

00381 13  
28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Frecuencia de mutación en el *locus hprt* de  
linfocitos de pacientes con neurocisticercosis  
y su modificación por el tratamiento con  
praziquantel**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**Doctora en Ciencias (Biología)**

Presenta

**Regina Dorinda Montero Montoya**

Asesorada por

**Dra. Patricia Ostrosky-Wegman**

México, D.F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Sistemas de prueba para el estudio de las mutaciones somáticas	7
Mutaciones en la cadena $\beta$ de la hemoglobina A	9
Mutaciones en la glicoforina A	10
Mutaciones en los alelos A2, A3 del sistema HLA	10
Mutaciones en el locus hprt	12
Neurocisticercosis	16
Tratamientos	17
Genotoxicidad del praziquantel	18
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	20
MATERIAL Y METODOS	22
Individuos estudiados	22
Tratamiento con praziquantel	23
Toma de muestra	23
Cuantificación de mutaciones en el locus hprt	24
Pruebas estadísticas	26
RESULTADOS	28
Frecuencias de variación	29
Características generales de la exposición	31
Indices de marcaje	32
Relación entre indices de marcaje y frecuencia de variación	33

<b>DISCUSION</b>	<b>34</b>
<b>Frecuencias de variación</b>	<b>34</b>
<b>Respuesta individual</b>	<b>36</b>
<b>Efecto del parásito</b>	<b>37</b>
<b>Efecto del praziquantel</b>	<b>39</b>
<b>Indice de marcaje</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>43</b>
<b>TABLAS</b>	
<b>CUADROS</b>	
<b>FIGURAS</b>	

## RESUMEN

El presente estudio es un monitoreo de genotoxicidad realizado en individuos afectados por neurocisticercosis, expuestos a una combinación de agentes y métodos de diagnóstico y sometidos a un tratamiento con el fármaco praziquantel.

La prueba aplicada es la que detecta mutaciones en el locus de la enzima hipoxantina-guaninafosforribosiltransferasa (HPRT) en linfocitos de sangre periférica, propuesta como prueba de mutagenicidad en 1979 y actualmente en validación para su uso en el monitoreo de individuos expuestos por motivos de trabajo, accidente o tratamiento médico.

Los resultados encontrados demuestran variabilidad en la respuesta de diferentes individuos por exposición a los mismos agentes. Esto tiene importancia biológica en primera instancia, y médica, ya que queda de manifiesto que cada individuo es capaz de responder al medio ambiente de diferente manera, de ahí que cuando se estudian grupos de individuos no se obtiene una respuesta característica a los agentes mutagénicos, sino que se encuentra una escala o distribución de ellas; desde una falta de respuesta hasta una respuesta muy alta, que se sale de la distribución.

Este tipo de resultados señalan la necesidad de emprender estudios que permitan explicar el porqué de la variabilidad y cuáles podrían ser sus consecuencias en términos de salud, para los individuos estudiados por estar expuestos a agentes mutagénicos.

## INTRODUCCION

Todo cambio en la información genética que no se deba a la recombinación de los genes es una mutación. Los cambios en el fenotipo celular debidos a las mutaciones varían desde unos tan drásticos que resultan letales, hasta los que apenas pueden advertirse, con toda una gama intermedia de alteraciones moderadas (Dobzhansky 1975).

Las mutaciones pueden ser de diversos tipos:

1. De los genes o génicas, que son modificaciones causadas por sustitución (transiciones y transversiones), adición o eliminación de nucleótidos dentro del DNA o del RNA de un gen.

2. Rearreglos cromosómicos estructurales que afectan el modo de agruparse de los genes en los cromosomas, por pérdida o duplicación de alguno de ellos, lo que provoca deleciones o amplificaciones; o por traslocaciones en las que grupos de genes cambian de un cromosoma a otro; inversiones, en las que el orden en que se presenta un grupo de genes cambia debido a una rotación de  $180^\circ$ , y transposiciones en las que un bloque de genes se desplaza a una nueva posición dentro de un cromosoma.

3. Cambios cromosómicos numéricos por los que se producen:

aneuploidías si se pierde o se gana uno o más cromosomas del agrupamiento normal ( $2n=46$  en células del ser humano); haploidías si se pierde un agrupamiento completo de cromosomas en un organismo diploide ( $n=23$  en células de humano) y poliploidías si se adquieren juegos completos de cromosomas ( $3n, 4n, \text{etc.}$ ) (Dobzhansky 1975, IARC/WHO 1987).

Las mutaciones se producen como un fenómeno natural cuando hay una interacción entre agentes químicos o radiaciones presentes en el ambiente que rodea a una célula, con el DNA, material susceptible de sufrir cambios debido a esas interacciones o a causa de errores introducidos por algunas enzimas que participan en su síntesis, reparación, transcripción, traducción o segregación (Cortinas y cols. 1980).

Las mutaciones son raras si se consideran en el contexto de un solo gen, pero son muy comunes evaluadas a nivel de todo el genoma y lo son aún más, tomadas en el contexto del acervo génico de toda una población (McLean 1989).

Además de que las mutaciones génicas ocurren al azar y constituyen una excepción en la estructura y replicación normales del DNA, no son específicas de un gen particular, organismo o generación y, principalmente, no son adaptativas per se, es decir, no se dan en respuesta a una necesidad adaptativa (McLean 1989).

Las mutaciones génicas, afectan a la célula individual en la que suceden. De la etapa del desarrollo en que ocurrieron y del nivel de diferenciación de las células afectadas dependerá el que las mutaciones tengan efecto en todo el organismo; y si las mutaciones fueron en células reproductivas, existe entonces la posibilidad de que sean transmitidas a la descendencia del organismo. En el primer caso, se trata de mutaciones somáticas no heredables a la descendencia, y en el segundo, de mutaciones germinales heredables. Sin embargo, aunque los cambios genéticos en las células somáticas no trascienden hasta las características genéticas colectivas de las poblaciones humanas, ni afectan la evolución de la especie (Dobzhansky 1975) sí se transmiten a las células hijas de la célula afectada y se tienen evidencias de que la persistencia de ese daño, así como el incremento de estos eventos por encima de los niveles normales, en un individuo, podrían tener consecuencias para su salud y si esto se produce en un número de individuos tal que se note en una población dada, se constituirían también en problemas médicos con repercusión económica y social. Además, el hecho de que se originen mutaciones somáticas no contradice ni descarta la posibilidad de que también estén ocurriendo mutaciones en las células germinales.

En diversos estudios realizados en animales de experimentación se ha observado que la proporción de daño en las células reproductoras siempre es menor que el encontrado en las células somáticas, así que un incremento significativo en el daño somático podría ser despreciable en células reproductoras y no tener ninguna trascendencia. No obstante, se desconoce cuánto daño es necesario para traducirse en un problema de salud o en una progenie afectada, y cuál es la frecuencia de mutación necesaria para aumentar su probabilidad. Esta incógnita persiste aún, a pesar de los conocimientos que hasta la fecha han aportado los estudios de genética toxicológica realizados en individuos expuestos a mutágenos y que han presentado un incremento significativo en su frecuencia de mutación somática.

Uno de los objetivos de la genética toxicológica es determinar si el incremento en las frecuencias de mutación somática favorece la ocurrencia de enfermedades degenerativas, tales como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y, en última instancia, el envejecimiento (Cortinas y cols. 1980, WHO/IPCS 1985, WHO 1973). Se sabe

que hay agentes que pueden afectar al material genético, pero no sabemos a quiénes, en qué medida, por cuánto tiempo ni en qué etapa de nuestras vidas, porque no conocemos cuál es la resistencia real de nuestro material genético en contra de esos agentes, es decir, aún no entendemos cómo está constituida nuestra susceptibilidad genética, ya sea somática o germinal. Para la Organización Mundial de la Salud esta es una preocupación desde su fundación en 1947, porque en los países más pobres, la baja calidad de las condiciones sanitarias y las enfermedades contagiosas asociadas eran desde entonces las fuentes principales de morbilidad y mortalidad (WHO/IPCS, 1985). Pero en los países industrializados y con mejor economía, los peligros ambientales también existen, aunque de otro tipo: factores físicos y químicos directamente relacionados con la industria moderna.

Actualmente, en los países pobres y de lento desarrollo estos factores se suman con los anteriores constituyen una amenaza para la salud de sus habitantes. Todavía es necesario definir cuales son los efectos adversos que dicho ambiente provoca a largo plazo sobre la salud.

La influencia ambiental sobre la salud, por ejemplo, tiene que ver con condiciones climáticas, sanitarias, alimenticias, hábitos en el hogar y en el trabajo, alcoholismo, tabaquismo, drogadicción, tratamientos médicos, historia personal de exposición a agentes físicos o químicos, etcétera. La afección puede ser a nivel de órganos, de tejidos, enfermedades agudas, crónicas, por agentes virales o por bacterias, parasitosis, desórdenes inmunológicos o genéticos adquiridos en algún momento a partir del desarrollo embrionario. El daño adquirido desde el desarrollo embrionario podría tener un origen genotóxico, es decir, ser resultado de un cambio en la información genética debido a un mutágeno; pero en el resto de las afecciones mencionadas también podría haber un origen genotóxico (como en algunos desórdenes inmunológicos) o bien, podrían ser la causa de genotoxicidad algunas parasitosis (Gentile 1985, NRC 1992).

Lo que se detecta con las pruebas de genética toxicológica, sin embargo, no es propiamente un daño a la salud, sino simplemente un daño al material genético celular. Se ha propuesto que puede tomarse como un indicador temprano de daño a la salud o, con base en él, estimar el riesgo de daño a la salud (Brusick 1987). Por esto, alrededor de 1972, se iniciaron los proyectos de vigilancia y monitoreo ambiental, uno de cuyos objetivos fue el desarrollo de un sistema de alerta temprana en contra de los efectos adversos del ambiente sobre la salud y cuyo objetivo final era el establecimiento de una red de información sobre salud que cubriera a todo el planeta (WHO 1973). Parte importante de esos proyectos lo constituyen los



estudios de genética toxicológica con el uso de sistemas que permiten detectar la presencia de agentes riesgosos en el ambiente, capaces de producir mutaciones. Tales sistemas consisten en la utilización de organismos, desde bacterias hasta mamíferos completos, como modelos para la investigación del efecto de los mutágenos o de posibles mutágenos sobre el DNA, con el fin de extrapolar esos resultados hacia lo que podría sucederle al ser humano expuesto a ellos, y poder tomar las decisiones adecuadas acerca de su uso. No obstante, el nivel de organización y los sistemas metabólicos de los modelos utilizados difieren de los del hombre y esto ha constituido una fuente de error en la toma de decisiones, ya que se ha comprobado que una sustancia que puede producir daño mutagénico en un sistema bacteriano, no necesariamente lo produce en células humanas (Ashby 1988).

El estudio del efecto de la exposición a agentes mutagénicos tanto *in vitro* como *in vivo* también es posible en el ser humano, mediante el uso de modelos celulares, como fibroblastos de piel, células epiteliales de descamación de mucosas (oral y de vejiga), células de médula ósea, así como eritrocitos y linfocitos de sangre periférica. El modelo mejor desarrollado es el de linfocitos de sangre periférica, en el que es posible evaluar numerosos tipos de daño al DNA: a nivel cromosómico, con el estudio de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas o de micronúcleos (WHO/IPCS 1985; Fenech y Morley 1985); a nivel génico, con el estudio de las mutaciones en el locus *hprt* (Albertini y cols. 1987 y 1990), o en los alelos A2 o A3 del sistema principal de histocompatibilidad (Albertini y cols. 1990, McCarron y cols. 1989). También es posible evaluar alteraciones en la proliferación celular, mediante el estudio del índice mitótico y de la cinética de proliferación (Ostrosky-Wegman y cols. 1988, Herrera y cols. 1992, Rojas y cols. 1992).

Desde los primeros esfuerzos por detectar los efectos adversos en la salud por la exposición al número creciente de sustancias químicas en el ambiente de trabajo, por tratamientos médicos, así como en las concentraciones urbanas, se postuló que el daño genético en células somáticas podría ser el origen de procesos cancerosos (Wogan 1988, WHO 1973, 1985; Cortinas y cols. 1980). Otros investigadores postularon que las mutaciones podían ser el origen de enfermedades como diabetes, reumatismo, gota, y otros más, como parte del proceso de envejecimiento o un factor que acelera el mismo (Brusick 1987). La relación directa entre ellos, sin embargo, no ha podido aún establecerse.

Hay evidencias de que algunos tipos de cáncer ocurren con mayor frecuencia entre individuos afectados por ciertos síndromes genéticos en los que un defecto

hereditario es común a todas las células del organismo y crea una predisposición a determinados tipos de neoplasias, como en el caso del Xeroderma Pigmentoso en el que una deficiencia en la reparación del DNA hace a los individuos susceptibles a contraer cáncer de piel, o el Síndrome de Down en el que la frecuencia de leucemias es mayor que en el resto de la población, aunque en este caso no se conoce el mecanismo. En otros tipos de cáncer se ha podido encontrar un daño genético específico, generalmente translocaciones que involucran a ciertos cromosomas (Schimke 1978, Yunis 1986, Heim y Mitelman 1987). Otras evidencias sugieren que un mecanismo importante en la patogénesis de algunos cánceres puede ser la pérdida funcional de los dos alelos normales de un gen "crítico" como serían los genes supresores de tumores que se supone actúan en forma recesiva (Fearon y Vogelstein 1990) o las secuencias reguladoras de la transcripción (Weinstein 1988). La posibilidad de la activación patogénica aumenta si el individuo es heterocigótico para uno de esos genes y una mutación somática produce dos alelos recesivos en la célula afectada (Turner y cols. 1988). Pero aparentemente hay otros genes que al mutar pueden actuar como dominantes negativos y en forma heterocigótica promoverían alteraciones en la proliferación celular como el gen p53 (Fearon y Vogelstein 1990) el cual es un gen supresor de tumores.

Los eventos mutacionales deben tener lugar en la estirpe celular de la que se derivará el tumor de que se trate, de hecho, en diversos estudios en los que se han utilizado las técnicas modernas de clonación de secuencias y la hibridación de DNA aplicadas a cánceres específicos, se han encontrado mutaciones específicas en oncogenes, a los cuales se ha asociado ese tipo de cáncer (Weinstein 1988), además de los otros eventos mutagénicos mencionados que pueden ocurrir en genes supresores de tumores. Las mutaciones pueden deberse no sólo a mutación puntual, sino también a rompimientos cromosómicos o a la pérdida de fragmentos cromosómicos, como se ha estudiado en el cáncer de colon (Fearon y cols. 1990), y aunque todavía no se conoce todo el proceso de la progresión hacia la neoplasia sí se ha establecido la importancia de las mutaciones en él. Los sistemas de prueba existentes para determinar el aumento de mutaciones somáticas como un evento que ocurre muy temprano en el proceso oncogénico, mucho antes de que se tenga una manifestación clínica, son necesariamente células cuya obtención causa la menor molestia al individuo. Por esto se utilizan células sanguíneas y otras, como fibroblastos de piel y células de descamación de mucosas, por la sencillez con que se obtienen (WHO/IPCS 1985). Sin embargo el sistema de linfocitos de sangre periférica, únicamente es un modelo de lo que puede suceder en el organismo. Los genes que se investigan, además, no son oncogenes, ni genes supresores ni reguladores sino otros, cuyo estudio se facilita por sus características particulares que permiten una identificación

indirecta a través del fenotipo, como ya se explicará más adelante. Quizá estos factores (tipos de células y genes estudiados) no permiten asociar a las enfermedades con el incremento en la frecuencia de mutaciones. Sin embargo, las mutaciones génicas que se evalúan en células humanas mediante los sistemas desarrollados hasta la fecha, tienen la importancia de reflejar un daño que se fijó en el DNA celular y que no fue letal. El hecho de detectarlas significa que hubo un cambio que produjo una alteración fenotípica observable; esto no ocurre con otros parámetros que se evalúan como indicadores de daño genético en linfocitos, como las aberraciones y los micronúcleos, los cuales pueden causar la muerte de la célula en el momento de la división (Brusick 1987).

Las observaciones hechas hasta el momento con los estudios de las mutaciones somáticas génicas o cromosómicas, nos permiten entender que:

- las mutaciones son un proceso inherente al material genético, (Dobzhansky T. 1975, McCarron y cols. 1989) y

- un incremento en la frecuencia de mutación puede implicar la probabilidad de un daño en los genes "críticos", necesario para la inducción de un proceso maligno el cual se manifiesta a largo plazo (Weinstein 1988).

Las mutaciones ocurren con una frecuencia basal en los seres humanos (Darnell 1990). A esa frecuencia contribuyen diversos factores, entre ellos, las radiaciones de fondo cuyo origen son los rayos cósmicos, el radón, los depósitos naturales de elementos radiactivos y la radiación solar (Brandán y cols. 1991). Se sospecha que hay otros factores, como el hábito de fumar, la edad y el sexo de los individuos, que podrían contribuir a elevar la frecuencia de mutación. Por esta razón, cuando se estandariza un nuevo sistema de prueba, se miden las frecuencias basales de mutación con relación al sexo, a la edad y al hábito de fumar, así como a la radiación. (Strauss y Albertini 1979, Cole y cols. 1991).

#### SISTEMAS DE PRUEBA PARA EL ESTUDIO DE LAS MUTACIONES SOMÁTICAS

El genoma humano, se calcula, debe contener de 50 000 a 100 000 genes, y cada gen debe tener una frecuencia normal de mutación (Dobzhansky 1975, McLean 1989, Darnell 1990) en las células somáticas, que podría variar en relación con el tipo celular debido a la diferenciación.

Actualmente es posible medir la frecuencia de mutación somática en 4 genes: el gen de la hemoglobina y el de la glicoforina-A en eritrocitos, así como el locus de la

enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HPRT) y los alelos A2 y A3 del sistema principal de histocompatibilidad (HLA) en linfocitos de sangre periférica. El poder evaluar la frecuencia de mutación somática en 4 genes, aunque es una pequeña muestra del total de genes de las células humanas, proporciona una perspectiva de los mecanismos por los cuales actúan los mutágenos sobre el DNA. Por ejemplo, mediante el estudio de las mutaciones en el locus de la enzima HPRT, y aplicando técnicas de biología molecular y celular, ha sido posible establecer el tipo de mutaciones producidas por un solo agente: rearrreglos complejos, deleciones parciales o del locus completo, sustituciones de bases, inserciones de bases. Se ha determinado que estas mutaciones afectan los sitios de corte para producir el rNAm, lo que da como resultado la pérdida de exones o la presencia de intrones en esa molécula (Andersson y cols. 1992). También se ha podido lograr una mejor aproximación a la frecuencia real de mutación y no sólo al número de células mutantes (Albertini y cols. 1990).

Otro aspecto interesante que ha surgido de estos estudios ha sido el análisis del mecanismo de mutación en un cromosoma sexual (X) (Albertini y cols. 1990), el cual puede compararse con el mecanismo de un autosoma, mediante el análisis de las frecuencias de mutación de los alelos A2 y A3 del sistema HLA en el cromosoma 6 (McCarron y cols. 1989). En ellos también se han encontrado deleciones completas o parciales, como en el locus *hprt*, pero se ha propuesto que esas deleciones podrían deberse a recombinación mitótica, o a la pérdida de un cromosoma con reduplicación del otro (Turner y cols. 1985, 1988) lo cual no ocurriría en el locus *hprt*, el cual está en el cromosoma X que es funcionalmente hemicigótico en la región donde se localiza ese gen, es decir, que aunque hay 2 alelos presentes en las células femeninas, sólo uno de ellos es funcional, debido a la pseudoinactivación de uno de los cromosomas X, así como el locus *hprt* en los hombres es único, no tiene homólogo.

Las frecuencias de mutación en el locus *hprt* y en los alelos HLA-A2 y A3 se miden en los linfocitos de sangre periférica y por las características de estas células es posible hacer cultivos, obtener clones y su DNA para análisis moleculares, con lo que ha podido estudiarse los tipos de mutaciones inducidas por diversos agentes genotóxicos. Existen otras dos pruebas para detectar mutaciones somáticas que utilizan el sistema de eritrocitos de sangre periférica. Estas células maduran en la médula ósea donde pierden el núcleo, por lo tanto, no son susceptibles de proliferar en un cultivo, de modo que no es posible hacer estudios moleculares con ellas. No obstante, sí se puede determinar la frecuencia de células mutantes en una muestra. Las mutaciones que se analizan se originaron en el gen de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina en el cromosoma 11,

y en el gen de la glicoforina A en el cromosoma 4, una proteína de superficie que determina el tipo sanguíneo del sistema M/N.

#### MUTACIONES EN LA CADENA BETA DE LA HEMOGLOBINA A

La molécula de la hemoglobina A (HbA) es un tetramero compuesto por dos cadenas de tipo alfa y dos cadenas de tipo beta. Se conocen algunas mutaciones que generan cambios específicos, la mejor conocida de esas mutaciones es una que ocurre en el locus de las cadenas beta que causa la llamada hemoglobina S (HbS) causante de la anemia falciforme. La mutación es puntual y consiste en el cambio de una adenina por una timina, lo cual ocasiona un cambio de aminoácido en el polipéptido final: de glutamina a valina en la posición 6. El gen de la cadena beta está constituido por 2 kilobases y contiene 3 exones (Tates y cols. 1989).

El método de detección de los eritrocitos que contienen hemoglobina mutada consiste en fijar a las células en un portaobjetos, tratarlas con anticuerpos policlonales contra la

HbS, conjugados con un colorante fluorescente. La frecuencia con que se encuentran las variantes que fluorescen al microscopio es la que define la frecuencia de variación (Vf), denominada así porque no se determinó el daño en el DNA, sino sólo a nivel del fenotipo celular (Albertini 1990), y puede detectarse aun cuando la mutación no es homocigótica. La Vf encontrada en este ensayo es del orden de  $3.8 \times 10^{-8}$ , es decir, aproximadamente 4 mutantes en cada 100 millones de células.

#### MUTACIONES EN LA GLICOFORINA A.

La glicoforina A (GPA) es una proteína de superficie de los eritrocitos que porta los antígenos para los grupos sanguíneos M/N. Se trata de dos alelos codominantes que dan lugar a tres genotipos diferentes cuya frecuencia de aparición en las poblaciones caucásicas es aproximadamente 25% cada genotipo homocigótico, siendo más frecuentes los individuos heterocigóticos (50%) (Carpenter 1982). El ensayo se aplica sólo en estos individuos.

El gen GPA está constituido por 44 Kb y tiene 4 exones. Las células mutantes se detectan con anticuerpos contra los polipéptidos M y N, y con la ayuda de un citofluorómetro es posible medir varios tipos de fluorescencia: los anticuerpos contra M están acoplados a un

fluorocromo verde y los anti-N, a fluorocromo rojo. Las células mutantes son de dos tipos diferentes: el primero expresa un fenotipo hemicigótico causado por mutaciones nulas, donde una de las dos formas alélicas no se expresa mientras que la otra lo hace normalmente (NO rojo sin la presencia de verde, o MO verde, sin rojo). El segundo tipo se debe a recombinación mitótica, conversión génica o no disyunción donde una forma alélica deja de expresarse, mientras que la otra se manifiesta doblemente (MM o NN); este fenotipo, al acoplársele los anticuerpos correspondientes da una medida de doble fluorescencia de un color sin la participación del otro; esto se mide mediante el uso de un citofluorómetro.

En el caso de pérdida de un alelo, ya sea MO o NO, se describe la frecuencia de variantes hemicigóticas. Cuando hay doble expresión de uno de los alelos: MM o NN, se reporta la frecuencia de variación homocigótica (Jensen y cols. 1990, Langlois y cols. 1990).

En individuos no expuestos se ha medido que las frecuencias basales de mutación son de  $11 \times 10^{-6} \pm 6.9$  para variantes hemicigóticas, y de  $10 \times 10^{-6} \pm 11$  para variantes homocigóticas (Jensen y cols. 1990).

La edad de los individuos en los que se determinaron las frecuencias de mutación produjo efecto equivalente a un aumento de  $0.09 \times 10^{-6}$  por año (Langlois y cols. 1989), y el hábito de fumar aparentemente eleva las frecuencias 1.5 veces, aunque esto no es significativo (Jensen y cols. 1990). La quimioterapia (una combinación de ciclofosfamida y adriamicina) incrementó hasta 7 veces las frecuencias basales (Bigbee y cols. 1990). Las Vf disminuyeron a lo normal 120 días después de terminada la terapia.

#### MUTACIONES EN LOS ALELOS A2 Y A3 DEL SISTEMA HLA

El sistema principal de histocompatibilidad (HLA) está constituido por numerosos loci (quizá cientos) con alto índice de polimorfismo, que contienen la información para la síntesis de moléculas que tienen función en el reconocimiento de las proteínas propias del organismo y de las extrañas. El sistema está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y los loci están ordenados en forma contigua en tres regiones reconocibles, llamadas clases I, II y III.

Las moléculas de clase I están codificadas en loci únicos que pueden ser de 3 tipos: A, B y C. Los productos de estos genes son cadenas pesadas glicoproteicas de membrana, asociadas con la beta<sub>2</sub>-microglobulina que se codifica en un locus fuera del HLA y se presentan en todas las células nucleadas. Cada uno de estos genes muestra una amplia gama de especificidades, así llamadas porque son reconocidos por

diferentes tipos de antisueros. Los antígenos del tipo A poseen aproximadamente 15 especificidades reconocidas y otras aún no bien establecidas. La frecuencia con que cada alelo se encuentra en las poblaciones humanas no es igual, siendo los más frecuentes el A2 y el A3, los cuales ocurren aproximadamente en la mitad de los individuos (Roitt y Brostoff 1989).

Las moléculas de clase II están constituidas por 2 polipéptidos distintos, codificados en la misma región y participan en fenómenos de respuesta inmune (Roitt y Brostoff 1989). La clase III son genes para algunas moléculas del complemento y otros, que no están relacionados directamente con la histocompatibilidad.

Para medir la frecuencia de mutación (Mf) en los alelos A2 y A3 es necesario que el individuo estudiado sea heterocigótico para uno o ambos: el A2 o el A3. El método para medir la Mf consiste en la selección de células normales que portan en su superficie cualquiera de los dos antígenos, mediante anticuerpos específicos. Estas células son eliminadas del pozo de cultivo mediante el uso de complemento, de tal manera que sólo permanecen vivas las células mutantes, las cuales son clonadas posteriormente durante 16 a 20 días, al cabo de los cuales se evalúa su frecuencia (McCarron y cols. 1989).

McCarron y cols. (1989) determinaron en 47 individuos una frecuencia media de mutación de  $2.56 \times 10^{-5} \pm 1.51 \times 10^{-5}$  para el alelo A2 y de  $3.17 \times 10^{-5} \pm 1.59 \times 10^{-5}$  para el alelo A3 en 36 individuos. En ancianos (70 a 90 años) se ha encontrado una media de  $7.16 \times 10^{-5} \pm 4.06 \times 10^{-5}$ , lo cual dio una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los adultos jóvenes (18 a 50 años). Janatipour y cols. (1988) analizaron las frecuencias espontáneas de mutantes A2 y A3 en 13 personas que portaban cualquiera de los 2 alelos. Las frecuencias encontradas fueron  $3.08 \times 10^{-5}$  para A2 y  $4.68 \times 10^{-6}$  para A3. Para determinar la sensibilidad de estos loci a la acción de mutágenos conocidos, se hizo el tratamiento *in vitro* con mitomicina-C o con rayos-X, de células de donadores sanos y se detectaron incrementos relacionados con la dosis. Una de las observaciones más importantes hechas en estudios de biología molecular se refiere a la frecuencia con que ocurren recombinaciones mitóticas, tomados los alelos como modelo de los genes autosómicos. Se ha establecido que es del 30% entre las clonas de mutantes analizadas (Albertini y cols. 1990). Su importancia radica en que se ha postulado que este tipo de daño es de gran importancia en los procesos carcinogénicos, particularmente del tumor de Willms (Fearon y cols. 1984, Koufos y cols. 1984, Murphree y Benedict 1984, Orkin y cols. 1984).

El aumento de mutaciones debido a la edad parece

deberse a recombinación mitótica, lo cual varía además entre individuos; en un estudio hecho con el fin de caracterizar la influencia de la edad, en 73 individuos, se encontró que 1/3 de ellos mostraron lo que se llamó grupo de "alta recombinación" (Grist y cols. 1992). Si esta forma de reparación está genéticamente determinada, podría implicar que en algunas personas al ser reparado el daño en su DNA por recombinación podrían resultar más susceptibles a enfermedades como el cáncer, en el que las mutaciones son importantes, pues se ha postulado que este tipo de reparación causa errores (Brusick D. 1987, Alberts y cols. 1989).

#### MUTACIONES EN EL LOCUS HPRT.

El sistema más utilizado hasta ahora para el estudio de mutaciones génicas somáticas ha sido el del locus de la enzima HPRT, del que se ha obtenido información acerca de la mutagenicidad de genes ligados al cromosoma X: tipos de mutación, frecuencias de mutación y persistencia de las células mutantes, así como en individuos sanos de diferentes edades y sexo.

Existen dos metodologías bien desarrolladas para la determinación de mutaciones en este locus: la de clonación, mediante el cual se determina la frecuencia de células mutantes (Mf) en una muestra, y la corta, mediante la cual se establece la frecuencia de células variantes (Vf).

Ambas consisten en seleccionar a las células resistentes a 6-tioguanina, un análogo de la guanina; para ello se agrega este análogo al medio en el que se cultivan los linfocitos; al incorporarlo al DNA durante la síntesis, las células normales mueren, mientras que las mutantes son incapaces de utilizar este análogo, por lo que sobreviven en su presencia y pueden proliferar. Posteriormente en el primer método, se clonan para su caracterización molecular, o se fijan, en el segundo, para su cuantificación al microscopio. En estudios realizados para comparar estos métodos se ha encontrado que se obtienen resultados equivalentes (Albertini y cols. 1990).

La determinación de la frecuencia de variación es más rápida y se ha preferido en los estudios de monitoreo de grupos de individuos expuestos a agentes ambientales, en los que se quiere obtener únicamente información acerca de si hubo efecto mutagénico o no (Ostrosky-Wegman y cols. 1990, Natarajan y cols. 1991).

Cuando las células sintetizan DNA incorporan un marcador que se agrega al medio de cultivo. En el ensayo propuesto originalmente por Strauss y Albertini (1979), se utiliza timidina tritiada como marcador de la síntesis; en



nuestro laboratorio estandarizamos el uso de bromodesoxiuridina (BrdU) para el marcaje de las células y para teñir con fluorescencia y Giemsa (Perry y Wolff 1974) que permite la diferenciación de los núcleos de las células que proliferaron, de aquellos que no proliferaron, por el color con que se tiñen: azul o rojo, respectivamente. Debido a que este método de tinción es estándar en los laboratorios de citogenética, el sistema para detectar mutaciones génicas se hizo más accesible (Ostrosky-Wegman y cols. 1987). Posteriormente modificamos el método de tinción y utilizamos anticuerpos monoclonales contra BrdU para la identificación de los núcleos de las células que proliferaron en el cultivo y cuyo DNA quedó marcado (Montero y cols. 1991), con el fin de hacer más fácil la identificación de las células mutantes y reducir el tiempo invertido en la interpretación de resultados.

En estudios en los que se han medido las frecuencias normales de mutación en el locus, se han encontrado por ambos métodos (clonación o tinción), frecuencias de hasta de  $28.9 \times 10^{-6}$  (tabla 2). Algunos autores han descrito que existe incremento con la edad: Cole y cols. (1989) reportan un incremento de 1.3% por año; Tates y cols. (1989), de 1.7% por año, y Albertini y cols. (1990), de  $0.26 \times 10^{-6}$  por año. Sin embargo, en estudios con personas expuestas no se ha encontrado que el aumento en la frecuencia de mutación tenga asociación con la edad (Albertini 1985, Ammenheuser y cols. 1991, Natarajan y cols. 1991, Ostrosky y cols. 1991).

En estudios hechos con sangre del cordón umbilical de 9 recién nacidos, Cole y cols. (1988) reportaron una frecuencia media de  $0.7 \times 10^{-7}$  y Manchester y cols. (1992), de  $1.65 \times 10^{-6}$  en 60 muestras y McGinnis y cols. (1990), de  $0.7 \times 10^{-6}$ . Como se podrá ver, en recién nacidos la Mf encontrada es menor, aunque son pocos los estudios realizados, e igualmente, se ha encontrado variabilidad (McGinnis y cols. 1990).

En relación con el hábito de fumar aunque las frecuencias de mutación reportadas varían, en algunos estudios se han encontrado valores más elevados en individuos sin exposición conocida que fuman, con respecto a los que no (Tates y cols. 1989). En individuos en contacto con mutágenos se ha observado mayor daño genético en los fumadores; los que presentan afecciones congénitas, y están expuestos a mutágenos, también han presentado más daño cuando el individuo es fumador (Tates y cols. 1989). Bridges (1989) reporta que para los fumadores, la frecuencia de mutación se incrementa un 2.77% cada año con respecto a 0.86% de los no fumadores. Esto está en relación con un efecto por la edad. El sexo es un factor para el que no se ha determinado un efecto significativo en la frecuencia de mutación en el locus hprt.

En la tabla 1 se presentan las frecuencias de variación en el locus *hprt* que causa la exposición a diversos mutágenos conocidos como las radiaciones y la quimioterapia. En cada uno de esos estudios se ha podido demostrar que el sistema del locus *hprt* es sensible para detectar daño por exposición a mutágenos, por lo que se considera que podría emplearse en los estudios de monitoreo para determinar la acción de mutágenos que no produzcan daño cromosómico, pero que sean capaces de afectar a genes individuales.

El análisis de pacientes con síndromes genéticos (es decir, enfermedades debidas a mutaciones, con las que se nace) asociados a alta frecuencia de cáncer y sensibilidad celular a ciertos agentes que dañan al DNA, es de interés pues permite "calibrar" al sistema en lo que se refiere a sensibilidad para detectar el daño debido a exposición. Cole y cols. (1990, 1992) estudiaron individuos con ataxia-telangiectasia, Xeroderma pigmentoso y síndrome de Cockayne. La ataxia-telangiectasia, por ejemplo, es un padecimiento que hace que los individuos sean muy sensibles a la radiación ionizante; entre éstos la frecuencia de tumores en tejidos linfoides es 50-200 veces mayor que en la población general. También entre los heterocigóticos para esta enfermedad se presentan tumores de mama de manera incrementada (Cole y cols. 1991). La frecuencia de linfocitos con mutaciones en el locus *hprt* entre estos sujetos fue 6.3 veces mayor en promedio con respecto a testigos sanos (Cole y cols. 1990, 1991). La Mf en heterocigóticos, para este locus, fue normal.

El Xeroderma pigmentoso es otro síndrome asociado con cáncer. Los enfermos son muy sensibles a la radiación UV y tienen alta incidencia de cáncer de piel en áreas expuestas. Su Mf en linfocitos para el locus *hprt* fue 2.5 veces mayor, resultado que tuvo significancia estadística en comparación con los valores encontrados en personas saludables, pero los individuos heterocigóticos, nuevamente, están dentro de valores normales (Cole y cols. 1992).

El síndrome de Cockayne también se asocia a sensibilidad a luz UV, aunque no con mayor tumorigenicidad. Los estudios revelaron 2.8 más mutaciones en 5 individuos enfermos que en testigos (Cole y cols. 1990, 1991).

Las frecuencias de mutación encontradas en los sujetos con síndromes genéticos son consistentes con los resultados de Langlois y cols. (1990), quienes observaron un incremento de 10 y 100 veces más mutantes en la glicoforina A de eritrocitos en individuos con ataxia telangiectasia y con síndrome de Bloom, respectivamente. Este tipo de datos conforman el marco de referencia contra el que se evalúa a los individuos expuestos a agentes ambientales en los estudios de monitoreo para establecer si ha existido un

efecto sobre el material genético o no (WHO 1973, Brusick 1987).

Como ejemplo de individuos expuestos se puede estudiar a los enfermos con neurocisticercosis que además de albergar a un parásito en su sistema nervioso central, son tratados con diversos tipos de medicamentos.

## NEUROCISTICERCOSIS

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los principales problemas de salud en nuestro país. La cisticercosis, causada por la infestación de huevecillos de *Taenia solium* (comúnmente conocida como solitaria), es una parasitosis que a menudo se desarrolla en forma asintomática por lo que su frecuencia en la población es difícil de establecer; las estimaciones varían entre 0.40 por 100 000 derechohabientes de los sistemas públicos de salud (González Angulo, 1984) a 7% en la población mexicana (Flisser, 1988).

La transmisión de la cisticercosis se debe a la falta de condiciones sanitarias adecuadas en la disposición de las heces fecales de humanos infectados por la forma adulta del parásito (la tenia), y al manejo descuidado de los cerdos en la producción de carne para consumo humano. Al ingerir un humano o un cerdo los huevecillos arrojados con las heces fecales de un individuo con tenia, las oncosferas penetran la pared intestinal y las larvas (o cisticercos) se establecen en el sistema nervioso, en músculos esqueléticos, en los ojos, o en tejido subcutáneo del huésped, produciéndose así la cisticercosis. El ciclo de vida continúa cuando la carne infectada del cerdo es consumida por el huésped definitivo en cuyo intestino se desarrolla la tenia adulta (Flisser, 1988).

Rudolphi nombró al cisticerco como *Cysticercus cellulosae*, pensando que era una especie zoológica independiente y debido a su afinidad por el tejido conectivo (Nieto 1982). En el cerebro también se encuentra otro tipo de cisticerco, anteriormente llamado *Cysticercus racemosus* que sólo se encuentra en sistema nervioso central del ser humano y que puede alcanzar grandes proporciones (10 a 12 cm) y produce síntomas más frecuentemente que el cisticerco celulozo (Rabiela 1989). Actualmente se sabe que ambos son formas larvianas de *Taenia solium* y por lo tanto, no deben tener una nomenclatura científica particular, por lo que su denominación correcta es cisticerco de tipo celulozo o de tipo racemoso.

En población latinoamericana es más frecuente que los cisticercos se alojen en el cerebro de los pacientes y pueden ocupar cualquier sitio: subaracnoideos, parenquimatosos y ventriculares, y aun en cerebelo, y en números variables. También los hay en la médula espinal. Debido a esto los síntomas neurológicos que causan son muy diversos y no pueden caracterizarse en un cuadro típico, sino que, por el contrario, se confunden con distintos padecimientos como migrañas, hidrocefalia, meningitis, epilepsia y desórdenes mentales (Zenteno-Alanís, 1982). El

paciente que llega a consulta y describe sus signos recibe en primera instancia, un tratamiento para combatir un padecimiento que corresponda a esa sintomatología. Es después, al no presentar mejoría, cuando se sospecha de la existencia de un cisticerco en el cerebro, o cuando los síntomas hacen pensar en un tumor cerebral.

Los métodos de diagnóstico de la neurocisticercosis están orientados a detectar inequívocamente la presencia del parásito con el fin de dar el tratamiento adecuado y no sólo un paliativo que ataque los síntomas sin eliminar el problema. Por esto, la tomografía computarizada y la resonancia magnética se cuentan entre los procedimientos de diagnóstico más exactos para determinar si se trata de un cisticerco y en dónde se encuentra (Rodríguez Carbajal y Boleaga Durán 1982; Jena y cols. 1988). Los ensayos inmunológicos que revelan la presencia de anticuerpos en líquido cefalorraquídeo (LCR) y en suero también han sido útiles en el descubrimiento de individuos enfermos y resultan más accesibles para las zonas rurales. El ELISA se adaptó con éxito al diagnóstico de neurocisticercosis (Espinoza y cols. 1986) y se ha empleado en estudios epidemiológicos para definir la endemicidad de las teniasis en áreas rurales (Téllez Girón y cols. 1984, Díaz Camacho y cols. 1990); también se ha utilizado para detectar la presencia de antígenos en líquido cefalorraquídeo (Choromanski y cols. 1990). Otra técnica de diagnóstico, la electroinmunotransferencia (western blot), también es eficaz y más específica para identificar cisticercos de *T. solium* (García y cols. 1991, Wilson y cols. 1991 y Flisser en prensa).

#### TRATAMIENTOS

Existen tres métodos para combatir la cisticercosis: cirugía, drogas cestocidas y quimioterapia sintomática.

La cirugía está indicada en los casos en que hay acceso al sitio donde está alojado el parásito y cuando estos son únicos. La cirugía brinda alivio completo sólo en los casos en que exclusivamente hay un cisticerco, en un sitio accesible y sin que exista respuesta inflamatoria meníngea o cerebral; únicamente en estos casos, el foco de irritación que causa síntomas de epilepsia desaparece, o el bloqueo de LCR causado por la presencia de un cisticerco intraventricular (Escobedo y cols. 1982).

La quimioterapia es indispensable para incrementar la eficiencia de los tratamientos contra esta parasitosis. Hasta hace poco tiempo (15 años), a los pacientes con neurocisticercosis múltiple se les administraban medicamentos que mitigaban algunas molestias como los ataques convulsivos y las inflamaciones empleando

antiepilépticos y corticosteroides; esto sin embargo, no elimina el problema. La búsqueda de fármacos eficientes llevó al uso del praziquantel (una pirazina-isoquinolona) y del albendazol (derivado del benzimidazol) cuyo uso es muy reciente.

**Fraziquantel.** Probado en pacientes con neurocisticercosis, este medicamento ha dado muy buenos resultados, eliminando incluso, la necesidad de cirugía. Es altamente soluble en lípidos y es capaz de atravesar la barrera hemato-cerebral, por lo que alcanza el parénquima cerebral en corto tiempo después de su administración (Bittencourt y cols. 1990).

A dosis de 50mg/kg/día dividida en tres tomas durante 10 a 14 días, se ha visto que el parásito es eliminado y que no hay efectos secundarios significativamente diferentes de los que se producen con dosis menores. En presencia de reacción inflamatoria, se recomienda su uso junto con corticosteroides como la dexametasona; y en casos severos de hipertensión endocraneal, se administra manitol (Botero y Castaño 1982).

Debido a que su acción alcanza aun a los cisticercos más inaccesibles dentro del cráneo, el uso del praziquantel (pzq) se indica en lugar de la cirugía (Groll 1982); Rawlings y cols. (1989) lo recomiendan también, en combinación con el diagnóstico tomográfico para casos en los que se presente sólo un cisticercero parenquimatoso negativo a las pruebas inmunológicas como se observa en algunos casos en Estados Unidos donde la enfermedad no es frecuente.

**Albendazol.** En años recientes, otros medicamentos se han adoptado para el tratamiento de la neurocisticercosis, como el albendazol (un imidazol) el cual ha resultado también muy eficiente, utilizado contra céstodos intestinales y nemátodos. Su absorción es rápida, igual que el pzq, y no tiene efectos tóxicos, excepto en casos raros en los que ha producido hepatotoxicidad (Marriner 1986). Debido a que su uso es muy reciente, es muy escasa la documentación respecto a su eficiencia en el tratamiento de la cisticercosis.

#### GENOTOXICIDAD DEL PRAZIQUANTEL

Estudiado en diversos sistemas de prueba de mutagenicidad, el praziquantel ha dado resultados negativos en general: en sistemas bacterianos, levaduras y células de mamíferos con activación metabólica y sin ella. Sin embargo, en un trabajo en cerdos neurocisticercosos, el praziquantel incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos, la cual ya era elevada antes del tratamiento

(Flisser y cols. 1990) y en otro estudio, orinas de ratones tratados con el medicamento, resultaron mutagénicas para *Salmonella* (Batzinger y cols. 1978).

Al combinarse con algunos mutágenos, el pzq ha incrementado su efecto en células de mamífero, por lo que se planteó que es comutagénico (Billings y Heidelberg, 1982). Administrado con benceno, aumentó la frecuencia de micronúcleos en células de médula ósea de ratón (Anwar y cols., 1989). Las investigaciones para probar su carcinogenicidad resultaron negativas, cuando se administró solo. En unión con carcinógenos conocidos, fue capaz de intensificar su efecto como en el caso del 3-metilcolantreno que induce transformación de células embrionarias de ratón; sin embargo, cuando se administró al mismo tiempo, o después, inhibió el efecto del carcinógeno (Billings y Heidelberg, 1982). Esto es consistente con el efecto antiinflamatorio del praziquantel en piel de ratón, el cual también bloqueó la formación de papilomas por ésteres de forbol en piel de ratones tratados con dosis subcarcinogénicas de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (Kramers y cols. 1991).

Por ser un medicamento de elección en el tratamiento de la cisticercosis humana, Flisser y cols. (1990) consideraron de interés estudiar el efecto genotóxico e inmunológico del praziquantel. En dicho estudio se determinaron aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas y se encontró un efecto clastogénico del praziquantel administrado en los cerdos infectados, pero no en los cerdos sanos, ni tampoco en los intercambios. Otro resultado interesante es que en los cerdos con cisticercosis se encontró una frecuencia elevada de linfocitos poliploides, antes del tratamiento con praziquantel, la cual disminuyó después del tratamiento. Este dato sugería que el parásito posiblemente tiene un efecto genotóxico por sí mismo (Flisser y cols. 1990). En el mismo trabajo se determinó el efecto sobre la respuesta inmunológica humoral, notándose que ésta aumentó después del tratamiento con praziquantel. Se postuló que al dañarse el parásito por efecto del fármaco liberan nuevos antígenos contra los que el sistema inmunológico responde con la producción de anticuerpos.

## PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Los resultados encontrados en la investigación de cisticercosis porcina realizado por Flisser y cols. (1990) despertaron el interés por determinar el efecto genotóxico del pzo en humanos que se estudió mediante el análisis de mutaciones génicas en el locus hprt.

La hipótesis del trabajo es que:

El pzo es capaz de producir mutaciones génicas que es posible detectar en linfocitos de sangre periférica por el ensayo para evaluar mutaciones en el locus hprt.

En vista de que es difícil realizar estudios en poblaciones humanas, ya que además de una serie de factores, existen variaciones individuales, en este trabajo, como objetivo general, se planeó inicialmente analizar un grupo de individuos sanos y otro, de enfermos con neurocisticercosis sintomática; de todos ellos se obtuvo una muestra de sangre al inicio y al final del tratamiento con pzo, con la idea de que el mejor testigo para un individuo es él mismo antes de exponerse a algún agente.

Sin embargo, al iniciar el estudio fue imposible encontrar pacientes sin exposición previa a algún agente mutagénico, debido a que habían sido ya tratados por su sintomatología con anticonvulsivos y/o analgésicos; algunos tuvieron cirugía y, para su diagnóstico de neurocisticercosis, todos fueron sometidos a TAC, de tal manera que en su totalidad habían estado expuestos a algún agente mutagénico, aunque diferente del que era nuestro objeto.

La exposición a una mezcla de agentes puede producir diferentes efectos, debidos a la interacción entre ellos y el material genético; así puede observarse un efecto aditivo, o un sinergismo o aun, un antagonismo que anule la acción porque compitan entre sí dos agentes (Kenakin 1987).

Debido a que existe poca información acerca de este tipo de exposiciones a mezclas de agentes, se consideró que era importante proceder con el estudio, pero existía la necesidad de agregar un tercer grupo de individuos, los cuales estuvieran expuestos a los mismos agentes que los pacientes, pero que no tuvieran el parásito.

El objetivo del trabajo no se modificó, pero sí se agregaron dos:

- el de tratar de determinar si existe alguna diferencia en la frecuencia de mutación en el locus hprt por



exposición a agentes xenobióticos entre individuos con padecimientos neurológicos e individuos con neurocisticercosis, y

- el de establecer si entre estos individuos enfermos y sometidos a diversos tratamientos y formas de diagnóstico presentan una frecuencia de mutación en el locus *hprt* diferente de lo que se encuentra entre individuos sanos, no expuestos.

## MATERIAL Y METODOS

### INDIVIDUOS ESTUDIADOS

**Con neurocisticercosis:** Se incluyeron en el trabajo, 23 individuos que fueron diagnosticados con esta enfermedad después de ser sometidos a una tomografía computarizada (TC) y que llegaron al servicio de Neurocirugía para tratamiento. Se estudiaron 15 hombres y 8 mujeres de 16 a 71 años de edad.

Algunos de ellos, además, habían sido sometidos también a cirugía en la que fueron tratados con anestésicos, antibióticos y antiinflamatorios, y otros habían recibido tratamiento con anticonvulsivos. Los pacientes habían recibido estos tratamientos o métodos de diagnóstico dentro del mes anterior al inicio del estudio.

Varios de los agentes a que estuvieron expuestos los pacientes han resultado mutagénicos en diversos sistemas de prueba, particularmente las radiaciones, el halotano, la difenilhidantoína y antibióticos (IARC/WHO 1987). La difenilhidantoína produce intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos (IARC/WHO 1987). Entre los anestésicos, el halotano provoca mutaciones génicas en organismos inferiores (IARC/WHO 1987). Durante la TC los pacientes estuvieron expuestos a radiaciones en forma controlada, las cuales, de cualquier manera son capaces de causar daño genético (Brandán y cols. 1991).

La exposición a los agentes mencionados tuvo lugar en un plazo menor de un mes antes de ser tomada la primera muestra.

**Con daño neurológico no parasitario:** como hidrocefalia fímica, quiste subaracnoideo con epilepsia, aneurisma y lesiones, los cuales estuvieron expuestos como grupo a los mismos agentes que los individuos con neurocisticercosis, excepto por el uso de diazepam en tres de ellos, el cual es un sedante que produce aneuploidías y micronúcleos, así como aberraciones cromosómicas en linfocitos. En el sistema de *Salmonella* produjo mutaciones génicas sólo con activación metabólica (IARC/WHO 1987). Los pacientes con neurocisticercosis no recibieron este medicamento.

**Testigos:** sujetos sanos, sin exposición a medicamentos ni tratamientos médicos.

## TRATAMIENTO CON PRAZIQUANTEL

Sólo 12 de los pacientes neurocisticercosos seleccionados recibieron tratamiento con pzaq.

El esquema de administración del pzaq consistió en una dosis diaria de 50 mg/kg de peso, repartida en tres tomas, durante 15 días; la efectividad de este régimen se ha comprobado en diversos estudios (Sotelo y cols. 1984, 1985; Robles y cols. 1987, Rawlings y cols. 1989), aunque en algunos casos es necesario administrar esteroides al mismo tiempo, para evitar reacciones inflamatorias.

### TOMA DE MUESTRA

La sangre se tomó en forma estéril, con jeringas desechables para evitar posibles contaminaciones y con heparina para evitar la coagulación. Para su transportación al laboratorio se envolvieron las jeringas y aseguraron los émbolos con cinta adhesiva. Fueron transportadas a temperatura ambiente (27°C en promedio) y procesadas el mismo día.

De cada paciente se obtuvieron 40 ml de sangre. De aquellos que recibieron el tratamiento se tomó la primera muestra el día en que lo iniciaron (antes de tomarlo) y la segunda, el último día de tratamiento.

Simultáneamente a la toma de estas muestras, se eligió a los pacientes con otro daño neurológico que hubieran estado expuestos a los mismos agentes que los pacientes con neurocisticercosis, procurando que tuvieran edad similar.

Los individuos aparentemente sanos estudiados fueron elegidos entre las personas que laboran en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y su sangre se procesó el mismo día en que se recibieron las muestras de pacientes.

Los donadores se eligieron entre pacientes a los que se informó acerca de los objetivos del estudio y que dieron su consentimiento por escrito, internos en los Hospitales de Especialidades de La Raza y del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Seguro Social.

## CUANTIFICACION DE MUTACIONES EN EL LOCUS HPRT

Como ya se explicó la enumeración de mutantes en el locus *hprt* consiste en seleccionar en un medio de cultivo las células mutantes en el locus *hprt*, las cuales son resistentes al análogo de la guanina, 6-tioguanina. Se usó el método de corta duración, descrito por Strauss y Albertini (1979), modificado por Ostrosky y cols. (1987) que consiste en:

### Obtención de células mononucleadas:

- Se separan las células mononucleadas de 40 ml de sangre, mediante un gradiente de fycoll-hypaque (Lymphoprep, Nycomed), centrifugando durante 30 min a 1600 rpm.

- Se recupera el plasma en un tubo estéril; luego se recupera la capa de células blancas, la cual se resuspende en medio de cultivo RPMI-1640 (Flow-Lab) suplementado con aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco) y L-glutamina 200 mM (Gibco) (RPMI-1640s), y se centrifugan a 1200 rpm para lavar los restos de fycoll-hypaque.

- Se desecha el sobrenadante y las células se resuspenden en 2 ml de medio RPMI-1640s.

- Se toma una muestra de 20  $\mu$ l de esta suspensión y se mezcla con 1 ml del colorante vital azul de tripano, se cuenta en un hemocitómetro el número de células recuperadas, así como su viabilidad.

### Congelación:

- Con el fin de eliminar fenocopias, las células se congelan en alícuotas de 2ml en la fase gaseosa a  $-70^{\circ}\text{C}$  de un refrigerador de nitrógeno líquido, en medio de cultivo RPMI-1640s, con plasma autólogo al 10% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 7.5%. La densidad celular se ajusta a  $10 \times 10^6$  células/ml.

### Descongelación y siembra:

- Al menos 24 hs después, las células se descongelan en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , una vez que la suspensión celular está completamente líquida, se lava en 45 ml por cada tres alícuotas, de medio RPMI-1640s

- Se cuenta el número de células recuperadas, en un hemocitómetro, con colorante vital azul de tripano para medir nuevamente la viabilidad. Si el 80% o más de las células están vivas, se procede a cultivarlas.

- Los cultivos consisten en medio RPMI-1640s, con plasma autólogo al 20% y fitohemaglutinina (PHA) al 4% para estimular la proliferación de los linfocitos. La densidad celular se ajusta a  $5 \times 10^6$  células en 5 ml de volumen total.

- Se siembran 4 tubos de cultivo: uno es el testigo, en el que las células proliferarán normalmente y 3 contienen el análogo de guanina, 6-tioguanina (6-TG) en una concentración final de  $2 \times 10^{-4} M$ ; en estos cultivos sobreviven sólo las células resistentes al análogo las cuales incorporan bromodesoxiuridina cuando efectúan la síntesis de DNA. Se incuban a  $37^{\circ}C$ .

- 24 horas después, cuando las células empiezan a sintetizar DNA, se agrega el análogo de timidina, bromodesoxiuridina (BrdU) a una concentración final de  $4 \times 10^{-4} M$ , con el fin de marcar aquellas células que sintetizan DNA durante el tiempo de cultivo.

#### Cosecha:

- A las 40 horas de incubación los cultivos, tanto el control como los selectivos con 6-TG, se cosechan con ácido cítrico 0.1M helado para romper las células y liberar los núcleos, que se fijan con metanol-ácido acético, en proporción 7:1.5.

#### Cuenta de núcleos recuperados de los cultivos con

##### 6-TG:

Es necesario saber cuántos núcleos se recuperaron de estos cultivos para poder estimar el índice de marcaje o proporción de células marcadas ( $LI_T$ ). Para contarlos se toma una gota de la suspensión de núcleos, con pipeta Pasteur, y se diluye con 20 gotas de fijador; se resuspende bien y se cuenta en un hemocitómetro. Este conteo da el valor del parámetro que es el número total de células (T) recuperadas de los cultivos con 6-TG y con los que se elaboran las preparaciones que serán revisadas al microscopio en su totalidad para buscar a los núcleos de células que hayan sintetizado DNA en presencia del análogo.

#### Elaboración de preparaciones citológicas y tinción:

Al menos 6 hs después de fijar los núcleos, se hacen preparaciones citológicas por goteo del material sobre un portaobjetos:

- Los núcleos recuperados se centrifugan durante 5 min a 1200 rpm y se resuspenden en 0.2 a 0.5 ml de fijador, de acuerdo con el tamaño del paquete celular.

- La resuspensión debe ser tal que los núcleos no se aglutinen y queden bien separados sobre la preparación. En cada una de ellas se aplican 2 ó 3 gotas y se revisan al microscopio para controlar su calidad.

- Se tiñen diferencialmente según el método descrito por Ostrosky y cols. (1987), que consiste en cubrir las preparaciones en el colorante fluorescente Hoechst 33258 (0.3ml de una solución acuosa al 10% en 10ml de amortiguador de fosfatos pH 7.0) y exponerlas a la luz de

una lámpara de luz negra (longitud de onda 366 nm) durante 1 hora.

Posteriormente se enjuagan en solución amortiguadora de fosfatos 0.066 M, pH 7.0 y se tiñen con Giemsa al 4% en la misma solución de fosfatos, durante 6 min. Se enjuagan en agua de la llave (pH 7.0) y se secan con aire, para después evaluar al microscopio.

#### EVALUACION DE LA FRECUENCIA DE VARIACION

En los cultivos testigo, donde no se agregó el análogo 6-TG, se determina el índice de marcaje por el conteo diferencial de núcleos azules en 2000 células registradas, en cada laminilla; se evalúan 2 de ellas y se saca el promedio de ambas:

$$\text{LIC} = \frac{\text{núm. núcleos azules}}{2000}$$

(LIC de las iniciales en inglés de label index; la c se refiere a testigo.)

De los cultivos con 6-TG se cuenta el número total de núcleos teñidos de azul que constituye el número de núcleos variantes o parámetro M y se divide entre el total de células recuperadas de los cultivos con 6-TG (T), calculado antes de hacer las preparaciones, como ya se describió:

$$\text{Lit} = \frac{(M)}{(T)}$$

(La t se refiere a cultivos con tioguanina)

La frecuencia de células resistentes a tioguanina (6-TG<sup>r</sup> T-lys es la abreviatura en inglés) o frecuencia de variación (Vf) se calcula a partir de estos valores:

$$\text{Vf} = \frac{\text{LIC}}{\text{Lit}}$$

#### PRUEBAS ESTADISTICAS

Para comparar las frecuencias de variación (Vf) se utilizó el análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis (Daniel, 1983) que se aplica a grupos de diferente tamaño y que no muestran una distribución típica.

En la determinación de los valores por fuera de la distribución (outliers) se empleó el método de la gráfica de caja (box plot) en la que se utilizaron la mediana y los cuartiles 1 y 3 de la distribución para establecer valores límite. Aquellos valores de la distribución que queden por

fuera de esos límites se pueden considerar no pertenecientes a la misma ("outliers") (Ostle y Malone 1988).

Para comparar dos Vf individuales se usó la prueba de la relación entre dos intervalos de confianza desarrollada para el sistema de hpvt por Sylwester y Albertini (1985).

Para contrastar los índices de marcaje se empleó la prueba de t de Student (Spiegel, 1961).

## RESULTADOS

Durante el desarrollo del estudio se plantearon algunas complicaciones que obligaron a incorporar otro grupo de pacientes con daño neurológico, como ya se explicó previamente. Los resultados obtenidos con respecto a la Vf mostraron un comportamiento cuyo análisis era interesante, independientemente del objetivo original del estudio el cual era determinar si el praziquantel tenía un efecto genotóxico en los pacientes tratados por neurocisticercosis, pues se encontró que antes del tratamiento con el medicamento ya existía un incremento en la frecuencia de variación, con respecto a los individuos sanos. Esto era de esperar debido a que los pacientes con otro tipo de daño neurológico, así como los pacientes con neurocisticercosis habían estado expuestos a una mezcla de agentes potencialmente mutagénicos. La trascendencia de esta observación está en que no son abundantes los estudios de grupos de individuos expuestos a dosis controladas de mezclas de sustancias, y la sensibilidad de los sistemas de prueba para detectar el daño producido en este tipo de exposiciones no está aún suficientemente validado.

El índice de marcaje de los cultivos control, en los que no se hizo selección con 6-TG, el cual es un indicativo de la capacidad de proliferación de los linfocitos, también mostró comportamientos dignos de análisis en cada grupo estudiado. Este parámetro en individuos normales suele distribuirse en forma normal. En este estudio se encontró que en los individuos con daño neurológico y exposición a diversos agentes con potencial mutagénico, así como en los pacientes con neurocisticercosis antes del tratamiento con pzq, el índice de marcaje no se distribuye de la misma manera. Por las implicaciones que esto pudiera tener desde un punto de vista inmunológico, se hizo también un análisis de estos resultados, independientemente del efecto sobre la frecuencia de variación en el locus hp<sub>rt</sub>.

Por las razones explicadas, los resultados que se presentan no se limitan sólo a la determinación del efecto del pzq sobre la frecuencia de mutación en el locus hp<sub>rt</sub>, sino que se han analizado otros aspectos, de ahí que los resultados se han organizado de la siguiente manera:

### 1) Frecuencias de variación:

- resultados individuales en los que se puede ver la variabilidad, según la exposición, por grupos: controles, enfermos neurológicos y enfermos con neurocisticercosis antes de tratamiento y después de tratamiento con pzq;



- valores estadísticos por grupos: mediana y desviación estándar;

- comportamiento de la frecuencia de variación (Vf) en algunos individuos antes y después de tratamiento.

**2) Valores agrupados: controles y expuestos.**

- comportamiento en una distribución, intervalo y valores estadísticos;

- efecto por edad y por sexo.

**3) Índices de marcaje: se presentan de la misma manera que Vf.**

**4) Relación LIC - Vf.**

**FRECUENCIAS DE VARIACION**

**Individuos sanos (Tabla 3):** Las frecuencias de variación correspondientes a este grupo se distribuyen entre  $0.52 \times 10^{-6}$  y  $25.00 \times 10^{-6}$ , con una mediana de  $1.00 \times 10^{-6}$  y media de  $4.35 \pm 6.75 \times 10^{-6}$ . La diferencia entre media y mediana indica que estos valores no se distribuyen en forma normal y que el 50% de ellos son inferiores a  $1 \times 10^{-6}$  (Tabla 4).

**Individuos con daño neurológico (Tablas 3 y 4):** Los individuos afectados por diversos tipos de trastornos neurológicos y expuestos a una mezcla de agentes potencialmente mutagénicos, mostraron frecuencias de variación entre  $2.20 \times 10^{-6}$  y  $35.3 \times 10^{-6}$ , mediana de  $10.45 \times 10^{-6}$  y media de  $17.9 \times 10^{-6} \pm 11.5 \times 10^{-6}$ . En la tabla 5 se muestran los agentes a que estuvieron expuestos y las frecuencias de variación encontradas, en orden de menor a mayor. No se observa correlación, aunque sí es claro que, en comparación con individuos no expuestos a ninguno de esos agentes, las frecuencias de variación son más elevadas, y como grupo, son significativamente diferentes de los sanos (Fig.1, Cuadro 1).

**Pacientes con neurocisticercosis antes de tratamiento:** Entre los individuos afectados por neurocisticercosis se encontraron valores de  $1.46 \times 10^{-6}$  a  $101.01 \times 10^{-6}$ . La mediana es de  $4.17 \times 10^{-6}$ , y la media de  $14.11 \pm 24.39 \times 10^{-6}$ . Respecto a la exposición a otros agentes, como en el caso de los pacientes con otras afecciones neurológicas, tampoco se observó correlación con un agente o con una mezcla particular de ellos (Tabla 5). El efecto de la exposición, sin embargo, sí es apreciable en todos los

grupos, tal como se muestra en la figura 1.

Se ha establecido que las frecuencias de variación en los seres humanos tienen una distribución de Poisson (Sylwester y Albertini 1985) en la que los valores menores son más frecuentes que los valores elevados. En la figura 2 se presenta esta distribución para los enfermos de neurocisticercosis antes del tratamiento con pzq en la que los cinco valores más altos fueron significativamente diferentes de la mediana. Aunque se trata de una distribución de Poisson, el dato más alto encontrado en estos individuos hace sospechar que se trata de un "outlier", es decir, un valor por fuera de la distribución. Este mismo individuo siguió mostrando un valor de Vf elevado después del tratamiento, el valor más elevado también en este grupo. Sin embargo no se excluyó del análisis de los resultados debido a que no se pudo establecer una diferencia importante con respecto al resto de los enfermos con neurocisticercosis, es decir, sus condiciones de salud y exposición a agentes con capacidad mutagénica, eran muy semejantes a las de los demás pacientes.

Una propiedad de la distribución de Poisson es que los logaritmos naturales ( $\ln$ ) de los valores en ella, se dispersan en forma normal. Obteniendo los  $\ln$  de las Vf de los pacientes con neurocisticercosis y aplicando la fórmula de la gráfica de caja (box-plot) resultó que el valor más alto encontrado podría considerarse correspondiente a un outlier. Lo mismo sucedió cuando se aplicó el mismo método a los valores después del tratamiento con praziquantel. Cuando se tiene un "outlier" que puede no corresponder a la distribución, es posible analizar el resto de los datos excluyendo ese caso. Al hacerlo, se encontró que antes y después de tratamiento con pzq no hay diferencia significativa entre grupos (Cuadro 1).

**Pacientes con neurocisticercosis tratados con praziquantel:** Los valores de este grupo se distribuyen entre  $3.03 \times 10^{-6}$  y  $102.52 \times 10^{-6}$  (tabla 6). La mediana es  $11.02 \times 10^{-6}$  estadísticamente diferente del valor de  $4.17 \times 10^{-6}$  encontrado antes del tratamiento ( $p < 0.05$ ), aunque, como ya se dijo, si se excluye el valor más alto, esa diferencia desaparece (Cuadro 1).

**Valores individuales de pacientes antes y después del tratamiento con praziquantel:** En 8 individuos se logró obtener resultados antes y después del tratamiento (Tabla 6). La distribución de sus Vf antes del tratamiento es de  $1.46 \times 10^{-6}$  a  $101.01 \times 10^{-6}$  y después, es de  $3.03 \times 10^{-6}$  a  $102.52 \times 10^{-6}$ . La media y mediana antes de tratamiento son de  $25.9 \times 10^{-6}$  y  $15 \times 10^{-6}$ , respectivamente y después de tratamiento, son de  $20.3 \times 10^{-6}$  y  $9.5 \times 10^{-6}$  respectivamente. Se aplicó la prueba estadística, nuevamente considerando o excluyendo el valor más alto (en uno y otro grupo ese valor

corresponde al mismo individuo). No se encontró diferencia significativa en ninguno de los dos casos. En la figura 3 se muestran las Vf antes y después de tratamiento de cada uno de estos individuos; en ella se puede apreciar la variabilidad en las respuestas al tratamiento, medidas por este parámetro..

#### CARACTERISTICAS GENERALES DE LA EXPOSICION

Quando se observa la distribución de todos los valores de los individuos expuestos, tomados como una muestra única, se observa que el 50% de los valores de Vf son menores de  $8.24 \times 10^{-6}$  (valor de la mediana en la Fig. 4), y la distribución se parece a lo predicho para este tipo de fenómenos, es decir, una curva de Poisson, pues las mutaciones son eventos raros, por tanto, su frecuencia normal en un gen, se espera que sea baja. La media es de  $15.3 \pm 21.75$ , el intervalo es de 1.46 a 102.52. Estos datos son significativamente diferentes de los del grupo de individuos sanos, cuyo intervalo es más corto y consecuentemente, los valores estadísticos, menores (Tabla 4).

Un resultado que llama la atención es que el grupo de pacientes con daño neurológico, expuesto a los mismos agentes que el de pacientes con cisticercosis antes del tratamiento con praziquantel mostraron una distribución de Vf que es estadísticamente distinta. Una diferencia entre ellos es el tipo de afección neurológica que en el primer grupo no es parasitaria y en el segundo, sí lo es (Cuadro 1).

**Edad:** Se agruparon los valores de Vf de los enfermos neurológicos y con cisticercosis antes del praziquantel, se graficaron en forma continua en orden de edad y se determinó la tendencia. Los datos mostraron que la edad no influye en la Vf producida por exposición. Entre los individuos sanos no se encontró una tendencia en relación con la edad (Fig.5).

**Sexo:** Con respecto al sexo, primero se agruparon todos los datos de enfermos neurológicos y con cisticercosis, antes de recibir éstos su tratamiento con pzq, y se compararon hombres y mujeres; los testigos se compararon por separado y en ambos casos se usó la prueba de Kruskal-Wallis. No se notaron diferencias significativas en ningún grupo, aunque la variabilidad dentro de cada grupo sí fue diferente (prueba de F,  $p < 0.05$ ) (Fig. 6). Cuando se agruparon todos los datos y se compararon hombres (30) y mujeres (25) tampoco hubo diferencia a un nivel del 5%.

Los valores estadísticos de todos los grupos por

sexos fueron de  $12.31 \times 10^{-6} \pm 19.49 \times 10^{-6}$  en hombres y de  $10.58 \times 10^{-6} \pm 15.69 \times 10^{-6}$  en mujeres, con intervalos de 0.59 a 101.01 ( $\times 10^{-6}$ ) y de 0.52 a 68.14 ( $\times 10^{-6}$ ) respectivamente. Las medianas, en el mismo orden, fueron  $5.63 \times 10^{-6}$  y  $3.33 \times 10^{-6}$ .

#### INDICES DE MARCAJE

El índice de marcaje en los cultivos sin 6-TG o testigos fue de interés, pues es un parámetro que refleja la capacidad de respuesta de los linfocitos de cada individuo a la estimulación con PHA y esto indica la capacidad de respuesta inmunológica celular (Roitt y cols. 1989; NRC 1992). En la figura 7 se ve el comportamiento de este parámetro en cada uno de los grupos y cómo la distribución y media de los individuos sanos y de los pacientes con cisticercosis después del tratamiento se parecen más entre sí en comparación con los otros dos grupos. En la tabla 7 se muestran en forma detallada los índices de marcaje por la estimulación con PHA; el análisis estadístico aparece en la tabla 8. En el grupo de individuos normales los índices varían entre 0.128 y 0.470, con media de 0.286 y mediana 0.254. El índice de marcaje en el grupo de individuos con daño neurológico varió entre 0.054 y 0.400, siendo la media 0.197 y la mediana 0.116. Estos pacientes tienen el promedio más bajo de proliferación de linfocitos por estimulación con PHA (Tabla 8, Fig. 7), con los índices de marcaje más bajos encontrados.

Entre los sujetos con cisticercosis antes del tratamiento con praziquantel los índices de marcaje varían entre 0.117 y 0.376, la media fue de 0.225 y la mediana, 0.218. Este grupo también mostró una disminución en la proliferación de linfocitos, y no se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo de neurológicos, pero sí es distinta de los no expuestos y del grupo posterior al tratamiento. Después del praziquantel, los índices de marcaje van de 0.156 a 0.410, con una media de 0.285 y mediana de 0.282. El cuadro 2 muestra las relaciones estadísticas entre todos los grupos por la prueba de t de Student.

Cuando se analizaron los 8 pacientes de quienes se tienen datos antes y después de tratamiento se encontró que todos los valores fueron menores antes (Tabla 7, Fig. 8). La media es de  $0.245 \pm 0.071$ , y la mediana fue idéntica. Después del tratamiento la media fue  $0.303 \pm 0.059$  y la mediana de 0.298. Se presentó diferencia significativa a un nivel del 5%.

## RELACION ENTRE INDICES DE MARCAJE Y FRECUENCIA DE VARIACION

Con la intención de analizar una posible correlación entre los  $V_f$  y las  $V_f$  de cada individuo se elaboró un diagrama de dispersión (fig.9) en el que no se encontró una relación entre dichos parámetros, lo cual significa que si los linfocitos en la muestra de sangre tuvieron una baja proliferación por la estimulación con PHA, ello no fue determinante en la frecuencia de células resistentes a 6-TG que se encontró.

## DISCUSION

### FRECUENCIAS DE VARIACION

Los resultados obtenidos en cada grupo, al graficarse, muestran una dispersión en la que la mayor parte de los valores se acumulan en los valores más bajos y cuya amplitud aumenta cuando los individuos estudiados han estado expuestos. Así, la dispersión que se encuentra en los individuos sanos tiene un intervalo menor que el de cualquiera de los grupos expuestos (Fig. 1); no obstante es posible obtener entre los controles valores que son elevados como el  $25 \times 10^{-6}$  el cual es un valor más alto que el 84% de los encontrados en las personas expuestas (Cuadro 3a). Por otra parte, independientemente de la exposición, siempre se presentan valores bajos: 60% de los valores mostrados por los individuos tratados están comprendidos dentro del tercer cuartil de la distribución de los testigos (cuadro 3b).

En diversas investigaciones para medir Vf en el locus hprt en grupos expuestos a sustancias químicas se ha descrito este tipo de dispersión en los resultados y en la medida en que aumenta la cantidad de datos se hace más característico este tipo de respuestas, las cuales ocurren incluso cuando los agentes estudiados son mutágenos considerados fuertes como las radiaciones y los medicamentos anticáncer. En la tabla 1 se muestran los resultados de Vf encontrados en diversos estudios de exposición a mutágenos y puede observarse cómo la exposición a sustancias químicas y a radiaciones, en condiciones controladas muestra este comportamiento (Albertini y cols. 1985, Ammenheuser y cols. 1988, Ammenheuser y cols. 1991, Natarajan y cols. 1991, Ostrosky y cols. 1990, 1991).

El segundo aspecto que se destaca en el presente estudio es que la exposición a agentes mutagénicos es detectable en el sistema del locus hprt, aun cuando se trata de detectar el daño sobre un solo gen. Esa exposición produce una elevación general en la Vf que hace la diferencia significativa entre el grupo de individuos sanos y los grupos de pacientes, misma que se manifestó incluso cuando la prueba estadística se hizo excluyendo el valor más alto considerado como posiblemente fuera de la distribución en los sujetos con neurocisticercosis.

Entre los individuos tratados, considerados en conjunto, el 96% (48/50) mostraron Vf superior al 59% de los sanos (Cuadro 4a), de tal forma que puede afirmarse que la exposición produce incremento en la inducción de daño genético medido por la prueba de mutaciones génicas en el locus hprt.

Comúnmente se encuentra más de una célula variante

por millón cuando el individuo ha estado expuesto a algún agente mutagénico; en los sanos, en cambio, 47% de los valores fueron menores de  $1 \times 10^{-6}$  (Cuadro 4b).

En otros trabajos donde también se han estudiado personas no expuestas, al igual que éste se ha descrito un intervalo de rangos menores que en individuos expuestos; de manera global, el valor más bajo es  $0.5 \times 10^{-6}$  y el más alto es  $28.9 \times 10^{-6}$  (Ammenheuser y cols. 1988, Albertini y cols. 1990, Natarajan y cols. 1991, Ostrosky y cols. 1987, 1990) (Tabla 2). Estos valores se consideran como normales, correspondientes a individuos normales genéticamente, es decir, que no tienen ningún síndrome ni enfermedad congénita y que además no están medicados. No obstante, es un grupo heterogéneo con respecto a edad y a hábitos como el tabaquismo, ingestión de bebidas alcohólicas y tipo de alimentación, los cuales son factores que pueden influir sobre la frecuencia de variación encontrada, pero debido a que son considerados como "estilo de vida" no constituyen un motivo para excluir de un estudio a los individuos aparentemente sanos que fuman ni a los que beben con moderación. Estos factores del estilo de vida influyen igualmente en los individuos expuestos a agentes mutagénicos, así como otros factores, llamados de riesgo, como son el área geográfica del lugar de residencia o si éste se encuentra cercano a una industria que produzca desechos contaminantes. La variabilidad en las Vf encontrada en estas condiciones, plantea dudas acerca de cual es el valor máximo que se debe aceptar como "normal", así como cuales son los resultados que se considerarían "positivos" debido a la exposición, aún más, el incremento general manifestado en los pacientes ¿debe tomarse como un riesgo para la salud? o ¿son sólo aquéllos individuos que presentaron valores superiores al más alto entre las personas no expuestas los que tendrían ese riesgo? Actualmente no puede darse una respuesta categórica porque no se conoce que cantidad de daño se necesita para esperar un efecto sobre la salud, y este tipo de exposiciones: a mezclas de sustancias, en dosis controladas de medicamentos, en tiempos diferentes, que a la larga se convierten en exposiciones crónicas a agentes, más bien parecen revelar la tolerancia y adaptabilidad del organismo humano a condiciones ambientales que no llegan a representar un compromiso para la vida. En otras palabras, los estudios de mutagenicidad estarían proporcionando, aparte de otros aspectos que se discuten más adelante, datos para establecer los límites de la "plasticidad genética" del ser humano sometido a las presiones de su propio ambiente. Dichos límites se pueden considerar como los extremos de una distribución que representan a los individuos más resistentes al daño genotóxico producido por la exposición a agentes, y a los individuos más sensibles.

Los sujetos que tuvieran menos daño, es decir con

los valores más bajos de Vf, proporcionarían un buen modelo para el estudio de la adaptabilidad de la especie humana desde un punto de vista estrictamente biológico. Pero esto también tiene utilidad médica pues sería posible caracterizar el origen de su susceptibilidad al daño genético, una vez reconocidos estos individuos. Los más sensibles, con valores más elevados de Vf serían, por lo contrario, los que corren un riesgo mayor de padecer neoplasias.

#### RESPUESTA INDIVIDUAL

Los resultados en este estudio muestran una clara variabilidad entre individuos, sean estos sanos o enfermos. La causa de esta variabilidad por sí misma puede ser un tema de estudio por la importancia médica que puede revestir. Actualmente se tiene conocimiento de algunos factores que determinan diferencias en las respuestas, las cuales tienen que ver con el metabolismo particular de las sustancias, con la concentración o la dosis de exposición y con la capacidad de reparación del daño al DNA (Brusick 1987). Por ejemplo, se sabe que más de 300 drogas y contaminantes ambientales inducen su propio metabolismo y el de compuestos similares (Conney 1967). Como ejemplo, la capacidad para metabolizar alguna sustancia particular puede variar en cada individuo y se ha demostrado que una razón de esa variabilidad puede ser el polimorfismo en el metabolismo de las drogas; los genes polimórficos del citocromo P450 son sólo una familia que se ha estudiado, pero se sabe que existen otras familias génicas semejantes (González y Nobert 1990). En lo que se refiere a la reparación del DNA, ésta depende también del agente que causa el daño, del tipo de alteración que provoca y del estado de actividad de los genes afectados (Bohr y cols. 1987). La variabilidad en esta capacidad de reparación estaría dando un cambio en la cantidad de mutaciones que se fijarían en las células. La velocidad de eliminación de un compuesto también puede influir en la Vf, como se demostró en un estudio realizado en borregos tratados con Metronidazol, un medicamento antiamebiano de amplio uso en México, en el que se midió la farmacocinética del medicamento en cada animal, y se encontró que en aquellos en los que la velocidad de eliminación era menor, el incremento en la Vf con respecto a la manifestada antes de administrar el medicamento fue mayor (Ostrosky y cols. 1992). De tal manera que no basta con que un agente tenga capacidad mutagénica para observar dicho efecto en una exposición *in vivo*, ya que hay muchos factores que pueden favorecer, impedir, o bien enmascarar esa acción. Es de esperar, entonces, que en exposiciones a mezclas de mutágenos y a dosis controladas, la respuesta que se encuentre dependerá en gran medida de cada individuo.

Entre los pacientes con daño neurológico no parasitario hubo cuatro individuos con una Vf



significativamente distinta a la mediana del grupo; entre los que tenían neurocisticercosis antes del tratamiento, cinco individuos tuvieron una Vf significativamente diferente de la mediana, contando al individuo que podría considerarse como fuera de esa dispersión. Se ha tomado la mediana como punto de comparación ya que este valor representa el comportamiento del 50% de los datos, lo cual es más informativo que la media aritmética en esta clase de distribución, en la que los valores no tienen una distribución normal.

La trascendencia de una adecuada determinación de quienes son los individuos más sensibles a los efectos de los agentes mutagénicos está en la sospecha de que esos sujetos estarían más proclives a enfermedades causadas por mutaciones como el cáncer y enfermedades autoinmunes. El perfeccionamiento de los diseños para este tipo de estudios es algo que sin duda ayudaría a la identificación de las personas más susceptibles, las cuales tendrían que buscarse necesariamente entre un grupo de expuestas de la misma manera que ellas, y una vez detectadas, sería necesario realizar estudios de seguimiento, con los que se podría establecer la evolución de las frecuencias de variación y caracterizar el tipo de mutación sufrida, en caso de persistir éstas. La aplicación de otras pruebas para detectar mutaciones génicas daría información adicional acerca de la extensión del daño causado al DNA, así como de la susceptibilidad de otros genes. El seguimiento permitiría conocer si el incremento en la Vf es una condición pasajera y al terminar la exposición, disminuirá, ya sea por la acción de las células encargadas de la vigilancia inmunológica o por la letalidad del daño sufrido por las células afectadas, y por otro lado, en caso de que el incremento en la Vf persistiera, poder determinar si evolucionará hacia otro tipo de daño o se mantendrá estable. Este es un aspecto que sería importante profundizar, pues la sensibilidad a enfermedades posteriores podría depender de la eficiencia del organismo para eliminar a las células dañadas, una vez interrumpida la exposición. No es fácil un estudio así, sin embargo, en países como Finlandia y los de la Comunidad Europea, los servicios de atención médica a víctimas de accidentes ambientales, así como a los trabajadores en fábricas donde se manejan mutágenos, están inscritos en programas de vigilancia genética y ambiental en los que se está tratando de llevar a cabo ese tipo de ensayos (Comission of the European Communities 1990).

#### EFFECTO DEL PARASITO

En este estudio, además del efecto por el tratamiento con medicamentos y radiación, se evaluó la exposición a un parásito: el cisticerco. Los tres valores más altos de Vf correspondieron a pacientes neurocisticercosos antes del tratamiento con pzq (Tabla 6,

Fig. 1): uno es el paciente cuya Vf podía considerarse como fuera de la distribución (outlier) ( $101.01 \times 10^{-6}$ ) y el siguiente más alto ( $68.14 \times 10^{-6}$ ), es significativamente diferente del valor más cercano anterior, de  $36.21 \times 10^{-6}$ . Ninguno de los pacientes con otro daño neurológico, ni aun los expuestos a diazepam y radiación (los mutágenos más fuertes a que estuvieron expuestos) mostraron valores tan elevados. La presencia del parásito, por lo tanto, hace sospechar un efecto mutagénico por sí mismo. En apoyo de esta idea está un estudio previo, realizado en cerdos con cisticercosis, en los que se encontró una frecuencia alta de células poliploides, así como de células con multifragmentación de cromosomas en comparación con cerdos sanos, antes de recibir el praziquantel (Flisser y cols. 1990).

Gentile (1985), al discutir la posible acción carcinogénica del *Schistosoma* propuso diferentes mecanismos por los cuales el parásito podría inducir cáncer de vejiga. Entre los mecanismos planteados destacan los que sugieren la presencia de agentes carcinogénicos, cuya procedencia puede ser el parásito mismo o la alteración del metabolismo de sustancias endógenas o exógenas, provocada por la infestación, aumentando la producción, por las células del epitelio de la vejiga, de metabolitos carcinogénicos naturales. Las posibilidades enumeradas son diversas, todas especulativas, que en resumen proponen la presencia de agentes generados por el parásito que serían capaces de dañar al DNA y llevar a la transformación celular.

La mutagenicidad causada por los parásitos es una idea relativamente nueva y a medida que se conoce más acerca de los mecanismos de interacción entre el parásito y su hospedero resulta inclusive obligado pensar en la inducción directa o en una acción asociada que conduzcan a un daño genético. En el caso de los cisticercos se han identificado moléculas tóxicas, producidas por ellos, y en los extractos crudos del parásito se ha detectado actividad mitogénica a dosis bajas, pero depresora de proliferación celular en dosis mayores (Flisser 1982). Estas moléculas producidas y provocadas por el parásito para evadir la inmunidad de su huésped y su interacción con las células inmunológicas, podrían también ser causantes de mutaciones no sólo en los linfocitos, sino en otros tejidos en los que se haya alojado el parásito. De esta posibilidad surge otro campo de interés de los estudios en linfocitos de personas expuestas: el linfocito como unidad funcional del sistema inmunológico del organismo, es un blanco primario para los agentes externos, sean agentes químicos o biológicos, y en la interacción con ellos pueden suceder tres cosas: que los linfocitos cumplan su función y sobrevivan, que sean destruidos, o que sean dañados permanentemente, disminuyendo su eficiencia. En los dos primeros casos no habría consecuencias para la salud, a menos que la destrucción de células fuera tan extensa que el

organismo no pudiera reponerlas; sin embargo en el tercer caso, no se sabe qué número de células dañadas debe haber para que la capacidad de defensa del organismo disminuya, tampoco se conoce qué clase de retos externos pondrán de manifiesto esa incapacidad, pero las consecuencias para el organismo necesariamente llevan a una pérdida de salud, ya sea porque esté más expuesto a infecciones, o porque sea menos eficiente en eliminarlas, lo que le llevaría a un estado crónico de infección-reinfección-inmunodepresión-baja vigilancia inmunológica-enfermedades autoinmunes?-neoplasias? en el que el organismo estaría cada vez en mayor desventaja (Fig. 10). La relación entre mutación y pérdida de capacidad inmunológica es, por lo tanto, otra área que requiere investigación.

#### EFFECTO DEL PRAZIQUANTEL

Después del tratamiento con el pzq encontramos que en las muestras de sangre de los pacientes había una elevada viabilidad celular, lo cual permitió hacer las pruebas, y una proliferación normal, medida por el LIC.

Con respecto a la producción de mutaciones génicas, ésta no es aparente. En cuatro pacientes las frecuencias de variación disminuyeron después del tratamiento (individuos TRR, JGG, HFP y JSQ, Tabla 6). Sin embargo, no es posible establecer un comportamiento general de la Vf debido al pzq, ya que dos valores aumentaron (JSC y DFG) y otros más no tuvieron cambio (AQA y HPG). Desde el punto de vista estadístico, sólo el individuo (HFP) presentó un cambio significativo y éste fue una disminución en la Vf (Fig. 3). Por lo anterior puede decirse que el pzq no produce mutaciones génicas en el sistema del locus *hprt*, tomado como modelo del genoma humano *in vivo*. Estos resultados son congruentes con lo reportado en otros estudios sobre mutagenicidad en los que no se demostró que el pzq interactúe directamente con el DNA, pues no indujo reparación en bacterias ni en células de mamíferos, ni produjo mutaciones génicas en *hprt* en células V79, ni se ha presentado daño cromosómico significativo (Kramers y cols., 1991).

Existen reportes de que el pzq es comutagénico: que aumentó la mutagenicidad del benceno *in vivo* (Anwar y cols. 1989), así como la transformación de líneas en cultivo por el 3-metilcolantreno, sólo cuando se administró al mismo tiempo o después del carcinógeno (Billings y Heidelberger, 1982), sin embargo en el presente estudio, en relación con los otros agentes a los que estuvieron expuestos los pacientes con neurocisticercosis, no se detectó dicho efecto comutagénico.

## INDICE DE MARCAJE

El índice de marcaje, el cual indica que las células sintetizaron DNA, es una medida de la función inmunológica celular, ya que constituye una respuesta a un estímulo por un mitógeno (en este caso PHA) o un antígeno al que los linfocitos T responden normalmente con la proliferación (NRC 1992). Se ha determinado que ciertas condiciones de inmunodepresión (sea por causas de enfermedad o inducidas por agentes químicos) presentan una disminución en la capacidad de esa respuesta (Roitt y Brostoff 1989, NRC 1992). Por esta razón, el LIC determinado por la incorporación de BrdU en cultivos donde no se hizo selección con 6-TG, puede ser tomado como una prueba de la capacidad de respuesta celular del individuo.

La exposición a agentes químicos, en forma crónica y a dosis bajas, es la manera de exposición más común de los seres humanos. La inmunodeficiencia que esto produce aún no ha podido asociarse categóricamente a una enfermedad particular, pues no se sabe cuál es el grado de inmunodeficiencia necesario para enfermarse. El estudiar la capacidad de respuesta celular en individuos ya enfermos puede ser un buen punto de comparación para el establecimiento de riesgo en individuos expuestos a mutágenos, pero aun sin síntomas clínicos. De acuerdo con lo anterior, en las personas analizadas encontramos una disminución significativa en la respuesta celular de los pacientes con cualquier tipo de daño neurológico y expuestos a medicamentos y tratamientos médicos; esta disminución fue mayor en los pacientes con daño neurológico no parasitario (Tabla 7, Fig. 7).

El tratamiento con pzq tuvo un efecto positivo en este parámetro, pues después del tratamiento, los índices de marcaje aumentaron hasta alcanzar los valores encontrados en el grupo de individuos sanos. Podría pensarse que el pzq está actuando como un agente restaurador de las funciones inmunológicas, pero este efecto bien podría ser una consecuencia de la lesión al parásito, con lo que nuevos antígenos pueden quedar expuestos lo cual induce una respuesta inmunológica (Flisser y cols. 1990). Esta respuesta, como se ha mencionado antes, podría estar deprimida o inhibida por algún factor producido por el parásito como el detectado por Letonja y cols. (1987) en suero de ratones infectados por *Taenia taeniaeformis*. Al desaparecer el parásito, y como consecuencia el factor depresor por efecto del pzq, el sistema inmunológico aparentemente se recupera (Groll 1988), siendo las células capaces de volver a proliferar normalmente. Este fenómeno ha podido medirse con la cinética de proliferación celular, evaluada en cultivos de sangre entera de los mismos

pacientes, que consiste en contar el número de veces que se dividen los linfocitos en un cultivo de 72 horas y sacar una proporción de aquellos que lo hicieron una, dos y tres veces o más, lo cual da una medida del ritmo de proliferación celular. En estos cultivos, antes de tratamiento, el tiempo de proliferación fue más lento que el observado después de la exposición, cuando se encontró una cinética normal (Montero y cols. 1989).

De los resultados sobre el índice de marcaje se desprende la conveniencia de diseñar estudios encaminados a establecer la relación entre **mutación- daño en la función celular- resultado en la salud**, pues es fundamental para la comprensión de los procesos de carcinogénesis y enfermedades inmunológicas adquiridas.

La interacción de numerosos factores, entre ellos mezclas de agentes químicos, algunos mutagénicos, otros no, los parásitos que no se alojan en forma pasiva en su huésped, los tratamientos con medicamentos y la capacidad individual de metabolización, reparación y defensa inmunológica hacen que los estudios de monitoreo de daño genotóxico sean complicados, difíciles tanto de controlar como de interpretar, pero los seres humanos nos exponemos de esta manera, nunca en un ambiente de laboratorio, y aunque los modelos animales proveen información acerca de lo que podría pasar en ciertas condiciones, la mejor comprensión de los procesos que nos interesan se puede encontrar a través de los estudios en seres humanos, con diseños adecuados a corto y a largo plazo.

## CONCLUSIONES

De los diferentes aspectos que surgieron del presente trabajo, es posible concluir lo siguiente.

- El pzq no incrementó la frecuencia de mutaciones génicas en el locus hprt de linfocitos en humanos, in vivo. Tampoco se comportó como un comutágeno, administrado después de la exposición a otros mutágenos.

- El contacto con agentes mutagénicos provoca un incremento en la Vf en el locus hprt en un grupo tratado, lo cual demuestra la capacidad del sistema para hacer evidente la exposición.

- Las frecuencias observadas implican que existe variación en la respuesta individual a la exposición y que pueden reconocerse individuos más susceptibles y otros con más sensibilidad a sufrir daño genético.

- En algunos individuos parasitados, la frecuencia de variación se elevó significativamente, y se observó una capacidad de proliferación disminuida en los linfocitos T, medida por el índice de marcaje por incorporación de BrdU.

- La capacidad de proliferación de los linfocitos T, por estimulación con PHA mejoró después del tratamiento con el pzq, esto sugiere una relación entre daño genético en linfocitos T y la inmunodepresión de la respuesta celular causada por el parásito. Por ello se recomienda que en estudios futuros se evalúe esa relación para determinar si se trata de un fenómeno asociado a la infestación parasitaria y caracterizarla.

## REFERENCIAS

- Albertini R. Somatic gene mutations in vivo as indicated by the 6-thioguanine resistant T-lymphocytes in human blood. *Mutation Res.* 150:411-422, 1985.
- Albertini R., Nicklas J., Sullivan L., Hunter T., O'Neill P. Hprt mutation in vivo in human T-lymphocytes. En: Moore, Tindall, De Marini, De Serres (eds.), *Banbury Reports 28: Mammalian cell mutagenesis.* Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor Laboratory, 28:139-148, 1987.
- Albertini R.J., Nicklas J.A., O'Neill P. and S.H. Robison. In vivo somatic mutations in humans: measurement and analysis. *Annu.Rev.Genet.* 24:305-326, 1990.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed. Garland Publishing Inc. New York, 1989.
- Azzenheuser M.M., Ward J.B.Jr., Whorton E.B.Jr., Killian J.M. and Legator M.S. Elevated frequencies of 6-thioguanine-resistant lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with cyclophosphamide: a prospective study. *Mutation Res.* 204:509-520, 1988.
- Azzenheuser M.M., William W. Au, Elbert B. Whorton Jr., James A. Belli and Jonathan B. Ward Jr. Comparison of hprt variant frequencies and chromosome aberration frequencies in lymphocytes from radiotherapy and chemotherapy patients: a prospective study. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 126-135, 1991.
- Andersson Björn, Sai-Mei Hou and Bo Lambert. Mutations causing defective splicing in the human hprt gene. *Environ.Mol.Mutagen.* 20(2):89-95, 1992.
- Anwar W.A., W.W. Au, V.M. Sadagopa R., and M.S. Legator. Enhancement of benzene clastogenicity by praziquantel in mice. *Mutation Res.* 222:283-289, 1989.
- Ashby J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutation Res.* 204: 543-551, 1988.
- Batzinger R.P., Bueding E., Reddy B.S. & Weisburger J.H. Formation of a mutagenic drug metabolite by intestinal microorganisms. *Cancer Res.* 38:608-612, 1978.
- Bigbee W.L., Wyrobek A.W., Langlois R.G., Jensen R.H., Everson R.B. The effect of chemotherapy on the in vivo frequency of glycophorin A "null" variant erythrocytes. *Mutation Res.* 240(3):165-175, 1990.
- Billings P.C. and C. Heidelberger. Effects of praziquantel a new antischistosomal drug, on the mutation and transformation of mammalian cells. *Cancer Res.* 42: 2692-2696, 1982.
- Bittencourt P., Gracia C., Gorz A., Oliveira T. High-dose praziquantel for neurocysticercosis: serum and CSF concentrations. *Acta Neurol. Scand.* jul 82(1): 28-33, 1990.
- Bohr Wilhelm, Phillips David & Hanawalt Philip. Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.* 47:6426-6436, 1987.
- Botero D., Castaño S. Treatment of cysticercosis with praziquantel in Columbia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 810-821, 1982.
- Brandán H., Ostrosky P., Diaz Perches R. La radiación al servicio de la vida. *La Ciencia desde México No.99*, Fondo de Cultura Económica, México, 1991.

- Bridges B., Cole J., Green M.H.L. Smoking, leukemia and lymphocyte mutations. (Letter to the editor) *Leukemia* 312:846, 1989.
- Brusick D. Principles of Genetic Toxicology. 2nd ed. Plenum Press N.Y., 1987.
- Caporaso N., Landi M.T. and Vineis P. Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis: evaluation of epidemiologic evidence. *Pharmacogenetics*: 1(1): 4-19, 1991.
- Carpenter Philip L. *Inmunologia y serologia*. La Prensa Mexicana S.A., 2a. edición, México D.F. 1982. pp.325-327.
- Choromanski L., Estrada J. y Kuhn R. Detection of antigens of larval Taenia solium in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. *J. Parasitol.* 76(1): 69-73, 1990.
- Cole J., Green M., James S.E., Henderson L. and Cole H. A further assessment of factors influencing measurements of thioguanine-resistant mutant frequency in circulating T-lymphocytes. *Mutation Res.* 204:493-507, 1988.
- Cole J., Green M.H.L., Stephens G., Waugh A.P.W., Beare D., Steingrimsdottir H. & Bridges B. HPRT somatic mutation data. *Mutation and the Environment, Part C*, Wiley-Liss, Inc., N. York, 25-35, 1990.
- Cole J., Waugh A., Beare D., Stephens G., Steingri H., Green M. Monitoring the human population for gene mutations in somatic cells. Meeting abstract. *Mutation Res.* 252 (2):172-173, 1991.
- Cole J., Arlett C.R., Norris P.G., Stephens G., Waugh A., Beare D., Green M.H.L. Elevated hprt mutant frequency in circulating lymphocytes-T of Xeroderma Pigmentosum patients. *Mutation Res.* 273(2):171-178, 1992.
- Commission of the European Communities. Environmental Research Programme. Biomonitoring of human populations exposed to genotoxic environmental chemicals. Progress reports presented at the 2nd meeting of the contact group, Espoo, Finland, 1990.
- Conney A.H., Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19:317-366, 1967.
- Cortinas de Nava C., Ostrosky P. y Galván S. Principios de Mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratogénesis. En: Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos, Carcinógenos y Químicos Ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, 1980.
- Daniel W.W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, México, 1983.
- Darnell. *Molecular Cell Biology*. Sci. Am. Books, 1990.
- Diaz Camacho S., Candil R.A., Uribe B.A., Willas K. Serology as an indicator of Taenia solium tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 563-566, 1990.
- Dobzhansky T. *Genética del proceso evolutivo*. Ed. Extemporáneos, México, 1a. edición en español. 1975.



- Escobedo F., González Mariscal G., Revuelta R. & Ruben M. Surgical treatment of cerebral cysticercosis. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A., Willas K., Lalette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 201-206, 1982.
- Espinoza B., Ruiz-Palacios G., Tovar A., Sandoval M., Plancarte A. y Flisser A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its applications in immunodiagnosis. Journal of clinical microbiology 24(4):536-541, 1986.
- Fearon E.R., B. Vogelstein & Feinberg A.P. Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumours. Nature (London) 309:176-178, 1984.
- Fearon E.R. y Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-767, 1990.
- Fearon E.R., Cho K.R., Nigro J.H., Kern S.E., Simons J.W., Ruppert J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Thomas G., Kinzler K.W. y Vogelstein B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 247: 49-56, 1990.
- Fenech M., Morley A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Res. 147:29-36, 1985.
- Flisser A. Discussion on the immune response of the host. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A., Willas K., Lalette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 611-617, 1982.
- Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. Parasitology today 4(5): 131-137, 1988.
- Flisser A., González D., Plancarte A., Ostrosky P., Montero R., Stephano A. y Correa D. Praziquantel treatment of brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis II. Parasitol. Res. 76:640-642, 1990.
- Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*, en prensa.
- García H., Martínez M., Gilman R., Herrera G., Tsang V., Pilcher J., Díaz F., Verástegui M., Gallo C., Porras M., Alvarado M., Naranjo J. Miranda E. and the Cysticercosis working group in Peru. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. The Lancet 338: 549-551, 1991.
- Gentile J. Schistosoma related cancers: a possible role for genotoxins. Environ.Mut. 7(5):775-785, 1985.
- González Angulo A. La cisticercosis en México. Gaceta médica de México, 120(9-10): 309-326, 1984.
- González F.J. and Nebert D.W. Evolution of the P450 gene superfamily. TIG, June, 6(6): 182-186, 1990.
- Grist S.A., McCarron M., Kutlaca A., Turner D.R. & Morley A.A. In vivo human somatic mutation: frequency and spectrum with age. Mutation Res. 266:189-196, 1992.
- Groll E.W. Chemotherapy of human cysticercosis with praziquantel. En:Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A., Willas K., Lalette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 207-218, 1982.

Hakoda M., Akiyama M., Kyoizumi S., Awa A.A., Yamakido M. & Otake H. Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. *Mutation Res.* 201:39-48, 1988.

Heim S. and Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss. New York, 1987.

Herrera L.A., Montero R., León Cázares J.M., Rojas E., Gensebatt M.E. and Ostrosky-Wegman P. Effects of progesteron and estradiol on the proliferation of phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Mutation Res.* (in press), 1992.

IARC (WHO). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Genetic and Related effects: an updating of selected IARC monographs from volumes 1 to 42. Suppl.6. Lyon, France, 1987.

Janatipour M., Trainor K.J., Kutlaca R., Bennett G., Hay J., Truner D.R. & Morley A. Mutations in human lymphocytes studied by an HLA selection system. *Mutation Res.* 198:221-226, 1988.

Jena A., Sanchette P., Gupta R., Khushu S., Chandra R. y Lakshkipathi N. Cysticercosis of the brain shown by magnetic resonance imaging. *Clinical radiology* 39: 542-546, 1988.

Jensen R.H., Bigbee W.L., Langlois R. Multiple endpoints for somatic mutations in humans provide complementary views for biodosimetry, genotoxicity and health risks. En: *Mutation and the environment part C: 81-92*. Wiley Liss, Inc. 1990.

Kenakin T.P. *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. Raven Press, Nueva York. Cap. 10, 1987.

Koufos A., Hanson M.F., Laapkin B.C., Workman M.L., Copland N.G., Jenkins N.A., & Cavenee W.K. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour. *Nature (London)* 309:170-172, 1984.

Kramers P.G.H., Centile J.M., Gryseels J.A.M., Jordan P., Katz N., Mott K.E., Mulvihill J.J., See J.L. & Froberg A. ICPFMC, Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. *Mutation Res.* 257:49-89, 1991.

Langlois R., Bigbee W., Jensen R. The glycoporin A assay for somatic cell mutations in humans. En: *Mutation and the environment, part C: 47-56*. Wiley Liss, Inc. 1990.

Letonja T., Hammerberg C., Schurig G. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*. *Parasitol. Res.* 73:265-270, 1987.

Manchester D., Nicklas J., O'Neill P., Lippert M., Grant S., Langlois R., Jensen R., Albertini R., Bigbee W. Sensitivity of somatic mutations in umbilical cord blood to maternal environments. En prensa.

Marriner S.E., Morris D.L., Dickson B., Bogan J.A. Pharmacokinetics of alendazole in man. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 30: 705-708, 1986.

McCarron M.A., Kutlaca A. & A.A. Morley. The HLA-A mutation assay: improved technique and normal results. *Muta. Res.* 225: 189-193, 1989.

McGinnis M., Falta M., Sullivan L., Albertini R. In vivo hprt mutant frequencies in T-cells of normal human newborns. *Mutation Res.* 240:117-126, 1990.

McLean N. *Genes and Gene Regulation*. Edward Arnold, London, 1989.

Montero R., Valencia D., Moreno F., Sandoval M. y Ostrosky-Wegman P. Point mutation and cytogenetic analysis on lymphocytes from neurocysticercotic patients treated with praziquantel. *Environ.Mol.Mutagen.* vol.14, suppl. 15: 132, 1989.

Montero R., Norppa H., Autio K., Lindholm C., Ostrosky-Wegman P. and Sorsa M. Determination of 6-thioguanine resistant lymphocytes in human blood by immunohistochemical antibromodeoxyuridine staining. Short communication. *Mutagenesis* 6(2):169-170, 1991.

Murphree A.L. y Benedict W.F. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*, 223: 1028-1033, 1984.

Natarajan A.T., Rohini C. Vyas, J. Wiegant & Curado M.P. A cytogenetic follow-up study of the victims of a radiation accident in Goiania (Brazil). *Mutation Res.* 247:103-111, 1991.

National Research Council. *Biologic Markers in Immunotoxicology*. National Academy Press, Washington D.C., 1992.

Nicklas J., O'Neill P., Sullivan L., Hunter T., Allegretta M., y cols. Molecular analysis of in vivo hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase mutations in human T-lymphocytes: II. Demonstration of a clonal amplification of hprt mutant T-lymphocytes in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 12:271-284, 1988.

Nieto D. Historical notes on cysticercosis. En: *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A., Willis K., Laclette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 1-7, 1982.

Orkin S.H., Goldman D.S., Sallan S.E. Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilms' tumor. *Nature (London)* 309:172-174, 1984.

Castle B. & Malone L. *Statistics in Research. Basic concepts and techniques for research workers*, 4th. ed. Iowa State University Press/Ames, 1988.

Ostrosky-Wegman P., Montero R., Cortinas de Nava C., Tice R.R. and Albertini R. The use of bromodeoxyuridine labeling in the human lymphocyte HGPRT somatic mutation assay. *Mutation Res.* 191:211-214, 1987.

Ostrosky-Wegman P., Montero R., Hernández N., Ruiz L., Gasque L., Herrera L.A., Ruiz M., Cortinas de Nava C. y R. Rodríguez. Lymphocyte proliferation kinetics as a cytostatic screening system. *Environ.Mol.Mutagen.* (abstr.) 11:80, 1988.

Ostrosky-Wegman P., Montero R., Palao A., Cortinas de Nava C., Hurtado F. & Albertini R.J. 6-thioguanine-resistant T-lymphocyte autoradiographic assay. Determination of variation frequencies in individuals suspected of radiation exposure. *Mutation Res.* 232:49-56, 1990.

Ostrosky P., Gonshebbat M.E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., Garcia Vargas G., Del Razo L.M. y Cebrián M. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 250:477-482, 1991.

- Ostrosky-Wegman P., Barba H., Santiago P., Lares I., Garcia R., Herrera L.A., Gensebatt M.E., Rojas E. and Montero R. Susceptibility to genetic effects of metronidazole on sheep peripheral lymphocytes, measured by BrdU HGPRT assay. *Environ.Mol.Mutagen.* vol.19, suppl.20: 48, 1992.
- Perry P. y Wolff S. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by SCE. *Nature (London)* 258: 121-125, 1974.
- Rabiela M.T., Rivas A., Flisser A. Morphological types of Taenia solium cysticerci. *Parasitol. today* 5:357-359, 1989.
- Rawlings D., D. Ferriero y R. Messing. Early CT reevaluation after empiric praziquantel therapy in neurocysticercosis. *Neurology* 39: 739-741, 1989.
- Robles C., Sedano A.M., Vargas N., Galindo S. Long term results of praziquantel therapy in neurocysticercosis. *J. Neurosurg.* 66: 359-363, 1987.
- Rodriguez Carbajal J. & Boleaga Durán B. Neuroradiology of human cysticercosis. En: *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* Flisser A., Willis K., Laclette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 139-162, 1982.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. *Immunology.* Gower Medical Publishing, N.York., 1989.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo H., Gensebatt M.E., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology? *Mutation Res.* 282:283-286, 1992.
- Schinke R.N. *Genetics and Cancer in Man.* Genetics in Medicine and Surgery Series, Churchill Livingstone, New York 1978.
- Sotelo J., Escobedo F., Rodriguez Carbajal J., Torres B., Rubio F. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N. England J. Med.* 310: 1001-1007, 1984.
- Sotelo J., Torres B., Rubio F., Escobedo F., Rodriguez J. Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology* 35: 752-755, 1985.
- Spiegel R.M. *Estadística serie de compendios Schaum.* McGraw-Hill, México, 1961.
- Strauss G. and R. Albertini. Enumeration of 6-thioguanine-resistant peripheral blood lymphocytes in man as a potential tool for somatic cell mutations arising in vivo. *Mutation Res.* 61 353-379, 1979.
- Sylwester D. & Albertini R.J. Confidence intervals and sample size calculations to compare variant frequencies. *Environ.Mutagen.* 7, supl.4:31-41, 1985.
- Tates A.D., Bernini L.F., Natarajan A.T., Ploem J.S., Verwoed N.P., Cole J., Green M.H.L., Arlett C.F. and P.M. Norris. Detection of somatic mutants in man: HPRT mutations in lymphocytes and hemoglobin mutations in erythrocytes. *Mutation Res.* 213:73-82, 1989.
- Téllez Girón E., Ramos M.C., Dufour L. y Montante M. Aplicación del método ELISA para el diagnóstico de la cisticercosis. *Bol. of Sanit. Panam.* 97(1): 8-13, 1984.
- Turner D.R., Morley A.A., Haliandros M., Kutlaca R. & Sanderson B. In vivo somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations. *Nature* 315:343-345, 1985.

Turner D.R., Scott A.G., M. Janatipour, Morley A. Mutations in human lymphocytes commonly involve gene duplication and resemble those seen in cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:3189-3192, 1988.

Weinstein B. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. Twenty seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Research 48:4135-4143, 1988.

WHO. Health hazards of the human environment. World Health Organization, Ginebra, reimpresión 1973.

WHO, IPCS. Environmental Health Criteria 46. Guidelines for the Study of Genetic Effects in Human Populations. Introduction, 1985.

Wilson M., Bryan R., Fried J., Ware D., Schantz P., Pilcher J. and Tsang V. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. Journal of Infectious Diseases 164: 1007-1009, 1991.

Wogan G.N. Detection of DNA damage in studies on cancer etiology and prevention. En: Bartsch H., Heminki K. and O'Neill I.K. (eds.) Methods for detecting DNA damaging agents in humans: applications in Cancer Epidemiology and Prevention. IARC Scientific Publications no. 89, Lyon 1988.

Yunis J.J. Chromosomal rearrangements, genes and fragile sites in cancer: clinical and biological implications. En: De Vita, Hellman & Rosenberg (eds.) Important advances in Oncology. Lippincott Co., Pennsylvania, pp. 93-128, 1986.

Zenteno Alanis G. Clasificación clinicoterápica de la cisticercosis humana. Tribuna médica, junio 19, 1984.

Zenteno-Alanis G.H. A classification of human cysticercosis. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A., Willes K., Lachette J.P., Larralde C., Ridaura C. & Beltrán F. (eds.). Academic Press, N.York, pp. 107-126, 1982.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**tablas, cuadros  
y  
figuras**

TABLA 1. FRECUENCIAS DE VARIACION EN INDIVIDUOS CON EXPOSICION A DIVERSOS AGENTES

EXPOSICION	NUMERO DE MUESTRAS	Vf MEDIA $\times 10^{-6} \pm D.E.$	INTERVALO $\times 10^{-6}$	REFERENCIA
Pacientes con cáncer:				
Pretratamiento	10	3.0 $\pm$ 1.7	0.0 a 6.1	Ammenheuser
Radioterapia	9	12.6 $\pm$ 8.7	2.5 a 23.8	y cols. 1991
Quimioterapia más radioterapia	35	24.0 $\pm$ *	0.0 a 135.0	Albertini 1985
Esclerosis múltiple(MS):				
Pretratamiento	6	4.1 $\pm$ 3.1	0.8 a 9.9	Ammenheuser
MS + ciclofosfamida	4	32.5 $\pm$ 13.9	11.6 a 40.3	y cols. 1988
Bajo hidroarsenicismo	7	2.5 $\pm$ 2.2	0.7 a 6.4	Ostrosky y
Alto hidroarsenicismo	7	5.0 $\pm$ 2.9	1.7 a 9.7	cols. 1991
Accidente por Cobalto-60	2	122.0 $\pm$ 5.9	18.6 a 126.2	Ostrosky y
				cols. 1990
Accidente por Cesio-137	4	194.0 $\pm$ 147.0	36.0 a 130.0	Natarajan y
				cols. 1991

\* La desviación no se pudo calcular a partir del artículo original.

**TABLA 2. FRECUENCIAS DE VARIACION DEL LOCUS HPRT EN INDIVIDUOS SANOS  
 EN DIVERSOS ESTUDIOS**

---

NUMERO DE MUESTRAS	VF MEDIA $\times 10^{-6} \pm$ D.E.	INTERVALO $\times 10^{-6}$	REFERENCIA
2	4.30 $\pm$ 1.69	3.1 a 5.5	Ostrosky y cols. 1987
8	1.92 $\pm$ 0.85	0.7 a 3.2	Ammenheuser y cols. 1988
18	7.12 $\pm$ 7.16	0.5 a 22.3	Ostrosky y cols. 1990
82	8.70 $\pm$ 6.10	1.0 a 28.9	Albertini y cols. 1990
5	6.35 $\pm$ 1.53	4.2 a 8.4	Natarajan y cols. 1991

---



1

1

TABLA 3. FRECUENCIAS DE VARIACION EN

INDIVIDUOS SANOS

---

DONADOR	EDAD	SEXO	Vf ( $\times 10^{-6}$ )
C1	34	F	0.52
C2	27	M	0.59
C3	30	M	0.65
C4	26	M	0.66
C5	29	F	0.72
C6	29	F	0.81
C7	36	F	0.85
C8	27	M	0.88
C9	42	F	1.00
C10	40	F	1.27
C11	35	M	1.47
C12	29	F	1.79
C13	24	F	4.60
C14	26	M	7.42
C15	30	M	10.49
C16	26	F	14.13
C17	32	M	25.00

---

TABLA 4. DATOS ESTADISTICOS DE LAS FRECUENCIAS DE VARIACION DE LOS GRUPOS ESTUDIADOS

	SANOS	NEUROLOGICOS	C I S T I C E R C O S I S	
	x10 <sup>-6</sup>	x10 <sup>-6</sup>	ANTES DE PZO x10 <sup>-6</sup>	DESPUES DE PZO x10 <sup>-6</sup>
MEDIA ± D.E.	4.3 ± 6.7	15.3 ± 11.7	14.1 ± 24.4 (10.1 ± 15.7)	17.5 ± 27.1 (9.8 ± 4.5)
MEDIANA	1.0	10.45	4.2 (3.9)	11.0 (10.9)
INTERVALO	0.5 a 25.0	2.2 a 35.3	1.5 a 101.1 1.5 a 68.1	3.0 a 102.5 3.0 a 16.6
N	17	15	23	12

Los valores entre paréntesis fueron obtenidos excluyendo el valor más alto, considerado "outlier".

TABLA 5. FRECUENCIAS DE VARIACION EN PACIENTES CON DAÑO NEUROLOGICO NO PARASITARIO, Y LOS AGENTES A LOS QUE ESTUVIERON EXPUESTOS

DONADOR	SEXO	EDAD	TAC	CIRUGIA	ANTICONVULS.	OTROS	Vf(X10 <sup>-6</sup> )*
GMV	F	28	ND	ND	ND	ND	2.20
MLPA	F	41	+	-	-	-	3.33
JLAM	M	22	ND	ND	ND	ND	3.50
ALA	M	41	+	+	+	DIAZEPAM	4.22
JG	M	22	+	+	-	-	8.52
AMH	M	36	ND	ND	ND	ND	8.30
MMM	F	61	+	+	+	DIAZEPAM	9.63
MAE	F	60	+	+	+	-	10.45
MMG	M	22	-	-	-	-	12.90
JHHG	M	49	+	-	-	DIAZEPAM	18.30
XGM	F	20	+	-	+	-	20.79
APS	F	ND	ND	ND	ND	ND	27.30
PRA	F	ND	ND	ND	ND	ND	31.50
DGG	M	42	-	-	-	-	33.60
MLVM	F	ND	ND	ND	ND	ND	35.30

\* El análisis cualitativo de estos datos no revela asociación entre algún agente o mezcla de agentes y la Vf. No obstante, los valores de Vf, individuales y en conjunto, son más elevados que en los individuos no expuestos.

ND no se tienen los datos de estos individuos.

**TABLA 6. CARACTERISTICAS Y EXPOSICION A POSIBLES AGENTES MUTAGENICOS DE LOS PACIENTES CON NEUROCISTICERCOSIS**

DONADOR	SEXO	EDAD	TAC	CIRUGIA	ANTICONVULS.	Vf ANTES PZO (X10-6)*	Vf DESPUES PZO (X10-6)
JSC	M	27	+	-	-	1.46	3.03
JGM	M	44	+	+	+	1.51	
AEB	ND					1.52	
CRE	F		+	+	-	1.81	
MZ	F	36	+	+	+	1.94	
SCM	F	37	+	+	+	2.06	
JM	M	35	+	+	+	2.08	
MME	F	45	+	+	+	2.17	
JMC	M	29	+	+	+	3.51	
NGA	M	61	+	+	-	3.54	
AGG	M	62	+	+	-	3.63	
ALS	F	71	+	+	+	4.17	
JRQ	M	54	+	-	-	5.31	
AOA	M	36	+	-	+	5.95	5.63
MOA	ND					6.66	
DFG	F	16	+	-	-	7.54	11.16
JSQ	M	35	+	+	+	8.19	4.38
MRP	M	20	+	-	+	9.05	
TRR	M	65	+	+	+	22.53	12.62
JGG	M	18	+	+	+	24.53	8.60
HFP	M	28	+	-	+	36.21	14.65
MTH	F	38	+	+	+	68.14	
HPG	M	32	+	-	-	101.01	102.52
PTD	F	56	+	+	+	NC	6.28
CLC	M	33	+	+	+	NC	10.88
CNC	M	35	+	+	+	NC	14.24
GGM	M	27	+	+	-	NC	16.58

\* Como en el caso de los pacientes con otro daño neurológico, aquí tampoco resalta una asociación entre algún agente o mezcla de agentes y la Vf encontrada. La dispersión de los valores es mayor que en esos individuos y en comparación con los testigos.

ND No se cuenta con los datos de estos individuos.

NC No fue posible obtener resultados de estas muestras.

TABLA 7. INDICES DE MARCAJE (Lic) DE CADA INDIVIDUO, POR GRUPOS\*

SANOS	PACIENTES NEUROLOGICOS	N E U R O C I S T I C E R C O S I S	
		ANTES DE PZO	DESPUES DE PZO
0.211	0.113	a 0.197	a 0.311
0.253	0.137	0.251	d 0.285
0.265	0.085	0.250	b 0.230
0.319	0.310	0.376	0.362
0.316	0.065	0.218	f 0.240
0.232	0.185	0.210	0.270
0.254	0.116	0.253	c 0.280
0.225	0.316	0.218	e 0.320
0.200	0.077	0.130	0.215
0.470	0.400	0.148	g 0.350
0.239	0.304	0.164	0.156
0.128	0.088	0.311	h 0.410
0.469	0.103	0.266	
0.366	0.054	b 0.210	
0.281	0.272	0.130	
0.193		c 0.250	
0.352		d 0.126	
		0.117	
		e 0.300	
		f 0.240	
		g 0.280	
		0.170	
		h 0.360	

\* Es interesante observar los valores de pacientes con neurocisticercosis de los que se tiene dato antes y después del tratamiento: después del tratamiento cada valor es mayor.

**TABLA 8. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS INDICES DE MARCAJE  
 EN LOS GRUPOS ESTUDIADOS.**

	SANOS	NEUROLOGICOS	N E U R O C I S T I C E R C O S I S	
			ANTES PZO	DESPUES PZO
MEDIA±D.E.	0.286±0.093	0.197±0.117	0.225±0.072	0.285±0.070
MEDIANA	0.254	0.116	0.218	0.282
INTERVALO	0.128 a 0.470	0.054 a 0.4	0.117 a 0.376	0.156 a 0.410
N	17	15	23	12

# CUADRO 1. ANALISIS ESTADISTICO DE V<sub>f</sub> ENTRE GRUPOS, POR LA PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS

	SANOS	NEUROLOGICOS	ANTES PZQ
NEUROLOGICOS	diferentes		
ANTES PZQ	diferentes	diferentes	
DESPUES PZQ	diferentes	iguales	diferentes (iguales)

Las diferencias son significativas a un nivel del 5%

El resultado entre paréntesis se refiere a las pruebas estadísticas aplicadas excluyendo al "outlier"

## CUADRO 2. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS INDICES DE MARCAJE POR GRUPOS, POR LA PRUEBA DE t

	SANOS	NEUROLOGICOS	ANTES PZQ
NEUROLOGICOS	diferentes		
ANTES PZQ	diferentes	iguales	
DESPUES PZQ	iguales	diferentes	diferentes

Las diferencias son significativas a un nivel del 5%



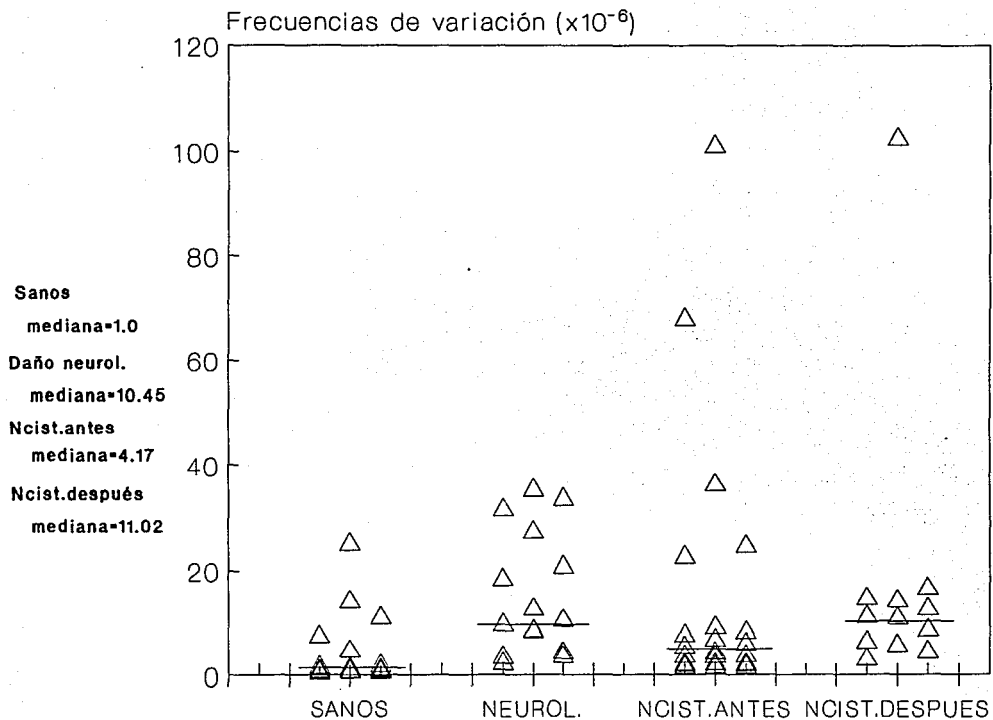


## CUADRO 4.

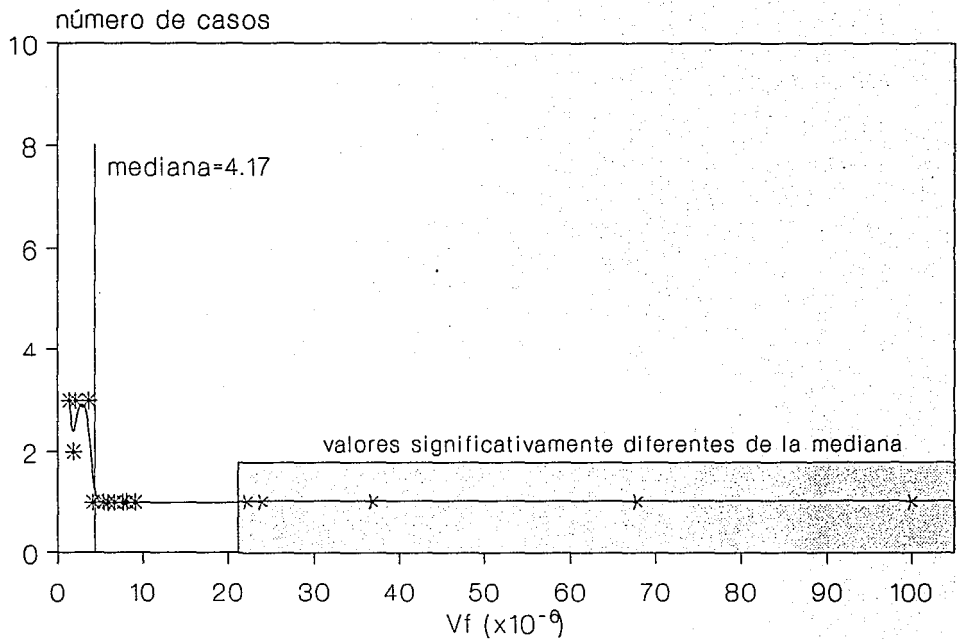
### RELACIONES ENTRE V<sub>f</sub> DE INDIVIDUOS SANOS E INDIVIDUOS EXPUESTOS

TESTIGOS		EXPUESTOS		TESTIGOS		EXPUESTOS			
52		1.48	8.52	52		1.48	8.52		
59		1.51	8.80	59		1.51	8.80		
.86		1.52	9.05	86		1.52	9.05		
.88		1.81	9.83	88		1.81	9.83		
.72	<b>59%</b>	1.94	10.45	72	<b>47%</b>	1.94	10.45		
.91			2.08	10.88		81		2.08	10.88
.86			2.08	11.18		86		2.08	11.18
.88			2.17	12.82		88		2.17	12.82
1.00			2.20	12.90		1.00		2.20	12.90
1.27			3.03	14.24		1.27		3.03	14.24
1.47			3.33	14.85		1.47		3.33	14.85
1.79			3.50	18.68		1.79		3.50	18.68
4.80			3.51	18.30		4.80		3.51	18.30
7.42			3.54	20.79		7.42		3.54	20.79
10.49		3.83	22.53	10.49		3.83	22.53		
14.13		4.17	24.53	14.13		4.17	24.53		
25.00		4.22	27.30	25.00		4.22	27.30		
		4.38	31.50			4.38	31.50		
		5.31	33.80			5.31	33.80		
		5.83	35.30			5.83	35.30		
		5.95	38.21			5.95	38.21		
		6.28	101.01			6.28	101.01		
		6.88	102.52			6.88	102.52		
		7.54				7.54			
		8.19				8.19			
		8.30				8.30			

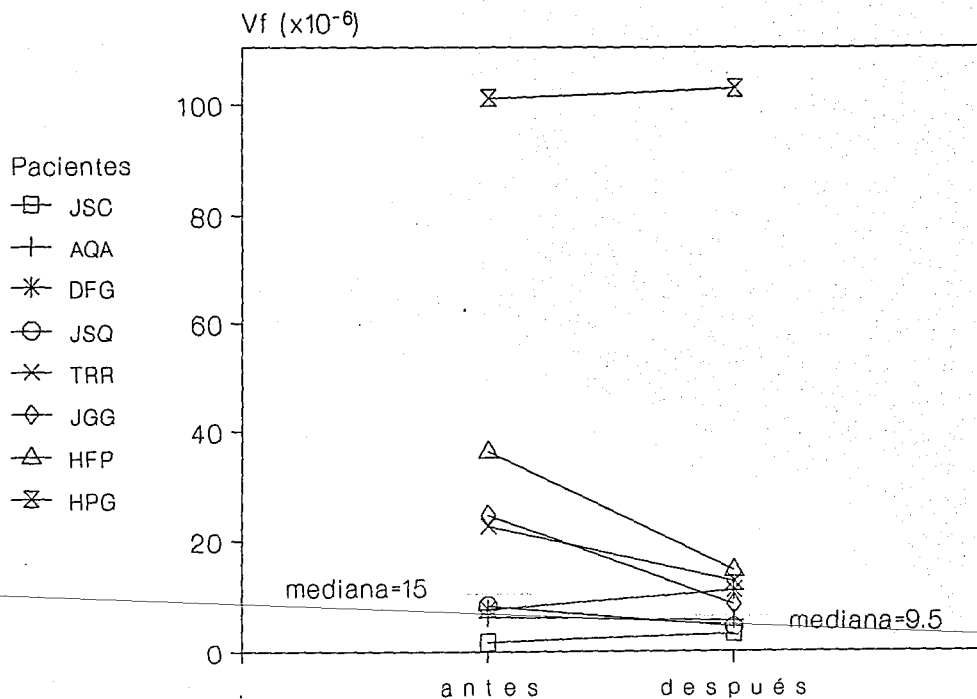
a
b



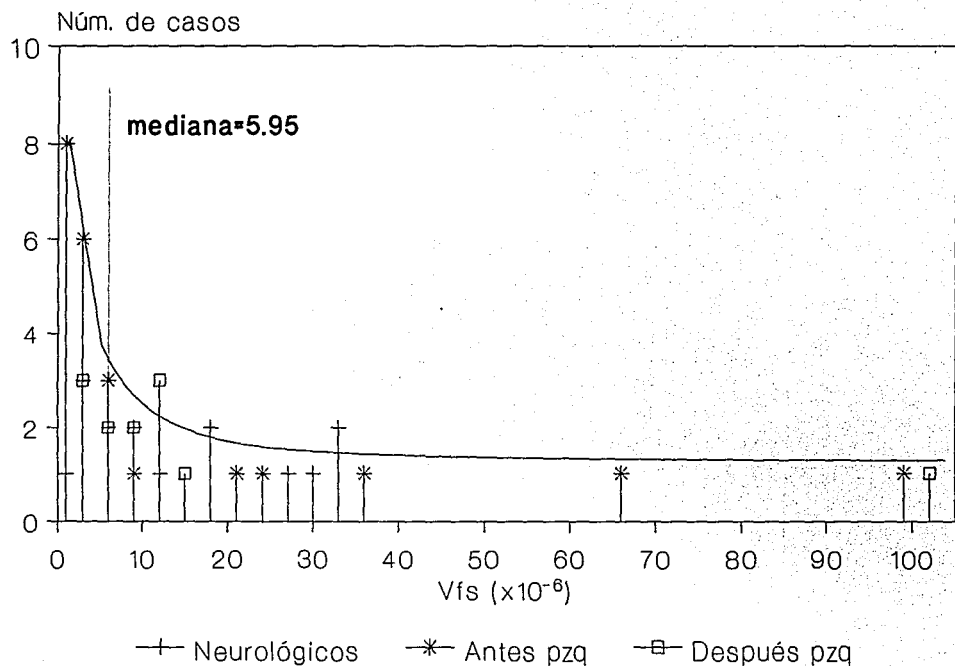
**Fig.1.** Frecuencias de variación en todos los grupos y medianas



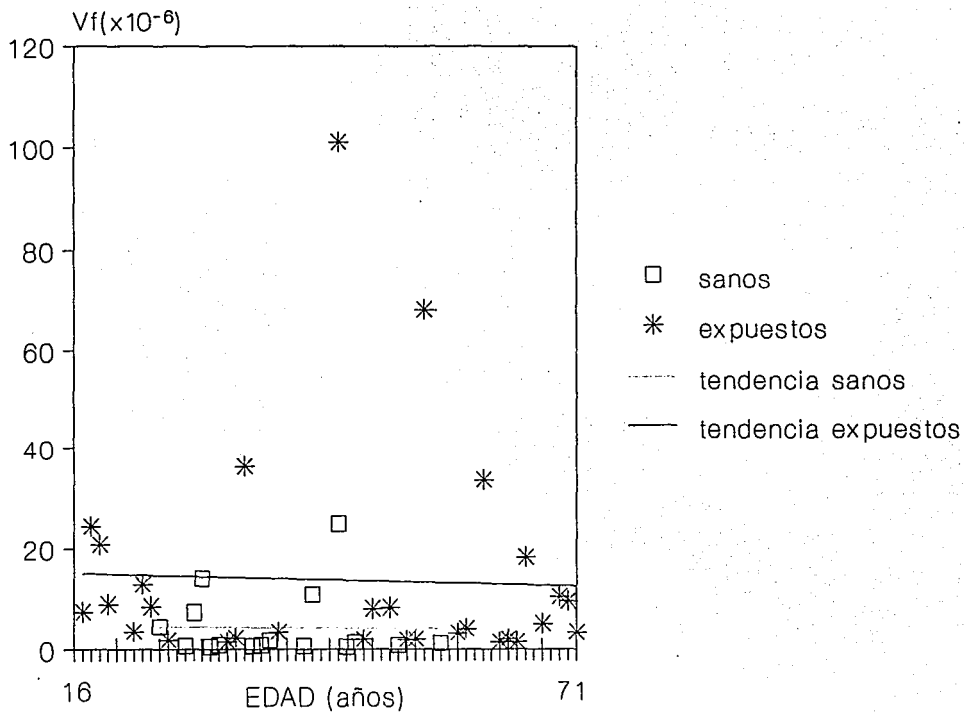
**Fig.2.** Frecuencias de variación en pacientes con neurocisticercosis antes de tratamiento con praziquantel



**Fig.3** Frecuencias de variación en ocho pacientes con dato antes y después de tratamiento con pzq

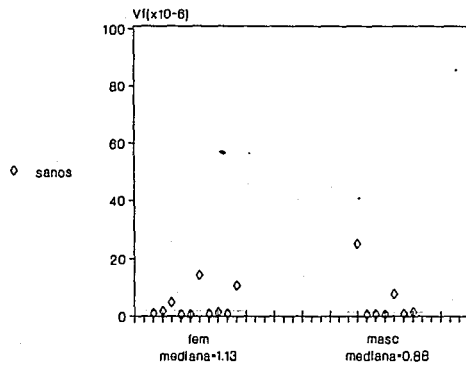


**Fig.4.** Distribución de las Vf de todos los individuos expuestos (Distribución de Poisson)

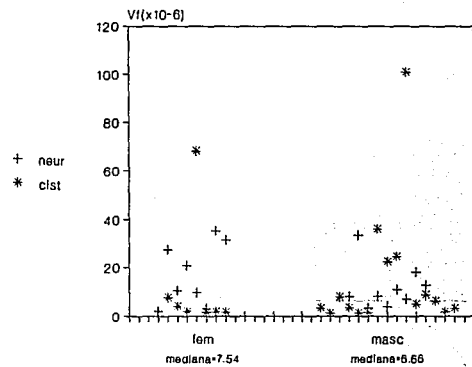


**Fig.5.** Efecto de la edad en la frecuencia de variación

**DISTRIBUCION DE Vf EN INDIVIDUOS SANOS, POR SEXO**



**DISTRIBUCION DE Vf EN INDIVIDUOS EXPUESTOS, POR SEXOS**



**Fig.6.** Influencia del sexo sobre la frecuencia de variación



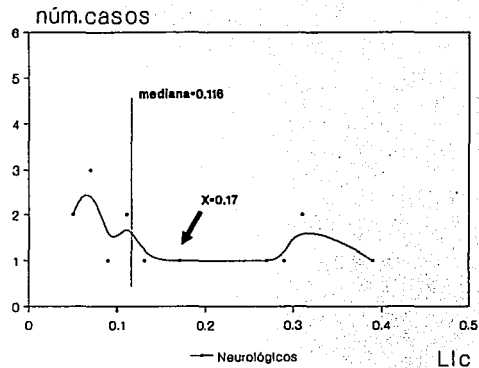
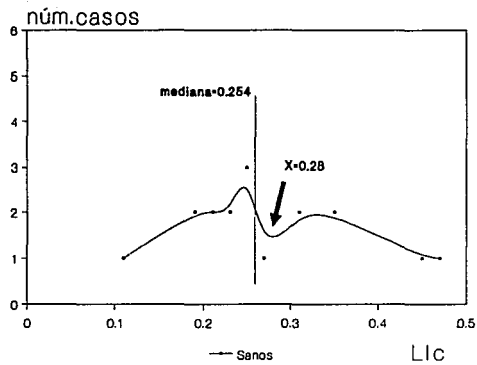
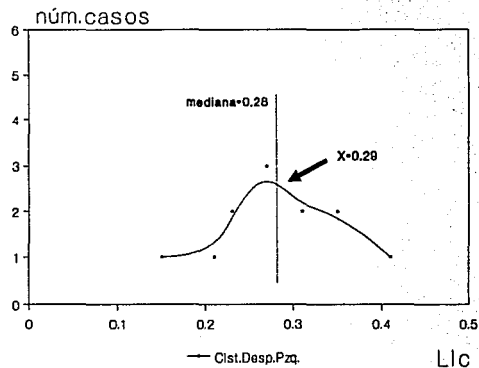
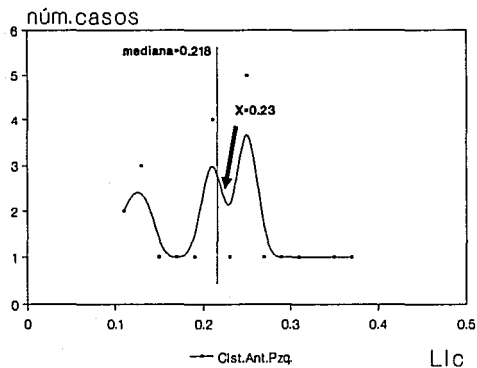
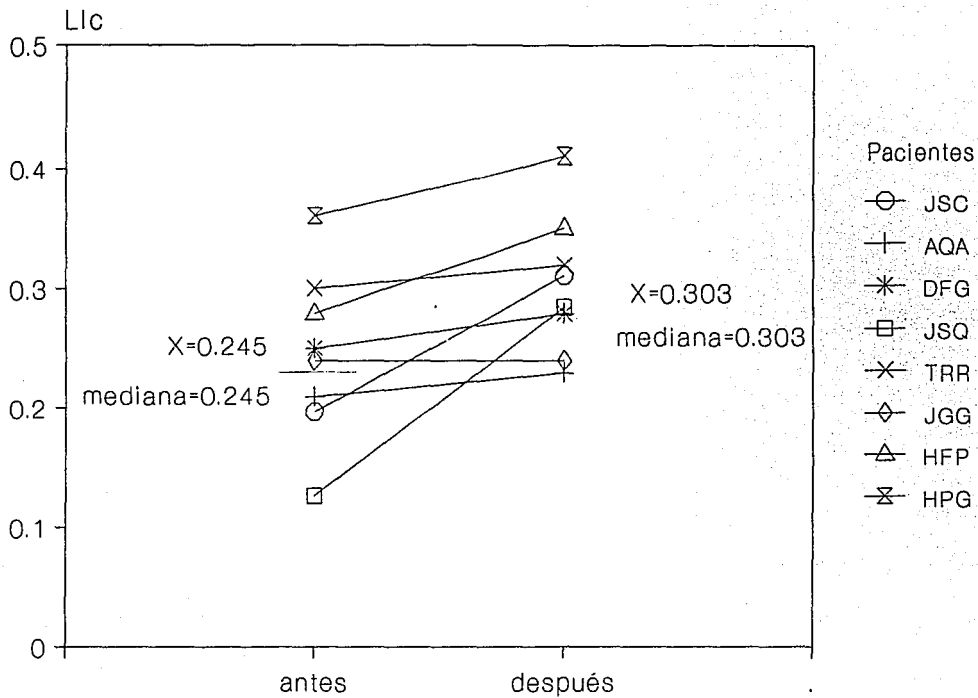
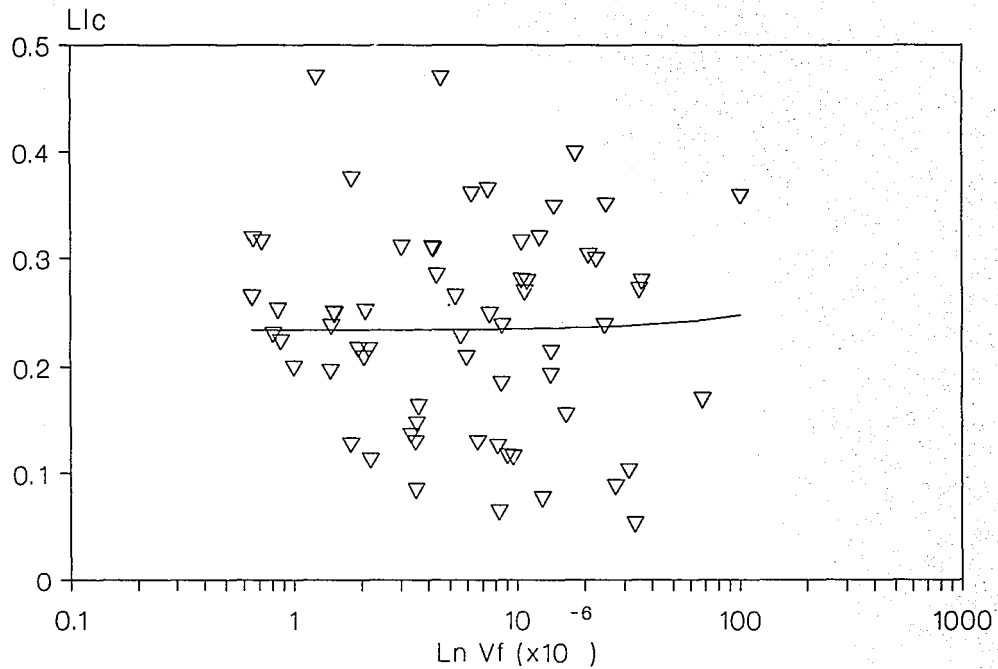


Fig.7. Comparación por grupos, de los índices de marcaje



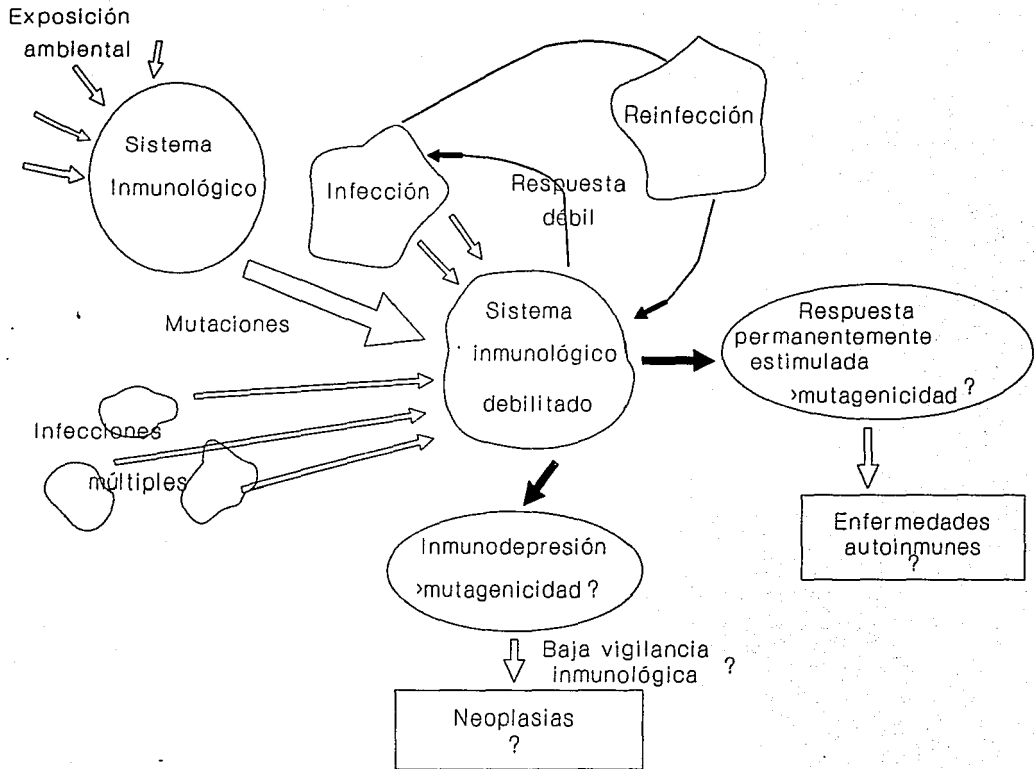


**Fig.8.** Indices de marcaje en 8 pacientes antes y después del tratamiento con p2q



$\nabla$   $V_f/Llc$  — Correlación lineal

**Fig.9.** Correlación de  $V_f$  y  $Llc$



**Fig.10.** Posible efecto de las mutaciones sobre el sistema inmunológico