



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología.

EFFECTOS CITOTÓXICOS Y GENOTÓXICOS DEL ALBENDAZOL Y SUS METABOLITOS EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A :

TZUTZUY RAMÍREZ HERNÁNDEZ

Director de Tesis: Dr. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
MÉXICO SECC. ESCOLAR
2000



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis
Efectos citotóxicos y genotóxicos del albendazol y sus
metabolitos en linfocitos humanos de sangre periférica.

realizado por Tzutzuy Ramírez Hernández

con número de cuenta 9650436-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Biólogo Luis A. Herrera Montalvo

Propietario Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Propietario Dra. Patricia Ostrosky-Wegman

Suplente Dra. Ma. Eugenia Gonsbatt Bonanarte

Suplente Dr. Emilio Rojas del Castillo

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Dedicado a

Mis Papás

Ma. De la Paz Hernández y Antonio Ramírez

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Luis A. Herrera Montalvo, en el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradecimiento Especial

A la Dra. Patricia Ostrosky-Wegman

Por abirme las puertas de su laboratorio y brindarme siempre su apoyo personal y académico desde el inicio de mi formación profesional.

Al Dr. Luis A. Herrera Montalvo

Por saber dirigir mis ideas y entusiasmo científico.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo

Por su disposición para orientarme y contribuir en mi formación académica.

Agradecimientos

A mis Padres:

Ma. De la Paz Hernández y Antonio Ramírez no sólo por darme el ser, sino por formarme como ser humano, darme los valores de superación para salir adelante en la vida y por ser mis mejores amigos.

A mis hermanos:

Hali y Ram por compartir conmigo todos los momentos de mi vida.

A mis tíos:

Lila, Jesús y José por hacerme sentir su presencia y apoyo en todo momento.

A mis amigos por darme su apoyo y cariño incondicional: Lulú O., Adriana R., Mariana R., Selene S., Nadia R., Adriana M., Luis P, Monserrat S., Mariana P., Jessica P., Paty M., Rosario C.

A todo el Laboratorio por aceptarme como soy y brindarme su amistad: Monse, Adrianita, Patito, Magy Carmen, Andreita, Sandra, Carmen, Daniel, Mahara, Gaby, Anita y Auro, Paty R.

A las doctoras: Rosario Rodríguez Arnaiz y Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por sus aportaciones y críticas al presente trabajo.

Al Dr. Raymundo Cea por hacer posible la realización de los ensayos de resonancia magnética nuclear.

A mis donadores estrella, ya que sin su sangre no hubiera sido posible la realización de esta tesis: Luis Serrano y Salomón Martínez.

A la Q.F.B. Monserrat Sordo Cedeño por todo el apoyo técnico y académico que me ha brindado durante toda mi estancia en el laboratorio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
• Impacto de las parasitosis en la salud de los seres humanos.....	2
• Uso de los benzimidazoles como agentes antiparasitarios.....	4
• Química del albendazol.....	5
• Metabolismo del albendazol.....	7
• Mecanismo de acción del albendazol.....	11
• Usos del albendazol en el tratamiento de parasitosis en humanos.....	15
• Toxicología del albendazol.....	17
• Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en estudios de genotóxicidad.....	20
• Evaluación de la cinética de proliferación celular.....	24
• Factores que pueden influir sobre la cinética de proliferación Celular.....	27
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	30
HIPÓTESIS	30
MATERIAL Y MÉTODO	31
• Evaluación de la posible interacción albendazol/sulfoxido de albendazol-DMSO	31
• Donadores	31
• Evaluación del efecto del albendazol y sus metabolitos sobre la cinética de proliferación linfocitaria	32
• Evaluación del efecto sobre la frecuencia de micronúcleos	33
• Análisis estadístico	34
RESULTADOS	35
• Efecto en el índice mitótico y la cinética de proliferación celular	35
• Efecto sobre la frecuencia de células micronucleadas	36
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	42
ABREVIATURAS	43
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

El albendazol (ABZ) es un antiparasitario usado para el tratamiento de diversas helmintosis. Una vez administrado por vía oral, este compuesto se metaboliza en sulfóxido (SOABZ) y sulfona (SO₂ABZ) de ABZ, siendo el SOABZ el metabolito activo. A pesar de que actualmente se usa con frecuencia en la clínica humana, existen pocos estudios acerca de su toxicología genética en células de seres humanos. La actividad biológica del ABZ se ha asociado con su capacidad para unirse a la tubulina interfiriendo con la formación de los microtubulos (MT). En el presente trabajo se evaluaron los efectos *in vitro* del ABZ y sus metabolitos sobre la proliferación celular y la frecuencia de células con micronucleos (MN) en linfocitos de sangre periférica humana. Los resultados mostraron que la SO₂ABZ no produjo ningún efecto significativo, mientras que el ABZ y el SOABZ detuvieron el ciclo celular en metafase e incrementaron la frecuencia de MN. Estas alteraciones podrían deberse a la interacción de ambas sustancias con los MT, ya que dicha interacción provoca el rezago cromosómico al evitar la adecuada polimerización de los MT, deteniendo la progresión a anafase hasta que todos los cromosomas alcancen la placa metafásica. Una vez que las células ingresan a anafase, se puede originar el retraso de cromosomas por inhibición de la depolimerización de los MT, promoviendo la formación de MN con cromosomas completos. No obstante, aún no se puede descartar el que los MN inducidos por ambas sustancias contengan fragmentos acentricos. Es importante mencionar que las dosis a las cuales se observaron estos efectos son difíciles de encontrar *in vivo*, por lo que es necesario evaluar otros efectos, como la no disyunción, que ocurren a dosis bajas

INTRODUCCIÓN

Impacto de las parasitosis en la salud de los seres humanos

Las helmintosis se encuentran entre las enfermedades más comunes en los seres humanos afectando la salud y productividad de más del 10 % de la población mundial (Crompton, 1999). Las consecuencias de las parasitosis en el desarrollo físico y mental de la población infantil son más severas que en los adultos ya que son la causa principal de desnutrición, anemia, disentería, retraso en la pubertad y de problemas en el aprendizaje-memoria (Sundaram et al., 1995). Además se calcula que las parasitosis provocan la muerte de por lo menos 150,000 niños al año, ya sea por obstrucción intestinal o por otro tipo de complicaciones abdominales ocasionadas por los parásitos adultos (UNICEF, 1998), es por eso que gran parte de los esfuerzos para combatir estas enfermedades se realizan en menores de edad.

Considerando que los hábitos higiénicos y medidas sanitarias inadecuados facilitan la transmisión de los parásitos, es comprensible que estas enfermedades ocupen un lugar importante en las tasas de morbi-mortalidad de la población de países en vías de desarrollo los cuales son incluso sitios endémicos de ciertas especies (Crompton, 1999). Por ejemplo, la infección por *Ascaris lumbricoides* es la helmintosis más común en los seres humanos, ya que está presente en aproximadamente 1,500 millones de personas con una distribución cosmopolita, mientras que alrededor de 115 millones de habitantes de África padecen esquistosomiosis (UNICEF, 1998). Además algunos hábitos como el consumo de carne

cruda y el uso de heces humanas como abono, favorecen la diseminación y prevalencia de ciertos parásitos en algunas regiones (Flisser, 1988).

El control de las parasitosis intestinales se basa en la implementación de letrinas y promoción de su uso, así como de mejoras en la higiene personal, uso de calzado, suministro de agua potable, educación y saneamiento ambiental. Mientras que en los países desarrollados estas medidas se adoptaron de manera definitiva desde hace varios años, en los países más pobres se llevan a cabo de manera esporádica, por lo que, los resultados no han sido tan favorables ya que para esto se requiere de un esfuerzo permanente sumado a un desarrollo socio-económico paralelo. En los últimos años, con el desarrollo de nuevos medicamentos antiparasitarios de baja toxicidad, amplio espectro parasitocida, gran efectividad, y bajo costo, se han empleado en el tratamiento comunitario, como una medida coadyuvante en el control de diversas parasitosis.

Estos programas de desparasitación están dirigidos contra helmintosis que son susceptibles de ser tratadas con dosis únicas del medicamento seleccionado. En México se decidió aprovechar la infraestructura de las campañas de vacunación para implementar la desparasitación masiva mediante la administración de una dosis de albendazol (ABZ) a los menores de edad. Fue así como a partir de 1993 se instituyeron las semanas nacionales de salud, en las que aparte de las vacunas administradas, se da una dosis de vitamina A y una dosis de 400 mg de ABZ.

Uso de los benzimidazoles como agentes antiparasitarios

El descubrimiento del tiabendazol (TBZ) en 1961 abrió las puertas para el desarrollo de un rango muy amplio de compuestos llamados benzimidazoles (BZ) útiles en el tratamiento de las helmintosis, aunque su uso en la clínica humana era restringido a causa de su toxicidad (Horton, 1990). Con el advenimiento de BZ menos tóxicos, se dejó a un lado el uso del TBZ y en la actualidad sólo se utiliza en los seres humanos para el tratamiento de strongiloidosis. Hoy en día, los BZ se utilizan frecuentemente para el tratamiento de parásitos intestinales ya que presentan, a diferencia de otros antiparasitarios, un amplio espectro de acción, eficacia contra estados inmaduros del parásito y baja toxicidad. (Campbell, 1990; Sánchez et al., 1993; Townsend y Wise, 1990).

En la práctica clínica humana se usan comúnmente tres BZ: ABZ, el flubendazol y el mebendazol (MBZ). Estos han mostrado ser muy efectivos y seguros para el tratamiento de la mayoría de las infecciones provocadas por helmintos a nivel intestinal, además de que son útiles tanto a nivel masivo como individual (Horton, 1990). En general, los BZ presentan una absorción limitada y un metabolismo rápido, por lo que se pensaba que a nivel sistémico sólo eran efectivos a dosis elevadas durante varios días (Sánchez et al., 1993; Whittaker et al., 1991). Sin embargo, se han demostrado que son útiles para el tratamiento de enfermedades como la neurocisticercosis (NCC) a dosis bajas y no prolongadas (Alarcón et al., 1989; Sotelo y Jung, 1998).

Dentro de los BZ, y en general de los antihelmínticos, uno de los fármacos más efectivos es el ABZ (Mascie et al., 1999). Este medicamento se introdujo en 1979 y desde entonces ha sido utilizado en el tratamiento de una gran variedad de infecciones

parasitarias. En la mayoría de los casos, el ABZ ha mostrado ser mas eficaz que el mebendazol (MBZ) (Cook, 1990; McCracken et al., 1992). En 1996 el uso del ABZ fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la NCC y enfermedades hidatídicas.

Química del ABZ

Cuando hablamos de un BZ nos referimos a un sistema que consta de un anillo bicíclico en el cual el benceno se ha fusionado en la posición 4-5 del heterociclo (imidazol) [Fig1]. Los compuestos BZ en general, y los BZ carbamatados (BZc) en particular, son materiales cristalinos con puntos de fusión bajos y relativamente insolubles en agua (Townsend y Wise, 1990). Estos compuestos son insustituibles en cualquiera de los átomos de nitrógeno del imidazol poseyendo tanto características ácidas como básicas.

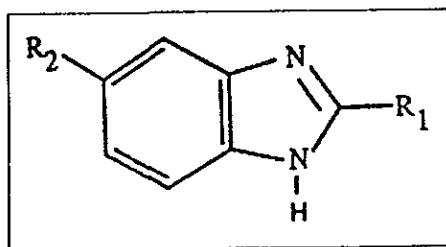


Fig. 1.- Estructura química de los BZ

La ruta sintética de varios BZ usualmente se realiza en dos pasos (Townsend y Wise, 1990), el primero es la construcción de un anillo benceno, el cual contiene el sustituyente deseado y un grupo 1,2-diamino seguido por un anillo cerrado derivado de 1, 2 -diaminobenceno (o-fenilendiamino) para construir el anillo imidazol. En muchos casos

este anillo se encierra en el último paso de la síntesis. En otros casos, el cierre de este anillo es seguido por derivaciones extensas de sustitutos exocíclicos.

Hablando en el caso particular del ABZ (metil[5-(propiltiol)-H-benzimidazol-2-yl]carbamato), conocido en México como Zentel (El Amri et al., 1987; FDA, 1989), presenta la siguiente fórmula condensada $C_{12} H_{15} N_3 O_2 S$; con un peso molecular de 265.33, teniendo C en 54.32 %; H en 5.7%; N en 15.84 %; O en 12.06 % y S en 12.08 % (Index Merck, 1989). Además contiene un sustituto alifático, el grupo benzoil en la posición 5 del MBZ es reemplazado por un grupo propiltiol (Fig. 2), a este último grupo es al que se le atribuye la efectividad del ABZ como antihelmíntico, superando por mucho al MBZ (Mc Cracken et al., 1992). La sulfoxidación del ABZ a sulfóxido de ABZ (SOABZ) y sulfona de ABZ (SO_2ABZ), son los primeros pasos en la bioconversión (Gyurik et al., 1981). Esta oxidación es importante para la actividad antielmíntica y toxicidad del ABZ (Delatour et al., 1981,1984).

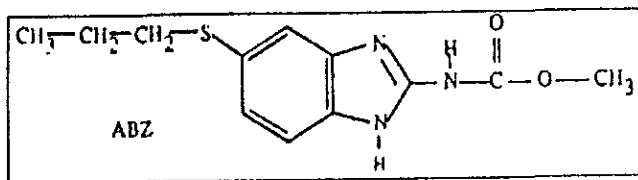


Fig. 2.- Estructura química del ABZ.

Metabolismo del ABZ

Los datos farmacocinéticos del ABZ después de la administración oral son difíciles de interpretar, probablemente por la disolución limitada y errática del fármaco, así como por los problemas de absorción *in vivo* (Sotelo y Jung, 1998). Sin embargo, se ha visto que la efectividad del ABZ radica en la habilidad que tiene para penetrar en el sitio en el cual se localiza el parásito. En general, se ha encontrado que en humanos el ABZ se absorbe en poca cantidad (alrededor del 5%) después de su administración oral. A dosis de 6.6 mg/kg de ABZ la concentración en plasma de SOABZ alcanza un máximo de 0.25 a 0.30 $\mu\text{g/ml}$ después de aproximadamente 2 h (Dominguez et al., 1995). La vida media del SOABZ es de 10 h (Jung et al., 1992) mientras que la del ABZ es de aproximadamente 8.5 h (Lauge et al., 1988).

En un estudio, en el que se administró ABZ a pacientes con NCC a dosis de 15 mg/kg de peso tres veces al día durante 8 días, se detectaron niveles de SOABZ de 0.918 ± 0.216 $\mu\text{g/ml}$ en plasma y 0.392 ± 0.073 $\mu\text{g/ml}$ en fluido cerebroespinal (CSF). La concentración de ABZ en CSF comparada con la del plasma fue del orden de 43 % y, sin embargo, en los pacientes tratados el número de lesiones cerebrales disminuyó en un 87% (Jung et al., 1992). Ese trabajo fue el primero en medir la concentración de ABZ en CSF y demostró la permeabilidad del espacio subaracnoideo al SOABZ, el paso es por difusión y no se incrementa aún después del rompimiento de la barrera subaracnoidea durante la inflamación secundaria a la enfermedad.

La oxidación del ABZ es importante para la actividad antihelmíntica y toxicidad del ABZ (Delatour et al., 1981, 1984) ya que el SOABZ (farmacológicamente activo y embriotóxico en ratas) y la SO_2ABZ (terapéuticamente y toxicológicamente inactiva), y no

el fármaco original, son los metabolitos presentes en mayor concentración que se han encontrado en muestras de plasma, tejido y orina (Delatour y Parish, 1986; Delatour et al, 1990; El Amri et al, 1988 a y b; Gyurik et al., 1981; Hennessy et al., 1993; Marriner et al., 1986). El SOABZ ha sido identificado como el metabolito con actividad antihelmíntica contra adultos de *Fasciola hepatica* en el conducto biliar de borrego (Hennessy et al., 1993) y además es el metabolito que está presente en mayor abundancia en la bilis de borrego (Hennessy et al, 1993) y de ratas (El Amri et al., 1988 b).

Otros estudios sobre la farmacocinética del ABZ en ratas (Lawrenz et al., 1992) refuerzan el hecho de que después de la administración oral, el ABZ se biotransforma rápida y completamente en SOABZ, además se ha visto que no sólo el hígado tiene la capacidad de sulfoxidar y sulfonizar al ABZ, sino que el intestino también puede sulfoxidar y absorber el metabolito SOABZ, más no el ABZ. También se ha encontrado que después de administrado el ABZ, las concentraciones en plasma son muy variables entre los individuos y presentan una vida media entre 6-15 h. En pacientes con obstrucción extrahepática, el proceso de eliminación se prolonga y las concentraciones en el plasma se incrementan (El-Mufti et al., 1993). Sin embargo, no sólo se puede incrementar la concentración de ABZ en plasma a través de este mecanismo, sino que además se ha visto que la administración conjunta de ABZ con dexametasona o con PZQ también la incrementan (Sotelo et al., 1988).

El metabolismo del ABZ se caracteriza por la oxidación del heteroátomo nucleofílico. Los metabolitos SOABZ y SO₂ABZ abundan en el plasma y dominan sobre otros metabolitos en la orina. aunque la proporción exacta de cada uno varía considerablemente entre especies, ello aunado a que el compuesto original se ha detectado

en cantidades traza ($<0.01\mu\text{g/ml}$) (Gottschall et al., 1990). El metabolismo del ABZ fue estudiado por Gyurik et al. (1981), en bovino, borrego, rata y ratón. La excreción total de orina del fármaco administrado marcado con ^{14}C varió de 59.1 % en bovinos a solo 19.5 % en ratón. Sin embargo, se encontró que el SOABZ fue el metabolito más abundante en la orina (22.9 -26.6 %) en todas las especies probadas, mientras que la SO_2ABZ contribuyó en menos del 6 % al total de los metabolitos excretados. La oxidación a SO_2ABZ es la primera reacción metabólica, pero una vez completada se desencadenan una serie de reacciones importantes. Por ejemplo, Gyurik et al. (1981), detectaron el metabolito 2-aminosulfona derivado de la oxidación del azufre y la hidrólisis del carbamato a niveles altos en todos los mamíferos exceptuando el ratón. Cuando el ABZ se incubó con microsomas de hígado de borrego (Delatour y Parish, 1986 y Gottschall et al., 1990), rápidamente se observó una oxidación a SOABZ dependiente de NADPH. La formación de SOABZ se inhibió por clorpromazina y FBZ, mientras que los inhibidores clásicos del citocromo P-450 (*CYP*), como monóxido de carbono, imidazol y SKF 525- A no tuvieron efecto. Estos datos muestran que la conversión de ABZ a SOABZ no está catalizada por *CYP* sino por flavin-adenin-dinucleotido-monoxigenasa (FMO). En otros estudios acerca del metabolismo del ABZ (Fargetton et al., 1986; Moroni et al., 1995) se muestra que en microsomas de hígado de rata la reacción metabólica de ABZ a SOABZ involucra además de las FMO a las familias *CYP3A* y *CYP2B*. A diferencia de esto, la reacción de oxidación del SOABZ a SO_2ABZ está mediada exclusivamente por *CYP* en hígado de rata perfundido, estudios en los que se han utilizado inductores específicos de *CYP* muestran que alguna de la isoenzima de la familia *CYP1A1* es responsable de la sulfonación del ABZ (El Amri et al., 1988 a, b; Fargetton et al., 1986).

Un estudio reciente realizado en borregos (Cristófol et al., 1998), sugiere que existen diferencias entre machos y hembras en cuanto a la disposición de los metabolitos del ABZ después de la administración oral de 20 mg/kg de netobimina (una prodroga del ABZ). Los picos de concentración y las áreas bajo la curva de los metabolitos sulfonados fueron más altos en los machos, sugiriendo una mayor tasa de oxidación comparada con la de las hembras. La excreción en orina de los metabolitos del ABZ, SOABZ y SO₂ABZ y amino-sulfona parecen ser mayores en las hembras que en los machos principalmente la del SOABZ. Estas diferencias entre los sexos pueden ser causadas por las hormonas ya que la testosterona y la progesterona pueden inducir o inhibir el metabolismo del CYP del microsoma. También se observaron diferencias entre la rapidez de unión de los metabolitos a la albúmina y las globinas del borrego, los machos mostraron un nivel de unión significativamente menor que en el caso de las hembras. Estas diferencias quizá se deban a la presencia de ácidos grasos no esterificados, ya que los machos al tener este tipo de ácidos en cantidades elevadas en plasma podrían competir con la albúmina para unirse a los metabolitos del ABZ.

En pacientes con NCC bajo tratamiento con ABZ se ha estudiado la unión a proteínas que presenta este fármaco (Jung et al., 1998), y se ha visto que se une en un 89-92% a proteínas del plasma, mientras que el SOABZ lo hace en un 62-67 %, este metabolito se une a la albúmina y a la glicoproteína α -1. Estos datos refuerzan la idea de que la absorción del ABZ es limitada en el tracto gastrointestinal por su poca solubilidad.

Mecanismo de acción del ABZ

El desarrollo de un gran número de BZ culminó en el uso de más de 15 y algunas prodrugas de los mismos. Sin embargo, para la mayoría de ellos no se conocía el mecanismo de acción. Los primeros estudios se encaminaron hacia la modificación del metabolismo de los carbohidratos (Malkin et al., 1972; Prichard, 1973; Rahman et al., 1977; Romanowski et al., 1975), mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa y la disminución en las reservas de glucógeno al inhibir la captación de glucosa. Sin embargo, también se vio que los BZ inhibían la secreción de acetil colinesterasa en los helmintos, al igual que la colchicina, un potente inhibidor de la polimerización de los microtúbulos (MT), de tal forma que se propuso que los BZ actuaban preferencialmente sobre la polimerización de la tubulina (Fig. 3). A mediados de los años 80, se realizaron estudios en células embrionarias de ratón tratadas con diversos BZ, en donde se observó una detención en la diferenciación y desarrollo de células (Lacey et al., 1987 a), por lo que concluyó que el mecanismo de acción más importante de estos fármacos involucra interacciones con una de las proteínas del citoesqueleto de eucariontes, la tubulina.

Los MT son subunidades de tubulina la cual es una proteína dimérica compuesta de subunidades la α y la β de aproximadamente 50 kDa cada una. Estructuralmente tanto α como β tubulina son proteínas heterogéneas, productos de familias multigénicas y de modificaciones post-traduccionales. Los MT existen en un equilibrio dinámico con la tubulina, sin embargo, dicho equilibrio puede alterarse tanto *in vivo* como *in vitro* por sustancias exógenas conocidas como inhibidoras de MT (Lacey, 1988). Muchas de estas

sustancias, actúan como inhibidores cuando se unen a la tubulina previniendo su asociación en forma de MT. Mientras que otras se unen directamente a los MT en crecimiento, promoviendo lo que se conoce como el "encapuchamiento", como resultado de este encapuchamiento del MT se inhibe el crecimiento del mismo. De tal forma que tenemos dos mecanismos de inhibición de MT, el primero es por la una unión del compuesto a los dímeros de tubulina y el segundo por encapuchamiento de MT en crecimiento. Algunos de los inhibidores de MT bien conocidos son la vinblastina y la vincristina, los cuales se utilizan en la quimioterapia contra el cáncer, pero muchos otros son muy tóxicos para uso terapéutico.

Se ha visto que uno de los mecanismos de acción determinantes de los BZ se da mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina en MT. En el año de 1987, (Lacey et al., 1987 b) se reportó una correlación entre la inhibición del desarrollo de los huevos de *Haemoncus contortus* y la inhibición de la polimerización de la tubulina del cerebro de mamíferos, causado por los BZ. De tal forma que postularon que el mecanismo de acción de los BZ en el desarrollo de los huevos involucraba procesos dependientes de la inhibición de los MT .

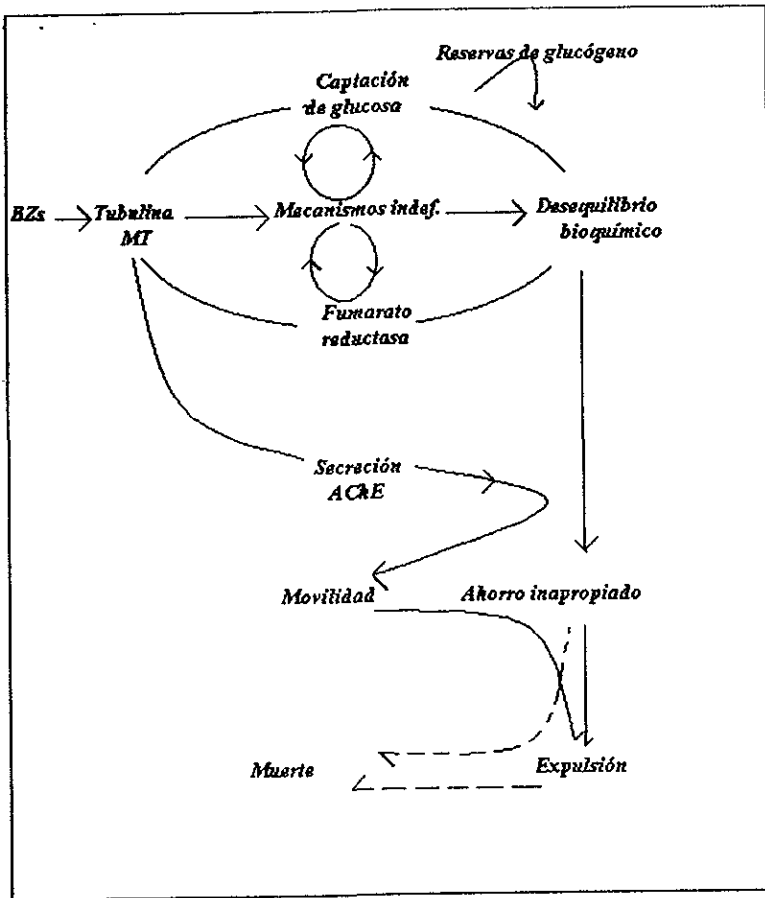


Fig.3.- Mecanismo de acción de los BZ

Otros estudios en los que se realizó la caracterización inicial de los BZ como inhibidores de la unión de la colchicina a la tubulina embrionaria de *Ascaris suum*, demostraron que esta inhibición era de 250 hasta 400 veces mayor que la inhibición que se daba en la tubulina de mamíferos, lo cual sugirió una posible selectividad de parte de los BZ por la tubulina del parásito y no por la del hospedero (Friedman y Platzer, 1980). Al

realizar la comparación de ligando-unión con ^3H -colchicina y BZ, se confirmó que los BZ interactúan con el dominio de unión de la colchicina (Lacey, 1988).

La potente actividad de los BZ como inhibidores de la polimerización de tubulina de mamíferos y parásitos *in vitro e in vivo* es paradójica. ¿Por qué la toxicidad de estos compuestos es baja en mamíferos, si los BZ tienen una gran capacidad inhibitoria sobre los MT? y ¿Cómo pueden los BZ interactuar con una proteína común en mamíferos y helmintos y sólo matar a los últimos? Recientemente, con el desarrollo de técnicas *in vitro* para medir la actividad larvicida se ha visto que existe una cierta selectividad por las células de nemátodos, de tal manera que esto podría explicar su alta eficiencia parasitocida y su toxicidad baja en el hospedero (Russell et al., 1992). Sin embargo, existen reportes en donde esto no se observa, Köhler y Bachmann (1981) no encontraron ninguna diferencia de afinidad por la tubulina, por lo que concluyeron que la selectividad está dada por las diferencias farmacocinéticas de los BZ dentro del hospedero y del parásito.

La demostración de la selectividad de unión de los BZ entre la tubulina de parásitos o de mamíferos, provee un argumento fundamental para decir que la tubulina es el sitio de acción de los BZ. Por lo que se dice que su mecanismo de acción puede relacionarse directamente a una interacción con la tubulina en tres aspectos importantes de la interacción parásito-droga: 1.- relación estructura-actividad, 2.- selectividad de especies y 3.- resistencia a la droga (Lacey, 1988).

La afinidad de unión de los BZ a la tubulina del hospedero es mucho menor que a la tubulina del parásito y esta puede ser la razón por la cual se da la acción selectiva de los BZ. Estudios moleculares de resistencia en eucariontes susceptibles a BZ, tales como

Neurospora crassa y *Saccharomyces cerevisiae* también indican que esta resistencia es causada por cambios estructurales en los genes de la β -tubulina. El complejo BZ - tubulina del parásito, como el complejo colchicina- tubulina de cerebro de mamífero, es pseudo reversible, aunque la unión es no covalente se ha visto que el ligando no es fácilmente removido sin desnaturalizar la proteína (Lacey, 1988).

Usos del ABZ en el tratamiento de parasitosis en humanos

El ABZ es uno de los medicamentos antiparasitarios más empleados actualmente tanto individual como masivamente en campañas de desparasitación. En nuestro país, desde 1993, las instituciones que conforman el Sistema Nacional de Salud decidieron aprovechar la experiencia e infraestructura existente para las entonces llamadas Semanas Nacionales de Vacunación, y ofrecer un conjunto de acciones básicas de prevención a la población de mayor riesgo. Es así como se instituyeron las Semanas Nacionales de Salud en las que se inició la administración de vitamina A y de antiparasitarios a menores de edad (Tabla 1). Esta última con la finalidad de reducir la tasa de infecciones por parásitos intestinales en la población y el impacto negativo de las parasitosis en el crecimiento y desarrollo infantiles. Desde la 3ª. Semana Nacional de Salud de 1993, se proporciona una dosis de 400 mg de ABZ a los preescolares y niños de primaria y secundaria ubicadas en los municipios definidos por autoridades de salud, como aquellos en que su población tiene mayor riesgo de enfermar por helmintos (SSA, 1998).

Además de la efectividad del ABZ para el tratamiento de parásitos intestinales, este fármaco se ha usado cada vez más contra enfermedades parasitarias sistémicas, como la

NCC y el quiste hidatídico. En un estudio realizado por Sotelo et al. (1988) se comparó la efectividad del ABZ con respecto a la del PZQ en el tratamiento de cisticercosis en parénquima cerebral. La dosis de ABZ utilizada fue de 15 mg/kg de peso al día durante 1 mes, los datos mostraron que el ABZ redujo las lesiones quísticas hasta en un 76%, de manera muy similar al PZQ. Aunque el uso del ABZ contra la NCC aún está en evaluación, se emplea en la mayoría de los casos en los que el tratamiento con PZQ falla, en éstos la dosis que se utiliza es de 15 mg/kg diario durante un mes. Alarcón et al. (1989), trataron 23 pacientes con NCC durante un período de 30 días con ABZ. Nueve pacientes recibieron dosis de 15 mg/kg de peso corporal por 3 días; 9 recibieron la misma dosis administrada durante 30 días, y 5 sólo recibieron tratamiento para los síntomas. Los resultados indicaron que el ABZ es un medicamento efectivo a los tres días de tratamiento tanto como si se hubiera administrado durante un mes.

Para combatir la hidatidosis en humanos se ha utilizado ABZ a dosis de 10 mg/kg de cuerpo/ durante 1 día en ciclos de 28 días separados por 14 días sin tratamiento. La eficacia de la quimioterapia fue evaluada mediante pruebas clínicas y cambios en la morfología del quiste. Los resultados mostraron que de 134 pacientes con hidatidosis, 67 tuvieron remisión total, mientras que de los otros 67 solo el 79 % tuvo respuesta parcial al fármaco y el otro 21 % no presentó ninguna mejoría. Sin embargo, los quistes presentaban modificaciones en su estructura interna. Además pudo observarse que la respuesta al fármaco depende del tamaño y el sitio del quiste (Radulescu, et al., 1997).

El ABZ también ha sido empleado contra infecciones por protozoarios como *Giardia sp.* incluso 400 mg de ABZ durante 5 días son igual de efectivos que el tratamiento

con metronidazol pero sus efectos secundarios son mucho menores lo que lo hace apropiado para su uso en niños (Hall y Nahar, 1993; Misra, 1995).

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

Toxicología del ABZ

Los datos sobre la toxicología del ABZ se han realizado en bovinos, ratas y conejos, mientras que los reportes en humanos son más escasos. En un estudio realizado en bovinos (FDA, 1989) dosis superiores a 75 mg/kg/día provocaron cuadros de toxicidad, como decremento en la actividad, anorexia seguida de severas diarreas y en algunos animales inclusive se presentó la muerte. En ratas, dosis menores o iguales a 30 mg/kg/día no provocaron ningún efecto tóxico tanto en machos como en hembras. Mientras que en perros esta dosis es altamente tóxica, provocando disresia hematológica, reducción en el peso corporal dentro de la cual cabe resaltar el peso testicular y una disminución en la cantidad de leucocitos (FDA, 1989).

En lo que respecta a su toxicología genética, los datos (FDA, 1989) muestran que 40 mg de ABZ/kg/día reducen la viabilidad del producto en ratas preñadas, además de producir malformaciones óseas. Otros estudios (FDA, 1989) muestran que 10 mg/kg/día son embriotóxicos en fetos de rata, disminuyendo la viabilidad, el peso y la talla de los fetos, mientras que dosis menores e iguales a 5 mg/kg/día no causan ningún efecto sobre estos. Al igual que otros BZ, el ABZ es teratogénico en ratas (Delatour et al., 1981). La posibilidad de que la teratogenicidad pueda resultar de la disrupción del citoesqueleto ha recibido poca atención, ya que no se considera que alteraciones en los MT durante las divisiones mitóticas de la embriogénesis pueden alterar el desarrollo embrionario (Whittaker, y Faustman, 1991).

En un estudio realizado en células de cerebro medio y de médula espinal (Whittaker y Faustman, 1991), tanto el ABZ como el SOABZ fueron inhibidores potentes del crecimiento y la diferenciación celular, provocando una acumulación de células en mitosis. En los mamíferos la actividad antimitótica de los BZ se refleja en efectos tóxicos como teratogenicidad, alopecia y leucopenia (Delatour y Parish, 1986). Otras manifestaciones de esta actividad antimitótica se han observado en varios sistemas *in vitro* e incluyen detención del ciclo celular (Delatour y Parish, 1986), disrupción del citoesqueleto, inducción de micronúcleos (MN) (Citado en Whittaker et al., 1991) y formación de células aneuploides (Whittaker et al., 1988, 1989).

En humanos el ABZ provoca efectos secundarios limitados como: dolores de cabeza y nausea en los pacientes con NCC, y para los que tienen enfermedades hidatídicas pueden presentarse disfunción del hígado, dolor abdominal y/o nausea (FDA, 1989). Se piensa (El Amri et al., 1987) que el ABZ puede tener otro tipo de resultados tóxicos, ya que induce la actividad del *CYP1A*, el cual produce en muchos casos metabolitos tóxicos (carcinógenos o hepatotóxicos) (Ioannides et al., 1983, 1984; Parke e Ioannides, 1984); sin embargo, varias sustancias como la β -naftoflavona, capaces de inducir el *CYP1A*, no son carcinogénicas. La respuesta a estas interrogantes requiere de más investigación, aunque algunos derivados BZ se han reportado como mutagénicos/carcinogénicos, la expresión de estos efectos requiere del uso de elevadas dosis del fármaco (Delatour y Parish, 1986).

Recientemente se realizó un estudio con 622 niños mexicanos, los cuales se dividieron en las categorías de poco parasitados y muy parasitados, y fueron tratados con ABZ durante tres períodos a lo largo de un año. Se evaluó su crecimiento corporal y se encontró que los niños muy parasitados a los que se administró 400 mg de ABZ durante tres días incrementaron su talla corporal, mientras que los niños poco parasitados tratados con una dosis de 400 mg de ABZ presentaron una disminución en su crecimiento (Forrester, 1998).

Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en estudios de genotoxicidad

Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para la evaluación de los efectos genotóxicos de agentes químicos. Uno de los métodos más empleados en la actualidad, debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez, es la determinación de la frecuencia de células con micronúcleo (MN), después del tratamiento *in vitro* o *in vivo*. Los MN son fragmentos del núcleo celular que se forman como consecuencia de una división mitótica o meiótica errónea (Rieger et al., 1968; Von Ledebur et al., 1973). Dichas irregularidades provocaban la pérdida de una porción o de todo un cromosoma, el cual podía incluirse en alguna de las células hijas después de la citocinesis (Fenech, 1997).

La exposición de un gran número de personas a la radiación ionizante de la bomba atómica de Japón estimuló un período de investigación cuyo objetivo fue evaluar las posibles repercusiones genéticas de las radiaciones. Estos estudios demostraron un incremento en la aparición de MN después del tratamiento con diferentes tipos de radiación (Thoday, 1951), lo que promovió el uso de la frecuencia de células con MN como una medida de daño genético. Posteriormente (Hedde, 1973) se reportó la inducción de MN *in vivo* en células hematopoyéticas de ratón expuestas a diversos mutágenos, estos datos indicaron que la frecuencia de MN era un método simple y rápido para la detección y cuantificación de daño genético en animales. Cincuenta años antes de estos estudios ya se conocían los MN *in vivo*. Los hematólogos Howell y Jolly describieron cuerpos nucleares que se teñían con el colorante feulgen en reticulocitos humanos. Estos cuerpos Howell-Jolly representan cromosomas que se han separado del huso mitótico, que son poco

frecuentes en individuos sanos, pero característicos de personas esplenectomizadas y con anemia hemolítica.

La técnica de MN originalmente se desarrolló para la evaluación del daño inducido por la radiación ionizante, aunque poco después se amplió su uso para el análisis de otros mutágenos (Heddle et al., 1983). Sin embargo, el análisis de MN en linfocitos de sangre periférica de seres humanos tuvo varios problemas, uno de los más importantes fue la fragilidad de las células durante la preparación de las laminillas, lo que provocaba el desplazamiento de los MN de las células que les habían dado origen. Esto se solucionó con el desarrollo de nuevos procesos de manejo de las muestras, así como de modificaciones hipotónicas, las cuales preservan el citoplasma y retienen el o los MN dentro de la célula parental (Hogstedt, 1984; Iskander, 1979). Sin embargo, el problema más grave fue la respuesta variable de los linfocitos a la estimulación mitogénica, y la presencia de células en cultivo que no entraron en división y por lo tanto no podían dar origen a ningún MN. Por lo anterior se desarrollaron metodologías para identificar a las células que se habían dividido una vez en cultivo y poder hacer una estimación real de la frecuencia de MN. Dentro de las metodologías más relevantes están el marcaje de la síntesis de ADN y el bloqueo de la citocinesis. Para marcar la síntesis de ADN se utilizó la bromodesoxiuridina (Pincu et al., 1984) o la timidina tritiada (Fenech y Morley, 1985). No obstante, cuando se empleaba timidina tritiada, la intensidad de los núcleos interfásicos de las células que se han dividido sólo una vez en cultivo y de las que lo han hecho más de una vez, es la misma. Además la marca radiactiva por sí misma producía daño cromosómico y podía incrementar la frecuencia real de MN dándonos un método poco confiable. El bloqueo de la citocinesis

que utiliza citocalasina B (Cyt-B) es la metodología que revolucionó la prueba de MN por ser efectiva para identificar a las células que se han dividido una vez en cultivo (Fig. 4), ya que estas se observan como células binucleadas (CBN), debido al efecto inhibitor de la Cyt-B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis (Carter, 1967). A diferencia de las CBN, las células mononucleadas no se han dividido en cultivo y las tri, tetra o polinucleadas corresponden a las células que se han dividido más de una vez en cultivo. La evaluación de MN se realiza en 1000 CBN, aunque este número puede variar de 500-5 000 CBN.

Los criterios para la identificación de MN en CBN aceptados en estudios internacionales son (Surrallés y Natarajan, 1997):

Criterios empleados para identificar CBN.

1.- La célula debe tener dos núcleos redondos u ovales.
2.- Los núcleos no deben estar conectados por puentes de cromatina.
3.- Los núcleos pueden estar en profase temprana.
4.- Los núcleos deben de tener un tamaño similar (No necesariamente idéntico)
5.- Los núcleos pueden estar parcialmente sobrelapados.
6.- Citoplasma bien preservado

Criterios para la identificación de MN.

1.- Forma redonda u oval.
2.- Tamaño: > 1 /2 - 1 /5 del tamaño de los núcleos.
3 - No debe ser refringente
4.- Debe presentar igual color e intensidad que el núcleo principal.
5.- No debe tocar ninguno de los núcleos.
6.- Debe presentar la misma condensación que los núcleos.

Desde que se utiliza el bloqueo de la citocinesis para la evaluación de MN, esta técnica se ha convertido en una herramienta poderosa y sensible para la detección de daño genético, además de presentar otras ventajas como su rapidez, facilidad, y aplicabilidad a diferentes tipos celulares, en algunos casos puede sustituir el análisis de aberraciones cromosómicas. También es posible discriminar el origen, clastogénico o aneugénico, de los MN empleando anticuerpos anticinetocoro o bien sondas fluorescentes para centromeros y telomeros, lo que da la posibilidad de discernir el mecanismo de acción de diversos agentes genotóxicos (Kirsch-Volders et al., 1997; Kirsch-Volders, 1997; Marzin, 1997).

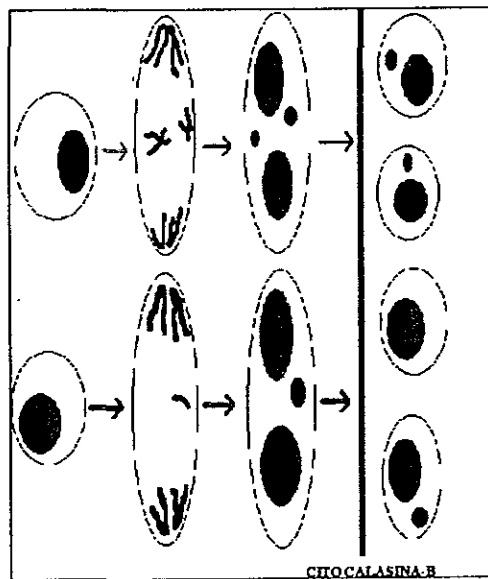


Fig 4 - Efecto de la Cyt-B sobre la citocinesis

Evaluación de la cinética de proliferación celular

A partir de los experimentos llevados a cabo en los años 50 (Howard y Pelc, 1953), se establecieron los primeros métodos confiables para entender la dinámica del ciclo celular. Con todos los avances técnicos disponibles se ha revolucionado considerablemente el conocimiento de la cinética celular y actualmente existen una serie de métodos para su estudio que han permitido entre otras cosas, determinar la duración del ciclo. De ellos, uno de los más utilizados es el marcaje con isótopos radiactivos. Este método tiene la ventaja de permitirnos estudiar la cinética celular en poblaciones asincrónicas, además de que puede aplicarse al estudio del ciclo celular *in vivo*, ya que una inyección del compuesto radiactivo es equivalente a un pulso en los cultivos celulares. La timidina tritiada es uno de los precursores radiactivos de más amplia utilización; no obstante su uso ha sido criticado (Hume et al., 1980; Morimoto et al., 1983) porque no se toman en cuenta las alteraciones que puede sufrir la concentración de timidina intracelular no marcada, así como los cambios en la actividad de la enzima timidincinasa o de los acarreadores de timidina en la membrana celular.

Otra forma de estudiar el ciclo celular fue introducida con el uso de la citofluorometría ya sea simple o de flujo. Ambas buscan principalmente detectar las variaciones en cantidad (n) y contenido (c) del ADN a lo largo del ciclo. De tal modo que una célula en G_1 tiene una cantidad diploide de ADN $2n$ y un contenido $2c$, las que están en G_2 y principios de M tienen $2n$ $4c$ y las que están en la fase S tienen una cantidad intermedia, mayor de $2c$ pero menor de $4c$. Debido a que este tipo de estudios son

transversales, la distribución del ADN en la población celular se puede hacer rápida y adecuadamente.

Poco tiempo después fue utilizada para examinar la cinética de proliferación de diversas poblaciones celulares tanto *in vitro* como *in vivo* (Craight-Holmes y Shaw, 1976; Crossen et al., 1977). De tal manera que cuando una población celular crece en presencia de BrdU, las células que han replicado una vez su ADN incorporan el análogo en una de las hebras de la molécula en ambas cromátidas (sustitución monofililar). Después de teñirse por fluorescencia más Giemsa, se observa al microscopio un patrón de coloración oscuro en ambas cromátidas de todos los cromosomas (M-1 en la Fig. 5). Cuando las células han pasado por un segundo ciclo de replicación, una cromátida de cada cromosoma ha incorporado en sus dos hebras el análogo (sustitución bifilar), mientras las otras sólo lo han hecho una vez. En el microscopio se ve entonces una cromátida más clara que la otra en todos los cromosomas metafásicos (M-2 en fig. 5). Finalmente cuando las células han replicado su ADN tres veces es decir, han pasado por tres fases, es decir, ha pasado por tres fases S, presentan cromosomas de dos tipos: con ambas cromátidas sustituidas bifilarmente que por lo tanto se ven ambas claras al microscopio y, aquellas que tienen una sustituida monofilamente (oscura) y la bifilarmente sustituida y por lo tanto clara (M-3 en la Fig. 5).

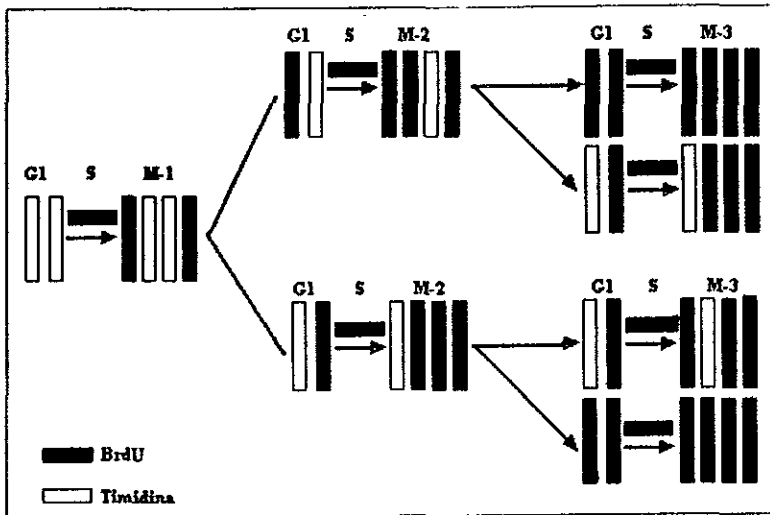


Fig. 5.- Incorporación diferencial de BrdU

De esta forma, se puede evaluar en un cultivo el porcentaje de células que se han dividido una, dos y tres o más veces: con esto se pueden calcular índices que nos dan información acerca de la historia replicativa de las poblaciones celulares. Se propuso (Ivette y Tice, 1982) una fórmula con la que se calcula el índice de replicación (IR) el cual es un parámetro que nos puede dar una idea más precisa de la cinética de proliferación celular (CPC). Los mismos autores han extendido el uso del IR para calcular el tiempo de generación promedio (TGP= tiempo desde que se agregó BrdU al cultivo/IR). Sin embargo, para que este cálculo sea preciso, es necesario que por un lado la población celular recuperada no tenga exclusivamente células en primera división, por otro que la determinación de metafases en tercera división no se vea incrementada por células que se han dividido más de tres veces.

Factores que pueden influir sobre la cinética de proliferación celular

En diversos trabajos se han estudiado algunos de los factores tanto ambientales como aquellos propios de cada donador, que pueden producir cambios en la CPC: se ha encontrado, por ejemplo, que el medio de cultivo utilizado influye sobre la duración del ciclo celular (CC) (Mutchinick et al., 1980): En algunos trabajos se ha reportado que la presencia de suero en los cultivos puede retardar el ciclo celular (Auf der Maur y Berlincourt, 1979; Wolff et al., 1984;), aunque en otro no se encontró tal efecto (Mutchinick et al., 1980).

Los valores de pH tanto intra como extracelular también afectan la proliferación de linfocitos en cultivo. Así: con valores de pH extracelular arriba de 6.8 se mantiene el crecimiento exponencial y además se induce la proliferación de las células en G_0 , mientras que si el pH extracelular se mantiene entre 6.7 y 6.4 la tasa de división se reduce por último, si el pH baja de 6.4, el crecimiento se inhibe casi por completo (Taylor et al., 1984).

Por otro lado se ha observado que cuando los linfocitos proliferan, frecuentemente el pH intracelular es más alcalino que en aquellas células que se encuentran en reposo (Sánchez, 1987). Las variaciones en la temperatura de cultivo también afectan la duración del CC, sobre todo si esta es menor de 35°C, reducción que produce el alargamiento del CC (Abdel- Fadil et al., 1982). Las condiciones de colecta de la sangre influyen en la proliferación de los linfocitos en cultivo, por ejemplo, si se obtiene la muestra durante la mañana, la proliferación de linfocitos de humanos es más rápida que si la venopunción se realiza durante el medio día o la noche (Tavadia et al., 1975). De igual forma, si como anticoagulante es usado el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el citrato ácido de

dextrosa (ACD), el CC se hace más prolongado que en aquellas muestras tomadas con heparina (Tucker y Christensen, 1987).

Por lo que respecta a las variaciones en la cinética de proliferación de linfocitos en cultivo, producidas por factores propios de los donadores, se ha detectado que esta es más lenta en las personas viejas que en las jóvenes (Wen y Liew, 1983). El estado nutricional de los donadores también parece ser un factor que influye en la proliferación linfocitaria (Ortiz y Betancourt, 1984). Al igual que las condiciones de salud, ya que en personas parasitadas la CPC es más lenta que en los individuos sanos (Herrera et al, 2000; Montero et al., 1989).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos toxicológicos muestran que el ABZ provoca limitados efectos secundarios a corto plazo. Sin embargo, sus efectos adversos a largo plazo han sido poco estudiados. Su principal mecanismo de acción parasitocida está relacionado con su capacidad de provocar alteraciones en la proliferación celular *in vitro*, así como en la pérdida del material genético (Whittaker, 1989 y 1991). Lo que *in vivo* podría representar severas repercusiones en el individuo e inclusive en su descendencia, ya que alteraciones en la proliferación celular podrían estar muy relacionadas con el retraso en el crecimiento corporal, en tanto que la pérdida de material genético en células somáticas se ha visto involucrada en procesos como el cáncer (Cavenee et al., 1991; Fearon y Vogelstein, 1990), mientras que a nivel germinal se le ha relacionado con diversos síndromes genéticos (Dellarco et al., 1986). A causa de la carencia de estudios sobre los efectos tóxicos y genotóxicos del ABZ en seres humanos, no se ha podido determinar el tipo de riesgo que este compuesto representa en países, como el nuestro, en donde su uso es masivo en menores de edad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos genotóxicos *in vitro* del ABZ y sus metabolitos (SOABZ y SO₂ABZ), así como sus posibles efectos sobre la cinética de la proliferación celular en linfocitos de humano tratados a concentraciones similares a las encontradas en el plasma de pacientes con parasitosis sistémicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los datos toxicológicos muestran que el ABZ provoca limitados efectos secundarios a corto plazo. Sin embargo, sus efectos adversos a largo plazo han sido poco estudiados. Su principal mecanismo de acción parasitocida está relacionado con su capacidad de provocar alteraciones en la proliferación celular *in vitro*, así como en la pérdida del material genético (Whittaker, 1989 y 1991). Lo que *in vivo* podría representar severas repercusiones en el individuo e inclusive en su descendencia, ya que alteraciones en la proliferación celular podrían estar muy relacionadas con el retraso en el crecimiento corporal, en tanto que la pérdida de material genético en células somáticas se ha visto involucrada en procesos como el cáncer (Cavenee et al., 1991; Fearon y Vogelstein, 1990), mientras que a nivel germinal se le ha relacionado con diversos síndromes genéticos (Dellarco et al., 1986). A causa de la carencia de estudios sobre los efectos tóxicos y genotóxicos del ABZ en seres humanos, no se ha podido determinar el tipo de riesgo que este compuesto representa en países, como el nuestro, en donde su uso es masivo en menores de edad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos genotóxicos *in vitro* del ABZ y sus metabolitos (SOABZ y SO₂ABZ), así como sus posibles efectos sobre la cinética de la proliferación celular en linfocitos de humano tratados a concentraciones similares a las encontradas en el plasma de pacientes con parasitosis sistémicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la posible interacción entre el ABZ o sus metabolitos con el solvente (Dimetil sulfóxido, DMSO) utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).
- 2.- Determinar las posibles alteraciones provocadas por el ABZ y sus metabolitos sobre el ciclo celular, evaluando el índice mitótico (IM) y la CPC.
- 3.- Estandarizar la técnica de MN en linfocitos humanos.
- 4.- Determinar el efecto del ABZ, SOABZ y la SO₂ABZ sobre la frecuencia de MN de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

HIPÓTESIS

El ABZ interfiere con la polimerización de la tubulina para formar MT, 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 CBN con MN.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la posible interacción entre el ABZ o sus metabolitos con el solvente (Dimetil sulfóxido, DMSO) utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).
- 2.- Determinar las posibles alteraciones provocadas por el ABZ y sus metabolitos sobre el ciclo celular, evaluando el índice mitótico (IM) y la CPC.
- 3.- Estandarizar la técnica de MN en linfocitos humanos.
- 4.- Determinar el efecto del ABZ, SOABZ y la SO₂ABZ sobre la frecuencia de MN de linfocitos humanos tratados *in vitro*.

HIPÓTESIS

El ABZ interfiere con la polimerización de la tubulina para formar MT, 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 CBN con MN.

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.

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

Se sembraron por duplicado y en dos ocasiones por cada donador, 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 BrdU (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; Jung et al, 1997; Sánchez et al, 1993). Decidimos utilizar estas dosis debido a que el ABZ se metaboliza rápidamente a SOABZ, siendo éste el metabolito que posee el efecto terapéutico (Gottschall et al., 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 más y se adicionó Colcemid (0.2 μ g/ml; Gibco, EUA), para detener la polimerización de los MT y poder evaluar el IM y la 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 y Wolff, 1974). Para evaluar el IM se determinó el número de células en metafase en un total de 2000 células. Mientras que para la CPC se analizaron en 100 metafases consecutivas, entre las cuales se diferenció a las células que se habían dividido una (M1), dos (M2) y tres (M3) o más veces. En los cultivos cada concentración tenía su duplicado y cada de cada individuo se realizaron dos cultivos.

1.4 Evaluación del efecto sobre la frecuencia de MN.

Se sembraron pro duplicado y en dos ocasiones por cada donador, 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 Cyt-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 y 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 y 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.

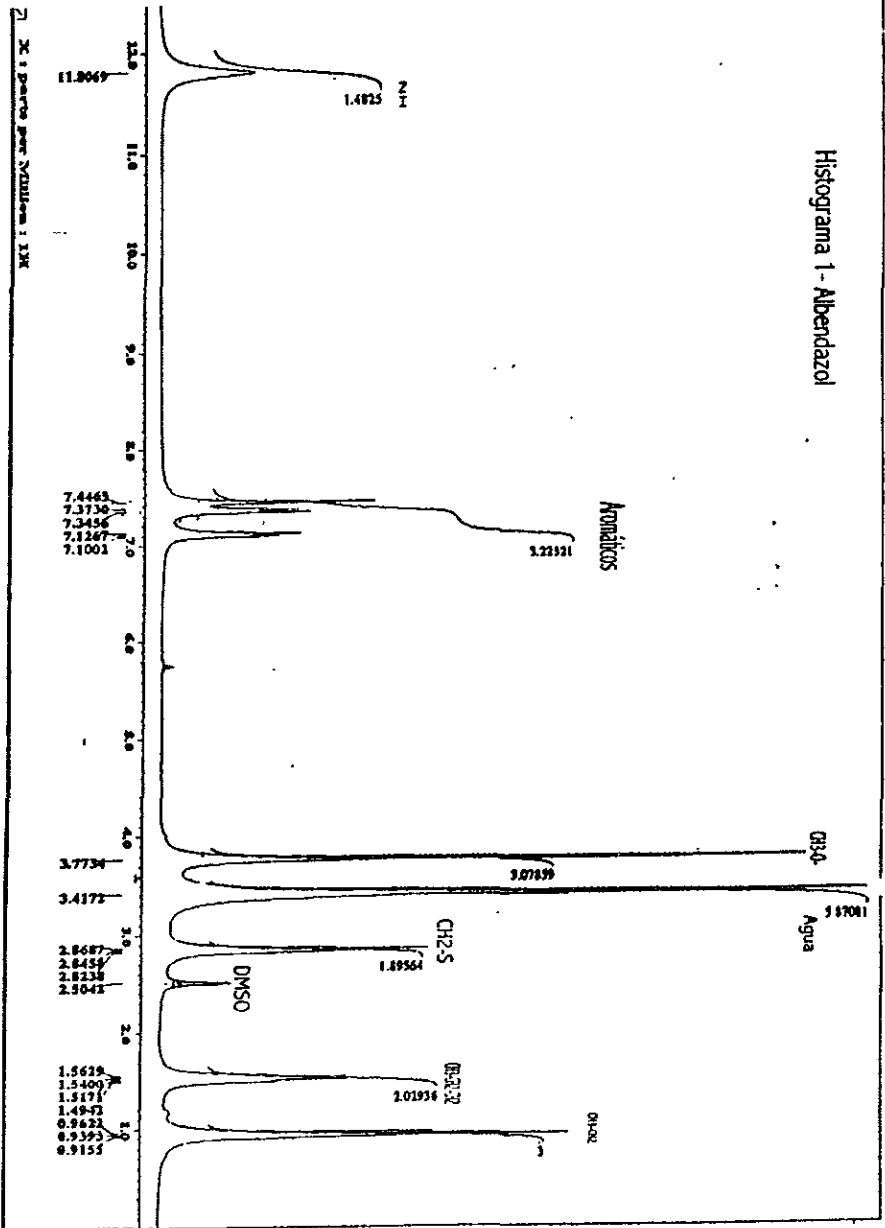
Efecto sobre el IM y la CPC.

El ABZ indujo un incremento significativo en el número de células en metafase a partir de la dosis 1 μ M (Tabla 2, Figura 6). De manera similar, este compuesto aumentó el número de células que solo se dividieron una vez en cultivo (células M1) desde la dosis 1 μ M (Tabla 3, Figura 7). En los cultivos tratados con SOABZ se observó un incremento en el IM estadísticamente significativo a partir de la dosis 10 μ M (Tabla 2, figura 6), mientras que la frecuencia de células M1 sólo se incrementó con la dosis 100 μ M (Tabla 3, Figura 7). 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 μ M (Tablas 2 y 3, Figuras 5 y 6).

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, Figura 8), 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, Figura 8). El metabolito inactivo (SO_2ABZ) no produjo ningún efecto significativo.

Histograma 1 - Albendazol



Histograma 2- Sulfóxido de ABZ

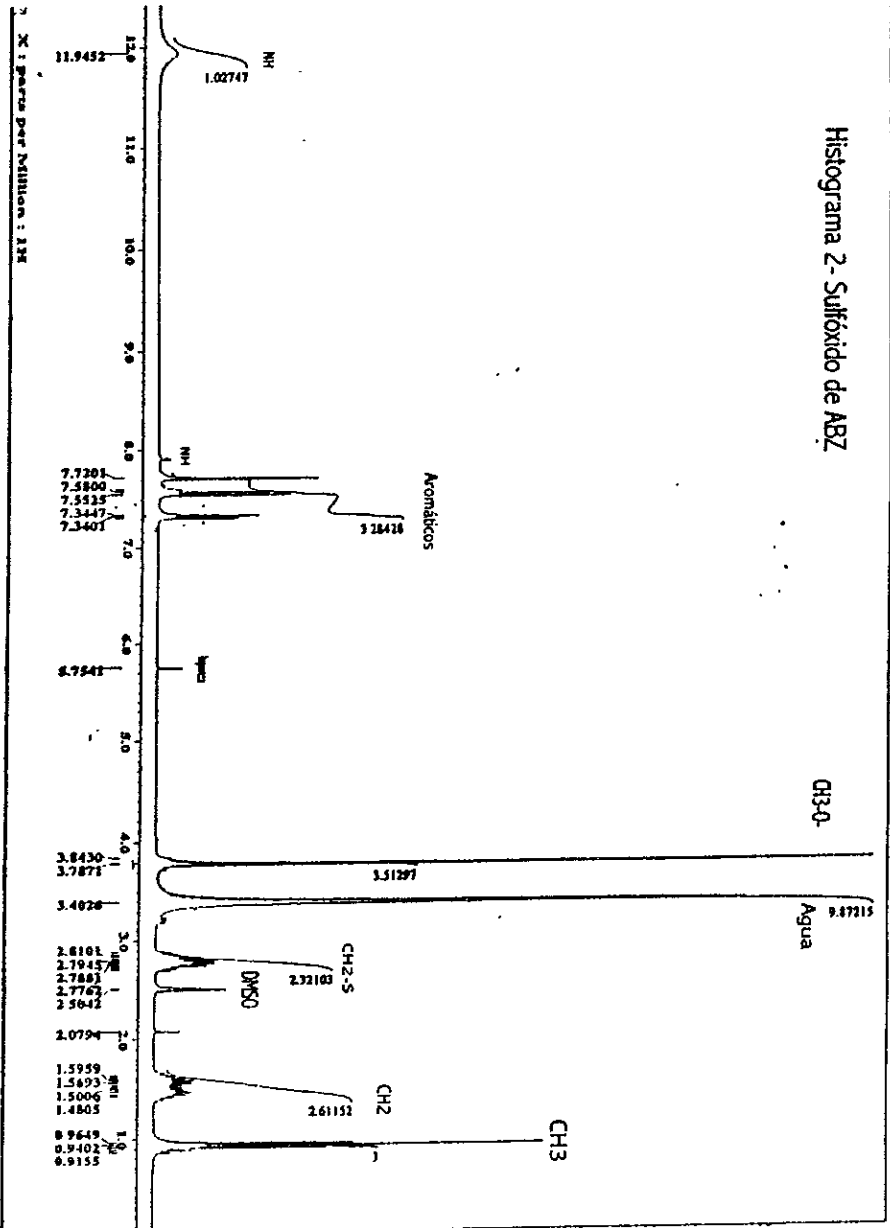


Tabla 2- Efecto del ABZ y sus metabolitos en el IM de linfocitos cultivados de humano tratados durante 24 h. Media de dos experimentos por donador.

CONCENTRACION (μ M)	ABZ		SOABZ		SO ₂ ABZ	
	X	DE	X	DE	X	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

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

X= Media

DE= Desviación estándar

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		SOABZ		SO ₂ ABZ	
	X	DE	X	DE	X	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

X= Media

DE= Desviación estándar

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		SOABZ		SO ₂ ABZ	
	X	DE	X	DE	X	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

* $p < 0.05$

X= Media

DE= Desviación estándar

Figura 6- Efecto del ABZ y sus metabolitos en el IM de linfocitos cultivados

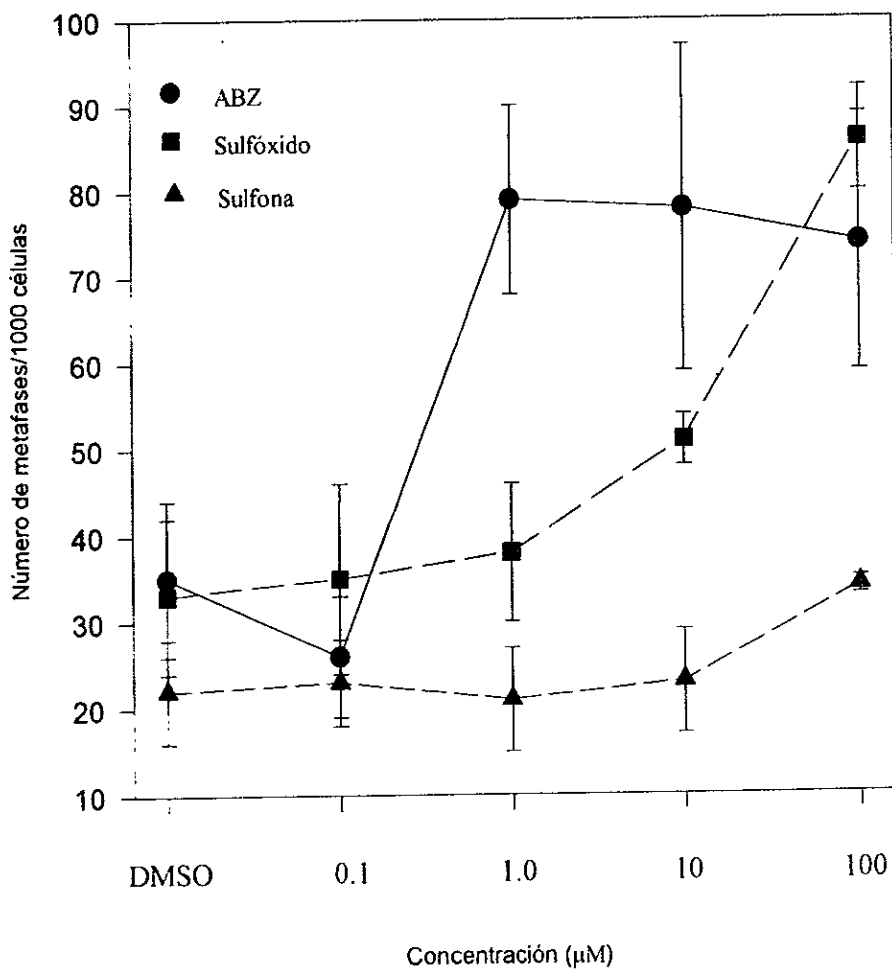


Figura 7- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células M1 en linfocitos cultivados

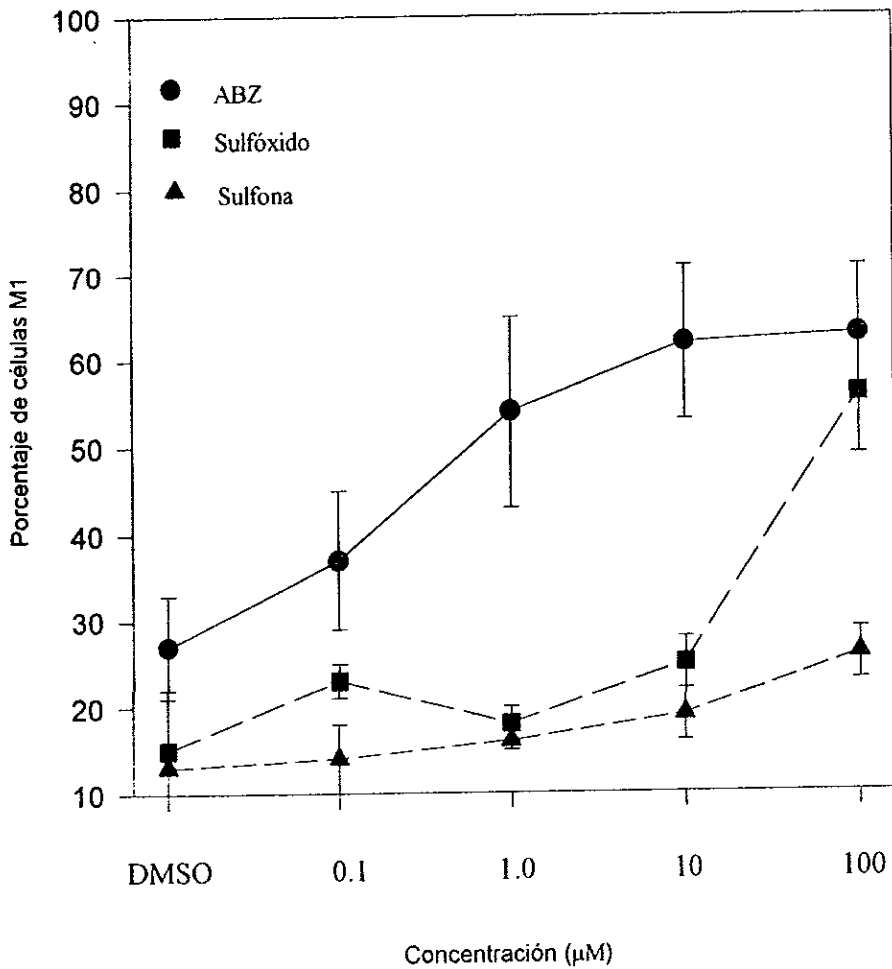
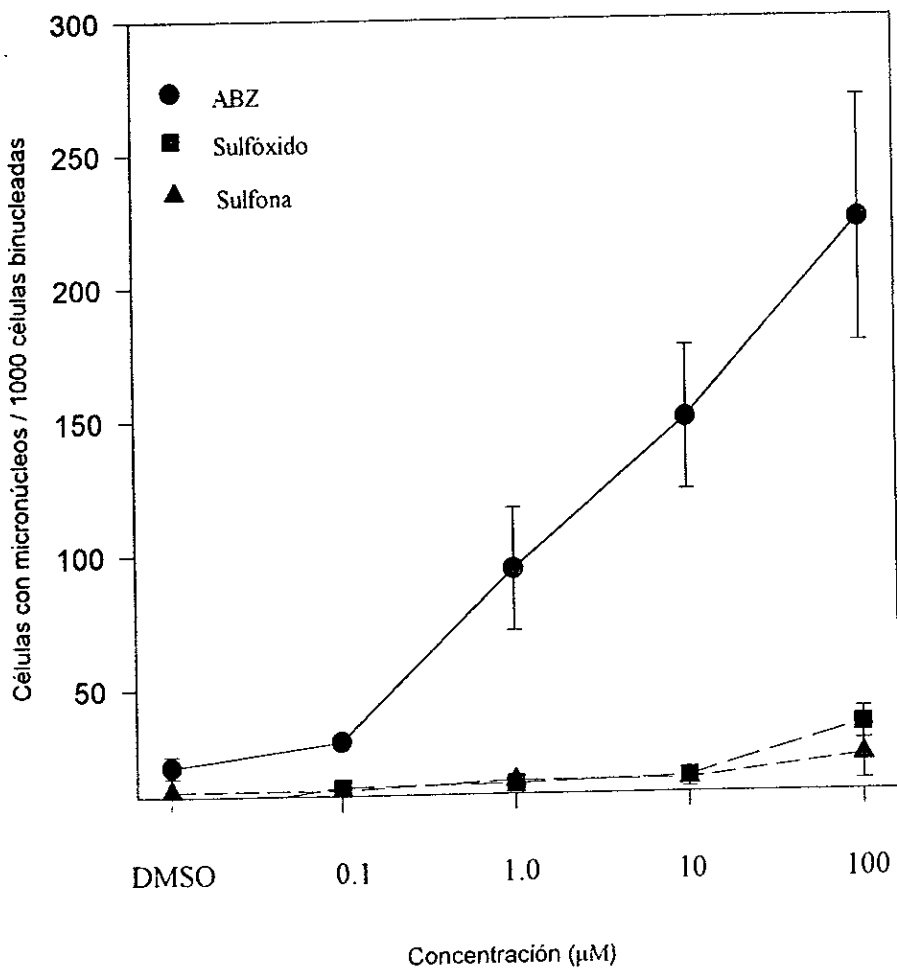


Figura 8- Efecto del ABZ y sus metabolitos en la frecuencia de células micronucleadas en linfocitos cultivados



DISCUSIÓN

Debido a su amplio espectro parasitocida, el ABZ se ha utilizado dentro de los esquemas de tratamiento de diversas parasitosis, no sólo en nuestro país, sino en muchos otros en donde las enfermedades causadas por helmintos ocupan un alto índice en la morbilidad de la población general, y un lugar muy importante en la mortalidad de menores de edad. A pesar de su uso frecuente, poco se sabe de los efectos adversos que provoca a largo plazo en seres humanos. Se sabe que el ABZ es teratogénico en ratas (Delatour et al., 1981), promueve alteraciones en la proliferación celular y en la frecuencia de MN *in vitro*, así como la formación de células aneuplóides (Mailhes y Aardema, 1992; Mailhes y Marchetti, 1994). En humanos, este compuesto provocó el retraso del crecimiento corporal de niños poco parasitados, a los que se les administró una sola dosis de 400 mg dos veces al año. Es importante resaltar que no sólo este efecto, sino todos los reportados tanto *in vitro* como *in vivo*, pueden estar directamente relacionados con el principal mecanismo de acción parasitocida del fármaco, que es la inhibición de la polimerización de los MT, ya que se ha visto que otras sustancias inhibitoras de la formación de MT producen alteraciones similares a las reportadas para el ABZ (Davidse y Flach, 1978; Lacey, 1990; Styles, 1973).

Considerando el mecanismo de acción parasitocida, la farmacología del ABZ y sobre todo la carencia de datos acerca de los efectos adversos a largo plazo en humanos, decidimos estudiar la citotoxicidad y genotoxicidad de este fármaco y sus metabolitos en células de humano *in vitro*. Se utilizaron linfocitos de sangre periférica de humano por la facilidad para obtener las muestras así como para su manejo *in vitro*. Los parámetros para

medir alteraciones en la proliferación de linfocitos humanos (el IM y la CPC) han sido validados en estudios anteriores (Herrera et al., 2000; Rojas et al., 1992; Rojas et al., 1993). Para analizar la genotoxicidad del ABZ y sus metabolitos se evaluó la frecuencia de MN en CBN (Fenech y Morley, 1985), ya que otros BZ como el benomil, la carbendazina, el MBZ, el nocodazol (NDZ), inducen MN como resultado de pérdida cromosómica provocadas por alteraciones en el huso mitótico (Banduhn y Obe, 1985; Georgieva et al., 1990; Lynch y Parry, 1993; Miller et al., 1998).

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 BZ (Andreassen et al., 1996; Whittaker, 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 MT dinámicos cuya organización espacial es crítica para la apropiada distribución de la información genética en las células hijas. Se sabe que BZ, como el NDZ, que interfieren con los MT detienen la proliferación celular (Andreassen et al., 1996; Li y Benezrra, 1996). De igual forma, la inhibición de la polimerización de los MT 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).

El o los mecanismos por los cuales la inhibición de la polimerización de los MT 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. Se ha visto que la administración *in vitro* de NDZ a células HeLa interfiere con la polimerización del huso mitótico, promoviendo la detención de la proliferación celular mediante la activación de mecanismos de verificación en la metafase. Esta verificación se realiza mediante la proteína del gen hSMAD2, localizada en los cinetocoros que están fuera de la placa metafásica (Li y Benezrra, 1996), la cual es reconocida como una señal de error en la alineación cromosómica, 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 (Rudner y Murray, 1996). A pesar de que la verificación de que la alineación cromosómica en la metafase explicaría la detención del ciclo celular cuando el ABZ o el SOABZ inhiben la polimerización de los MT, aún no se sabe si estos eventos ocurren en linfocitos de seres humanos.

Los resultados de la evaluación del daño genotóxico inducido tanto por el ABZ como por el SOABZ mostraron que ambos compuestos incrementaron la frecuencia de CBN con MN, en tanto que la SO₂ABZ no provocó ningún efecto. Es importante resaltar que el ABZ tuvo una mayor eficacia para producir MN que el SOABZ, lo que puede estar relacionado con la diferencia en la afinidad por la tubulina entre ambos compuestos.

Tomando en cuenta la dinámica de polimerización y depolimerización de los MT, las células son susceptibles de sufrir daño en la información genética aunque sea indirectamente, aún después de que los cromosomas ingresen en anafase, ya que el ABZ o el SOABZ pueden inhibir el proceso de depolimerización de los MT retrasando la segregación de algunos cromosomas las células son susceptibles de sufrir daño en la información genética aunque sea indirectamente, lo que muy probablemente sería una de las causas de formación de MN. No obstante, aún no se puede descartar un posible efecto clastogénico del ABZ o el SOABZ, para lo cual es necesario emplear otro tipo de 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. 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 aneuploidia (Aadema et al, 1998; Elhajouji et al., 1997; Marshall et al., 1996; Sgura et al., 1997; Zijno et al, 1996), 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 (Crompton, 1999; Horton, 1990). 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*.

CONCLUSIONES

- No existe ningún tipo de interacción entre el ABZ/SOABZ con el DMSO.
- Tanto el ABZ como su metabolito activo (SOABZ) provocaron la detención del ciclo celular en metafase a dosis superiores a 1 μ M.
- La frecuencia de 4 células con micronúcleos en los linfocitos cultivados tratados con ABZ y SOABZ, sin embargo, el efecto del ABZ es mucho mayor que el provocado por el SOABZ.
- El metabolito inactivo (SO2ABZ) no alteró ninguno de los parámetros evaluados, lo que concuerda con otros estudios.
- Es necesaria la evaluación de otros efectos genotóxicos, como la no disyunción que es muy frecuente a dosis bajas.
- Aunque la utilidad del ABZ como antiparasitario es incuestionable, se considera necesaria la evaluación de los efectos en seres humanos.

ABREVIATURAS

ABZ	-	Albendazol
TBZ	-	Tiabendazol
BZ	-	Benzimidazol
FLBZ	-	Flubendazol
MBZ	-	Mebendazol
NCC	-	Neurocisticercosis
BZc	-	Benzimidazoles carbamatados
SOABZ	-	Sulfóxido de albendazol
SO ₂ ABZ	-	Sulfona de albendazol
CSF	-	Fluido cerebroespinal
PZQ	-	Praziquantel
CYP	-	Citocromo P-450
FMO	-	Monoxigenasas dependientes de flavina
MT	-	Microtúbulos
MN	-	Micronúcleo
ADN	-	Ácido desoxirribonucleico
Cyt-B	-	Citocalasina B
CBN	-	Células binucleadas
IM	-	Índice mitótico
IR	-	Índice de replicación
CPC	-	Cinética de proliferación celular
CC	-	Ciclo celular
RMN	-	Resonancia Magnética Nuclear
DMSO	-	Dimetil sulfóxido
KCl	-	Cloruro de Potasio
M1	-	Células en 1ª. División
NDZ	-	Nocodazol

BIBLIOGRAFÍA

- Aadema M, Albertini S, Arni P, Henderson L, Kirsh-Volders, Mackay J, Sarrif A, Stringer D, Taalman R. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Res* 1998; 410:3-79.
- Abdel-Fadil MR, Palmer CG, Heerema N. Effect of temperature variation on sister chromatid exchange and cell-cycle duration in cultured human lymphocytes. *Mutation Res* 1982; 104:263-267.
- Alarcón F, Escalante L, Dueñas G, Montalvo M, Román M. Neurocysticercosis. Short course of treatment with albendazole. *Arch Neurol* 1989; 46: 1231-1236.
- Andreassen PR, Martineau SN, Margolis RL. Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutation Res* 1996; 372:181-194.
- Auf der Maur P, Berlincourt- Bohni K. Human lymphocyte cell cycle: studies with the use of BrdUr. *Hum. Genet* 1979; 49:209-215.
- Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, dyethylstilbestrol and estradiol: Structural chromosomal aberration, sister-chromatid exchanges, C-mitosis, polyploidies and micronuclei. *Mutation Res* 1985; 156:199-218.
- Campbell WC. Benzimidazoles: Veterinary uses. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 130-133.
- Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 1967; 213:261-264.
- Cavenne WK, Scrabble HJ, James CD. Molecular genetics of human cancer predisposition and progression. *Mutation Res* 1991; 247:199-202.

- Cook GC. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: Indications and efficacy. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 133-136.
- Craight-Holmes AP, Shaw MW. Cell cycle analysis in asynchronous cultures using the BrdR- Hoechst technique. *Exp Cell Res* 1976; 102:232-239.
- Cristófol C, Navarro M, Franquelo C, Valladares FE, Arboix M. *Vet Parasitol* 1998; 78(3):223-231.
- Crompton D. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 1999; 85:397-403.
- Crossen PE, Morgan WF. Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp Cell Res* 1977; 104:453-457.
- Davidse L, Flach W. Interaction of thiabendazole with fungal tubulin. *Biochem Biophys Acta* 1978; 543:82-90.
- Delatour P, Parish R, Gyurick R. Albendazole: A comparison of relay embriotoxicity with embriotoxycity of individual metabolites. *Ann Rech Vet* 1981; 12: 159-167
- Delatour P, Garnier F, Benott E, Login GH. A correlation of toxicity of albendazole and oxobendazole with their free metabolites and bound residues. *J Vet Pharmacol Ther* 1984; 7:139-145.
- Delatour P, Parish R. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: Toxicity and evaluation of residues. In: Rico A (Ed). *Drug residues in animals*. Academic Press, New York, USA, 1986, 175-204 pp.

- Delatour P, Benoit E, Lechenet J, Besse S. Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule. *Res Vet Sci* 1990; 48(3):271-5.
- Dellarco VL, Mavourmin KH, Waters MD. Aneuploidy Data Review Committee: summary compilation of chemical data base and evaluation of test methodology. *Mutation Res* 1986; 167: 149-169.
- Dominguez L, Fagiolino P, Gordon S, Manta E. Bioavailability comparison between albendazole and albendazole sulfoxide in rats and man. *Farmaco* 1995; 50(10): 697-702.
- El Amri HS, Fargetton X, Delatour P, Batt AM. Sulphoxidation of albendazole by the FAD-containing and cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases from pig liver microsomes. *Xenobiotica* 1987; 17: 1159-1168.
- El Amri HS, Fargetton X, Benoit E, Totis M, Batt AM. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite. *Pharmacokinetics. Toxicol Appl Pharmacol* 1988 a; 92: 141-149.
- El Amri HS, Mothe O, Totis M, Masson C, Batt A, Delatour P, Siest G. Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome p-450c. *Journal of pharmacology. Exp Ther* 1988 b; 246:758-764.
- Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1997; 12(3): 133-140.
- El-Mufti M, Kawag A, Ibrahim H, Taktuk S, Swaisi I, Zaidan A. Albendazole therapy of hydatid disease: 2-year follow-up of 40 cases. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87: 241-246.

- 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.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61, 759-767.
- FDA. 1989, www.verity.fda.gov/search
- Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res* 1985; 147: 29-36.
- Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Res* 1997; 392:11-18.
- Flisser A. Multiple cerebral hydatid cysts or neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82(5):799.
- 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.
- Friedman PA, Platzer EG. Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1980; 630: 271-278.
- Georgieva V, Vachkova R, Tzoneva M, Kappas A. Genotoxic activity of Benomyl in different test systems. *Env Mol. Mut* 1990; 16: 32-36.
- Gottschall DW, Theodorides VJ, Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintic. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 115-124.

- Gyurik RJ, Chow AW, Zaber B, Brunner EL, Miller JA, Villani AJ, Petka LA, Parish R. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice . *Drug Metabol Dispos* 1981; 9: 503-508.
- Hall A, Nahar Q. Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87(1):84-6.
- Heddle JA. A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutation Res* 1973; 18, 187-190.
- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1983;123(1):61-118.
- Hennessy DR, Sangster NC, Steel JW, Collins GH. Comparative pharmacokinetics behavior of albendazole in sheep and goats. *International J Parasitol* 1993; 23(3): 321-325.
- Herrera LA, Ramirez T, Rodriguez 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 blood lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; .94: 1-5
- Hogstedt B. Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm: A method for assessment of cytogenetic damage in man. *Mutation Res* 1984; 130:63-72.
- Horton, RJ. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 106.
- Howard A, Pelc SR. Synthesis of desoxiribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1953; 6:261-273.

- Hume DA, Weldemann MJ. Mitogenic lymphocytes Transformation. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Netherlands, 1980; 77-79 pp.
- Index Merck. Encyclopedia of chemical drugs and biologicals. 11 Edith. Published by Merck & CO. Inc, Rahway N.Y. USA, 1989; 200 pp.
- Ioannides C, Steele CM, Parke DV. Species variation in the metabolic activation of paracetamol to toxic intermediates: role of cytochromes p-450 and p-448. Toxicol Lett. 1983;16(1-2):55-61.
- Ioannides C, Lum PY, Parke DV. Cytochrome P-448 and the activation of toxic chemicals and carcinogens. Xenobiotica. 1984;14(1-2):119-37.
- Iskander O. An improved method for the detection of micronuclei in human lymphocytes. Stain Technol 1979; 54:221-223.
- Ivett JL, Tice RR. Average generation time: a new method of analysis and quantification of cellular proliferation kinetics. Environ Mutagen 1982; 4:358 (Resumen).
- 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, Sanchez M, Gonzalez-Astiazaran A, Martinez JM, Suastegui R, Gonzalez-Esquivel DF. Clinical pharmacokinetics of albendazole in children with neurocysticercosis. Am J Ther 1997;4(1):23-26.
- Jung H, Medina L, Garcia L, Fuentes I, Moreno-Esparza R . Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. J Pharm Pharmacol 1998; 50(1):43-8.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Kirsch-Volders M, Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res* 1997; 392: 1-4.
- Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and chromosome non-disjunction. *Mutation Res* 1997; 392: 19-30.
- Köler P, Bachman R. Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 1981; 4: 325-336.
- Lacey E, Snowdon KL, Eagleson GK, Smith EF. Further investigation on the primary mechanism of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1987a; 17: 1421-1429.
- Lacey E, Brady RL, Pichard RK, Watson TR. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth-ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol* 1987 b; 23: 105-119.
- Lacey E. The role of the cytoskeleton protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 1988; 18(7): 885-936.
- Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 112-115.
- 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.
- Lawrenz A, Eglit S, Kroker R, The metabolism of albendazole in the isolated perfused intestine of rats. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1992; 99(10):416-8.

- Li Y, Benezra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* 1996; 274: 246-248.
- Lynch AM, Parry JM. The cytochalasin -B micronucleus kinetocore assay in vitro: Studies with 10 suspected aneugens. *Mutation Res* 1993; 286:71-86.
- Mailhes S, Aardema M. Benomyl-induced aneuploidy in mouse oocytes. *Mutagenesis* 1992; 7: 303-309.
- Mailhes J, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in mammalian oocytes. *Mutation Res* 1994; 320: 87-111.
- Malkin MF, Camacho RM. The effect of thiabendazole on fumarate reductase from thiabendazole -sensitive and resistant *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 1972; 58: 845-846.
- Marriner S, Morris D, Dickson B, Bogan J. Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30: 705-708.
- Marshall RR, Murphy M, Kirkland DJ, Bentley KS. Fluorescence in situ hybridization with chromosome specific probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Res* 1996; 372: 233-245.
- Marzin D. The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutation Res* 1997; 392: 175-181.
- Mascie G, Alam M, Montanari R, Karim R, Akmed 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.

- Mc Cracken RO, Lipkowitz KB, Dronen NO. Efficacy of albendazole and mebendazole against *Hymenolepis microstoma* and *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol Res* 1992; 78: 108-111.
- Miller B, Potter-Locker F, Seelbach A, Stopper H, Utesh D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in trio chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. *Mutation Res* 1998; 410:81-116.
- Misra PK, Kumar A, Agarwal V, Jagota SC. A comparative clinical trial of albendazole versus metronidazole in children with giardiasis. *Indian Pediatr* 1995; 32(7):779-82.
- Montero R, Valencia D, Moreno P, Sandoval M, Ostrosky-Wegman P. Point mutation and cytogenetic analysis on lymphocytes from neurocysticercotic patients treated with praziquantel. *Env Mol Mut* 1989; 14 supplement 15: 132.
- Morimoto K., Sato M, Koizumi A. Proliferative kinetics of human lymphocytes in culture measured by autoradiography and S.C.E. stainig. *Exp Cell Res* 1983; 145:349-356.
- Moroni P, Buronfosse T, Longin- Sauvageon C, Delatour P, Benoit E. Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin -adenin dinucleotid containing and cytochrome P450-dependet monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Met Dispos* 1995; 23(2):160- 165.
- Mutchnick O, Ruz L, Casas L. Time of first generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutation Res* 1980; 72: 127-134.

- Ortiz R, Betancourt M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J Nutr* 1984; 114:472-476.
- Parke DV, Ioannides C. Active metabolites in toxicology: the role of cytochrome P-448 and flavoprotein oxidases. *Arch Toxicol Suppl* 1984; 7:183-92.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251:156-158.
- Pincu M, Bass D, Norman A. An improved micronuclear assay in lymphocytes. *Mutation Res* 1984; 139:61-65.
- Prichard R. The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol* 1973; 3: 409-417.
- Radulescu S, Angelescu N, Horvat T, Lazar L, Cretu C, Popa L, Filiiu P, Ene V, Burcos T, Ifrim S, Popa G. Clinical study of the efficacy of albendazole treatment in human hydatidosis. *Chirurgia* 1997; 92(5):331-5.
- Rahman MS, Bryant C. Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole. *Int J Parasitol* 1977; 7: 403-409.
- Rieger R, Michaelis A, Green MM. A glossary of genetics and cytogenetics, 3rd. DE. Allen and Unwin, London, 1968; 507 p.
- Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodriguez R, Ostrosky-Wegman P. Are mitotic index and lymphocytes proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Res* 1992; 282: 283-286
- Rojas E, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodriguez R, Ostrosky-Wegman P. *Anti- Cancer Drugs* 1993; 4 : 637-640.

- Romanowski RD, Rhoads ML, Colglazier ML, Kates KC. Effects of cambendazole, thiabendazole and levamisole on fumarate reductase in cambendazole-resistant and sensitive strains of *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 1975; 61:777-778.
- Rudner AD, Murray AW. The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(6): 773-780.
- Russell GJ, Gill JH, Lacey E. Binding of [3H]benzimidazole carbamates to mammalian brain tubulin and the mechanism of selective toxicity of the benzimidazole anthelmintics. *Biochem Pharmacol* 1992; 43(5):1095-100.
- Sánchez F. Intercambio de cromátidas hermanas y ciclo celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos T humanos. Tesis de Maestría Fac. de Medicina, UNAM.1987.
- Sánchez M, Suástegui R, González D, Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: 77-82.
- Sgura A, Antoccio A, Ramirez MJ, Marcos R, Tanzarella C, Degrassi F. Micronuclei centromere-positive micronuclei and chromosome non disjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C and vincristine treatment. *Mutation Res* 1997; 392: 97-107.
- Sotelo J, Escobedo F, Penagos P. Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis: a controlled trial. *Arch Neurol* 1988; 45: 532-534.
- Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetics optimization of the treatment of neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetics* 1998; 34(6): 503-515.

- Styles JA. Cytotoxic effects of various pesticides *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Res* 1973; 21:50.
- Sundaram KR, Seth V, Jena TK, Shukla DK. Age at which chest circumference overtakes head circumference in children. *Indian J Pediatrics* 1995; 62: 89-94.
- Surrallés J, Natajaran AT. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Res* 1997; 392:165-174.
- SSA, 1998, www.ssa.gob.mx
- Tavadia HB, Fleming KA, Hume PD, Simpson HW. Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation *Clin Exp Immunol* 1975; 22:190-193.
- Taylor IW, Hodson PJ. Cell cycle regulation by environmental pH. *J Cell Physiol* 1984; 121:517-525.
- Thoday JM. The effect of ionizing radiations on the broad bean root . Part IX. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiation to the root meristem. *Br J Radiol* 1951; 24:572-576.
- Towsend LB, Wise DS. The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitol Today* 1990; 6(4): 107-112.
- Tucker JD, Christensen ML. Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Res* 1987; 190:225-228.
- UNICEF. The state of the world's children. Oxford University Press, Oxford, UKM 1998; 131p.

- Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Res* 1973; 19: 109-117.
- Wen WN, Liew TL. The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. *Mech. Ageing Dev* 1983; 21:377.
- Whittaker SG, Rockmill BM, Blechl AE, Maloney DH, Resnick MA, Fogel S. The detection of mitotic and meiotic aneuploidy in yeast using a gene dosage selection system. *Mol Gen Genet* 1988; 215: 10-18.
- Whittaker SG, Zimmerman FK, Dicus B, Pie-gorsh WW, Fogel S, Resnick MA. Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*- An interlaboratory study. *Mutation Res* 1989; 224: 31-78.
- Whittaker SG, Faustman EM. Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109: 73-84.
- Wolff S, Azfal V, Brown LP. Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mutation Res* 1984; 129:207-213.
- Ziegler D. *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol. 1, WB Jacoby E. (Ed), pp 201-227. Academic Press, New York, 1980.
- 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 concentration exposure to spindle poisons. *Mutagenesis* 1996; 11: 335-340.