluar el IM se determinó el número de células en metafase en un total de 2000 células. Mientras que la CPC se analizó en 100 metafases consecutivas, entre las cuales se diferenció a las células que se habían dividido una (M1), dos y tres o más veces.

1.4 Evaluación del efecto sobre la frecuencia de MN.

Se sembraron 0.5 ml de sangre entera en tubos de 15 ml (Falcon, EUA), a los que se adicionaron 6.3 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, EUA) suplementado con 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco, EUA) y glutamina (Sigma, EUA). Se agregaron 0.2 ml de PHA. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h, después de las cuales las células se trataron con ABZ, SOABZ o SO₂ABZ. Las dosis utilizadas fueron 0.1, 1, 10 y 100 µM. Al igual que en los cultivos para IM-CPC se utilizó DMSO como testigo negativo. Después de dar el tratamiento, se agregó citocalasina-B (concentración final: 6 µg/ml; Sigma, EUA) para inhibir la citocinesis, la suspensión celular se homogeneizó y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h (Fenech and Morley, 1985). A las 24 h de tratamiento los cultivos se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, se extrajo el sobrenadante y se fijaron en una solución de metanol y ácido acético en proporción 3:1. Nuevamente se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min, para realizar los lavados en la solución fijadora hasta obtener un botón celular limpio. Después de obtener el botón celular

limpio, este se resuspendió en 0.3 ml de fijador y se goteó cuidadosamente, para evitar romper las membranas celulares, en laminillas frías bañadas en agua y se dejaron secar al aire. Finalmente las laminillas se tiñeron con colorante de Wright, y se evaluaron al microscopio. Para realizar la evaluación de la frecuencia de células con micronúcleos se analizaron 1000 células binucleadas, que son aquellas que se dividieron sólo una vez en cultivo, de las cuales se identificaron las que tenían micronúcleos según los criterios recomendados (Surrallés and Natarajan, 1997).

1.5 Análisis estadístico.

En análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA. Se consideró como estadísticamente significativo cualquier valor de p igual o menor de 0.05.

Resultados

Los análisis de RMN indicaron que ni el ABZ ni el SOABZ interaccionan con el DMSO, por lo que los datos que a continuación se describen pueden considerarse resultado del efecto de las sustancias evaluadas (histogramas 1 y 2). Debido al alto costo de la RMN, a los resultados negativos con ABZ y SOABZ, así como a las características químicas de la SO₂ABZ que permiten predecir que esta molécula, al igual que las otras dos, no interacciona con el solvente empleado, no se realizó RMN de este último metabolito disuelto en DMSO.

Efecto sobre el IM y la CPC.

El ABZ indujo un incremento significativo en el número de células en metafase a partir de la dosis 1 µM (tabla 2, gráfica 1). De manera similar, este compuesto aumentó el número

de células que solo se dividieron una vez en cultivo (células M1) desde la dosis 1 μM (tabla 3, gráfica 2). En los cultivos tratados con SOABZ se observó un incremento en el IM estadísticamente significativo a partir de la dosis 10 μM (tabla 2, gráfica 1), mientras que la frecuencia de células M1 sólo se incrementó con la dosis 100 μM (tabla 3, gráfica 2). El metabolito inactivo (SO₂ABZ) no produjo ningún efecto en el IM, encontrándose un ligero incremento en la frecuencia de células M1 a la concentración 100 μM (tablas 2 y 3, gráficas 1 y 2).

Efecto sobre la frecuencia de células micronucleadas.

El ABZ incrementó significativamente la frecuencia células con micronúcleos a partir de la dosis 10 μM (tabla 4, gráfica 3), mientras que al evaluar el daño inducido por el SOABZ, no se encontró un efecto como el inducido por el ABZ. En este caso se observó un ligero aumento, estadísticamente significativo sólo a la dosis más alta, 100 μM (tabla 4, gráfica 3). El metabolito inactivo (SO₂ABZ) no produjo ningún efecto significativo.

Discusión

El incremento en el IM, así como la acumulación de células que solo se dividieron una vez en los cultivos tratados con ABZ y SOABZ, sugieren la detención del ciclo celular en metafase. Estos efectos producidos sobre la cinética de proliferación celular concuerdan con lo que se ha reportado en otros estudios *in vitro* en sistemas animales no humanos, en los que también se ha visto la detención de la proliferación celular en metafase por ABZ y otros benzimidazoles (Lubega and Prichart, 1991). Este efecto está relacionado con el mecanismo

de acción parasitocida del ABZ, ya que se ha visto que la segregación cromosómica depende de la formación del huso mitótico constituido básicamente por microtúbulos. Se sabe que benzimidazoles, como el nocodazol, que interfieren con los microtúbulos detienen la proliferación celular (Li and Benezra, 1996). De igual forma, la inhibición de la polimerización de los microtúbulos nos ayudaría a entender las diferencias observadas en los efectos provocados por el ABZ y el SOABZ, ya que el SOABZ tiene una menor afinidad por los dímeros de tubulina que el ABZ, por lo que su eficacia para detener el ciclo celular mediante la interacción SOABZ-tubulina es menor que la esperada para el ABZ (Lacey, 1988; Lubega and Prichard, 1991).

El o los mecanismos por los cuales la inhibición de la polimerización de los microtúbulos promueve(n) la detención del ciclo celular son aún poco claros. Una posibilidad es la activación de mecanismos mediante los cuales se verifique la alineación de todos los cinetocoros en la placa metafásica, para que pueda iniciarse la segregación durante la anafase. Esta verificación se realiza mediante la proteína del gen *hsMAD2*, localizada en los cinetocoros que están fuera de la placa metafásica (Li and Benezra, 1996; Gorbsky, 1997), la cual es reconocida como una señal de error en el alineamiento cromosómico, desencadenando una cascada de eventos que inhiben la progresión del ciclo celular hacia anafase, y deteniendo temporalmente el ciclo hasta que todos los cromosomas se encuentren alineados correctamente (Fang et al. 1998).

En cuanto al daño genotóxico inducido tanto por el ABZ como por su metabolito activo, nuevamente el ABZ mostró mayor eficacia para producir células con micronúcleos. Considerando los reportes que se tienen *in vitro* acerca de otros benzimidazoles (Seiler,

1976; Banduhn and Obe, 1985; Georgieva et al, 1990), es muy probable que los micronúcleos producidos por ambas sustancias también sean resultado de su interacción con los dímeros de tubulina, y del rezago en la segregación de algunos cromosomas. El ABZ o su metabolito pueden inhibir la polimerización de los microtúbulos después de que los cromosomas se hallan alineado en la placa metafásica, provocando un retraso en la segregación cromosómica. Este retraso no puede ser detectado como un error por los mecanismos de verificación de la alineación de la placa metafásica por lo que podría dar origen a una mala segregación del material genético y a la formación de células micronucleadas. No obstante, no se pueden descartar eventos clastogénicos, por lo que es necesario aplicar metodologías que nos permitan discernir entre los micronúcleos formados por cromosomas completos y aquellos que sólo contienen fragmentos cromosómicos. Por ejemplo, la identificación de cinetocoros mediante anticuerpos, o de centrómeros y telómeros con sondas cromosómicas específicas (Lynch and Parry, 1993; Kirsch-Volders et al, 1997). Sólo así podríamos afirmar que el efecto inducido por estas sustancias se debe a la pérdida cromosómica causada por la interferencia con la formación del huso mitótico.

Aunque la formación de micronúcleos con cromosomas completos puede resultar en la generación de células aneuploides, con repercusiones severas tanto en el individuo como en su descendencia, es importante resaltar que las dosis a las cuales se observó el incremento en la frecuencia de células micronucleadas son dos órdenes de magnitud más elevadas que las encontradas normalmente en el plasma de los pacientes a los cuales se les administra el ABZ (Jung et al, 1992; Sánchez et al, 1993; Jung et al, 1997). De tal forma que el daño observado *in vitro* podría no tener significado biológico ya que estas dosis se

alcanzarían muy raramente *in vivo*, a menos que se tratara de individuos con daño hepático. en los cuales las concentraciones séricas de ABZ y SOABZ se incrementan (El-Mufti et al. 1993). También es importante considerar que las sustancias que alteran la formación del huso mitótico provocan eventos de no disyunción más frecuentemente que la pérdida de cromosomas completos incluso a dosis más bajas a las cuales se induce aneuploidía (Zijno et al, 1996; Aardena et al, 1998), por lo que es necesario evaluar este tipo de daño. La no disyunción puede ser determinada en los núcleos interfásicos de las células binucleadas mediante el uso de sondas centroméricas específicas.

La utilidad del ABZ como un medicamento antiparasitario es incuestionable. sobretodo si consideramos que las helmintosis continúan siendo una causa importante de morbi-mortalidad en países en desarrollo (Horton, 1990; Crompton, 1999). Nuestros datos mostraron que a las concentraciones reportadas en el suero de pacientes tratados con varias dosis de ABZ, este compuesto y sus principales metabolitos no provocaron alteraciones en la cinética de proliferación celular ni en la formación de células micronucleadas. No obstante, es importante evaluar otros eventos, como la no disyunción de cromosomas, que ocurren con mayor frecuencia que el daño determinado en este estudio. Cabe señalar que muchos de los efectos a largo plazo dependen en gran medida de la susceptibilidad individual, y del grado de exposición, el cual a su vez está influenciado por la farmacocinética del medicamento en cada individuo, de tal forma que es necesario realizar la evaluación de estos efectos *in vivo*.

Referencias

- Aadema M, Albertini S, Arni P, Henderson L, Kirsch-Volders M, Mackay J, Sarrif A, Stringer D, Taalman R. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Res.* 1998; 410: 3-79.
- Alarcón F, Escalante L, Dueñas G, Montalvo M, Román M. Neurocysticercosis: short course of treatment with albendazole. *Arch Neurol* 1989; 46: 1231-1236.
- Archibald L, Beeching N, Gill G, Bailey J, Bell D. Albendazole is effective treatment for chronic strongyloidiasis. *Q J Med* 1993; 86: 191-195.
- Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of metil 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. *Mutat Res*, 1985; 156: 199-218.
- Corral I, Quereda C, Moreno A, López R, Martínez J, Guerrero A, Sotelo J. Intramedullary cysticercosis cured with drug treatment. A case report. *Spine* 1996; 21: 2284-2287.
- Cossetto D, Gruenewald S, Antico V, Little J. Albendazole treatment of recurrent hydatid disease: serial evaluation with ultrasound. *Aust N Z J Surg* 1989; 59: 933-936.
- Crompton D. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol.* 1999; 85: 397-403.
- Davidse L, Flach W. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochem Biophys Acta* 1978; 543: 82-90.

- El-Mufti M, Kawag A, Ibrahim H, Taktuk S, Swaisi I, Zaidan A, et al. Albendazole therapy of hydatid disease: 2-year follow-up of 40 cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87: 241-246.
- Escobedo E, Penagos P, Rodríguez J, Sotelo J. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Intern Med* 1987; 147: 738-741.
- Fang G, Yu H, Kirschner M. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Dev*, 1998; 12: 1871-1883.
- Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*. 1985; 148: 29-36.
- Forrester J, Bailar J, Esrey S, José M, Castillejos B, Ocampo G. Randomised trial of albendazole and pyrantel in symptomless trichuriasis in children. *Lancet*, 1998; 352: 1103-1108.
- Georgieva V, Vachkova R, Tzoneva M, Kappas A. Genotoxic activity of benomyl in different test systems. *Env Mol Mutagen*, 1990; 16: 32-36.
- Gorbsky G. Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *BioEssays*, 1997; 19: 193-197.
- Gottschall D, Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Today* 1990; 6: 115-124.
- Horton R. Chemotherapy of *Echinococcus* infection in man with albendazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 97-102.
- Horton R. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol Today* 1990; 6: 106.

- Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina M, Sotelo J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J Clin Pharmacol* 1992; 32: 28-31.
- Jung H, Sánchez M, González A, Martínez J, Suástegui R, González D. Clinical pharmacokinetics of albendazole in children with neurocysticercosis. *Am J Ther* 1997; 4: 23-26.
- Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The in vitro micronucleous test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, 1997; 392: 19-30.
- Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*. 1988; 18: 885-936.
- Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; 6: 112-115.
- Lacey E, Watson T. Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 1073-1077.
- Li Y, Benzra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*, 1996, 274: 246-248.
- Lubega G, Prichard R. Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Exp Parasitol* 1991; 73: 203-213.
- Lynch A, Parry J. The cytochalasin-B micronucleous/kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneuploids. *Mutat Res*, 1993; 287: 71-86.

- Mascie G, Alam M, Montanari R, Karim R, Ahmed T, Karim E, Akhtar S. A study of the cost effectiveness of selective health interventions for the control of intestinal parasites in rural Bangladesh. *J Parasitol* 1999; 85: 6-11.
- Mailhes J, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in mammalian oocytes. *Mutation Res* 1994; 320: 87-111.
- Mailhes S, Aardema M. Benomyl-induced aneuploidy in mouse oocytes. *Mutagenesis* 1992; 7: 303-309.
- Mailhes J, Young D, Aardema M, London S. Thiabendazole-induced cytogenetic abnormalities in mouse oocytes. *Env Mol Mutagen* 1997; 29: 367-371.
- Nokes C, McGarvey S, Shiue L, Wu G, Wu H, Bundy D, Olds G. Evidence for an improvement in cognitive function following treatment of *Schistosoma japonicum* infection in Chinese primary schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 556-565.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, 1974; 251: 156-158.
- Pihan G, Doxsey S. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Sem Cancer Biol*, 1999; 9: 289-302.
- Proano J, Madrazo I, Garcia L, Garcia E, Correa D. Albendazole and praziquantel treatment in neurocysticercosis of the fourth ventricle. *J Neurosurg* 1997; 87: 29-33
- Puri P, Grover A. Medical management of orbital myocysticercosis: a pilot study. *Eye* 1998; 12: 795-799.

- Sánchez M, Suástegui D, González D, Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: 77-82.
- Seiler J. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the Chinese hamster. *Mutat Res*, 1976; 40: 339-348.
- Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis: a controlled trial. *Arch Neurol* 1988; 45: 532-534.
- Sotelo J, Del Brutto O, Penagos P, Escobedo F, Torres B, Rodríguez J, Rubio F. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 1990; 237: 69-72.
- Surrallés J, Natarajan A. Human lymphocytes micronucleous assay in Europe. An international survey. *Mutat Res*, 1997; 392: 165-174.
- Teggi A, Lastilla M, de Rosa F. Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1679-1684.
- Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Crebelli R. Analysis of chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent damage resulting from low dose exposure to spindle poisons. *Mutagenesis*. 1996; 11: 335-340.

Tabla 1.- Número de dosis de ABZ administradas en las semanas nacionales de vacunación de 1993 a 1998.

Año	Fecha	Meta	Logro	%
1993	18- 22 octubre	8,000, 000	9. 714, 042	121.43
1994	21-26 febrero	9, 991, 830	9, 240, 562	92.48
	25 junio l julio	12, 031, 873	11.339, 972	94.25
	17 -21 octubre	11, 641, 577	11, 408, 223	98.00
1995	25 feb- 3marzo	11, 459, 130	11, 313, 364	98.73
	24 -30 junio	14, 421, 874	12, 751, 258	88.42
1996	25-31 mayo	11, 195, 232	11, 719, 603	104.68
	21-25 octubre	11, 696, 636	11, 814, 092	101.00
1997	24-30 mayo	11, 978, 283	11.679, 088	97.50
	27-31 octubre	11, 936, 753	11, 767, 417	98.58
1998	23-29 mayo	13, 111, 932	13. 117. 759	100.04

Tabla 2- Efecto del ABZ y sus metabolitos en el IM de linfocitos cultivados de humano tratados durante 24 h. Media de dos experimentos por donador.

CONCENTRACION (μ M)	ABZ	DE	SOABZ	DE	SO ₂ ABZ	DE
DMSO	35	9	33	9	22	6
0.1	26	7	35	11	23	5
1.0	79 *	11	38	8	21	6
10	78 *	19	51 ***	3	23	6
100	74 *	15	86 **	6	34	1

* $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.01$

Tabla 3- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células M1 de linfocitos cultivados de humano tratados durante 24 h. Media de dos experimentos por donador.

CONCENTRACIÓN (μ M)	ABZ	DE	SOABZ	DE	SO ₂ ABZ	DE
DMSO	27	6	15	7	13	3
0.1	37	8	23	2	14	4
1.0	54 **	11	18	2	16	1
10	62 **	9	25	3	19	3
100	63 **	8	56***	7	26 *	3

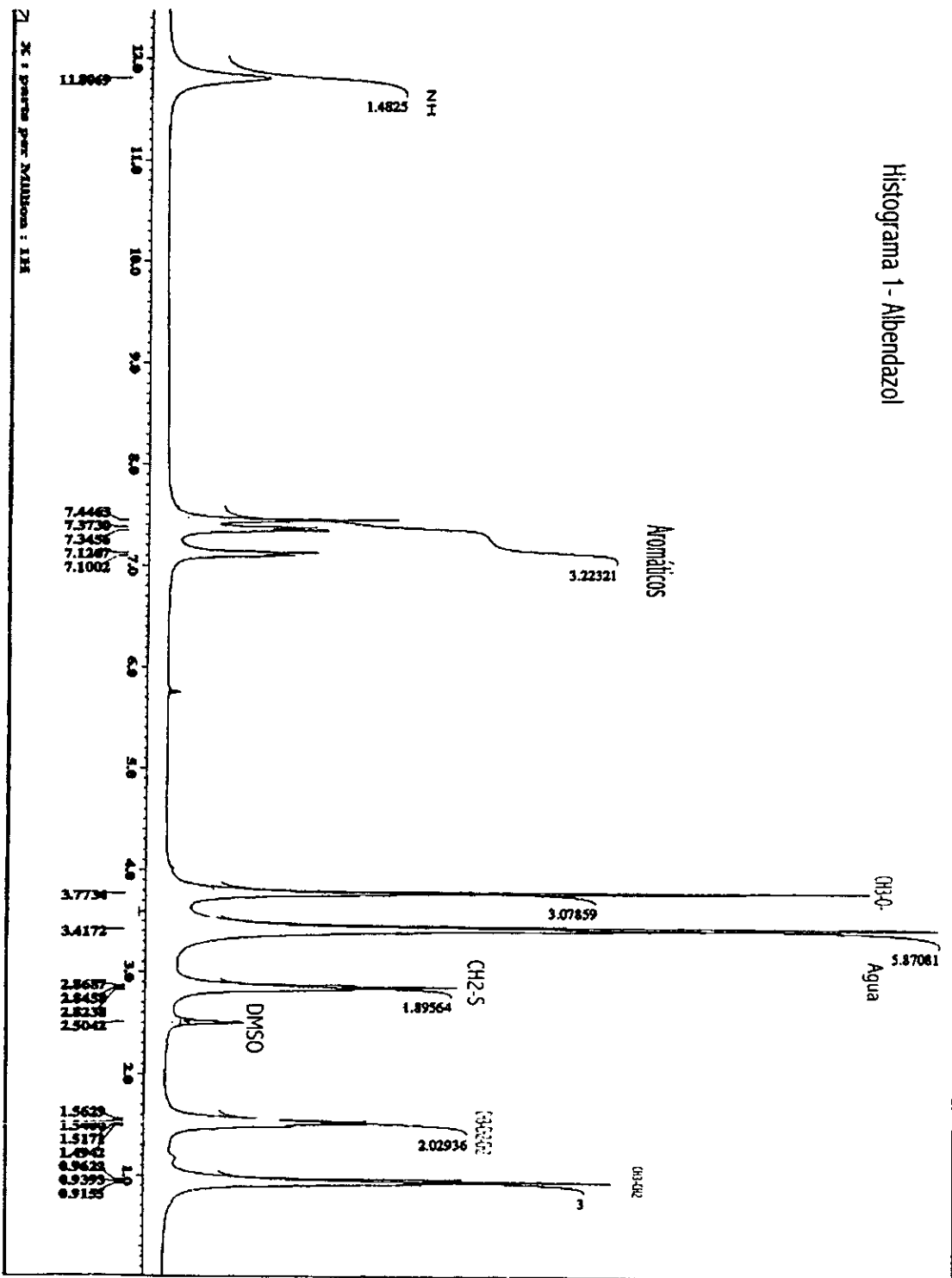
** $p < 0.001$, *** $p < 0.01$, * $p = 0.05$

Tabla 4- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células micronucleadas en linfocitos cultivados de humano tratados durante 24 h. Media de dos experimentos por donador.

CONCENTRACIÓN (μ M)	ABZ	DE	SOABZ	DE	SO ₂ ABZ	DE
DMSO	21	4	8	0	12	0
0.1	30	1	13	1	12	2
1.0	94	23	14	0	15	0
10	150*	27	16	1	15	3
100	224*	46	35*	6	23	9

* $p < 0.05$

Histograma 1 - Albendazol



Histograma 2-Sulfóxido de ABZ

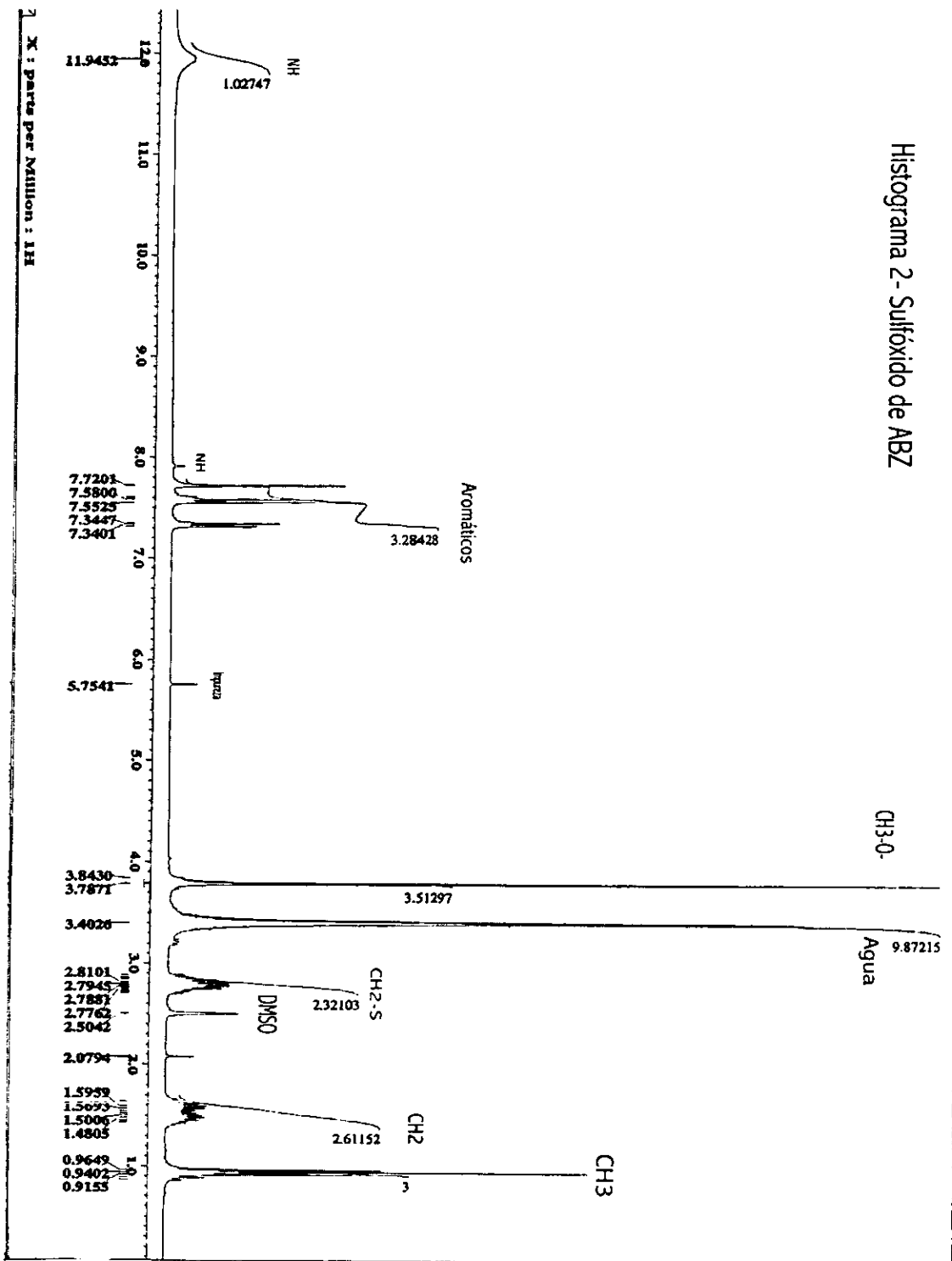


Figura 1- Efecto del ABZ y sus metabolitos en el IM de linfocitos cultivados

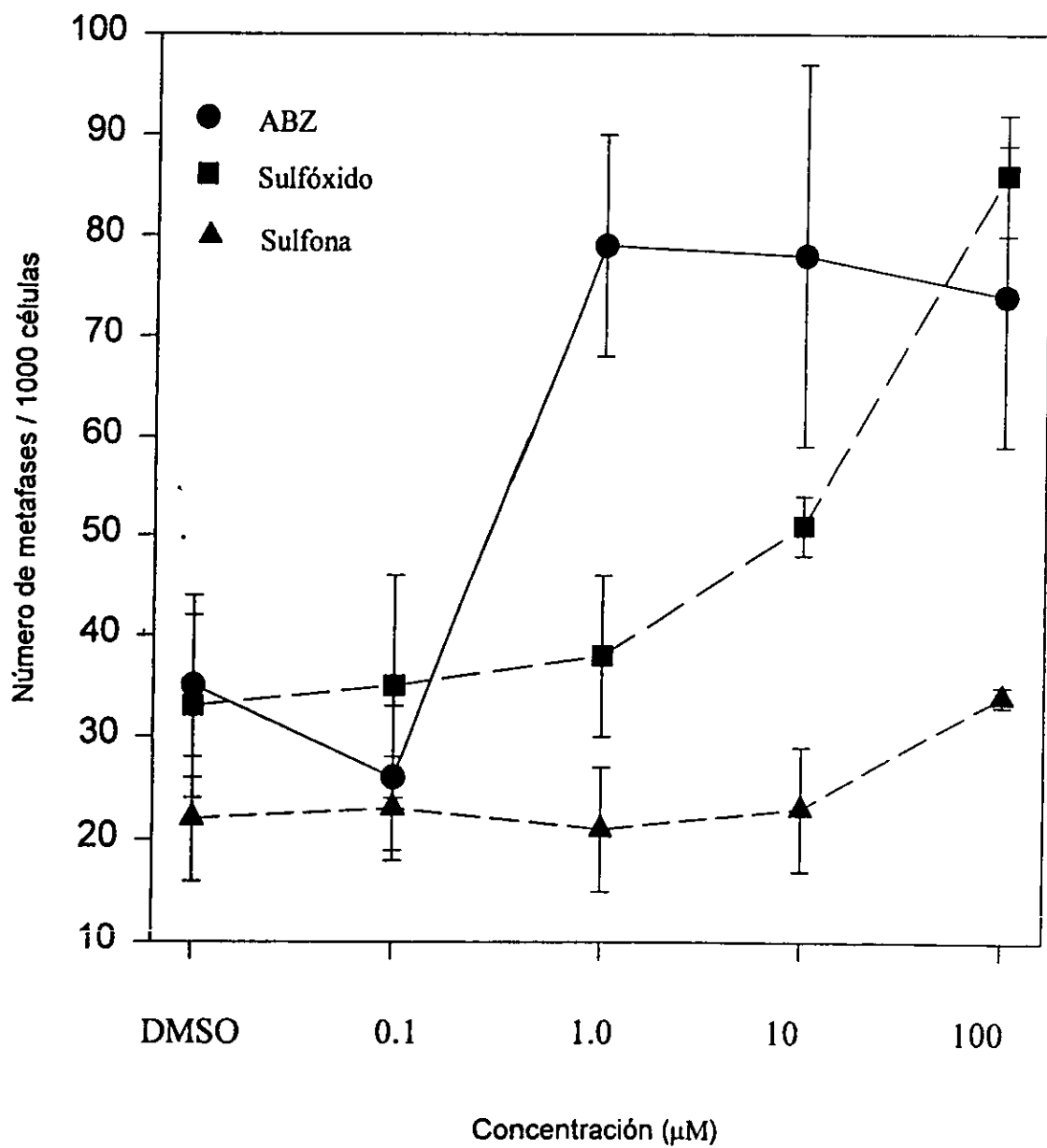


Figura 2- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células M1 en linfocitos cultivados

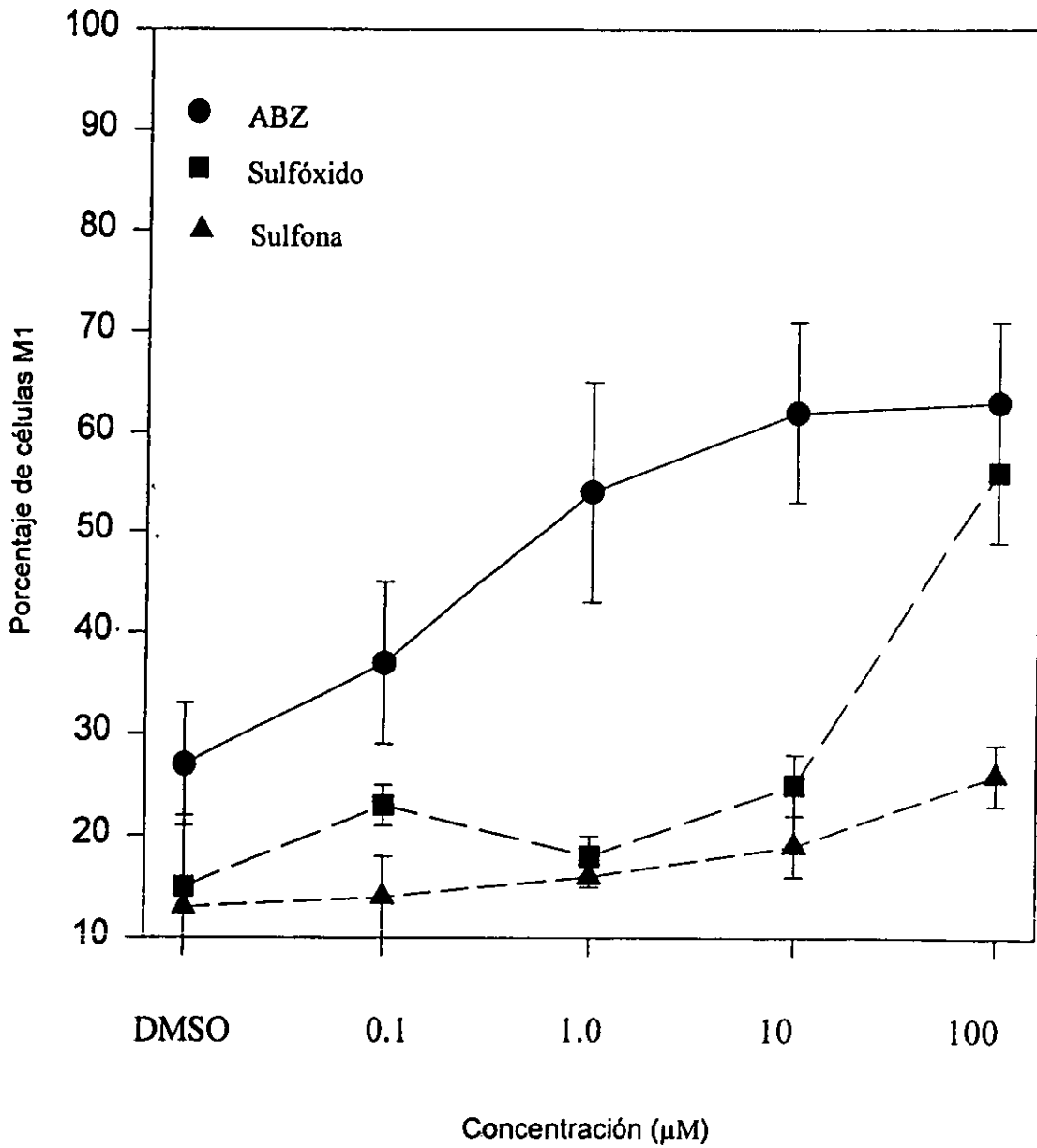
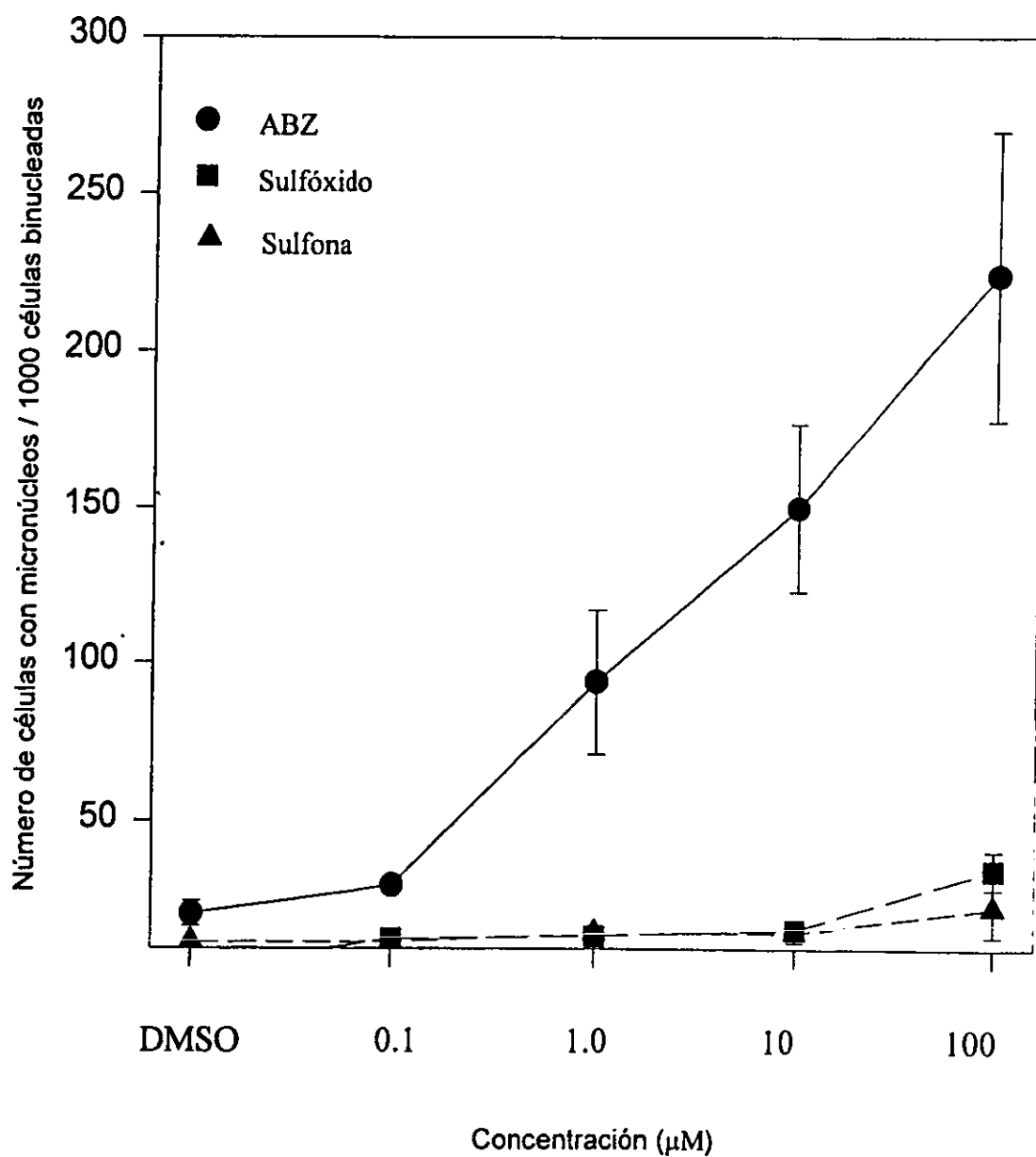


Figura 3- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células micronucleadas en linfocitos cultivados



ANEXO 6

ORIGINAL ARTICLE

Possible Relationship Between Neurocysticercosis and Hematological Malignancies

Luis A. Herrera,^{*1} Antonio Benita-Bordes,^{**} Julio Sotelo,^{**} Laura Chávez,^{***} Juan Olvera,^{***} Alberto Rascón,^{****} Malaquías López^{****} and Patricia Ostrosky-Wegman^{*}

^{*}Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

^{**}Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud, México, D.F., México

^{***}Unidad de Patología, Hospital General de México, México, D.F., México

^{****}Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México, D.F., México

Received for publication August 18, 1998; accepted November 30, 1998 (98/097).

Background. Previous studies have shown an increased frequency of chromosomal abnormalities in lymphocytes from animals and humans with cysticercosis. Some reports have suggested an association between cancer and cysticercosis. The aim of this study was to investigate the possible association between neurocysticercosis and cancer.

Methods. We designed a mortality rate study from the autopsy files of the Department of Pathology at the General Hospital of Mexico. A total of 1,271 autopsy files were reviewed. All files in which a malignant neoplasia was found during autopsy were selected as cases. Autopsies in which no malignant disease was found were used as controls. The odds ratio was determined between the frequency of neurocysticercosis in patients with any malignant neoplasia and that of the controls.

Results. Neurocysticercosis was more frequent in cases with malignant hematological diseases (MHD) than in controls ($p = 0.01$). The odds ratio for this association was 3.54, with 95% confidence interval from 1.17–9.79.

Conclusions. Most human cancers arise from the interaction of a multiplicity of factors, including xenobiotics and endogenous constituents. Therefore, while it will be difficult to demonstrate that neurocysticercosis is a causal agent of malignant hematological diseases (MHD), it should be considered as a potential risk factor for cancer induction in countries where cysticercosis remains a public health problem. © 1999 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Cysticercosis, Neurocysticercosis, Cancer, Lymphoma.

Introduction

Neurocysticercosis is one of the most frequent neurological infections (1). This parasitosis is frequently asymptomatic, leading to a chronic host-parasite interaction. Could this relationship modify the host cells' homeostasis and result in additional health risks? In 1990, we reported that lymphocytes from pigs naturally infected with *Taenia solium* cysticerci had a higher frequency of chromosomal alterations than did lymphocytes from non-infected animals (2). After treatment with praziquantel (PZQ), that difference was no longer observed. This was the first indication of a possible role of cysticercosis in the induction of DNA alterations in host cells. Some years later, three additional findings came to reinforce this hypothesis. Montero et al. (3) found a high frequency of mutations at the HPRT locus in lymphocytes from some patients with neurocysticercosis; moreover, these values returned to normal after treatment with PZQ. A longitudinal study was then performed with swine inoculated with *T. solium* eggs; DNA damage, measured as the frequency of sister chromatid exchanges of stimulated lymphocytes was determined weekly during the 4-month experimental period. Results showed an increased genotoxic

ticerci had a higher frequency of chromosomal alterations than did lymphocytes from non-infected animals (2). After treatment with praziquantel (PZQ), that difference was no longer observed. This was the first indication of a possible role of cysticercosis in the induction of DNA alterations in host cells. Some years later, three additional findings came to reinforce this hypothesis. Montero et al. (3) found a high frequency of mutations at the HPRT locus in lymphocytes from some patients with neurocysticercosis; moreover, these values returned to normal after treatment with PZQ. A longitudinal study was then performed with swine inoculated with *T. solium* eggs; DNA damage, measured as the frequency of sister chromatid exchanges of stimulated lymphocytes was determined weekly during the 4-month experimental period. Results showed an increased genotoxic

Address reprint requests to: Luis A. Herrera, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Genética y Toxicología Ambiental, UNAM, P.O. Box 70-228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México. Tel.: (+525) 622-3846; FAX: (+525) 622-3365; E-mail: metil@hotmail.com

¹LAH is a doctoral fellow of the Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA).

damage only in those animals that developed cysticercosis (4). In the same study, we showed that a factor secreted by cysticerci induced the morphological transformation of Syrian hamster embryo cells, suggesting a carcinogenic potential for this disease (4). The role of genomic alterations during the carcinogenic process is well documented. Therefore, the first question we posed after the induction of chromosome changes by the cysticercus was whether this genetic instability could lead to diseases such as cancer.

The autopsy data in 18 cases of childhood neurocysticercosis taken from the files of the National Institute of Pediatrics in Mexico City indicated that 22% of patients had developed leukemia or lymphoma (5). In a larger clinical and pathological study of 481 autopsy cases of neurocysticercosis performed at the General Hospital of Mexico, neurocysticercosis was found to be associated with malignant neoplasms in 21% of the cases (6). However, these results were considered anecdotal; it was only recently that a more specific epidemiological study reported a correlation between intracranial tumors and neurocysticercosis (7).

In the present work, we report the results of a proportional mortality study performed with autopsy cases from the General Hospital of Mexico, Mexico City. The aim was to determine whether or not neurocysticercosis is associated with malignant neoplasms.

Materials and Methods

Selection of cases and controls. A total of 1,274 consecutive autopsy files were reviewed. Autopsies were performed between January 1993 and December 1995, at the Pathology Department of the General Hospital of Mexico. Neuro-

cysticercosis was determined by pathological analysis of the brain carried out independently by two specialists (authors LC and JO), regardless of the cause of death. The pathologists were not informed of the hypothesis, to avoid differential bias. Files were separated into two groups: the first included patients whose autopsies revealed any malignant neoplasia, and the second consisted of all patients with no histopathological indication of cancer. This latter group was assigned as control. The cases of malignant neoplasia were categorized according to the International Disease Classification.

Statistical analysis. The χ^2 test was used to assess the significance of the prevalence of neurocysticercosis between cases and controls. The odds ratio and the 95% confidence interval were calculated as our best estimate of the relative risk. Statistical analysis was performed with Epi Info 6 software. P values of less than 0.05 were considered significant.

Results

A significant difference of the prevalence of neurocysticercosis was observed between controls and patients with malignant hematological diseases ($p = 0.01$; MHD, Figure 1). No significant differences were found for other malignancies.

One hundred thirteen autopsy cases had MHD. Fifty-five were women (49%), and 58 were men (51%). The median age was 31 years (range: 0-80). Of these, seven cases (6%) had pathological evidence of neurocysticercosis (Table 1). All seven cases with MHD and neurocysticercosis were women; their ages ranged from 14-75 years (median age = 58). According to their medical files, only one (case 1) of

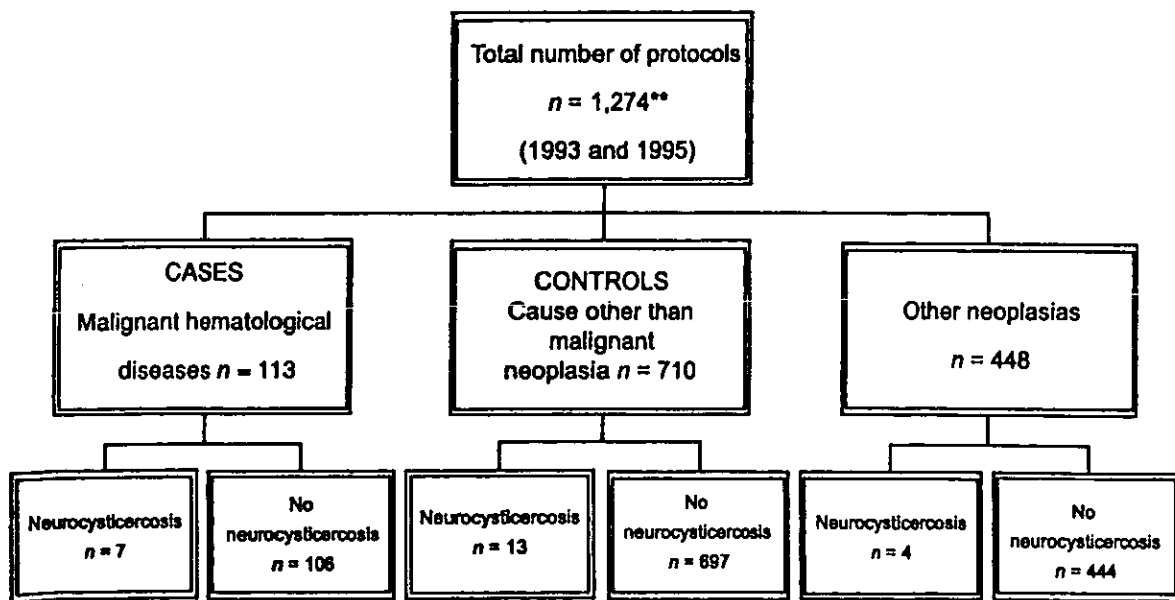


Figure 1. Mortality rate study with autopsy files from the General Hospital of Mexico. **Three files not available for examination.

Table 1. Characteristics of seven women who had presented neurocysticercosis whose cause of death was a malignant hematological disease

Case number	Sex	Age (years)	Neoplasia	Neurocysticercosis
1	F	36	Multiple myeloma	Cysticerci in subarachnoid and ventricular space with degenerative changes, granulomatous reaction, and chronic edema
2	F	58	Hodgkin's disease	Cysticerci in subarachnoid and subdural space with intense eosinophilia and moderate mononuclear infiltrates
3	F	75	Non-Hodgkin's lymphoma	Calcified cysticerci in caudate nucleus
4	F	14	Acute lymphoblastic leukemia	Calcified cysticerci in left putamen
5	F	64	Non-Hodgkin's lymphoma	Calcified cysticercus in right superior parietal lobule
6	F	28	Acute myeloblastic leukemia	Calcified cysticerci in subarachnoidal space
7	F	72	Non-Hodgkin's lymphoma	Calcified cysticerci in Sylvian fissure

these women had symptoms compatible with neurocysticercosis since childhood. The rest had no recorded symptoms, and neurocysticercosis was an unexpected finding at autopsy. In all cases, the time period between the diagnosis of MHD and the death of the patient was no longer than 1 year. The median age of patients without neurocysticercosis was 30 years (range 0-80). Forty-eight (45%) were women and 58 (55%), men.

Table 2 shows the distribution of MHD among cases with and without neurocysticercosis. There is a higher frequency of lymphomas, Hodgkin's disease and multiple myeloma in patients with neurocysticercosis than in patients with MHD but without neurocysticercosis. In the latter group, leukemias were more frequent. Interestingly, all pa-

Table 2. Distribution of malignant hematological diseases among cases with and without neurocysticercosis (NCC)

Disease	Cases with NCC	Cases without NCC
Non-Hodgkin's lymphoma	42.9% (n = 3)	31.1% (n = 33)
Hodgkin's disease	14.3% (n = 1)	3.8% (n = 4)
Multiple myeloma	14.3% (n = 1)	4.7% (n = 5)
Leukemia	28.6% (n = 2)	60.4% (n = 64)

tients with hematological malignancies and neurocysticercosis were women.

Seven hundred ten files were selected as controls. All were patients who died from diseases other than malignant neoplasias. Their median age was 42 years (range: 0-97); 335 were women (47%), and 375 were men (53%). Pathological evidence of neurocysticercosis was found in 13 files (8 women and 5 men), corresponding to 1.8% of controls.

Statistical analysis indicates that neurocysticercosis was more frequent in cases with MHD than in controls ($p = 0.01$). The odds ratio for this association was 3.54, with a 95% confidence interval from 1.17-9.79.

Four hundred forty-eight files were obtained on patients whose cause of death was other than malignant neoplasia; four presented evidence of neurocysticercosis. This difference was not considered significant.

Discussion

A variety of factors have been identified as carcinogens. Among them are several biological agents such as viruses, bacteria, and helminths, which have been implicated in the development of human cancer (8). Neurocysticercosis has recently been associated with a high prevalence of intracranial tumors (7). However, in our study we did not find a correlation with brain neoplasms, even when the number of cases with any malignant neoplasia of the brain was increased to 90 and matched by age and sex with controls. The odds ratio was 1.68, with a 95% confidence interval of 0.16-17.29. One explanation could be the difference in ages of the cases from the present study and those reported by Del Brutto et al. (7), who found the mean age of patients with brain tumor associated with neurocysticercosis to be 62.7 ± 18.3 years, while in our study the mean age was 54.5 ± 14.8 years. Therefore, a longer exposure period may be necessary in order to promote the malignant growth of glial cells.

Our results do indicate a positive association between neurocysticercosis and MHD. Previous reports have linked neurocysticercosis with lymphoma or leukemia. However, conclusions from those studies indicated that neurocysticercosis could result from cancer-induced immunosuppression (9,10). In the present study, the clinical and histopathological records suggest that neurocysticercosis was present before the induction of the neoplasm. Measures of exposure to infectious agents frequently have no time reference; a recent exposure cannot always be easily distinguished from one in the distant past. However, according to the histopathological analysis of the brain, all cases with MHD and neurocysticercosis had evidence of an old infection because the cysticerci were either calcified or hyalinized. This indication provides support for a temporal relationship between neurocysticercosis and MHD.

The induction of chronic inflammation has been proposed as the mechanism of action by which helminths in-

crease the risk for cancer (11,12). In fact, neurocysticercosis in humans is commonly associated with intense gliosis (13). DNA damage on the host cells could be induced during chronic inflammation (14). This damage may result either from the interaction of oxygen-reactive radicals with different cellular molecules such as DNA, proteins, and lipids (12), from the endogen formation of carcinogens (15), or from modification of metabolism to xenobiotics (16). There are various models proposed to explain foreign-body carcinogenesis, which have implicated similar mechanisms (17,18). Nevertheless, additional mechanisms by which parasites may contribute to carcinogenesis, such as the production of toxins and carcinogens, should be considered.

However, the question arises as to whether a systemic effect of cysticercosis may be responsible for a neoplasm induced outside the central nervous system. It appears to be possible. Perhaps small molecules produced during chronic inflammation, such as all oxygen reactive species, and, while passing to the bloodstream through a normal blood-brain barrier, react with critical macromolecules. In addition, there are other connections between the central nervous system and the immune system. Integrative centers of the brain, such as the cerebral cortex and the hippocampus, have an impact on the immune system (19). Moreover, conditions that disturb neuroendocrine regulation, including prolonged aggravated stress and psychotic states, have been suspected of directly affecting the competency of the immune system (20). In mice infected with *T. crassiceps* cysticerci, an increase of serum estradiol has been observed (21). This increase is probably mediated by IL-6 and may promote a suitable environment for infection through the suppression of the immune system. Other data suggest the thymus as the mediator between gonads and the immune system in the control of cysticercosis (21).

Neurocysticercosis has been correlated with alterations in the systemic immune response. The available data concerning cellular immune response in patients with neurocysticercosis, although scanty, report an abnormal relation in CD4/CD8 T lymphocytes, suggesting immune dysfunction (22,23). There is still some controversy concerning the origin of the immunosuppression. However, a parasite molecule with immunosuppressive effects has been reported in swine cysticercosis (24). Coincidentally, the same molecule has been found to have carcinogenic potential (4). Nevertheless, it still remains to be studied whether the parasite secretes this factor *in vivo* and in humans.

Results from previous studies have also indicated the possibility of DNA damage in host cells induced by cysticerci either in humans, animals, or even *in vitro* by some specific factor secreted by the parasite (1-4). In addition, a correlation between the absolute number of antigen-receptor trans-rearrangements, a particular type of genetic instability, and the risk of lymphoma has been recently proposed (25). Also, chromosome alterations have been identified in peripheral blood lymphocytes, which coincidentally are the

cells affected in the present work with a high frequency of lymphomas, Hodgkin's disease, and multiple myeloma detected in patients dying with the combined presence of MHD and neurocysticercosis. It is important to mention that all seven cases of MHD associated with NCC were found in women whose main work was at home. Therefore, occupational exposure did not seem to be the major source of an exogenous carcinogen. However, we could not exclude other potential environmental risk factors such as petroleum derivatives, because this information was not available. Additional investigation that explores this question should be undertaken.

In humans as well as in animal models, carcinogenesis is a complex process in which normal cell growth is modified. The majority of human cancers arise from the interaction of a multiplicity of factors, including xenobiotics and endogenous constituents; therefore, it is difficult to postulate neurocysticercosis as the causal agent of MHD, or of intracranial tumors. But it should undoubtedly be considered as another risk factor for cancer induction in countries where cysticercosis is endemic.

References

- White C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease world-wide. *Clin Infect Dis* 1997;24:101.
- Flisser A, González D, Plancarte A, et al. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol Res* 1990;76:640.
- Montero R, Flisser A, Madrazo I, Cuevas C, Ostrosky-Wegman P. Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutat Res* 1994;305:181.
- Herrera LA, Santiago P, Rojas G, et al. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat Res* 1994;305:223.
- Ridaura C. Host response in childhood neurocysticercosis. Some pathological aspects. *Childs Nerv Syst* 1987;3:206.
- Villagrán J, Olvera JE. Cisticercosis humana, estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. *Patología* 1988;26:149.
- Del Brutto OH, Castillo PR, Mena IX, Freire AX. Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Arch Neurol* 1997;54:1125.
- IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994;61:261.
- Mauad T, Battlehner CN, Bednrow CL, Capelozzi VL, Saldiva PH. Case report: massive cardiopulmonary cysticercosis in a leukemic patient. *Pathol Res Pract* 1997;193:527.
- Wilber RR, King EB, Howes EL. Cerebrospinal fluid cytology in five patients with cerebral cysticercosis. *Acta Cytol* 1980;24:421.
- Ishii A, Matsuoka H, Aji T, et al. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutat Res* 1994;305:273.
- Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994;305:253.
- Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. In: Palacios E, Rodríguez J, Taveras JM, editors. *Cysticercosis of the central nervous system*. Springfield, IL: Charles C Thomas;1983. p. 27.
- Rosin M, El Din Zakı S, Ward A, Anwar WA. Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat Res* 1994;305:283.
- Haswell-Elkins M, Satarug S, Tsuda M, et al. Liver fluke infection and

- cholangiocarcinoma: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat Res* 1994;305:241.
16. Gentile J, Gentile G. Implications for the involvement of the immune system in parasite-associated cancers. *Mutat Res* 1994;305:315.
 17. James J, Pogribna M, Miller B, Bolon B, Muskhelishvili L. Characterization of cellular response to silicone implants in rats: implications for foreign-body carcinogenesis. *Biomaterials* 1997;18:667.
 18. Brand K, Buen L, Johnson K, Brand I. Etiological factors, stages, and the role of the foreign body in foreign-body tumorigenesis: a review. *Cancer Res* 1975;35:279.
 19. Brinton R. Neural basis for CNS regulation of the immune system. In: Cotman C, Brinton R, Galaburda A, McEwen B, Schneider D, editors. *The neuro-immune-endocrine connection*. New York: Raven Press; 1987. p. 15.
 20. McEwen B, Biron C, Brunson K, et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Rev* 1997;23:79.
 21. Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govenzensky T, Romano M. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Molec Biol* 1995;52:575.
 22. Flisser A, Espinoza B, Tovar A, Plancarte A, Correa D. Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet Parasitol* 1986;20:95.
 23. Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Sun T, editor. *Progress in clinical parasitology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. p. 77.
 24. Molinari JL, Tato P, Reynosa OA, León-Cázares JM. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Ann Trop Med Parasitol* 1990;84:205.
 25. Kirsch IR. Trans-rearrangements and the risk of lymphoid malignancy. *Ann Oncol* 1997;8:45.

ANEXO 7

**INDUCCIÓN DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA Y NEOPLASIAS
EXPERIMENTALES POR LA NEUROCISTICERCOSIS Y UN FACTOR
SOLUBLE SECRETADO POR CISTICERCOS DE *TAENIA SOLIUM***

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria producida por las larvas del helminto *Taenia solium*. Varios estudios han demostrado que los linfocitos de sangre periférica de individuos o cerdos con cisticercosis tienen una mayor frecuencia de daño genético, como mutaciones en el locus HPRT (1), intercambio de cromátidas hermanas (2), micronúcleos y aberraciones cromosómicas (3). Debido a que la frecuencia de estas alteraciones retornó a los valores normales después del tratamiento cestocida, se sugirió que el parásito *per se* induce inestabilidad cromosómica en las células del hospedero (1-3). Recientemente la neurocisticercosis (NCC) se ha relacionado con la generación de neoplasias malignas, específicamente con enfermedades hematológicas malignas (4) y con tumores intracraneales (5).

Se sabe que ciertas helmintosis se asocian a la aparición de tumores malignos en los hospederos y algunas como la esquistosomiosis son reconocidas actualmente por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer como agentes causales de ciertos tumores (6). Las hipótesis propuestas para explicar esta relación causal son diversas. La más socorrida hace una estrecha relación entre el proceso inflamatorio crónico inducido por el parásito y la transformación maligna (6-11). Sin embargo, la relación que se establece entre estos parásitos y sus hospederos es más compleja que el desarrollo de una respuesta inflamatoria. Por ejemplo, para sobrevivir en un ambiente desventajoso y agresivo durante periodos largos, algunos helmintos secretan factores que interactúan con las células del hospedero, en particular con aquellas del sistema inmune (12). Basados en un estudio previo en el que se encontró que un factor soluble secretado por cisticercos de *T. solium* indujo la

transformación de células primarias de mamíferos *in vitro* (2) postulamos que alguno(s) de estos factores es capaz de participar directamente en el proceso carcinogénico.

Debido a que durante la cisticercosis se establece una respuesta inmune constante aunque a veces inefectiva (12), que podría generar alteraciones estructurales en cromosomas donde normalmente existen rearrreglos en la respuesta inmunológica, decidimos investigar la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) estables y no estables en linfocitos de sangre periférica de pacientes con NCC. Las AC se analizaron mediante la utilización de sondas específicas para los cromosomas 7, 11 y 14, ya que en ellos se localizan genes que codifican a receptores de células T así como a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, y están involucrados en AC asociadas frecuentemente con la aparición de enfermedades linfoproliferativas (13-14). Además, comparamos esta frecuencia de AC con la observada en los cromosomas 1, 2 y 4, de los mismos individuos, ya que son los más comúnmente analizados en los estudios de genotoxicidad por abarcar casi el 23 % del genoma humano. Por otro lado, se investigó si un factor soluble secretado por cisticercos de *T. solium* induce inestabilidad cromosómica en linfocitos de humano tratados *in vitro* y si dosis repetidas de este factor generan la formación de tumores en ratones BALB/c.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos

Se estudiaron 8 pacientes con NCC activa (es decir que el cisticerco está vivo), 4 mujeres y 4 hombres, que no estuvieron sometidos previamente a tratamiento cestocida. La edad mediana del grupo fue 38 años (rango: 20-78). Como grupo testigo se incluyeron 10 individuos, 5 mujeres y 5 hombres, sin sintomatología de NCC y a los cuales se realizó una tomografía computarizada del cerebro para confirmar que no estuvieran parasitados. La edad mediana de este grupo fue de 30 años (rango: 20-48). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. A todos los participantes se les informó por escrito los objetivos del trabajo y se obtuvo su consentimiento antes de ser incorporados al estudio.

Cultivos de linfocitos

Se sembró 1 ml de sangre periférica heparinizada en 9 ml de medio RMPI suplementado con glutamina, aminoácidos no esenciales y 10 % de suero fetal de ternera (3). Se estimularon con fitohemaglutinina (0.3 ml) y se incubaron a 37 °C durante 48 h; 3 h antes de la cosecha se adicionaron 0.3 ml de colcemid. Después de este período los cultivos se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se agregaron 7 ml de una solución de KCl (0.075 M) durante 30 min. Se centrifugaron los cultivos, se retiró el sobrenadante y se fijaron con una mezcla de metanol y ácido acético (3:1). Las células se lavaron hasta obtener un botón limpio, se resuspendieron en 0.5 ml de fijador y se gotearon en laminillas limpias. Las preparaciones se dejaron secar al aire y se almacenaron en etanol al 70 % hasta que se realizó la hibridación *in situ* (3).

Hibridación *in situ* y análisis de las aberraciones cromosómicas (AC)

Las AC se analizaron con una técnica de supresión de la hibridación *in situ* (CISS, 15). Esta técnica, conocida como “chromosome painting”, permite detectar aberraciones complejas, tales como translocaciones recíprocas e inserciones, mediante la visualización de cambios de color. Varios laboratorios han demostrado que CISS es un método válido para cuantificar aberraciones cromosómicas (16-18). Para la CISS se utilizaron dos mezclas de sondas específicas (donadas por Erich Gebhart, Universidad de Erlangen, Alemania), una para los cromosomas 1, 2 y 4 la cual es la más comúnmente empleada en los estudios de genotoxicidad ya que abarca casi el 23 % del genoma humano (19-20); y otra para los cromosomas 7, 11 y 14 los cuales están involucrados en AC observadas en pacientes con enfermedades hematológicas malignas. Las AC se analizaron en laminillas codificadas mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60), determinándose la frecuencia de rompimientos cromosómicos y cromatídicos, así como de translocaciones recíprocas y no recíprocas en un total de 1000 metafases por individuo. Los resultados se expresaron como frecuencia de rompimientos (la suma de los cromatídicos y cromosómicos), de translocaciones (tanto recíprocas y no recíprocas), y de rompimientos totales, los cuales son la suma de los rompimientos (considerados como un evento) y translocaciones (considerados como dos eventos).

Aislamiento del factor de metacéstodos de *Taenia solium*

Para obtener el factor secretado por los cisticercos de *T. solium* (FC) se adquirieron cerdos de 5 a 6 meses de edad en un pueblo de una zona endémica de cisticercosis porcina en México. Los cisticercos se disecaron del tejido de los animales parasitados y se incubaron en 500 ml de agua destilada desionizada (ADD, 6h, 23 °C). Posteriormente se separaron los

cisticercos del líquido de incubación y este se centrifugó durante 15 min (10,000 rpm); el sobrenadante se liofilizó, se resuspendió en 5 ml de ADD y se dializó en un tubo de diálisis Spectrapor 3 (corte molecular de 3,500 Da) contra 100 ml de ADD estéril a 4 °C en recipientes de vidrio estériles. Después de 12 h, el material fuera del tubo de diálisis se recolectó, se liofilizó y almacenó a 4 °C. Se tomaron muestras de 50 mg (peso seco) del FC crudo las cuales se diluyeron en 3 ml de ADD y se fraccionaron por filtración en gel usando una columna Bio-gel P-6. Se midió la densidad óptica (260 nm) de las fracciones recolectadas, detectándose dos picos de absorción. Se evaluó la concentración de ribosa en la fracción que mostró el primer pico, ya que en experimentos anteriores se ha demostrado que esta fracción es la que tiene actividad biológica en células de ratones y de seres humanos (21-23), se sabe que esta fracción contiene una molécula de RNA de peso molecular bajo (21), de manera que la concentración de ribosa se usó para determinar la cantidad de FC a ser usada en nuestros experimentos. Se determinó la viabilidad de los cisticercos antes y después de la obtención del FC mediante la evaluación de la evaginación del escolex en 50 cisticercos. Se observó un alto grado de viabilidad en los cisticercos (96 y 94% respectivamente).

Animales y régimen de tratamiento

En cada grupo experimental se incluyeron 20 ratones hembra de la cepa BALB/cAnN de 6 a 7 semanas de edad y con un peso corporal promedio de 20 ± 2 g. Los animales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los ratones se mantuvieron en jaulas de plástico implementadas con filtros de aire (5 animales por jaula); las camas de las jaulas se cambiaron cada 3 días, el alimento y agua estériles se administraron *ad libitum*. Los regímenes de tratamiento fueron: **Grupo 1 (testigo)**- se

inocularon 0.1 ml de solución salina estéril por vía subcutánea a intervalos de 3 días durante 6 semanas; **grupo 2 (FC)**- se inocularon 100 µg del FC disueltos en 0.1 ml de solución salina estéril por vía subcutánea a intervalos de 3 días durante 6 semanas; **grupo 3 (MNU)**- se inyectó una sola dosis intraperitoneal del carcinógeno N-metil-N-nitrosourea (MNU, 50 mg/kg) 4 semanas después de haber empezado el experimento. Es importante mencionar que este compuesto induce principalmente tumores del sistema linfático de ratones cuya frecuencia depende de la dosis empleada; **grupo 4 (FC + MNU)**- se inocularon 100 µg de FC disueltos en 0.1 ml de solución salina estéril por vía subcutánea a intervalos de 3 días durante 6 semanas, y después de un período de 4 semanas se administró una dosis intraperitoneal de MNU (50 mg/kg). Todos los animales se sacrificaron con éter 5 meses después del último tratamiento. Se colectaron el timo, el bazo y cualquier otro órgano con crecimiento tumoral evidente, se fijaron con formol amortiguado al 10 %, y se embebieron en parafina. El análisis histopatológico se realizó en secciones de 5 µm teñidas con hematoxilina-eosina.

Evaluación de la genotoxicidad del FC

Se estudió la capacidad del FC para inducir daño al DNA de células de humano mediante la evaluación de la frecuencia de linfocitos con micronúcleos (MN). Los MN son fragmentos del núcleo celular que pueden contener un cromosoma completo o bien una fracción de éste. Se utilizó la técnica de bloqueo de la citocinesis mediante la cual es posible distinguir a las células que se han dividido sólo una vez (células con dos núcleos) después del tratamiento lo que permite la evaluación del daño en una población homogénea (24). Se realizaron tres experimentos independientes usando sangre de un donador sano. La sangre periférica (0.5 ml) se cultivó en 6 ml de medio RPMI estimulada con 0.2 ml de

fitohemaglutinina durante 72 h. Veintiocho horas antes de la fijación se adicionó citocalasina-B (6 $\mu\text{g/ml}$) para detener la división del citoplasma o citocinesis; 4 h después de este paso, las células se trataron con el FC disuelto en medio RPMI (20 y 80 $\mu\text{g/ml}$). Se usó mitomicina-C (10^{-5} M) como testigo positivo. Las células se fijaron cuidadosamente con una solución de metanol y ácido acético (3:1) y se gotearon en laminillas. Después de 24 h, las laminillas se tiñeron con el colorante de Wright. Se analizaron 1000 células binucleadas para medir la presencia de MN.

RESULTADOS

Frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos de individuos con NCC.

La figura 1 muestra la frecuencia de AC en linfocitos de sangre periférica de pacientes con NCC antes del tratamiento y de un grupo de individuos no parasitados. El daño al DNA expresado como rompimientos totales (translocaciones + rompimientos) fue mayor en los individuos parasitados que en los no infectados, independientemente del grupo de cromosomas analizado (1, 2, y 4: $p = 0.02$; 7, 11 y 14: $p = 0.03$). La frecuencia de translocaciones cromosómicas fue más elevada en células de los pacientes con NCC comparada con la de los individuos sanos, aunque sólo fue estadísticamente significativa cuando se usaron sondas para los cromosomas 7, 11 y 14 ($p = 0.03$). Por otro lado, el daño al DNA observado como rompimientos cromosómicos o cromatídicos fue significativamente más alto en los linfocitos de los pacientes con NCC, tanto aquellos que involucraron a los cromosomas 1, 2 y 4 ($p = 0.006$), como el observado con sondas para los cromosomas 7, 11 y 14 ($p = 0.002$). A pesar de que la frecuencia de AC que involucraron los cromosomas 7, 11 y 14 fue mayor que la observada en los cromosomas 1, 2 y 4, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Potencial genotóxico y carcinogénico de un factor secretado por cisticercos de *T. solium*.

La tabla 1 muestra la frecuencia de linfocitos con MN inducidos por el tratamiento con el FC. Esta fue similar a la observada en los cultivos tratados con mitomicina-C, y fue significativamente más alta que los testigos ($p < 0.05$, ANOVA). No hubo diferencia en la frecuencia de células micronucleadas inducida por 20 o 80 $\mu\text{g/ml}$ de FC.

Dos de los animales tratados (10%) con el FC durante 6 semanas desarrollaron tumores malignos 5 meses después de la última inyección (tabla 2). El análisis histopatológico indicó que un ratón presentó dos tumores primarios: un linfoma en timo y un adenocarcinoma en páncreas con metástasis al pulmón; el otro ratón del mismo grupo tuvo un carcinoma indiferenciado de pulmón. Sólo un animal (5%) de los tratados con el carcinógeno MNU desarrolló un linfoma en timo. Dos ratones desarrollaron un tumor después del tratamiento con FC y MNU (10%), uno presentó un linfoma en timo y el otro un linfoma en bazo. Ninguno de los animales del grupo testigo desarrollaron neoplasias. No hubo diferencia en el peso de los animales de todos los grupos en el momento de la disección.

DISCUSIÓN

Se ha sugerido que las infecciones parasitarias crónicas son la causa de casi un tercio de los casos de cáncer en el mundo (25). Estudios epidemiológicos recientes reportaron una posible asociación de la cisticercosis por *T. solium*, la infección parasitaria más común del sistema nervioso central en todo el mundo, con neoplasias hematológicas malignas (4) y tumores intracraneales (5). Aunque los mecanismos mediante los cuales esta enfermedad ocasiona la transformación maligna de células del hospedero no están claros, un hecho constante es la inestabilidad cromosómica observada en los linfocitos de sangre periférica de los individuos infectados (1-3, 26). Actualmente los datos epidemiológicos indican que esta inestabilidad cromosómica puede estar relacionada con una mayor predisposición para desarrollar cáncer especialmente del sistema linfoide (27-28). Nuestros resultados mostraron que la frecuencia de AC que involucró a los cromosomas 7, 11 y 14 fue mayor que la observada con sondas para los cromosomas 1, 2 y 4, sobretodo las translocaciones cromosómicas las cuales representan un daño al DNA más estable que puede transmitirse de una generación celular a otra. Es importante recordar que en los cromosomas 7, 11 y 14 están localizados los genes que codifican a algunos receptores de células T así como aquellos involucrados en la síntesis de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, y que durante la respuesta inmunológica se producen rearrreglos en regiones de estos cromosomas, un hecho que puede convertirlas en zonas de mayor inestabilidad (13). De manera que mientras el parásito sigue vivo promueve una respuesta inmune persistente, aunque no muy efectiva, por parte del hospedero, lo que puede generar una mayor inestabilidad en estos cromosomas. Esto podría darnos una explicación a la asociación entre la NCC y neoplasias malignas del sistema linfoide.

Sin embargo, existe otra posibilidad que sugiere una participación más directa del parásito. Cerca de la mitad de los individuos con cisticercosis no presentan síntomas de la enfermedad, una característica que se ha relacionado con la habilidad del cisticerco para prevenir una respuesta inmune (29). Los cisticercos de *T. solium* secretan varios factores que pueden interferir con este proceso (12, 30), entre ellos se ha aislado un factor soluble que se cree es un RNA de bajo peso molecular. Este factor (FC) inhibe la proliferación inducida por mitógenos, las respuestas celular y humoral a antígenos del cisticerco, y la inflamación alrededor de cisticercos implantados subcutáneamente en ratones BALB/c (21-23). En un estudio previo se demostró que el FC induce la transformación *in vitro* de fibroblastos de embriones de hámster sirio (2). De aquí surgió la pregunta si este FC puede tener un papel en la inestabilidad cromosómica observada en los individuos parasitados y finalmente en la inducción de un proceso carcinogénico.

Nuestros resultados demuestran que este factor soluble induce la formación de micronúcleos en linfocitos cultivados de humano. Este tipo de daño representa la pérdida de material genético durante la división mitótica, contribuyendo a la inestabilidad del DNA de las células de los hospederos por lo que puede representar un factor de riesgo en el proceso de la carcinogénesis (24). Es necesario resaltar que aún se necesitan más estudios para determinar si el FC se secreta en cantidades biológicamente significativas en seres humanos con cisticercosis.

Por otro lado, los experimentos con ratones BALB/c mostraron que dosis repetidas del FC indujeron la formación de tumores en 10% de los animales. Aunque el número de animales que desarrollaron neoplasias malignas después del tratamiento con FC es bajo (2/20), el FC puede tener un potencial carcinogénico si consideramos que los tumores se

observaron en animales relativamente jóvenes (de 8 meses de edad) de una cepa que raramente desarrolla neoplasias espontáneas a esa edad (31-32).

Los datos presentados apoyan la hipótesis de una participación directa del cisticerco en la inducción de inestabilidad cromosómica en células del hospedero y sugieren que algún(os) factor(es) secretado(s) por estos parásitos podrían promover la transformación maligna.

REFERENCIAS

- 1- Montero, R., Flisser, A., Madrazo, I., Cuevas, C., Ostrosky, P (1994) Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. *Mutat Res*, 305, 181-188.
- 2- Herrera LA, Santiago P, Rojas G, Salazar P, Tato P, Molinari J, Schiffmann D, and Ostrosky-Wegman P (1994) Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat Res*, 305, 223-228.
- 3- Herrera LA, Ramírez T, Rodríguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, Ramos F, Verdorfer I, Gebhart E, and Ostrosky-Wegman P (2000) Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer. Increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. In press.
- 4- Herrera LA, Benita A, Sotelo J, Chávez L, Olvera J, Rascón A, López M, and Ostrosky-Wegman P (1999) Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. *Arch Med Res*, 30, 154-158.
- 5- Del Brutto O, Castillo P, Mena I, and Freire A (1997) Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas. *Arch Neurol*, 54, 1125-1128.
- 6- International Agency for Research on Cancer (1994) Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 61, Lyon, France.
- 7- Ohshima H. and Bartsch H (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*, 305, 253-264.
- 8- Rosin M, Anwar W, and Ward A (1994a) Inflammation, chromosomal instability, and cancer: The schistosomiasis model. *Cancer Res*, 54, 1916s-1933s.

- 9- Rosin M, Saad El Din Zaki S, Ward A, and Anwar W (1994b) Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat Res*, 305, 283-292.
- 10- Gentile J, and Gentile G (1994) Implications for the involvement of the immune system in parasite-associated cancers. *Mutat Res*, 305, 315-320.
- 11- Montero, R., Gentile, G., Frederick, L., McMannis, J., Murphy, T., Silva, G., Blankespoor, H., Gentile, J (1999) Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis*, 14, 217-220.
- 12- White C, Tato P, and Molinari J (1992) Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Agents Dis*, 1, 185-193.
- 13- Kirsch, I., Lista, F (1996) Transrearrangements as biomarkers for risk of lymphoid malignancy. *Cancer Surveys*, 28, 311-328.
- 14- Kluin, M., Schuurin, E (1997) FISH and related techniques in the diagnosis of lymphoma. *Cancer Surveys*, 30, 3-20.
- 15- Neubauer, S., Gebhart, E., Schmitt, G., Birkenhake, S., and Dunst, J. (1996). Is chromosome *in situ* suppression (CISS) hybridisation suited as a predictive test for intrinsic radiosensitivity in cancer patients? *Int J Oncol*, 8, 707-712.
- 16- Lucas, J., Tenjin, T., Straume, T., Pinkel, D., Moore, D., Litt, M., and Gray, J. (1989). Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization. *Int J Radiat Biol*, 56, 35-44
- 17- Cremer, T., Popp, S., Emmerich, P., Lichter, P., and Cremer, C. (1990). Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression *in situ* hybridization. *Cytometry*, 11, 110-118.

- 18- Natarajan, A., Vyas, R., Darroudi, F., and Vermeulen, S. (1992). Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int J Radiat Biol*, 61, 199-203.
- 19- Tucker, J., Ramsey, M., Lee, D., and Minkler, J. (1993). Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*. *Int J Radiat Biol*, 64, 27-37.
- 20- Tucker, J., Lee, D., and Moore, D. (1995). Validation of chromosome painting II: a detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Mutagenesis*, 9, 151-156.
- 21- Tato P, Castro A, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, and Molinari J (1995) Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res*, 81, 181-187.
- 22- Arechavaleta F, Molinari J, and Tato P (1998) A *Taenia solium* metacestode factor non-specifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res*, 84, 117-122.
- 23- Molinari J, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M. and Sepúlveda J (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res*, 84, 173-180.
- 24- Fenech M, and Morley A (1985) Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res*, 148, 29-36.
- 25- Ames B, and Gold L (1997) The causes and prevention of cancer: Gaining perspective. *Environ Health Perspect*, 105, suppl. 4. 865-873.

- 26- Flisser, A., Gonzalez, D., Plancarte, A., Ostrosky, P., Montero, R., Stephano, A., Correa, D (1990) Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol Res*, 76, 640-642.
- 27- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prá, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., and Puntoni, R. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? *Cancer Genet Cytogenet*, 79, 133-135.
- 28- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brogger, A., Knudsen, L., Norppa, H., Reuterwall, C., and the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58, 4117-4121.
- 29- Flisser A, Woodhouse E, and Larralde C (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies, and non-responders. *Clin Exp Immunol*, 39, 27-37.
- 30- Laclette J, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, and Nicholson A (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol*. 148, 165-172.
- 31- Frith C, Zuna E, and Morgan K (1981) A morphologic classification and incidence of spontaneous ovarian neoplasms in three strains of mice. *J Natl Cancer Inst*, 67, 693-702.
- 32 Sheldon W, and Greenman D (1980) Spontaneous lesions in control BALB/c female mice. *J Environ Pathol Toxicol*, 3, 155-167.

Tabla 1- Frecuencia de células micronucleadas (x 1000 células binucleadas) en cultivos de linfocitos de sangre periférica de humanos tratados con un factor secretado por cisticercos de *Taenia solium*.

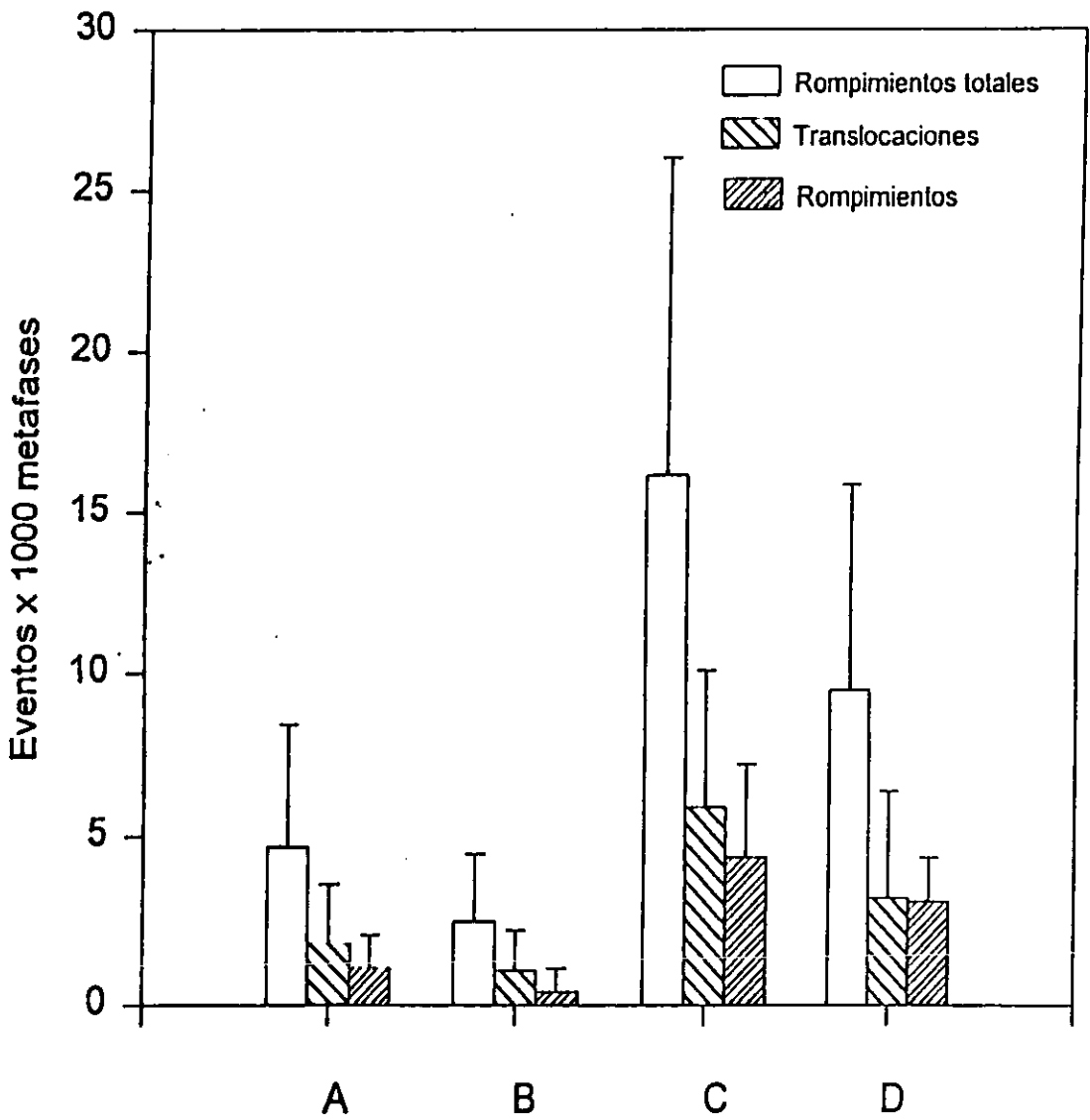
Tratamiento	Frecuencia de células micronucleadas
Medio de cultivo	16 ± 2.6
Mitomicina C (1 x 10 ⁻⁵ M)	33.3 ± 1.5 **
Factor (20 µg/ml)	32.3 ± 3.2 **
Factor (80 µg/ml)	31.7 ± 7.8 **

** P<0.05 ANOVA.

Tabla 2- Frecuencia de animales que desarrollaron tumores malignos después del tratamiento subcutáneo con un factor secretado por cisticercos de *Taenia solium* .

Tratamiento	Animales con Tumores	Tipo de Tumor
Solución salina	0/20	
Factor FC	2/20	Ratón 1) Linfoma tímico y adenocarcinoma pancreático con metástasis al pulmón. Ratón 2) Carcinoma indiferenciado de pulmón
MNU	1/20	Linfoma tímico
Factor FC + MNU	2/20	Ratón 1) Linfoma tímico Ratón 2) Linfoma esplénico

Figura 1- Frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de individuos no infectados y de pacientes con NCC antes del tratamiento. Las aberraciones cromosómicas se analizaron mediante una técnica de hibridación *in situ* utilizando dos diferentes mezclas de sondas: una para los cromosomas 1, 2 y 4; y la otra para los cromosomas 7, 11 y 14.



A: individuos no infectados, sondas para cromosomas 7, 11 y 14

B: individuos no infectados, sondas para cromosomas 1, 2 y 4

C: pacientes con NCC, sondas para cromosomas 7, 11 y 14

D: pacientes con NCC, sondas para cromosomas 1, 2 y 4

ANEXO 8

[MSN Home](#) [Hotmail](#) [Web Search](#) [Shopping](#) [Money](#) [People & Chat](#) [Passport sign out](#) 



From a friend's,

Hotmail® metil@hotmail.com

[Inbox](#) [Compose](#) [Addresses](#) [Folders](#) [Options](#) [Help](#)

Inbox

From: "PT, ETJ (ELSLON)" <pt@current-trends.com> [Save Address](#) - [Block Sender](#)
To: "metil@hotmail.com" <metil@hotmail.com> [Save Address](#)
Subject: RE: the role of parasites in carcinogenesis
Date: Thu, 8 Jun 2000 12:23:58 +0100

[Reply](#) [Reply All](#) [Forward](#) [Delete](#) [Previous](#) [Next](#) [Close](#)

Dear Dr Herrera

Thank you for your manuscript for Parasitology Today , which has arrived safely in our office. We will contact you again once it has completed editorial assessment. In the meantime, if you have any queries, please don't hesitate to contact us (please use this email address for correspondence).

Thank you for writing for Parasitology Today.

Yours sincerely

Naomi Adams
Editorial Administrator
Parasitology Today

Elsevier Science London
84 Theobald's Rd
London UK WC1X 8RR
Tel: +44 (0)20 7611 4133
Fax :+44 (0)20 7611 4485
email: PT@current-trends.com

THE ROLE OF PARASITES IN CARCINOGENESIS

By

Luis A. Herrera

and

Patricia Ostrosky Wegman

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Correspondence: Luis A. Herrera. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Depto. Genética y Toxicología Ambiental. P.O. Box 70-228, Ciudad Universitaria,

México D.F. 04510, MEXICO. E-mail: metil@hotmail.com

Acknowledgements: Authors are grateful for useful comments from Dr. Ana Flisser and

Raymond Damian

Carcinogenesis is a complex process in which normal cell growth is modified due to the interaction of multiple factors, including xenobiotics and endogenous constituents. Biological agents represent one of the broad categories of cancer causation for which the epidemiological evidence in humans is strong and plausible (1). It is currently accepted that the carcinogenic process results from the accumulation of genetic changes driven by instability of the cellular genome, thus factors that influence this genetic instability may contribute to the malignant transformation of normal cells (2). It has been estimated that chronic infections by viruses, bacteria or parasites, contribute to about one-third of the world's cancer (1). Although several parasites, helminths in particular, have been implicated in human cancer causation (3), the knowledge of the mechanisms by which parasites induce malignant transformation of host cells is unclear. In this paper we discuss some conditions that take place during human helminthiasis that can generate genetic instability and ultimately favour tumour development, i.e., inflammation, modulation of the host immune system, and secretion of soluble factors that interact with host cells (Fig. 1).

Inflammation as a source of genetic instability.

Inflammation is a common feature of helminthiasis in which inflammatory cells generate reactive oxygen and nitrogen species that, apart from killing invading pathogens, are capable of inducing genetic instability in normal surrounding tissue, which eventually conduct to malignant transformation. The reactive oxygen and nitrogen species can oxidise and damage DNA, either directly or after interaction with other radicals or cellular components (4-5). Inflammatory cells have also been shown to participate in the metabolic activation of procarcinogens, such as aflatoxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (6), as well as in the formation of carcinogenic nitrosamines from nitric oxide (7). In addition, the altered metabolic capacity to xenobiotics of cells surrounding the site of inflammation

may increase the susceptibility to toxic agents to which individuals are normally exposed (8). Once DNA damage has been generated, it could be transmitted to the next cell generations giving rise to clones of transformed cells, an event that could be enhanced by the proliferative response of host cells to repair the tissue damage incurred during inflammation (9).

Modulation of host immune system.

The malignancies suspected of originating with chronic inflammation are located nearby the site of inflammation; i.e., bladder cancer in schistosomiasis patients (3, 6). However, systemic cancers may also result from long and chronic infections (10). Some reports have indicated a higher frequency of genetic damage, both in bone marrow cells and in peripheral lymphocytes of parasitised animals and patients, compared to that observed in uninfected donors or treated individuals (11-13). If this genetic damage is not repaired, the persistent antigenic stimulation characteristic of several helminthiases may increase the proliferation rate of damaged cells, and ultimately represent a promoting factor for haematological malignancies in parasitised individuals. Moreover, the mechanisms by which parasites evade the immune attack frequently lead to immunopathological changes that could affect immunological surveillance, a condition that may contribute to the cloning expansion of transformed cells.

Soluble factors secreted by parasites that may participate in carcinogenesis.

In order to survive in a disadvantageous and aggressive environment during long periods, helminths secrete several soluble factors that interact with host cells leading to the possibility that some of these molecules may modify host cell homeostasis and increase the risk for malignant transformation. A small RNA molecule secreted by *Taenia solium* cysticerci has the capacity to transform Syrian hamster embryo cells *in vitro* (14). Recently

we have found that this molecule induces DNA damage in human cultured lymphocytes, suggesting that this factor could induce genetic instability in infected individuals. Furthermore, parasite-secreted factors could also be involved in tumour promotion and progression, for instance the *Schistosoma* soluble egg antigen, one of the most important components in the pathology of schistosomiasis, has been shown to have a weak but significant tumour promoting activity (15). Although less characterised, it has been suggested that some protein components of *T. taeniaeformis* larval excretory-secretory products induce hyperplasia of the stomach in heavily infected rats (16). Additional studies should be conducted in order to investigate whether or not these factors alter the mechanisms that control cell proliferation, as well as to investigate their mutagenic and carcinogenic potential.

Final comments.

The relationship between parasites and cancer has been suggested several years ago, in fact, Johannes Fibiger was honoured with the Nobel Prize in 1926 for his work on gastric carcinoma induced by *Spiroptera carcinoma*. Fibiger's hypothesis was later questioned and forgotten; however, there is no doubt today that helminths can induce cancer both in animals and in humans. Apart from the mechanisms discussed above, certain studies suggest that parasites could harbour viral particles raising the provocative possibility of genetic exchange with their hosts that may also participate in the carcinogenesis process (17-18).

Bladder cancer induced by *S. haematobium* is perhaps the most investigated parasite-associated neoplasia, in which some of the molecular events that cause malignant transformation of normal cells have been identified, i.e., inactivation of p53, deletion of p16^{INK4}, and overexpression of Bcl-2 (19). Although the temporal occurrence of each of

those events along the multiple stages of carcinogenesis can be intuited, the evidences to sustain these inferences are still missing since the molecular findings have been mainly observed in advanced tumour stages. The use of animals in which malignant transformation can be generated as natural hosts by controlled infection with helminths may be a good opportunity to analyse the specific role of each parasite-induced event along the carcinogenic process.

The International Agency for Research on Cancer of the World Health Organisation has found sufficient evidence for a causal association between *S. haematobium* and *Opisthorchis viverrini* with specific cancers in humans (3). Nevertheless, the number of helminthiases for which there are indications of association with cancer is low compared to the large number of helminths that can infect humans (20). An explanation for this is the difficulty of studying the correlation between human parasitic diseases and cancer, due to the intricate natural history of both diseases. Both, cancer and most human helminthiases have a prolonged symptomless period and are long lasting disorders, along which many other endogenous and exogenous factors may interact and obscure a causal relationship. The impact of parasitic infections in cancer incidence is important mainly in countries where individuals harbouring worms live for long periods increasing the chance of malignant transformation. In these countries individuals are normally exposed to other xenobiotics, thus carcinogenesis in parasitised individuals may result from the interaction of multiple cancer risk factors.

References

- 1- Ames B, and Gold L. (1997). The causes and prevention of cancer: Gaining perspective. *Env. Health Perspect.* 105, 865-873.
- 2- Loeb K, and Loeb L. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379-385.
- 3- IARC. (1994). Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. IARC. Lyon: International Agency for Research on Cancer, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, no. 61.
- 4- Ohshima H, and Bartsch H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: Possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305, 253-264.
- 5- Burcham P. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: Their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13, 287-305.
- 6- Rosin M, Anwar W, and Ward A. (1994). Inflammation, chromosomal instability, and cancer: The schistosomiasis model. *Cancer Res. (Suppl.)* 54, 1929s-1933s.
- 7- Haswell-Elkins M, Satarug S, Tsuda M, Mairiang E, Esumi H, Sithithaworn P, Mairiang P, Saitoh M, Yongvanit P, and Elkins D. (1994). Liver fluke infection and cholangiocarcinoma: Model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 305, 241-252.
- 8- Montero R, Gentile G, Frederick L, McMannis J, Murphy T, Silva G, Blankespoor H, and Gentile J. (1999). Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis* 14, 217-220.

- 9- Rosin M, El Din Zaki S, Ward A, and Anwar W. (1994). Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat. Res.* 305, 283-292.
- 10- Herrera L, Benita A, Sotelo J, Chávez L, Olvera J, Rascón A, López M, and Ostrosky-Wegman P. (1999). Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. *Arch. Med. Res.* 30, 154-158.
- 11- Flisser A, González D, Plancarte A, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Stephano A, and Correa D. (1990). Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol. Res.* 76, 640-642.
- 12- Ilyinskikh E, Lepyehin A, Logvinov S, and Ilyinskikh N. (1998). Estimation of the mutagenic potential of the trematode *Opisthorchis felineus* in experimentally infected guinea pigs. *Parasitol. Res.* 84, 570-572.
- 13- Herrera L, Ramírez T, Rodríguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, Ramos F, Verdorfer I, Gebhart E, and Ostrosky-Wegman P. (2000). Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: Increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 94, 61-65.
- 14- Herrera L, Santiago P, Rojas G, Salazar P, Tato P, Molinari J, Schiffmann D, and Ostrosky-Wegman P. (1994). Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat. Res.* 305, 223-228.
- 15- Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Hayatsu H, Wataya Y, Arimoto S, and Tokuda H. (1989). Evaluation of the mutagenicity and the tumor-promoting activity of parasite extracts: *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis*. *Mutat. Res.* 224, 229-233.

- 16- Konno K, Oku Y, Nonaka N, and Kamiya M. (1999). Hyperplasia of gastric mucosa in donor rats orally infected with *Taenia taeniaeformis* eggs and in recipient rats surgically implanted with the larvae in the abdominal cavity. *Parasitol. Res.* 85, 431-436.
- 17- Laclette J, Merchant M, Damian R and Willms K. (1990). Crystals of virus-like particles in the metacestodes of *Taenia solium* and *T. crassiceps*. *J. Invertebr. Pathol.* 56, 215-221.
- 18- Khrantsov N, Chung P, Dykstra C, Griffiths J, Morgan U, Arrowood M, and Upton S. (2000). Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 86, 275-282.
- 19- Mostafa M, Sheweita S, and O'Connor P. (1999). Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 97-111.
- 20-Crompton D. (1999). How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* 85, 397-403.

Figure legend

Figure 1- Events occurring during human parasitic infections that may influence the multistage carcinogenic process. Parasites could initiate carcinogenesis by direct action of genotoxic factors, either secreted by them or produced during the inflammatory response. Instability of the host genome can be influenced by: products of the inflammatory response, an increased proliferative response of host cells to repair the tissue damage incurred during inflammation, soluble factors secreted by the parasite, and by the clonal expansion of some host cells induced by a persistent antigen stimulation. This genetic instability of host cells causes changes in regulation of oncogenes and tumour suppressor genes, which play an important role in tumour progression. An altered immunological surveillance may enable the clonal expansion of initiated cells, thereby enhancing the development of malignancy.

