



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Comparación de la Actividad Genotóxica de
Ciclofosfamida y Niclosamida en Médula
Osea de Ratón.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

ISABEL JIMENEZ YANES

México, D. F.

1984



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
I.- La prueba de Micronúcleos en la médula osea de ratón	5
Conceptos básicos	5
Tratamientos	12
Sacrificio	15
Variables que se analizan	16
Determinación del tamaño de muestra y análisis estadístico	17
Criterios para establecer estrategias de muestreo	18
Ventajas de la prueba de micronúcleos	20
Limitaciones de la prueba de micronúcleos	21
Validación de la prueba de micronúcleos	21
II.- Características Generales de la Niclosamida	25
III.- Características Generales de la Ciclofosfamida	28
MATERIALES Y METODOS	
I.- Materiales	
Compuestos químicos	35
Material biológico	35
II.- Métodos	
Preparación de soluciones	35

Tratamiento	36
Recuperación de la médula	36
Análisis al microscopio	37
Análisis estadístico	38
RESULTADOS	39
DISCUSION Y CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	46

INTRODUCCION

Durante los últimos doscientos años el hombre ha desarrollado una gran diversidad de tecnologías y procesos industriales, que al mismo tiempo que han promovido "avances", han traído consigo la producción de numerosos compuestos químicos a los que el hombre se expone constantemente y que pueden constituir un riesgo para su salud.

La preocupación, por el posible daño genético que estos compuestos puedan ocasionar, se ha incrementado en los últimos años en virtud de la relación que existe entre las mutaciones y el cáncer. Como resultado, se han desarrollado diversas pruebas para evaluar el daño genotóxico de los agentes químicos, con el objeto de prevenir sus efectos en la población humana. La necesidad de crear estas pruebas se hizo imperativa ya que por razones éticas, económicas, y de tiempo, es difícil realizar este tipo de investigación en humanos. Además de que los estudios de tipo epidemiológico dan la respuesta demasiado tarde, cuando el daño ya se llevó a cabo.

Las pruebas para medir daño genotóxico presentan la ventaja de ser en su mayoría relativamente rápidas y baratas. En ellas se emplean diversos sistemas biológicos tales como: microorganismos, plantas, insectos, células de mamífero en cultivo, mamíferos completos, linfocitos humanos y aun en ADN aislado. Es importante señalar que ninguna de las

pruebas en sistemas no humanos, permite extrapolar los resultados obtenidos al hombre, sin embargo, cuando un agente dado induce alteraciones en varios sistemas biológicos incluyendo a los mamíferos, debe considerarse como un riesgo potencial (1).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM se formó un grupo de Mutagénesis Ambiental dirigido por la Dra. Cristina Cortinas de Nava, que cuenta en la actualidad con las siguientes pruebas (Tabla 1):

- 1.- Determinación de mutaciones puntuales en Salmonella typhimurium (prueba de Ames) y Saccharomyces cerevisiae.
- 2.- Pruebas de daño al ADN no reparado en Escherichia coli y Bacillus subtilis.
- 3.- Análisis de anomalías morfológicas en la cabeza del espermatozoide en ratón.
- 4.- Análisis de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratón.
- 5.- La prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón.
- 6.- Análisis tanto de aberraciones cromosómicas como de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos expuestos tanto in vivo como in vitro.

El interés de este grupo se orientó al estudio de los medicamentos antiparasitarios debido a que las enfermedades producidas por ellos, parti

TABLA 1

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
LABORATORIO DE MUTAGENESIS AMBIENTAL

SISTEMAS UTILIZADOS PARA LA DETECCION DE DAÑO GENETICO

SISTEMA DE PRUEBA	MUTACIONES GENICAS	REPARACION DEL ADN	ROMPIMIENTOS CROMOSOMICOS	ICH	MICRONUCLEOS	MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE
MICROORGANISMOS						
<u>S. thyphimurium</u>	+					
<u>E. coli</u>		+				
<u>B. subtilis</u>		+				
LEVADURAS						
<u>S. cerevisiae</u>	+					
RATON <u>IN VIVO</u>			+		+	+
HUMANO						
<u>In vivo</u> *			+	+		
<u>In vitro</u>			+	+		

* Muestras sanguíneas de individuos en tratamiento

cularmente las ocasionadas por amibas y helmintos, constituyen un problema de salud pública. Esto es debido a la débil estructura sanitaria de las poblaciones rurales y de los cinturones de miseria de las grandes ciudades, así como a la falta de educación y de hábitos higiénicos de sus habitantes. Todo ésto, aunado a la dificultad de proporcionar asistencia médica y demás aspectos sanitarios a una población cuyo crecimiento rebasa la capacidad de ofrecerle los servicios básicos. El consumo de medicamentos antiparasitarios es por lo tanto muy alto, y la misma persona puede recibir más de un tratamiento a causa de reinfestaciones sucesivas, o por recurrir a la automedicación (2).

En virtud de lo anterior, se planteó llevar a cabo la evaluación de la genotoxicidad de los siguientes medicamentos:

Amibicidas

Difosfato de cloroquina

Iodoclorohidroxiquinolefna

Dehidroemetina

Antihelmínticos

Hidroxi-naftoato de Befenio

4-hexilresorcinol

Mebendazol

Pamoato de pirantel

Pamoato de pirvinio

Niclosamida

En el sistema de S. typhimurium mostraron actividad mutagénica los siguientes compuestos (3):

Dehidroemetina

Difosfato de Cloroquina

Pamoato de pirvinio

Niclosamida

En estudios posteriores, en los que se administró dehidroemetina, pamoato de pirvinio y niclosamida a ratones, solamente la orina de ratones que recibieron oralmente niclosamida, mostró actividad mutagénica, con y sin β -glucuronidasa. Esto sugiere que la orina contiene metabolitos mutagénicos de la niclosamida, tanto libres como conjugados.

Con base en los datos anteriores, se propuso realizar este estudio, cuyo objetivo es evaluar la capacidad de la niclosamida y sus metabolitos, de inducir micronúcleos en las células de la médula ósea de ratón. Así mismo, y con el propósito de valorar la potencia genotóxica de este medicamento, se determinó en paralelo la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea de ratones a los que se administró ciclofosfamida, mutágeno conocido

que también requiere de activación metabólica para ser mutagénico.

GENERALIDADES

I.- LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN LA MEDULA OSEA DE RATON

Conceptos básicos

En la búsqueda de un sistema sencillo para el análisis de daño citogenético, surgió la Prueba de Micronúcleos.

Los micronúcleos se originan de cromatina que por diferentes razones se ha retrasado en anafase y que, en el curso de la telofase, queda incluida dentro de una u otra célula hija. Ahí puede fusionarse con el núcleo principal, o bien formar uno o varios pequeños núcleos secundarios a los que se ha denominado micronúcleos (Figura 1).

Este retraso puede ocurrir a través de dos mecanismos principales:

- 1) Rompimiento cromosómico, que se traduce en la formación de fragmentos acéntricos y de cromosomas di o multicéntricos, conectados por puentes.
- 2) Segregación cromosómica defectuosa, debida al mal funcionamiento.

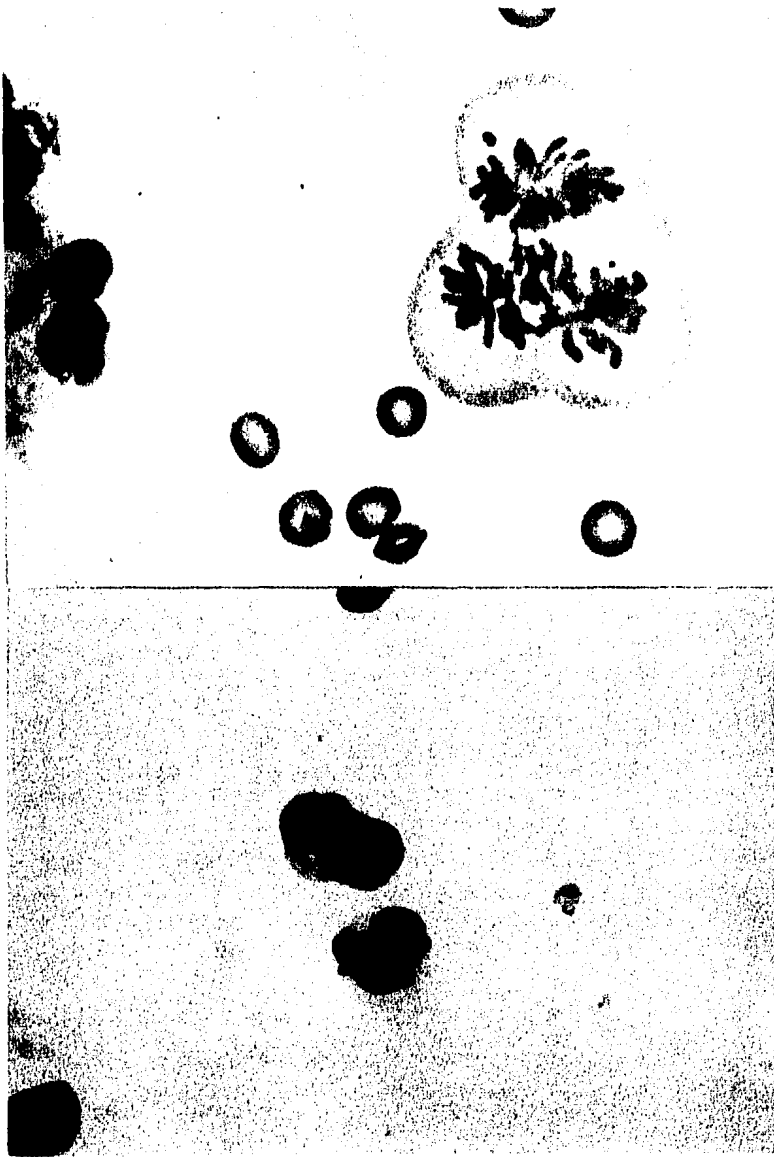


Figura 1. Arriba: anafase tripolar con dos micronúcleos.
Abajo: telofase temprana con un micronúcleo.

to del aparato mitótico, que ocasiona el retraso de cromosomas completos.

La existencia de micronúcleos ha sido reconocida desde hace muchos años; ya en 1937 se les relacionó con daño cromosómico en trabajos hechos con radiaciones. El primer intento serio para utilizar a los micronúcleos como un ensayo para medir daño citogenético aparece reportado por Evans y col. A partir de entonces, ha sido aplicada ésta técnica en diversos tejidos y tipos de organismos (Tabla 2) (28).

En plantas, se ha trabajado con tejidos meristemáticos de brotes y en raíz de Allium cepa L., Allium sativum, Tradescantia y Vicia faba. Este tipo de estudios resulta importante ya que las plantas pueden servir como sensores ambientales, aunque desafortunadamente hasta ahora se han probado pocos agentes en estas especies mediante esta técnica (4,5,6).

Una de las grandes desventajas asociadas con los estudios in vivo, es que el agente o sus metabolitos no lleguen en suficiente concentración a la célula blanco. El uso de células en cultivo resuelve este problema, ya que las células pueden exponerse directamente al compuesto; sin embargo en estos estudios se pierde la información acerca de los efectos de los productos derivados de la activación metabólica de los compuestos. Los

TABLA 2

SISTEMAS BIOLÓGICOS DONDE SE HAN ANALIZADO LOS MICRONUCLEOS

1.- PLANTAS

Allium cepa

Allium sativum

Tradescantia

Vicia faba

2.- CELULAS EN CULTIVO

Linfocitos y fibroblastos de mamíferos

Linfocitos y líneas celulares humanas

3.- MAMÍFEROS

a) Células germinales

Espermatidas

b) Células somáticas

Células hepáticas en fetos y adultos

Sangre

Médula ósea

4.- HUMANOS IN VIVO

Médula ósea

tejidos más frecuentemente utilizados en estos estudios hasta ahora son: linfocitos y fibroblastos de mamíferos, así como, linfocitos y líneas celulares humanas (7,8,9,10).

Varias especies de mamíferos se han usado para la prueba de micronúcleos (11,12,13). Sin embargo el ratón ha sido la especie de elección porque su manejo es más fácil y su mantenimiento más barato, de ahí que la mayoría de los reportes sobre la capacidad de compuestos químicos para producir micronúcleos se refieren a trabajos hechos con ratones.

A continuación mencionamos los diversos tejidos de mamíferos empleados en la evaluación de micronúcleos:

A) Células germinales.

Lahdetie y Parvinen en 1981 (14) reportaron un estudio realizado con ratas irradiadas con rayos X, donde encuentran micronúcleos durante la espermatogénesis. El hecho de detectar daño genético en el tejido germinal es importante, aunque los micronúcleos representan un evento letal más que heredable.

B) Células somáticas

Un estudio en el que se analizan micronúcleos en sangre circulante de ratones ha sido reportado recientemente (15). Este trabajo tiene la ven

taja de que un mismo animal se puede muestrear varias veces, y seguir el comportamiento de la producción de micronúcleos a través del tiempo.

Dado que el metabolismo de muchas drogas se lleva a cabo en el hígado, Tates y col. en 1980 (16) propusieron el análisis de micronúcleos en células hepáticas de rata para asegurar de esta manera que el compuesto hubiera llegado más fácilmente a las células blanco. Sin embargo como las células hepáticas no están proliferando, se hace necesario estimular su proliferación mediante una hepatoctomía.

Recientemente Cole y col. (17,18) trataron a ratones hembras preñadas y posteriormente determinaron la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea de la madre y las células hepáticas fetales. Una desventaja de analizar micronúcleos en células fetales es que la placenta pudiera representar una barrera para algunos compuestos, pero a la vez se considera un método adecuado para la detección de carcinógenos transplacentarios.

Schmid y col. (19,20,21 y 22) iniciaron una serie de investigaciones en preparaciones de médula ósea de ratón para determinar los parámetros necesarios para utilizar la prueba de micronúcleos como indicadora de daño citogenético in vivo. Muchos trabajos siguieron a éstos, ya que esta prueba presenta la ventaja de ser sencilla, relativamente rápida de analizar al microscopio y barata. Se han reportado alrededor de ciento cincuenta compuestos probados en médula ósea; por esta razón se puede considerar

rar que la prueba de micronúcleos bajo estas condiciones es la más estandarizada.

En humanos también se ha trabajado en médula ósea in vivo, pero está claro que es difícil la obtención de muestras; sin embargo, se han estudiado trabajadores expuestos en el ambiente laboral y pacientes tratados por razones médicas a agentes mutagénicos (23,24,25,26,27).

Las ventajas que presenta la médula ósea para realizar en ella estudios de tipo citogenético son las siguientes: es un tejido que está proliferando constantemente y por lo tanto no requiere de una estimulación externa para activar la división celular y además, se obtiene fácilmente una gran población celular (28).

Originalmente el análisis de micronúcleos se hacía en toda la población celular de la médula, pero Von Ledeburg y Schmid en 1973 (19) concluyeron que si el análisis se hacía en los eritrocitos jóvenes o policromáticos la prueba se tornaba más fácil de analizar y la sensibilidad de ésta aumentaba, ya que se selecciona una población celular que fácilmente se pueda identificar.

Ahora bien, ¿qué son los eritrocitos policromáticos? Durante el desarrollo de los elementos mieloides, la célula madre o célula del retículo

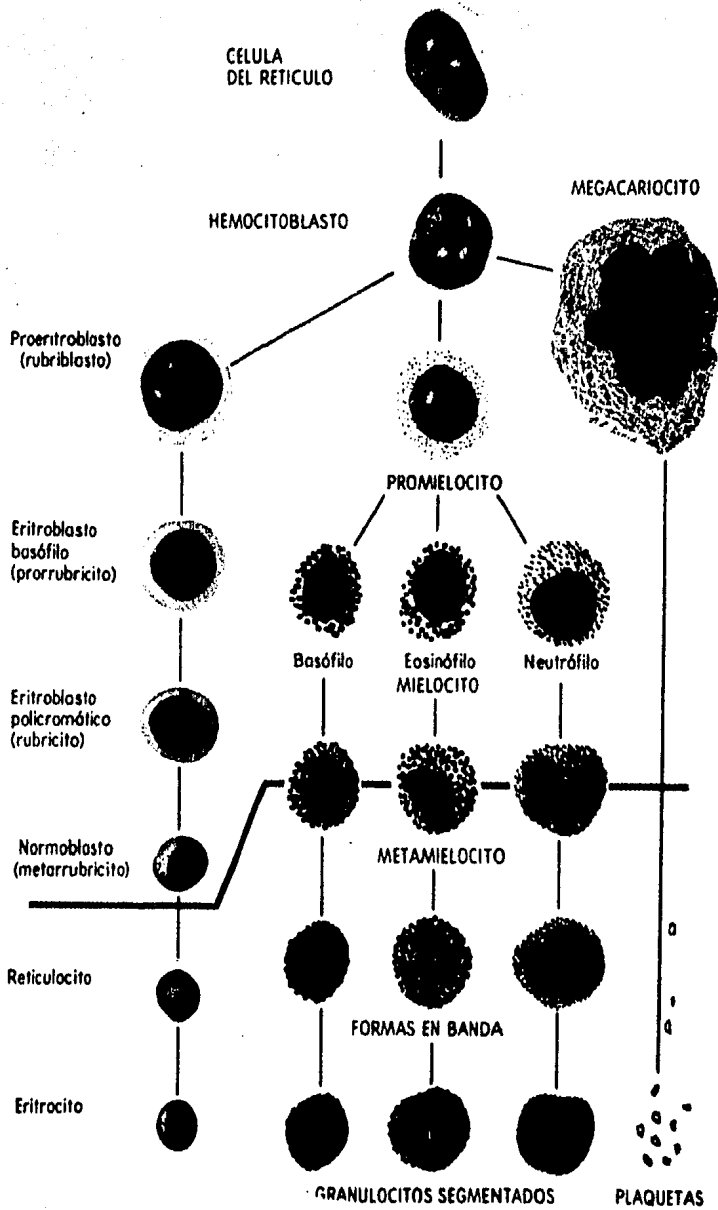


Figura 2. Desarrollo de los elementos mieloides. La línea doble separa las células que se hallan en la médula ósea de las células maduras, que se observan normalmente en sangre periférica. Tomada de Leeson, y Leeson (29).

puede originar tres líneas (Figura 2):

- 1.- A partir del megacariocito se producen las plaquetas.
- 2.- A partir del promielocito se desarrollan los granulocitos segmentados.
- 3.- A partir del proeritroblasto maduran los eritrocitos.

El desarrollo de un eritrocito maduro requiere solamente de unos tres días. Los procesos principales que intervienen en la diferenciación del eritrocito son la reducción del volumen, la condensación de la cromatina nuclear, y finalmente la pérdida del núcleo y de organelos celulares con adquisición de hemoglobina. El desarrollo del eritrocito se divide en cierto número de etapas, pero debe entenderse que el desarrollo es continuo. Las etapas del desarrollo eritrocítico para la diferenciación del hemocitoblasto son: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, normoblasto, reticulocito o eritrocito policromático y eritrocito maduro o normocito (29,30).

Desafortunadamente muchos aspectos de la biología de los eritrocitos policromáticos no han sido lo suficientemente estudiados; hasta ahora se sabe que la desnucleación del eritrocito se lleva a cabo de 6 a 8 hrs después de la última mitosis del normoblasto (31), sin embargo, no se conocen los mecanismos mediante los cuales ésta se lleva a cabo, ni se sabe

si todos los micronúcleos escapan a la expulsión.

Durante 24 hrs después de la expulsión, los eritrocitos jóvenes no pierden sus ribosomas y cuando se tiñen en forma supravital con azul de crecil brillante, este material aparece como una red interna muy fina o retículo; por lo contrario, cuando se tiñen con colorantes tipo giemsa presentan un color gris-azuloso que contrasta con los eritrocitos maduros que después de la disolución de sus ribosomas se tiñen de rosa-naranja. Por otra parte, los eritrocitos policromáticos son ligeramente más grandes que los normocitos o eritrocitos maduros.

Estas dos diferencias entre ambos tipos de eritrocitos se han empleado para poder distinguir a los policromáticos de los normocitos en el análisis de micronúcleos (21).

Las ventajas que presenta el análisis de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos son las siguientes:

- 1.- Los policromáticos son muy abundantes y fácilmente reconocibles.
- 2.- Estas células son el producto de una reciente división celular.
- 3.- No poseen núcleo lo cual facilita el análisis, ya que el núcleo

principal pudiera enmascarar a los micronúcleos.

Hasta ahora, hemos descrito las bases teóricas de la prueba de micronúcleos; a continuación analizaremos cómo se lleva a cabo esta prueba.

Ya habíamos mencionado que esta prueba es fácil de realizar: se exponen los ratones al compuesto a probar, posteriormente se sacrifican para procesar la médula y finalmente se cuantifican al microscopio los eritrocitos policromáticos con micronúcleos. Ahora bien, vamos a analizar por separado cada uno de estos pasos.

Tratamiento

Las condiciones de tratamiento se deben establecer bajo los siguientes criterios:

1.- Vía de administración

Los toxicólogos recomiendan que de preferencia se exponga a los organismos en estudio por la misma vía mediante la cual se exponen los seres humanos en forma natural; sin embargo, en pruebas de tipo genotóxico se requiere que el agente problema alcance niveles significativos en un lapso corto de tiempo; por esta razón las vías de administración más

usadas son la intraperitoneal y la oral.

2.- Dosis

Este factor se puede analizar desde dos puntos de vista:

a) Número de dosis: si solamente se usa una concentración del compuesto, pudiera ocurrir que la producción de micronúcleos se presente en concentraciones más bajas o altas. Por lo tanto es necesario abrir el intervalo de concentraciones procurando no complicar demasiado el estudio de un solo compuesto. Por esta razón es recomendable usar tres concentraciones abarcando un intervalo logarítmico y si en alguna de éstas hubiese respuesta positiva, entonces probar otras dos concentraciones más, cercanas a este punto para buscar si hay alguna relación dosis-respuesta.

b) Elección de dosis: Se debe partir de un punto para determinar las demás dosis. Los criterios para fijar este valor pudieran ser:

- La dosis a la que está expuesto el humano, y posteriormente, fijar unas diez veces menor y diez veces mayor.
- Fijar como dosis más alta, aquélla donde existan ciertos niveles de toxicidad como por ejemplo el 80% de la dosis letal (D.L.) 50 y las demás concentraciones pudieran ser 10 y 100 veces menor.
- Si el compuesto tiene un tope de solubilidad, esta concentración puede servir como la dosis más alta.

3.- Grupos Controles

a) Testigo

Constituidos por ratones no expuestos a ningún agente. Su estudio permite conocer la variabilidad espontánea de la producción de micronúcleos en la población de referencia.

b) Control negativo

Formado por ratones expuestos al solvente en el que se disuelve el compuesto en estudio; este tipo de control se requiere en cada experimento.

c) Controles positivos

También este tipo de controles se requieren en cada experimento. Se integran por ratones tratados con algún compuesto mutagénico conocido que sirve como referencia de la respuesta adecuada del sistema y para comparar la potencia de los agentes en estudio.

Puede haber dos tipos de controles positivos:

- agentes que requieran activación metabólica
- agentes que no requieran activación metabólica

4.- Tipo de Exposición

Se puede tratar a los ratones en diferentes maneras (32);

- #### a) Tratamientos de tipo agudo: donde se expone a los organismos durante 24 hrs o menos al compuesto.

b) Tratamiento de tipo subagudo: la exposición se hace, desde las 24 hrs hasta los 90 días.

c) Tratamiento de tipo crónico: la exposición se hace durante más de 90 días.

Dado que la prueba de micronúcleos está basada en eventos que causan pérdida de cromatina, es de esperarse que no sea adecuada para detectar el daño causado por la exposición crónica a los compuestos químicos, ya que si las células diploides normales pierden una apreciable cantidad de material genético, se incrementará la mortandad y se eliminarán rápidamente, y aquellas que excepcionalmente fueran viables, pierden sus micronúcleos por la acción de nucleasas y proteasas.

Salamone y col. en 1980 (33) observaron que más de un tratamiento con 24 hrs de intervalo aumentaba la sensibilidad del sistema, pero si el tratamiento se ampliaba a más de dos días la respuesta se reducía.

Por lo contrario, recientemente Schlegel y MacGregor (34), al tratar ratones durante 17 días con trietilenemelamine (TEM), demostraron que la incidencia de normocitos con micronúcleos en sangre periférica, se incrementa durante el periodo de tratamiento y se mantiene hasta los 30 días aproximadamente, donde empieza a bajar hacia los valores control.

Sacrificio

Schmid en 1976 (21) recomendó el siguiente protocolo: tratar a

los ratones a las 0 y 24 hrs y sacrificarlos a las 30 hrs; de esta manera una sola muestra representaría 6 y 30 hrs post-tratamiento.

Los estudios posteriores de Jenssen y Ramel indicaron en 1978 (31) que el muestrear a las 6 hrs no era apropiado, ya que la expulsión del núcleo se lleva a cabo de 6 a 8 hrs después de la última división mitótica, lo que indica que este intervalo no da la oportunidad de detectar micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

La necesidad de más de un intervalo de cosecha fue mostrada por los estudios de Salamone y col. en 1980 (33) donde concluyen que la máxima frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos ocurre después de 30 hrs y que es innecesario muestrear a intervalos menores de 10 hrs. Ahora bien, cada compuesto puede tener su máxima respuesta a diferentes tiempos dependiendo de la farmacocinética y de la naturaleza del compuesto; por esta razón, se recomienda sacrificar a las 48 y 72 hrs. En el caso de que no hubiese respuesta, se podrá ampliar la muestra hasta las 96 hrs o más; dependiendo del tipo de agente que se pruebe, ya que si, el compuesto que se está estudiando es un antimetabolito, la respuesta se puede retrasar.

Variables que se analizan

a) Estado proliferativo de la médula.

Schmid en 1973 (20) reportó que en condiciones normales, en la médula ósea la proporción de los eritrocitos es de un 50% de policromáticos y un 50% de normocitos. Ahora bien, si la médula se ve expuesta a agentes tóxicos y se produce alto índice de muerte celular, la proporción de normocitos aumenta, ya sea porque ya no salen a sangre circulante o porque entran de la circulación a la médula ósea. Si se cuantifican los normocitos que aparecen en los campos microscópicos donde se analizan los eritrocitos policromáticos, se puede hacer una evaluación del estado proliferativo de la médula.

b) Incremento porcentual de células con micronúcleos.

Una célula puede tener más de un micronúcleo, pero como se desconoce si éstos fueron causados por uno o varios eventos, es recomendable contar solamente las células que poseen micronúcleos aunque tengan más de uno.

Es importante señalar que aún con controles positivos a las dosis más altas, es raro encontrar más del 8% de eritrocitos policromáticos que contengan micronúcleos.

Determinación del tamaño de muestra y análisis estadístico

Para establecer el tamaño de muestra se deben considerar dos parámetros:

a) El número de eritrocitos policromáticos que se cuentan por análisis

mal.

b) El número de animales que se incluyen en cada grupo dosis-tiempo.

En algunas ocasiones los criterios estadísticos establecidos han sido poco rigurosos; por esta razón MacKey y MacGregor (35) describieron un análisis estadístico secuencial, basándose en que la incidencia de eritrocitos policromáticos con micronúcleos muestran una distribución binomial negativa. Este análisis permite al investigador optimizar el número de animales por grupo de prueba y de células analizadas por animal. Aplicando la fórmula de Oakland a sus datos, construyeron una gráfica que permite decidir si el compuesto es o no mutagénico, o si es necesario seguir muestreando (Figura 3).

En la aplicación del plan de muestreo secuencial, las cuentas de 1,000 células por animal se suman, hasta que la suma de cuentas acumulativa graficada contra el número de animales se localice arriba o debajo de las líneas del plan basado en cuentas de 1,000 células. Se debe continuar tratando animales y contando, siempre y cuando el total de cuentas caiga entre las dos líneas.

Criterios para establecer estrategias de muestreo

Cuando se trabaja con compuestos de actividad mutagénica no cono-

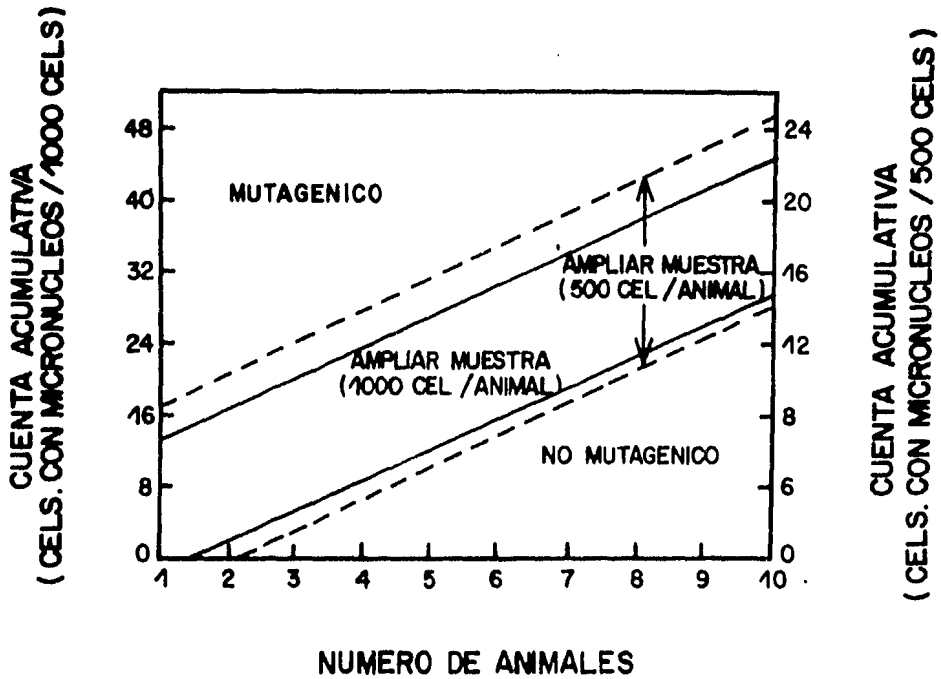


Figura 3. Límites para interpretar los valores de dos planes de muestreo secuencial, 1000 (líneas continuas) y 500 (líneas punteadas) - células por animal, de acuerdo a la distribución binomial negativa.

cida, es difícil predecir la dosis y el intervalo de sacrificio adecuados, para esto es necesario usar varios tiempos de cosecha y diferentes dosis. Pero si en un experimento se incluyen todos estos factores, su realización se hace compleja.

Para simplificar los experimentos se presentan las siguientes alternativas:

- 1) probar a diferentes tiempos de cosecha una sola dosis,
- 2) probar en un solo tiempo diferentes dosis.

Por lo general los micronúcleos se presentan cerca de las dosis tóxicas, sin embargo existen excepciones como los venenos mitóticos en los que la frecuencia de micronúcleos se incrementa en las dosis bajas ya que el ensamblaje de los microtúbulos del aparato mitótico es parcial, causando que algunos cromosomas no se puedan desplazar adecuadamente en las dosis más altas el aparato mitótico se bloquea completamente disminuyendo la presencia de micronúcleos.

La estrategia más adecuada, sería el probar diferentes dosis en un solo intervalo; en caso de obtener resultados negativos, se deberá ampliar el tiempo de sacrificio hasta las 96 hrs con las mismas dosis. Si en algún intervalo se observa respuesta positiva, el paso siguiente será

realizar una curva dosis-respuesta.

La evaluación del estado proliferativo de la médula ósea sirve como pauta para indicar una alteración en la proporción celular normal de la médula como un parámetro de toxicidad, y poder evaluar si el compuesto está llegando o no a las células blanco.

Ventajas de la prueba de micronúcleos en médula ósea

- 1 - Es un estudio in vivo en mamíferos
- 2 - La técnica es fácil, rápida y relativamente barata
- 3 - El análisis al microscopio es sencillo
- 4 - La frecuencia espontánea de micronúcleos es baja y constante en las diferentes especies
- 5 - Los micronúcleos permanecen durante todo el ciclo celular
- 6 - La técnica no necesita el uso de reactivos mutagénicos como colchicina y BrdU
- 7 - La evaluación del estado proliferativo de la médula ósea puede dar una orientación con respecto a la toxicidad de los compuestos en estudio
- 8 - Virtualmente pueden usarse todas las especies de mamíferos

Limitaciones de la prueba de micronúcleos

- 1.- Si se requiere saber el daño cromosómico específico, esta prueba es insuficiente
- 2.- El sistema no detecta agentes:
 - a) no clastógenos es decir que no rompen cromosomas,
 - b) que no causen retardo cromosómico en anafase,
 - c) que produzcan rearrreglos cromosómicos sin presencia de fragmentos,
 - d) que no lleguen a la célula blanco en suficiente concentración,
 - e) que actúen específicamente en ciertos tejidos o tipos celulares que no sean médula ósea.

Validación de la prueba de micronúcleos

Dado que la prueba de micronúcleos fue propuesta como un sustituto del análisis citogenético, para el monitoreo de agentes químicos ambientales varios autores se han preocupado por evaluar la sensibilidad de esta prueba.

De esta preocupación surgieron estudios comparativos entre la prueba de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en varios tejidos.

Heddle en 1973 (36) después de exponer a ratones a los rayos X y cuantificar aberraciones cromosómicas y micronúcleos en médula ósea, reporta que la prueba de micronúcleos resultó ser alrededor de diez veces más rápida; sin embargo, a dosis bajas la sensibilidad de esta prueba es muy limitada, por lo que recomienda el uso de esta prueba con fines de monitoreo a dosis altas.

El grupo de Goetz (23,24) estudió la sensibilidad de micronúcleos en médula ósea de humanos, ratón, rata y hamster chino. En estos trabajos concluyeron que la prueba de micronúcleos puede ser utilizada como una prueba de monitoreo, sin embargo, a pesar de ser igualmente sensibles, el análisis citogenético clásico parece ser la técnica más exacta y real.

Por el contrario, Tates y colaboradores (37,38) encontraron la siguiente relación en cuanto a sensibilidad al trabajar con ratones: en médula ósea la prueba de micronúcleos es más sensible que la de aberraciones cromosómicas; ésta a su vez es más sensible que la prueba de aberraciones cromosómicas en espermatogonia y ésta es más sensible que la de translocaciones en espermatocito.

También Jensen y col. (25,26,27) consideran que la prueba de mi-

crónucleos es más sensible que el análisis clásico de cromosomas; esta evaluación se llevó a cabo en médula ósea de pacientes con anemia pernicioso y de pacientes tratados con trimetoprim, sulfametazol y metotrexate.

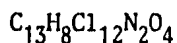
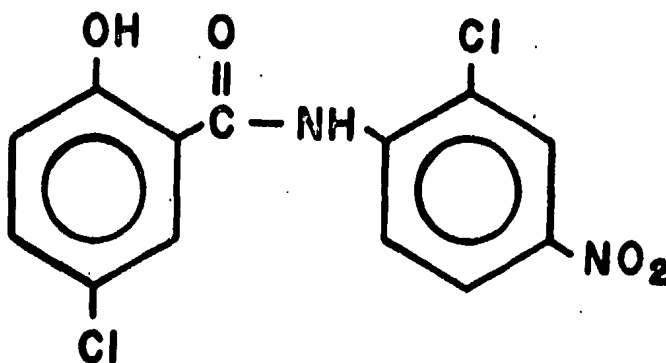
Con el fin de evaluar la capacidad para detectar agentes carcinógenos de la prueba de micronúcleos Bruce y Heddle (39) analizaron los resultados de 61 compuestos probados en los siguientes sistemas: la prueba de Ames en S. typhimurium, las anomalías en la cabeza del espermatozoide en el ratón y la prueba de micronúcleos. Reportaron que los dos primeros sistemas detectaron el 65% de los carcinógenos conocidos y que la prueba de micronúcleos, el 43%. Como cada sistema detectó compuestos diferentes, la capacidad para detectar carcinógenos conocidos se incrementa al 89% si se suman los resultados de los tres sistemas. Por esta razón los autores recomiendan el uso combinado de estas tres pruebas para el monitoreo ambiental de agentes carcinógenos.

Jenssen y Ramel (40) analizaron la correlación existente entre la prueba de micronúcleos, la prueba de Ames y la carcinogenicidad de los compuestos, y encontraron que el 80% de los agentes que mostraron capacidad carcinogénica fueron positivos en Ames y el 56% en micronúcleos. Los autores comentan que la divergencia de resultados puede ser explicada por la diferente capacidad metabólica de cada uno de los sistemas.

La agencia para la protección del ambiente de los Estados Unidos de América (EPA), nombró un grupo de expertos con el fin de evaluar la utilidad de los sistemas existentes para detectar agentes mutagénicos (gene-tox program) (28); los resultados de estos trabajos han sido publicados. El grupo que evaluó la prueba de micronúcleos reportó que más de 150 compuestos han sido probados en micronúcleos con diferentes grados de rigor, por lo que ellos establecen ciertos criterios para la utilización del sistema. La prueba de micronúcleos fue capaz de detectar el 50% de los agentes carcinógenos, sin embargo, el comité comenta que si esta prueba se usara con el protocolo recomendado, tal vez pudiera detectar hasta el 70% de los carcinógenos conocidos.

La prueba de micronúcleos ha sido recomendada por varios autores como la prueba para el monitoreo del efecto de los agentes mutagénicos in vivo en mamíferos, ya que en general muestra correlación con el análisis citogenético clásico, presentando la ventaja de ser más rápida, sencilla de realizar, fácil de analizar al microscopio y relativamente más barata.

II.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA NICLOSAMIDA



N-(2'cloro 4'nitrofenil-clorosalicilamida)

Fue introducida como taenicida en 1960. Se utiliza en el tratamiento de céstodos, fundamentalmente Taenia saginata, Taenia solium, Hymenolepis nana y el Diphylobotrium latum.

Características Fisicoquímicas

Es un polvo amarillo inodoro e insípido; p.f. 227-230°C; muy insoluble en agua, soluble en etanol 1/50, en éter 1/350, en $CHCl_3$ 1/400 y soluble en acetona.

Mecanismo de Acción

In vitro la Hymenolepis diminuta suspendida en solución salina absorbe muy poca cantidad de niclosamida, pero si a la solución se añade homogenado de intestino de rata normal o de rata ya tratada con este medicamento, aumenta mucho la cantidad del mismo, que toma el parásito.

La niclosamida produce notables efectos en el metabolismo de H. diminuta en ratas. En bajas concentraciones estimula la absorción de oxígeno, pero en altas concentraciones la respiración exógena es inhibida y la absorción de glucosa es bloqueada. Los gusanos afectados por la niclosamida tanto en el intestino como in vitro son más sensibles a la acción de las enzimas proteolíticas de los jugos digestivos que terminan por digerir a los helmintos.

Estudios efectuados con el parásito entero y las mitocondrias de los mismos, han revelado que la acción principal de la niclosamida es inhibir la incorporación del fósforo inorgánico, para la formación de adenosin trifosfato o ATP.

Toxicidad y efectos secundarios

Se ha señalado que es inocua, pues sólo causa algún trastorno gas

trointestinal. A la vez, se ha reportado que no se absorbe por el tubo digestivo, no tiene acción irritante directa, ni ha producido efectos desfavorables cuando ha sido administrada a pacientes debilitados y mujeres embarazadas (Ginnert y Schaufstätter 1960, en 41).

El seguimiento ulterior de los pacientes tratados con este medicamento no ha revelado trastornos de la función hepática ni de la renal, ni la alteración del número de corpúsculos en sangre (Abdallah y Saif 1960, en 41).

No tiene contraindicaciones como taenicida, pero conviene advertir que si el medicamento es letal para los gusanos adultos, no lo es para los huevos contenidos en los proglotidios. Esto significa que el uso de la niclosamida para el tratamiento por infestación con T. solium lleva cierto peligro de cisticercosis, porque la digestión de los anillos muertos del gusano pone en libertad huevos viables en la luz del intestino. De ahí la necesidad de administrar un purgante para eliminar todos los segmentos muertos del parásito antes que sean digeridos.

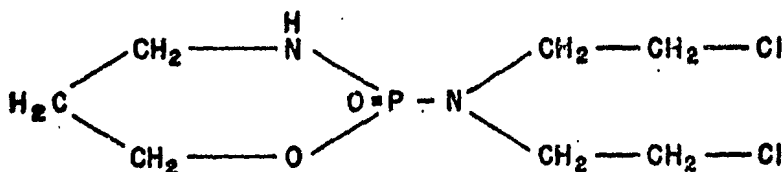
Tratamiento

Se administra oralmente en tabletas de 0.50 g para tratamientos de T. saginata, T. solium y H. nana, se recomienda:

- niños de 2 años: 1/2 tableta y una hora después, 1/2 tableta
- niños de 2 a 8 años: 1 tableta y una hora después, 1 tableta
- niños de 8 años y adultos: 2 tabletas y una hora después 2 tabletas.

También para infestaciones por H. nana se recomienda: 2 g diarios por 5 días (41).

III.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CICLOFOSFAMIDA (CF).



La ciclofosfamida se sintetizó cuando se intentaba modificar la estructura de la mecloretamina, con objeto de lograr una mayor selectividad para los tejidos neoplásicos.

Características fisicoquímicas

Es un polvo de peso molecular 261.1, soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol, benceno, etilglicol y tetracloruro de carbono; es poco soluble en éter.

Mecanismo de acción

La ciclofosfamida es una mostaza nitrogenada y como tal es un agente alquilante capaz de formar uniones covalentes con sustancias nucleofílicas como son los grupos fosfatos, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. Es capaz de alquilar al ADN, siendo particularmente sensible el nitrógeno 7 de la guanina. También son sensibles, aunque en menor grado, los nitrógenos 1 y 3 de la adenina, el nitrógeno 3 de la citosina y el oxígeno 6 de la guanina, los átomos fosfato del ADN; así como las proteínas asociadas a esta molécula.

Tal vez la clave de su actividad biológica esté contenida en la alquilación del nitrógeno 7 de la guanina, favoreciendo así su tautómero enol, el cual se puede aparear con la timina produciendo finalmente una substitución de las bases G-C por A-T. La alquilación del nitrógeno 7 de la guanina, puede también provocar, la apertura del anillo imidazol y la

depurinización por escisión de los residuos de guanina. Por otra parte, la cadena 2 cloroetil puede alquilarse a una segunda guanina o a otro grupo nucleofílico tales como grupos aminos o radicales sulfhidrilos de las proteínas; de esto puede resultar un entrecruzamiento de las dos cadenas del ADN o la unión de éste a una proteína mediante uniones covalentes muy fuertes, reacciones que tal vez causen mayor daño al ADN. Cualquiera de estos tres efectos pueden explicar su efecto mutagénico y citotóxico.

Farmacocinética

La ciclofosfamida requiere activación metabólica para ser terapéuticamente activa (Fig. 4). Primero es hidroxilada por un sistema mono-oxidasa, dependiente del citocromo p450 y se transforma en 4 hidroxí-ciclofosfamida, el cual está en equilibrio con su tautómero de anillo abierto aldófosfamida. En general se cree que estos metabolitos no tienen actividad anti-tumoral, y más bien pudieran representar pasos intermedios de la activación de la ciclofosfamida. Se siguen dos vías de metabolismo: una catalizada por una enzima soluble que da por resultado dos metabolitos relativamente tóxicos que son la carboxifosfamida y la 4-cetofosfamida y otra, que probablemente no sea enzimática, que finalmente da los metabolitos citotóxicos denominados fosfamida mostaza (PAM) y acroleína. La especificidad oncolítica de la ciclofosfamida pudiera recaer en una predominancia relativa de

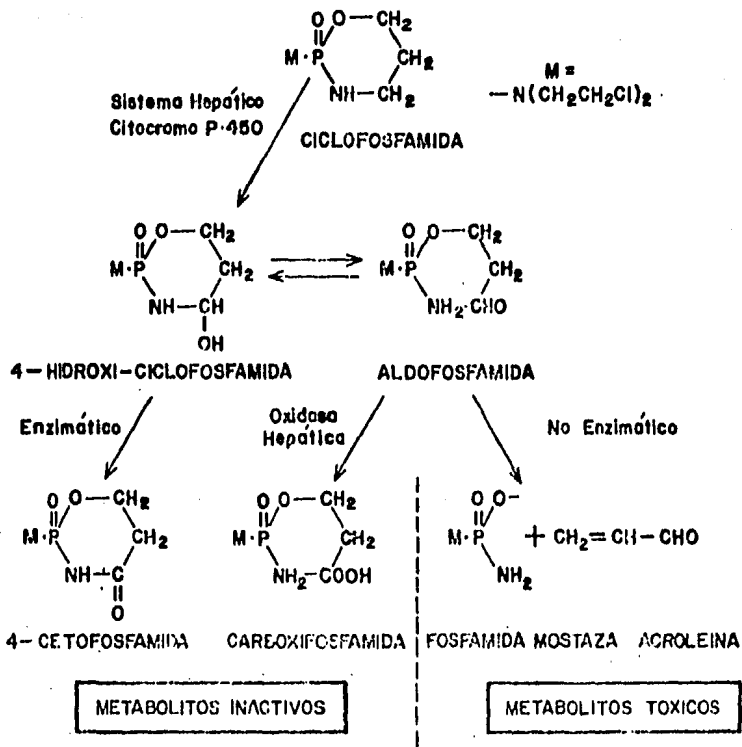


Fig. 4. Metabolismo de la ciclofosfamida tomada de: Goodman y Gilman (41)

la vía de formación de PAM y acroleína en las células tumorales si se compara con las células normales. La ciclofosfamida es carcinogénica, teratogénica y mutagénica, y todos estos efectos son mediados por sus metabolitos.

Usos terapéuticos

Se han observado buenos resultados en la enfermedad de Hodgkin, linfomas y leucemias, hemoblastosis, neuroblastomas, glomerulonefritis, retículo sarcoma, tumores ginecológicos, carcinomas de útero, ovario y broncogénicos. La ciclofosfamida también presenta propiedades inmunosupresoras por lo que se utiliza en el control del rechazo inmunológico, en transplantes y en desórdenes asociados con una reactividad inmune alterada como son la artritis reumatoide, el síndrome nefrótico en niños, la granulomatosis de Wegener y los padecimientos alérgicos oculares.

Rutas de administración y dosificación

La ciclofosfamida puede ser administrada por vía oral, intravenosa, intrapleural e intraperitoneal. Una dosis diaria de 2 a 3 mg/Kg ha sido recomendada para pacientes con neoplasias como linfomas y leucemias. También han mostrado ser útiles las administraciones únicas de 30 mg/Kg, en el tratamiento de linfomas.

Efectos adversos

Los efectos inmediatos más comunes son: náusea, vómito, liberación de la mucosa, vértigos de corta duración, hematuria y trombocitopenia.

Durante la gestación se ha reportado que en ratones es teratogénica, afectando principalmente el esqueleto (41,42).

Mutagénesis

La actividad mutagénica de la ciclofosfamida es indirecta, ya que son sus metabolitos lo que pueden interactuar con el ADN. Hampel en 1969 (42), demostró que cuando la ciclofosfamida se activa es capaz de producir aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos humanos in vitro. También puede inducir intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en humanos y mamíferos experimentales in vivo.

La ciclofosfamida ha sido utilizada para la producción de micronúcleos y se han publicado alrededor de 15 trabajos, donde se usa como un control positivo, o como una droga modelo para evaluar el sistema.

Goetz y col. en 1975 (23,24) se preocuparon por la extrapolación de los resultados experimentales en roedores, al hombre; por esta razón probaron la ciclofosfamida en varias especies: ratón, rata, hamster chino y humano. Observaron que la ciclofosfamida indujo claramente una relación dosis-respuesta tanto en la frecuencia de rompimientos cromosómicos y metafases anormales, como la frecuencia de micronúcleos. Cuando se compararon los resultados entre roedores y humanos a la misma dosis (40 mg/Kg), el patrón de sensibilidad de las diferentes especies fue el siguiente: el ratón resultó ser la especie más sensible, siguiendo en orden descendiente la rata, el hamster chino y el humano; este resultado puede ser ocasionado por el diferente metabolismo que sufre la ciclofosfamida en cada especie.

En 1976, Maier y Schmid (22) probaron ciclofosfamida junto con 10 drogas modelo, para evaluar la prueba de micronúcleos. Ellos observaron para ciclofosfamida el siguiente comportamiento: a dosis bajas, la sustancia transformada en el hígado se elimina antes de alcanzar las células - blanco, pero a dosis altas se requiere un lapso de tiempo mínimo para transformarse a mutágeno.

Salamone y col. en 1980 (33), utilizan la ciclofosfamida para establecer el protocolo óptimo de la prueba de micronúcleos, ellos observan - que el incremento mayor de micronúcleos producidos por la CF se encuentra

a las 48 hrs si solamente se inyectó una vez, pero si el tratamiento es doble, entonces este incremento se observa hasta las 60 hrs.

Mitchell (43), prueba ciclofosfamida en roedores, con el fin de evaluar el método estadístico más adecuado para las siguientes pruebas micronúcleos, metafases en médula ósea y dominantes letales. Concluye que la distribución binomial negativa se adapta mejor a los resultados obtenidos con estas pruebas.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

a) Compuestos químicos

Niclosamida (Bayer); Ciclofosfamida (Genoxal, Lab. Shering); Goma arábiga (Sigma); Suero fetal de bovino (Microlab); Giemsa (Merck); Metanol (Baker); Etanol (Baker); Na_2HPO_4 (Baker); KH_2PO_4 (Baker).

b) Material biológico

Ratones machos de la cepa CD1 de 8 a 12 semanas de edad.

II. Metodos

a) Preparación de soluciones

Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de la administración. La niclosamida es muy insoluble en agua, por lo que se administró suspendida en una solución de goma arábiga-etanol al 2/15% (P/V). Para las soluciones de ciclofosfamida se utilizó el mismo vehículo.

b) Tratamiento

La niclosamida y ciclofosfamida se administraron a las 0 y 24 hrs a las dosis de 30, 150, 300 y 10, 50, 100 mg/Kg de peso respectivamente, por vía oral forzada a través de sonda. El grupo control recibió solamente el vehículo. El número de animales por grupo de tratamiento varió de 4 a 8 ratones.

c) Recuperación de la médula

Se tomaron muestras de médula a las 12, 24, 36, 48, 72 y 96 hrs mediante la técnica reportada por Schmid (21):

1.- Inmediatamente después de sacrificar al animal, se extrajeron los fémures y se limpiaron con una gasa hasta quedar libres de músculos.

2.- Se cortó el extremo proximal, a manera que la cavidad del hueso quedara visible.

3.- Se insertó en la cavidad del hueso una jeringa de 1 ml con 0.2 ml de suero fetal bovino, inactivado a 56°C durante 30 min y filtrado por millipore 0.45 μ .

4.- Así insertada la jeringa, se sumergió el hueso en 5 ml de suero fetal bovino contenido en un tubo de centrifuga y se resuspendió suavemente, absorbiendo y expulsando con el émbolo.

5.- Se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 min.

6.- Se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur. En el caso de sedimentos grandes se agregó una gota de suero, o bien se suspendió todo el sedimento cuidadosamente con repetidas aspiraciones con una pipeta Pasteur.

7.- Se puso una pequeña gota de esta suspensión al final de un portaobjetos y se extendió empujando al material con un cubreobjetos inclinado en un ángulo de 45°C. El tamaño de la gota fue tal que todo el material fuera distribuido de 2 a 3 cm. La preparación se secó al aire.

La técnica de tinción usada fue la reportada por Salamone y col. (33):

- Veinticuatro horas después de la preparación de las laminillas se fijaron en metanol absoluto por 5 min y se tñieron por 20 min en Giensa al 5% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (0.71 g de Na₂HPO₄, 0.68 g de KH₂PO₄, 1000 ml de agua destilada), ajustando el pH a 6.8.

- Se lavaron en agua corriente y se dejaron secar. Se limpiaron por detrás con metanol.

d) Análisis al microscopio

- Se analizaron 500 ó 1,000 eritrocitos policromáticos por ratón.

- El análisis se hizo tomando en cuenta las células con micronúcleos sin importar cuantos tenían.

- La lectura se llevó a cabo "a ciegas", es decir sin conocer la clave de la laminilla.

- Se leyeron campos contiguos. Un criterio para establecer los campos de muestreo fue la calidad de las células nucleadas, que en general se encuentran situadas en las orillas, y la tinción.

- La evaluación de la relación de eritrocitos policromáticos/normocitos, se llevó a cabo solamente en las curvas dosis-respuesta, como un parámetro que indica toxicidad.

e) Análisis estadístico

El método secuencial de Mackey y MacGregor (35) fue usado para de terminar el tamaño de muestra y decidir si los compuestos fueron mutagénicos o no lo fueron.

RESULTADOS

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de micronúcleos realizado a las 48, 72 y 96 hrs después de administrar a un grupo de ratones niclosamida en concentraciones de 150 y 300 mg/Kg de peso y a otro 100 mg/Kg de peso de ciclofosfamida. Como puede verse no se observó incremento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos con micronúcleos en los ratones testigos, ni en los expuestos a niclosamida. Mientras que, la respuesta obtenida con ciclofosfamida, se ve que disminuye con el tiempo.

En este experimento se recuperaron además, las orinas de los ratones que recibieron niclosamida y se determinó la presencia en ellas de actividad mutagénica mediante el sistema bacteriano de Salmonella typhimurium. Este ensayo tuvo como objeto buscar evidencias que indiquen la generación in vivo de posibles metabolitos mutagénicos de niclosamida y por ende estar seguros de que el medicamento se absorbe. En la orina de los ratones a los que se administró por vía oral 150 mg/Kg de peso de niclosamida, se detectó actividad mutagénica a las 24 y 48 hrs, más no a las 72 hrs. Por el contrario con la dosis de 300 mg/Kg de peso se encontró mutagenicidad hasta las 72 hrs, pero no a las 96 hrs.

Estos resultados sugieren que los metabolitos de niclosamida se excretan en mayor concentración en las primeras horas después de su administración. Con este criterio se tomaron muestras de médula a las 12, 24, 36 y

TABLA 3

EFECTOS DE NICLOSAMIDA Y CICLOFOSFAMIDA EN MEDULA OSEA DE RATON

	RECUPERACION DE LA MUESTRA (HORAS)	NUMERO DE ANIMALES	POL ANALIZADAS POR ANIMAL	POL TOTALES	POL CON MICRONUCLEOS	% DE POL CON MICRONUCLEOS	RESULTADO ESTADISTICO	ACTIVIDAD MUTAGE- NICA EN ORINA* - gluc	+gluc
Control (goma arábica)	24							--	--
	48	4	500	2,002	2	0.1	--	--	--
	72	5	500	2,500	0	0	--	--	--
	96	5	500	2,294	7	0.3	--	--	--
Niclosamida (150 mg/Kg de peso)	24							++	TOX
	48	4	500	2,005	25	1.2	--	++	TOX
	72	4	500	2,002	2	0.1	--	--	--
	96	5	500	2,518	7	0.3	--	--	--
Niclosamida (300 mg/Kg de peso)	24							TOX	TOX
	48	5	500	2,505	5	0.2	--	++	TOX
	72	5	500	2,505	5	0.2	--	+	++
	96	5	500	2,501	8	0.3	--	--	--
Ciclofosfamida (100 mg/Kg de peso)	48	4	500	2,045	145	7	+		
	72	5	500	2,315	139	6	+		
	96	4	500	2,044	84	4.6	+		

* Capacidad para inducir revertantes en *S.thyphimurium* (cepa TA 1538). La - glucoronidasa libera los metabolitos mutagénicos conjugados, aumentando su actividad. TOX: Toxicidad; + Actividad mutagénica; -- Ausencia de actividad mutagénica.

TABLA 4

EFECTOS DE NICLOSAMIDA EN MEDULA OSEA DE RATON

	RECUPERACION DE LA MUESTRA (HORAS)	NUMERO DE ANIMALES	POL ANALIZADOS POR ANIMAL	POLICROMATICOS TOTALES	POL CON MICRONUCLEOS	% DE POL CON MICRONUCLEOS	RESULTADO ESTADISTICO
Control (goma arábica)	12	5	500	2,506	6	0.2	-
	24	5	500	2,514	14	0.5	-
	36	5	500	2,517	17	0.7	-
	48	4	1,000	4,004	8	0.2	-
Niclosamida (150 mg/Kg de peso)	12	5	500	2,512	12	0.5	-
	24	5	500	2,507	7	0.3	-
	36	5	500	2,523	23	0.9	-
	48	4	1,000	4,042	15	0.4	-
Ciclofosfamida (100 mg/Kg de peso)	48	4	500	2,000	189	9.4	+

48 hrs a los ratones que recibieron 150 mg/kg de peso de niclosamida, para cubrir el periodo en el que se sabe la droga está en el organismo. Como control positivo se utilizó ciclofosfamida (100 mg/kg), recuperando la muestra únicamente a las 48 hrs.

Los resultados se muestran en la tabla 4 en la que se puede observar que los valores de micronúcleos para cada uno de los tiempos del muestreo obtenidos en el grupo de ratones expuestos a niclosamida, no varían con respecto a los del grupo testigo. Estos datos se pueden comparar con los de ciclofosfamida, donde el incremento de células con micronúcleos sí fue estadísticamente significativo.

Dados los resultados negativos obtenidos con niclosamida, se consideró interesante evaluar la capacidad citotóxica de este agente y de la ciclofosfamida como control positivo, usando diferentes dosis, para excluir la posibilidad de que la ausencia de micronúcleos en los ratones expuestos a niclosamida se debiera a un efecto tóxico. Para llevar a cabo este estudio, se tomaron en cuenta el número de normocitos existentes en los campos necesarios para contar 400 policromáticos. Teóricamente en una médula normal, la relación existente entre policromáticos/normocitos debe ser de 1:1, es decir, el valor de la relación: Pol./Nor. en animales controles será cercano a uno, en caso de toxicidad dicha relación se altera por invasión de la médula por normocitos sanguíneos.

TABLA 5

RELACION DOSIS-RESPUESTA DE NICLOSAMIDA A LAS 48 HRS.

	NUMERO DE ANIMALES	POLICROMATICOS TOTALES	POL CON MICRONUCLEOS	% POL CON MICRONUCLEOS	POL/NOR	RESULTADO ESTADISTICO
Control (goma arábica)	4	4,011	9	0.22	1.21	--
Niclosamida (30 mg/Kg de peso)	5	4,509	9	0.19	1.11	--
Niclosamida (150 mg/Kg de peso)	4	4,018	9	0.22	1.46	--
Niclosamida (300 mg/Kg de peso)	4	4,008	8	0.20	1.02	--
Ciclofosfamida (100 mg/Kg de peso)	4	3,866	313	8	0.14	+

TABLA 6

RELACION DOSIS-RESPUESTA DE CICLOFOSFAMIDA A LAS 48 HRS.

	NUMERO DE ANIMALES	POLICROMATICOS TOTALES	POL CON MICRONUCLEOS	% POL CON MICRONUCLEOS	POL/NOR	RESULTADO ESTADISTICO
Control (goma arábica)	8	3,763	3	0.07	0.86	--
Ciclofosfamida (10 mg/Kg de peso)	8	4,064	49	1.2	0.84	+
Ciclofosfamida (50 mg/Kg de peso)	8	4,050	126	3.1	0.36	+
Ciclofosfamida (100 mg/Kg de peso)	8	4,068	313	7.7	0.28	+

Para éste ensayo se tomaron muestras a las 48 hrs a ratones que recibieron 30, 150 y 300 mg/kg de peso de niclosamida y 10, 50 y 100 mg/kg de ciclofosfamida.

En las Tablas 5, 6 y Figura 5 se muestran los valores obtenidos con cada uno de los compuestos. En el caso de los ratones a los que se administró la ciclofosfamida se observa un incremento de policromáticos con micronúcleos proporcional al aumento de la dosis, no así en los que recibieron niclosamida cuyos valores de micronúcleos no varían de los del control.

La evaluación del estado proliferativo de la médula indica lo siguiente: con ciclofosfamida el valor de policromáticos/normocitos disminuye en relación con el aumento de la dosis, por lo tanto hay un incremento anormal de normocitos en médula que se puede interpretar como muerte de las células medulares. Los valores de policromáticos/normocitos de las diferentes dosis de niclosamida permanecen por el contrario, dentro del intervalo normal.

CURVA DOSIS - RESPUESTA DE NICLOSAMIDA Y CICLOFOSFAMIDA

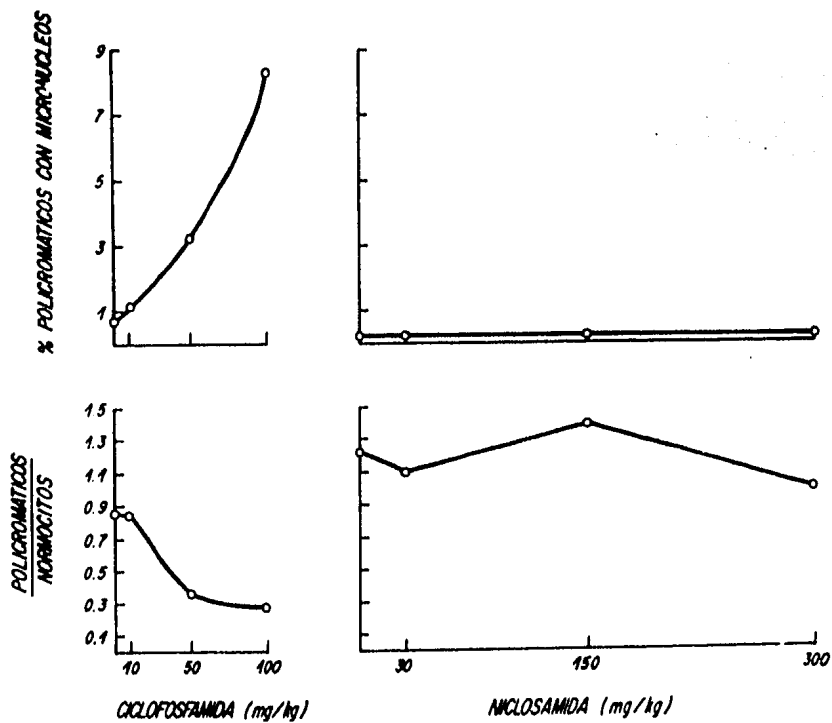


Figura 5. Curva dosis-respuesta de ciclofosfamida y niclosamida. Los puntos sobre las ordenadas pertenecen al grupo control.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron con la ciclofosfamida utilizada en este estudio como una droga modelo, confirman la gran potencialidad de la prueba de micronúcleos para el estudio de agentes mutagénicos. Estos resultados son además interesantes en vista que este compuesto, ampliamente utilizado en la prueba de micronúcleos, aparentemente no había sido administrado por vía oral como ocurrió en el presente estudio.

En la Tabla 3 se puede observar que a las 48 hrs después de su administración, la ciclofosfamida induce la mayor proporción de eritrocitos policromáticos con micronúcleos, y que éstos disminuyen paulatinamente a las 72 y 96 hrs. Estos datos coinciden con los reportados por Salamone (33) después de administrarla intraperitonealmente. En cuanto a la relación dosis-respuesta nuestros resultados se asemejan a los reportados por Maier y Schmid (22), quienes por la vía intraperitoneal también observaron un aumento en la inducción de micronúcleos en relación con la dosis hasta los 500 mg/Kg de peso; por lo contrario Salamone y colaboradores (33) y Goetz y colaboradores (23) discrepan en este sentido, ya que ellos observan la mayor inducción de policromáticos con micronúcleos alrededor de los 40 y 50 mg/Kg de peso y una disminución entre los 90 y 100 mg/Kg de peso. Estas diferencias pudieran deberse, no tan solo al tipo de vía de administración empleada en dichos estudios, sino a las condiciones específicas de cada experimento tales como: el protocolo experimental es

decir la dosificación, tiempo de recuperación de la médula y número de células analizadas, el origen de los compuestos y la diferente sensibilidad a los mismos entre cepas, que se ha observado en estudios previos en el laboratorio. Un estudio bajo las mismas condiciones experimentales, administrando ciclofosfamida por diferentes vías podría esclarecer si la capacidad de este compuesto para producir micronúcleos se modifica con respecto a la vía de administración.

Es importante señalar que en la evaluación del estado proliferativo de la médula (policromáticos/normocitos), se encontró un comportamiento relacionado con la producción de micronúcleos, ya que con la dosis de 10 mg/Kg de peso el aumento de normocitos en médula es mucho menor que en la dosis de 50 y 100 mg/Kg de peso, donde se incrementa la frecuencia de células con micronúcleos. Estos resultados muestran que este tipo de evaluación sirve como un criterio auxiliar para conocer la disponibilidad del compuesto en estudio a nivel del órgano blanco, en otras palabras, nos da idea de la accesibilidad de la médula a la ciclofosfamida así como de la toxicidad de esta droga.

En nuestro estudio se empleó la dosis de 100 mg/Kg de peso de ciclofosfamida, como control positivo, ya que como podemos observar no hubo mucha variabilidad en los valores obtenidos de experimentos que se realizaron

en el laboratorio.

La niclosamida no indujo un aumento en la frecuencia de células con micronúcleos en ninguno de los diferentes tiempos de cosecha, ni con las diferentes dosis empleadas, que son las máximas por la insolubilidad de la droga, a pesar de que los resultados del estudio de la mutagenicidad en S. typhimurium de la orina de los ratones tratados con esta droga sugieren que la niclosamida y sus metabolitos están presentes in vivo hasta las 72 hrs después de la administración. Sin embargo, no se puede excluir que, a pesar de que la niclosamida se encuentre dentro del organismo esté llegando a las células blanco en suficiente concentración para producir el efecto que se busca. De hecho el estudio de la relación de policromáticos/normocitos, mostró que la droga no tiene efectos tóxicos en médula, lo que también podría interpretarse como que no está llegando a ella o no lo hace en suficiente cantidad.

Dado que los micronúcleos representan más bien un evento letal, es de esperarse que su producción se dé a las dosis altas, por lo que en el caso de la niclosamida sería necesario aumentar su concentración hasta niveles letales para el animal, y analizar la relación de policromáticos/normocitos con el objeto de explorar aún más si este compuesto llega o no a la médula ósea. Para este fin, deberán prepararse las soluciones

de niclosamida con otro solvente, ya que en este estudio la concentración más alta que se pudo disolver fué de 300 mg/Kg de peso suspendida en goma arábica. Se podrían también, emplear otras alternativas para estudiar sus efectos como el administrarla por vía intraperitoneal. Sin embargo, estas decisiones dependen de la relevancia de los datos que se obtengan mediante esos ensayos y el costo que representen.

Podemos concluir, con fines prácticos, que en este estudio en el que la niclosamida se administró por la misma vía a la que se expone el humano y en una dosis 10 veces mayor que la recomendada terapéuticamente, no se alteró la frecuencia espontánea de células con micronúcleos. Este resultado, aunado a los obtenidos en otros sistemas biológicos empleados en el laboratorio, permitirá valorar si la niclosamida representa o no un riesgo potencial para la población que se expone a ella. Además, se confirmó que la ciclofosfamida es un compuesto altamente genotóxico, mientras la niclosamida a las dosis usadas no lo es.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cortinas de Nava, C. (1980). Capacidad mutagénica, carcinogénica y teratogénica de medicamentos amebicidas y antihelmínticos. Posibles fuentes de riesgo en el consumo de amebicidas y antihelmínticos. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.: 79-90.
- 2.- Castillo de Sánchez, M.L. (1980). Recomendaciones para la evaluación de los efectos ocasionados por los medicamentos antiparasitarios. Posibles fuentes de riesgo en el consumo de amebicidas y antihelmínticos. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.: 1-11.
- 3.- Cortinas de Nava, C., Espinosa, J., García, L., Zapata, A.M. y Martínez, E. (1983). Mutagenicity of antiamebic and anthelmintic drugs in the Salmonella typhimurium microsomal test system. Mut. Res. 117: 79-91.
- 4.- Sharma, C.B.S.R. y Sahú, R.K. (1977). Cytogenetics hazards from agricultural chemicals. Mut. Res. 46: 19-26.
- 5.- Te-Hsiu, M.A., Sparrow, A.H., Scheirer, L.A. y Nauman, A.F. (1978). Effect of 1,2 bromoethane on meiotic chromosomes of Tradescantia. Mut. Res. 53: 112-113.
- 6.- Linnainmaa, K., Meretoga, T., Sorsa, M. y Vainio, H. (1978). Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide. Mut. Res. 58: 277-286.
- 7.- Sekiguchi, T., Shelton, K. y Ringertz, N.R. (1978). DNA content of microcells prepared from rat kangaroo and mouse cells. Exp. Cell. Res. 113: 247-258.

- 8.- Ashwood-Smith, M.J., Grant, E., Heddle, J.A. y Friedman, G.B. Hamster cells sensitized to near-ultraviolet light by psoralen and agelicin. *Mut. Res.* 43: 377-385.
- 9.- Countryman, P.I. y Heddle, J.A. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mut. Res.* 41: 321-332.
- 10.- Heddle, J.A., Lue, C.B., Saunders, E.F. y Bens, R.A. (1978) Sensitivity of five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus test. *Cancer Res.* 38: 2983-2988.
- 11.- Trzos, R.J., Petzold, G.L., Brunden, M.N. y Sweberg, J.A. (1978) The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mut. Res.* 58: 79-86.
- 12.- Rotislav, C. (1979) Evaluation of benzidine by the micronucleus test. *Mut. Res.* 67: 383-384.
- 13.- Tsuchimoto, T. y Matter, B.E. (1979) In vivo cytogenetic screening methods for mutagens, with special reference to the micronucleus test. *Arch. Toxicol.* 42: 239-248.
- 14.- Lahdetie, J. y Parvinen, M. (1981) Meiotic micronuclei induced by the X-rays in early spermatids of the rat. *Mut. Res.* 81: 103-115.
- 15.- MacGregor, J.T., Wehr, C.M. y Gould, D.H. (1980) Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mut.* 2: 509-514.
- 16.- Tates, A.D., Neutheboom, Hofker, M. y den Engelse, L. (1980) A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. *Mut. Res.* 74: 11-20.

- 17.- Cole, R.J. y Taylor, N.A. (1979) Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature* 277: 317-318.
- 18.- Cole, R.J., Taylor, N., Cole, J. y Arlett, C.F. (1981) Short-term Tests for transplacentally active carcinogens. I. micronucleus formation in fetal and maternal erythroblasts. *Mut. Res.* 80: 141-157.
- 19.- Von Ledenburg, M. y Schmid, W. (1973) The micronucleus test. Methodological aspects. *Mut. Res.* 19: 109-117.
- 20.- Schmid, W. (1973) Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. *Agents and Actions* vol. 3/2: 77-85.
- 21.- Schmid, W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. *Chemical Mutagens* vol. 4. Editado por A. Hollaender. Plenum Press. New York.
- 22.- Maier, P. y Schmid, W. (1976) Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mut. Res.* 40: 325-338.
- 23.- Goetz, P. Sram, R.J. y Dohnalova, O. (1975) Relationship between experimental results in mammals and man. I. Cytogenetic analysis of bone marrow injury induced by a single dose of cyclophosphamide. *Mut. Res.* 31: 247-254.
- 24.- Goetz, P., Sram, R.J., Kodytkova, I., Doslatova, O. y Bartova, J. (1976) Relationship between experimental results in mammals and man. II. Cytogenetic analysis of bone marrow-cells after treatment of cytembena and cyclophosphamide-cytembena combination. *Mut. Res.* 41: 143-152.
- 25.- Jensen, M.K. (1977) Cytogenetic findings in pernicious anemia. Comparison between results obtained with chromosome studies and the micronucleus test. *Mut. Res.* 45: 249-252.

- 26.- Jensen, M.K. y Nyfors, A. (1979) Cytogenetic effects of methotrexate on human cells in vivo. Comparison between results obtained by chromosome studies on bone marrow cells on blood lymphocytes and by the micronucleus test. Mut. Res. 64: 339-343.
- 27.- Sorensen, P.J. y Jensen, M.K. (1981) Cytogenetic studies in patients treated with trimetoprim-sulfamethoxazole. Mut. Res. 89: 91-94.
- 28.- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Larsen, K., MacGregor, J.T., Newell, G.W. y Salamone, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity (comunicación personal).
- 29.- Leeson, C.R. y Leeson, T.S. (1977) Histología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Tercera edición. México, D.F.
- 30.- Ham, A.W. (1970). Tratado de Histología. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Sexta edición. México, D.F.
- 31.- Jenssen, D. y Ramel, C. (1978) Factors affecting the induction of micronuclei at low dosis of X-rays, M.M.S. and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts. Mut. Res. 58: 51-65.
- 32.- Organización Panamericana de la Salud (1978) Criterios de salud ambiental. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las substancias químicas. Parte I. Servicio de comunicaciones y documentación de la OPS/OMS. México, D.F.
- 33.- Salamone, M. Heddle, J., Stuart, E. y Katz, M. (1980) Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzantracene. Mut. Res. 74: 347-356.

- 34.- Schlegel, R. y MacGregor, J.T. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice (en prensa).
- 35.- MacKey, B.E. y MacGregor, J.T. (1979) The micronucleus test: Statistica design and analysis. *Mut. Res.* 64: 195-204.
- 36.- Heddle, J.A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mut. Res.* 18: 187-190.
- 37.- Tates, A.D. y Natarajan, A.T. (1976) A correlative study on the genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow and spermatogonia of mice. I. CNU-ethanol. *Mut. Res.* 37: 267-270.
- 38.- Tates, A.D., Natarajan, A.T., De Vogel, N. y Meijers, M. (1977) A correlative study on genetic damage induced by chemical mutagens in bone marrow on spermatogonia in mice. III. 1,3 bis (2-cloroethyl)-3 nitrosourea(BCNU). *Mut. Res.* 44: 87-95.
- 39.- Bruce, W.R. y Heddle, J.A (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleous, Salmonella and sperm anormality assays. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 319-334.
- 40.- Janssen, D. y Ramel, C. (1980) The micronucleus test as part of short-term prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mut. Res.* 75: 191-202.
- 41.- Goodman y Gilman (1980) The pharmacological basis of therapeutics. 6ª edición. MacMillan publishing Co. Inc. New York.
- 42.- Naw, H., Spielmann, H., Lo Turco Mortler, C.M., Winckler, K., Ridel, L., y Obe, G. (1982) Mutagenic, teratogenic and pharmacokinetic properties of cyclophosphamide and some of its deuterated derivatives. *Mut. Res.* 95: 105-118.

- 43.- Mitchell, I. de G., Dixon, P.A., White, D.J. (1981) Analysis of in vivo results of cyclophosphamide-induced chromosomal damage in mammals from sensitivity and statistical aspects. Jour. Toxicol. Environ. Health. 7: 585-592.