

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. Generalidades

El campo de la Toxicología aborda los efectos de los agentes químicos y físicos sobre sistemas vivos, con el propósito de definir los efectos sobre la salud, para lo cual se apoya especialmente en datos y metodología de varias ciencias básicas, tales como la fisiología, farmacología, genética, embriología, química y bioestadística.

Desde hace 30 años, la Toxicología ha proporcionado la fuente primaria de datos acerca de los efectos sobre la salud de productos químicos existentes o nuevos. Sin esta información, muchos compuestos químicos potencialmente peligrosos solo podrían haberse identificado mediante la exposición humana. De hecho esto ha ocurrido con algunos agentes, como el accidente con el metilisocianato en Bhopal, India en 1984, y el uso de armas químicas.

La Toxicología Genética identifica y analiza la acción de agentes potencialmente tóxicos hacia los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Algunos tóxicos dañan al complejo genético a concentraciones que también producen citotoxicidad aguda no específica y muerte; el objetivo principal de la Toxicología Genética, sin

embargo, es el de detectar y analizar el daño potencial de aquéllos agentes que interaccionan directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que producen alteraciones en elementos genéticos a concentraciones subtóxicas modificando las características hereditarias o inactivando al DNA, agentes a los que se les denomina **genotóxicos**.

El surgimiento de esta disciplina se remonta a 1927 cuando se demostró que la radiación aumentaba la frecuencia de mutaciones espontáneas (Müller, 1927); veinte años después se demostró el mismo hallazgo con agentes químicos utilizando especies no mamíferas. Cattanaach (1966) sugirió por primera vez que algunas enfermedades hereditarias podrían tener un origen ambiental.

Con el descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) en los años 50 por Watson y Crick se abrieron nuevos horizontes para el estudio de la mutagénesis. En 1969 la Toxicología Genética fue reconocida como disciplina al fundarse la Sociedad de Mutagénesis Ambiental bajo el liderazgo del Dr. Alexander Hollaender en Estados Unidos. El concepto de carcinógenos mutagénicos fue revitalizado seguido de la introducción de la activación de procarcinógenos empleando la mediación de hospederos o de los sistemas de activación mediante microsomas *in vitro*.

Así, la Toxicología Genética ha desempeñado un papel dual en la evolución de programas de seguridad. Su primera función es la de implementar pruebas y métodos de asesoramiento de riesgo para definir el impacto de agentes genotóxicos que se encuentran en el ambiente y cuya presencia pudiera alterar la integridad de la reserva génica humana. La segunda función es la de aplicar las metodologías genéticas para la detección de agentes químicos carcinogénicos.

Los cambios en la composición de los pares de bases de un codón de un gen pueden dar como resultado un producto génico que no funcionará. Esto puede eventualmente expresarse como muerte celular o muerte del organismo, o en una forma alterada de la célula u organismo. Estos cambios son llamados **mutaciones**. Tanto la duplicación como la reparación del DNA no son perfectas, de manera que ocurren alteraciones espontáneas las cuales conforman la frecuencia basal de mutaciones. Los cambios espontáneos en el DNA ocurren a nivel nucleótido y cromosómico. Algunas mutaciones pueden ser neutrales o aún benéficas, sin embargo, la mayoría de las mutaciones son dañinas para las células y normalmente se pierden con rapidez de la población celular, bajo presiones de selección ambientales apropiadas. Algunas células mutantes sobreviven, y en caso de ser células somáticas se pueden duplicar y formar clonas que eventualmente pueden originar tumores; si son células germinales, éstas pueden ocasionar abortos o el nacimiento de un producto con malformaciones.

El daño al DNA se agrupa en dos amplias categorías: los efectos visibles detectables mediante el análisis citológico de los cromosomas (macrolesiones) y los cambios no visibles, los cuales ocurren a nivel de nucleótido y se denominan microlesiones (Brusick, 1987) (Figura 1).

Para detectar agentes genotóxicos, la *Environmental Protection Agency* y otras agencias recomiendan que se usen varias pruebas *in vitro* e *in vivo* como la prueba de dominantes letales, el análisis citogenético, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), mutaciones génicas y micronúcleos, y se evalúe el compuesto de manera simultánea en cada una de ellas las cuales tienen su propio margen de detección. Las categorías para cada ensayo se clasifican como: alteraciones en la secuencia de bases y en la integridad del DNA,

inducción de rearrreglos o intercambios en el DNA, alteraciones en la segregación y en la integridad de los cromosomas (Brusick, 1987).

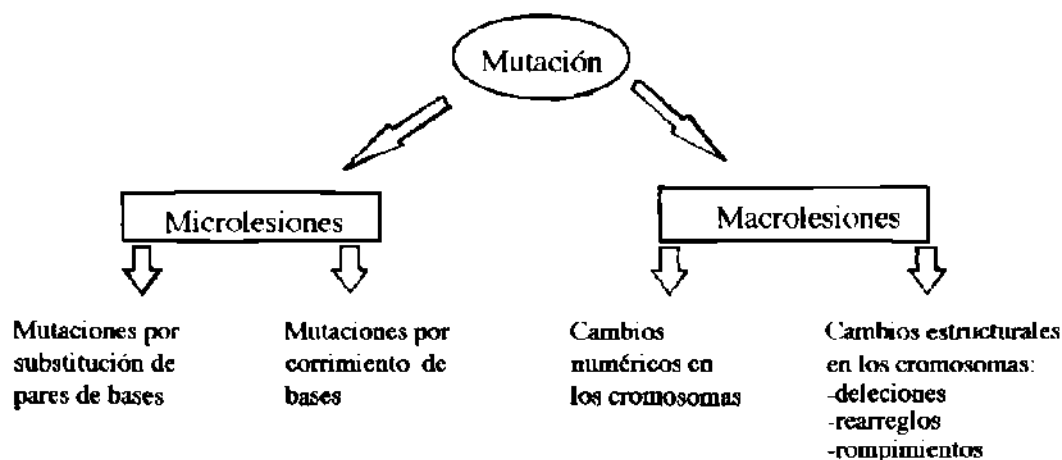


Figura 1. Clasificación de los cambios moleculares en el DNA que aparecen como resultado de la mutación. (Brusick, 1987).

1.2. Carcinogénesis química

La producción experimental de cáncer con sustancias químicas data de 1915, cuando los investigadores japoneses provocaron cáncer de piel por medio de alquitrán de hulla en conejos. Desde entonces, la lista de carcinógenos orgánicos e inorgánicos ha crecido en forma exponencial.

Aun así, por muchos años existió una paradoja: varios compuestos de potencia carcinogénica conocida eran relativamente inertes en cuanto a su reactividad química. La solución de este enigma se puso en evidencia a comienzos de 1960, cuando se comprobó que la

mayoría de los carcinógenos químicos requerían activación metabólica para que pudieran reaccionar con los constituyentes celulares.

De acuerdo con estas observaciones y teniendo en cuenta la íntima relación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, una década después se desarrolló una prueba *in vitro* para identificar sustancias cancerígenas, la prueba de Ames, llamada así por el bacteriólogo genetista que la desarrolló (Rubin y Farber, 1990).

Los carcinógenos se clasifican en dos amplias categorías: los de acción directa y los de acción indirecta; estos últimos requieren activación metabólica. Los carcinógenos de acción directa, de los cuales hay unos cuantos, son compuestos electrofílicos reactivos (seleccionan y reaccionan con centros cargados negativamente de otras moléculas). La activación metabólica de los carcinógenos se lleva a cabo por enzimas que están presentes en el organismo. Los mamíferos poseen estas enzimas en sus tejidos, especialmente en el hígado y forman parte del sistema de detoxificación.

La activación se inicia con una serie de oxidaciones catalizadas por un grupo de proteínas llamadas citocromo P-450. Estas enzimas, las cuales están unidas a la membrana del retículo endoplásmico, pueden oxidar compuestos altamente no reactivos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La oxidación de estas sustancias produce un epóxido, un grupo electrofílico muy reactivo, el cual se hidroliza lentamente por la epóxido hidratasa. Una vez adentro de la célula, los grupos electrofílicos pueden reaccionar con centros con carga negativa como las proteínas, el ácido ribonucleico (RNA) y principalmente con el DNA, produciendo mutaciones (Darnell y cols. 1990).

1.3. Productos Naturales en el Tratamiento del Cáncer

Desde la antigüedad, la farmacopea del México indígena fincaba la mayor parte de su experiencia en la herbolaria. Se han escrito varios tratados sobre las hierbas medicinales empleadas por los indios del siglo XVI, en donde se mencionan varias plantas y arbustos cuyas hojas se usaban para detener los "crecimientos anormales".

Bhakuni en 1972, realizó investigaciones para encontrar principios activos vegetales con actividad antitumoral, y obtuvo resultados positivos con 14 extractos, entre los que figuran los de *Cassia obtusa*, que inhibieron significativamente la leucemia linfocítica P-388 en ratones; y el de *Digitalis purpurea* var. *alba* que posee glucósidos que mostraron citotoxicidad tumoral en ratones (Bhakuni, 1974).

Actualmente entre las plantas empleadas como antitumorales está la mandrágora (*Podophyllum peltatum*), de la cual se extrajo la podofilotoxina, utilizada por los indios del Perú como remedio popular por sus efectos eméticos, catárticos y antihelmínticos. Los derivados del *Podophyllum* son el etopósido y tenipósido, glucósidos semisintéticos que actúan principalmente en las fases S y G₂ del ciclo celular. A diferencia de la podofilotoxina, no detienen las células en mitosis, sino que forman un complejo ternario con una topoisomerasa II y el DNA (Goodman y Gilman, 1996).

Uno de los descubrimientos más importantes ha sido el de los alcaloides de *Catharanthus roseus* o *Vinca rosea*. En tanto Noble y cols. en 1958 estudiaban las afirmaciones de que los extractos de la vinca tenían efectos benéficos en la diabetes mellitus, observaron

granulocitopenia y depresión de la médula ósea en ratas, datos que los condujeron a purificar un alcaloide activo. Investigaciones ulteriores de Johnson y cols. (1963) demostraron la actividad de algunas fracciones alcaloides contra una neoplasia linfocítica aguda en ratones. Los efectos de la vinblastina y vincristina son específicos de cada fase del ciclo celular, bloquean a las células que están en mitosis; son capaces de ligarse específicamente a la tubulina y bloquear la facultad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos (Goodman y Gilman, 1996).

La actinomicina A fue el primer antibiótico cristalino aislado del medio de cultivo de una especie de *Streptomyces* (Waksman y Woodruff, 1940). Más tarde se obtuvieron muchos antibióticos similares, incluida la actinomicina D (dactinomicina). La dactinomicina posee beneficios en el tratamiento de diversos tumores, en particular algunas neoplasias de niños, y el coriocarcinoma. La capacidad de las actinomicinas para ligarse con el DNA de doble hélice es el punto de partida de su actividad biológica y su citotoxicidad (Sobell, 1973)

Los antibióticos antraciclínicos, daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina y sus derivados, se cuentan entre los agentes antitumorales más importantes. Son producidos por el hongo *Streptococcus peucetius* var. *caestus*. La idarrubicina es un derivado sintético. La utilidad clínica de estos agentes queda limitada por la rara aparición de cardiomiopatía.

En la búsqueda de sustancias con gran actividad antitumoral pero poca toxicidad en corazón, se han preparado y estudiado cientos de derivados antraciclínicos y compuestos similares. Varios de ellos han sido promisorios en estudios clínicos, como la idarrubicina, epirrubicina y el compuesto sintético mitoxantrona, que es una

aminoantracenediona (Arlin y cols., 1990; Feldman y cols., 1993). Estos compuestos se intercalan en el DNA y por consiguiente inhiben la síntesis de DNA y RNA. Se producen roturas en filamentos solos o dobles, como ocurre en el intercambio de cromátidas hijas. Por tanto, las antraciclina son mutagénicas y carcinogénicas. Se cree que el rompimiento del DNA es mediado por la acción de la topoisomerasa II o por la generación de radicales libres (Tewey y cols., 1984).

Las bleomicinas fueron descubiertas como producto de la fermentación de *Streptomyces verticillus* (Umezawa, 1973). El medicamento utilizado en seres humanos es una mezcla de dos péptidos quelantes de cobre, bleomicinas A₂ y B₂. Su acción citotóxica es consecuencia de su facultad de fragmentar el DNA. Los estudios *in vitro* indican que causan acumulación de células en la fase G₂ del ciclo, y muchas de éstas muestran aberraciones cromosómicas que incluyen rompimientos cromatídicos, brechas y fragmentos, así como translocaciones (Twentyman, 1983).

Las mitomicinas fueron descubiertas por Hata en 1956 y su estructura química fue dilucidada hasta el año de 1962. Estas sustancias presentan un grupo uretano, una quinona y un anillo azididina, el cual es esencial para que presente la actividad antineoplásica (Kersten, 1975). En 1958, Wakaki y cols. aislaron a la Mitomicina C, la más activa de todas, de *Streptomyces caesptosus*. Este antibiótico sufre reducción química o enzimática en el interior de la célula y se vuelve un agente de alquilación bifuncional o trifuncional (Verweij y cols., 1988). Este compuesto inhibe la síntesis de DNA. Se ha reportado como mutagénica para bacterias (Szybalsky, 1964), como agente clastogénico, teratógeno y carcinógeno en roedores (Cohen y Shaw, 1964; Nowell, 1964; Crooke y Bradner, 1976).

En 1992 se aprobó el uso del taxol (Paclitaxel) para el tratamiento del cáncer ovárico refractario a cisplatino. Este compuesto se aisló originalmente de la corteza del fresno (*Taxus brevifolia*) en 1971. El mecanismo de acción del taxol es el de estimular la formación de microtúbulos, los estabiliza e impide su despolimerización con la subsecuente interrupción del ciclo celular en mitosis (Schiff y Horwitz., 1979).

Las nuevas generaciones de estructuras diversas del taxol, han sido descubiertas a partir de los metabolitos secundarios de especies del coral *Eleutherobia*., La eleuterobina y la sarcodictina A son compuestos que promueven la formación y estabilización de microtúbulos y así inhiben la división celular. Actualmente están probándose en ensayos clínicos en humanos (Holmes, 1997).

CAPITULO 2

DERIVADOS ANTRAQUINONICOS Y ANTRACENONICOS

2.1. Generalidades

Las antraquinonas (AQ's) forman un grupo de compuestos químicos funcionalmente diversos usados en el campo industrial y médico. Las AQ's naturales así como las sintéticas son utilizadas como colorantes en la industria de los alimentos, medicamentos, cosméticos, tintes para el cabello y de textiles. El departamento de la Defensa de E.U. utiliza estos agentes en cortinas de humo en el campo de batalla. En el área clínica, las AQ's son utilizadas como preparaciones purgantes y como agente antimicrobial y antitumoral (Traganos, 1983; Sendelbach, 1989). Las hidroxiantraquinonas (HAQ's) son los principios activos de muchos fármacos fitoterapéuticos, entre ellos, los laxantes derivados de plantas como aloe, senna, frángula y rheum. Adicionalmente, algunos extractos de plantas son usados para el tratamiento de cálculos en el riñón y vejiga (*Rubia tinctorum*) y como sedante moderado (*Hypericum*) (Westendorf 1990).

Los derivados antraquinónicos y antracenónicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Varias familias de dicotiledóneas son ricas en derivados antracenónicos, tales como

Hypericaceae (*Hypericum*), Polygonaceae (*Rheum, Rumex, Polygonum*), Rhamnaceae (*Rhamnus*) y Rubiaceae (*Rubia, Morinda, Gallium*). En las monocotiledóneas, solo la familia Liliaceae (*Aloe*) contiene esta clase de compuestos. Cerca del 90% de éstos compuestos aparecen como derivados del compuesto 9,10-antracenediona con algunos grupos funcionales hidroxilo, como los grupos metilo, hidroximetilo y carboxilo (Westendorf y cols., 1990).

2.1.1. Nomenclatura y estructura química

La figura 2 ilustra la nomenclatura y las estructuras químicas de los derivados antraquinónicos. El nombre "Antraquinona" fue propuesto inicialmente por Graebe y Lieberman en 1868, quienes demostraron la misma relación estructural del antraceno y la AQ en la cual el grupo benceno es sustituido por una benzoquinona (Phillips M. citado en Sendelbach, 1989). Las posiciones 1, 4, 5 y 8 son referidas frecuentemente como α ; las posiciones 2, 3, 6 y 7 son referidas como β . Las AQ's naturales son compuestos glucuronizados en la molécula de glucosa por un enlace α -glucosídico mientras que las AQ's sintéticas, como la alizarina y la lucidina, no contienen glucosa unida.

2.1.2. Metabolismo

Las AQ's naturales generalmente están presentes en las plantas como glucósidos (glucósido antraquinónico), después de la administración oral, el glucósido antraquinónico pasa por la parte superior del tracto gastrointestinal sin modificación química.

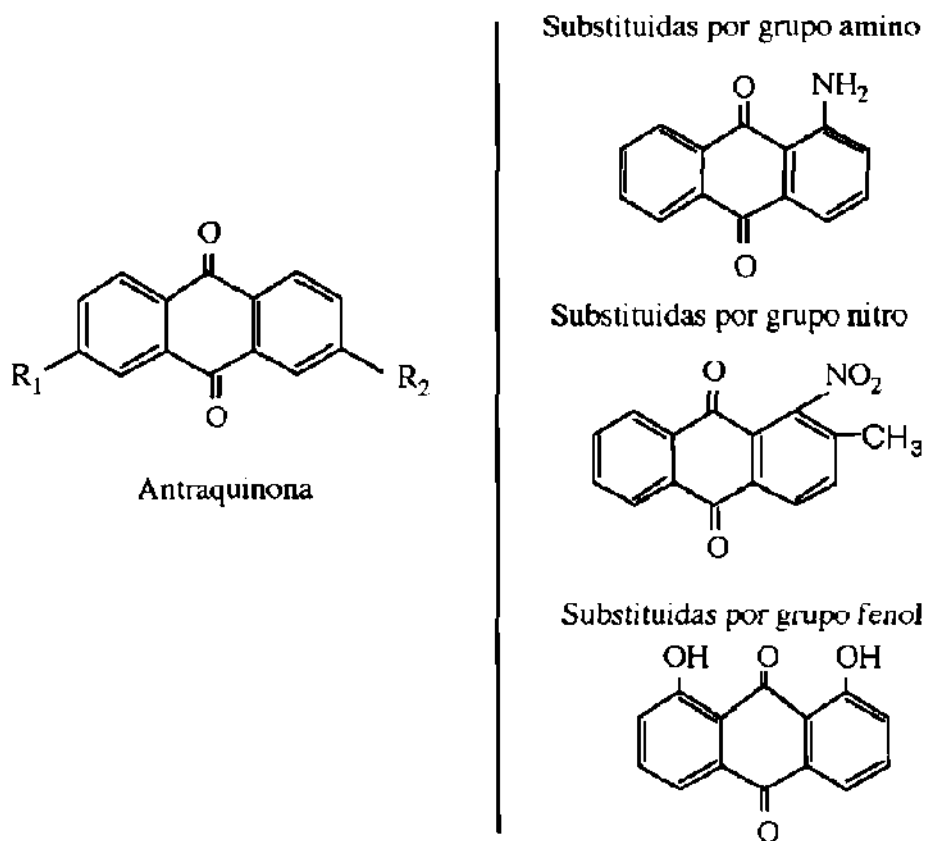


Figura 2. Diferentes estructuras químicas de los derivados antraquinónicos (Sendelbach, 1989).

La porción del azúcar le confiere características hidrofílicas al glucósido antraquinónico lo que le impide ser absorbido por las células epiteliales del intestino (Figura 3). El enlace α -glucosídico no es hidrolizado por el ácido del estómago o por las α -glucosidasas del intestino delgado. Por lo tanto, el metabolismo de los glucósidos antraquinónicos toma lugar en el colon en donde el enlace α -glucosídico se hidroliza por la flora intestinal liberando a la glucosa y dejando la AQ libre (aglicona antraquinónica).

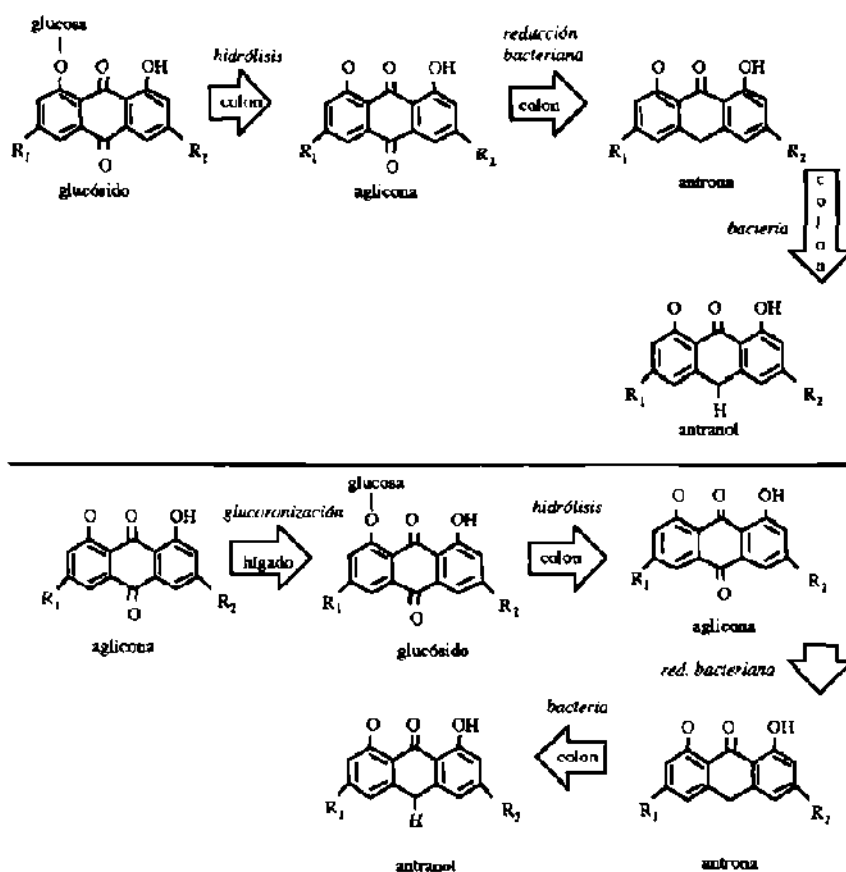


Figura 3. Diagrama esquemático del metabolismo de los glucósidos y agliconas antraquinónicas. (Sendelbach, 1989).

Una vez separada, el metabolismo de la aglicona antraquinónica no es claro. Se ha demostrado la reducción bacteriana de las agliconas lo que ha llevado a pensar que la actividad catártica puede no ser por la AQ sino por las antronas o antranoles formados. Por lo que a los glucósidos antraquinónicos se les ha considerado como pro-fármacos, en los que el grupo azúcar tiene una función de transportador.

En contraste con los glucósidos antraquinónicos, las AQ's libres (aglicona antraquinónica) siguen un destino metabólico diferente

después de la administración oral. La lipofilidad de las agliconas antraquinónicas facilita la absorción a través del intestino delgado, donde son transportadas al hígado y glucuronizadas. Los compuestos glucuronizados son excretados parcialmente en la orina y retornan al intestino a través de la bilis.

Así como la ruta del glucósido antraquinónico, la AQ glucuronizada que es soluble en agua, es transportada hacia el colon donde las enzimas bacterianas de la flora separan a la AQ libre (Brown, 1980 y Brugeman 1984). Por lo que la habilidad de las AQ's libres para ser absorbidas a través del intestino delgado parece determinar el potencial tóxico de estos compuestos, en contraste con los glucósidos antraquinónicos los cuales pasan libremente a la recirculación enterohepática (Sendelbach 1989).

2.2. Mutagenicidad

Los compuestos antracénicos se han reconocido como tóxicos y se sospecha que los derivados antraquinónicos también lo sean debido a su similitud estructural. Swanbeck (1966) reportó la interacción entre el DNA y algunos derivados antracénicos y antraquinónicos. En su trabajo señaló que los compuestos con grupos hidroxilo en las posiciones 1 y 8 y con un oxígeno o un grupo hidroxilo en la posición 9, formaron complejos con el DNA, detectados por espectroscopía en el rango visible.

Estudios realizados por Brown en 1980 demostraron el comportamiento mutagénico *in vitro* de ciertas AQ's y compuestos

relacionados en sistemas procarionticos. Brown y Dietrich (1979) reportaron que numerosos derivados antracénicos son mutagénicos en la prueba de *Salmonella typhimurium* con activación metabólica, con una particular sensibilidad a la cepa TA1537. En la misma prueba, Liberman y cols. (1982), reportaron que los derivados antraquinónicos probados fueron mutagénicos para la cepa TA1537 y ninguno de los compuestos antacenónicos exhibieron actividad mutagénica.

Con base en sus experimentos, Tikkanen y Matsushima (1983), sugirieron que las HAQ's que tienen de uno a tres grupos hidroxilo son mutagénicas, mientras que los compuestos con más de tres grupos hidroxilo carecen de esta actividad.

Krivobok y cols. (1992) estudiaron la mutagenicidad de las HAQ's y metil-antraquinonas, así como los compuestos diméricos skirina, rugulosina y rugulina en varias cepas de *S. typhimurium*, y sus resultados sobre las relaciones actividad mutagénica-estructura sugieren que el grupo 6-metilo juega un papel importante en dicha actividad después de la activación metabólica.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la emodina (1,6,8-trihidroxi-3-metil-antraquinona), hidroxiantraquinona presente en plantas de la familia Polygonaceae y Rhamnaceae, de las cuales algunas especies son comestibles para el hombre en algunos países y utilizadas como laxantes (Figura 4). Estos estudios reportan que la emodina se metaboliza por el citocromo P-450 a 2-hidroxi-emodina, mutágeno de acción directa. Además, la emodina es producida por algunas especies de hongos de *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Masuda y Ueno, 1984; Masuda y cols., 1985; Tanaka y cols., 1987). En las cepas TA90, TA97, TA102, TA1537 y TA2637 de *S. typhimurium* la emodina fue mutagénica después de su activación metabólica (Brown, 1976, 1980;

Bruggeman y van der Hoeven, 1984), y requiere de la transformación microsomal para producir su metabolito activo, la 2-hidroxiemodina (Masuda y cols., 1984; Masuda y cols., 1985). Se demostró que no tenía interacción covalente con el DNA de *Salmonella*, ni en hígado de rata (Bösch y cols., 1987). Sin embargo, anteriormente se había demostrado por medición espectroscópica que la emodina y el ditranol, 1,8,9-trihidroxiantraceno, forman complejos con el DNA (Swanbeck, 1966).

La emodina ha mostrado resultados negativos en el ensayo de mutagenicidad con la prueba del locus *hprt* (hipoxantina-fosforribosil-transferasa) en células de cobayo V79, así como también para inducir ICH (Bruggeman y van der Hoeven, 1984). Sin embargo, se demostró que este compuesto fué mutagénico en células de carcinoma mamario de ratón y la 1,4-hidroxiantraquinona mostró una débil inducción de ICH en células V79 (Bruggeman y van der Hoeven, 1984). Finalmente, no indujo reparación no programada (UDS) en hepatocitos primarios de rata (Westendorf y cols., 1990)

La luteoskirina, una hidroxiantraquinona dimérica tumorigénica y hepatotóxica, producida por el género *Penicillium* spp, mostró un efecto citostático a bajas concentraciones sobre las células tumorales de ascitis de Ehrlich en cultivo (Figura 4). Además encontraron los autores un incremento en la frecuencia de células multinucleadas. En células resistentes a la luteoskirina aisladas como una sublínea, se observaron aberraciones cromosómicas y cromosomas de mayor longitud (Schachtschabel y cols., 1969). Por otro lado, Akuzawa y cols.(1992) demostraron que la luteoskirina incrementó el nivel de residuos 8-hidroxidesoxiguanina en el DNA de células de hepatoma H4-II-E, y favoreció la degradación de la desoxirribosa en productos reactivos del ácido tiobarbitúrico en presencia de ácido ascórbico, ensayos que evalúan la generación de radicales oxígeno.

2.3. Carcinogenicidad

El dantron, 1,8-dihidroxi-antraquinona, actúa como promotor tumoral en fibroblastos de ratón C3H y estimula la síntesis de DNA en hepatocitos de rata de cultivo primario, y sugieren que las hidroxiantraquinonas con grupos hidroxilo en posiciones 1,8 pueden tener actividad promotora (Wölflé y cols., 1990). La lucidina, 1,3-dihidroxi-2-hidroximetil-antraquinona, fue capaz de formar aductos en el DNA en hepatocitos primarios de rata con activación metabólica *in vitro*, por lo que los autores sugieren que los efectos genotóxicos de este compuesto observados en pruebas *in vitro* son el resultado de una interacción covalente con el DNA celular, indicando una potencial actividad carcinogénica de estos compuestos (Poginsky y cols., 1991).

2.4. Actividad Citostática

Algunas aminoantraquinonas y dihidroxiantraquinonas substituidas han mostrado actividad citostática *in vivo*. Inhiben el crecimiento de células que se dividen rápidamente por lo que se asume que la hidroxilación en el sistema de anillos incrementa la potencia de estos compuestos (Traganos, 1983). Varias hidroxiantraquinonas estimularon, en diferentes grados, la producción de la anión superóxido a través del mecanismo de reducción de un electrón catalizado por la NADPH-citocromo- P450 reductasa (Mian y cols., 1991). Compuestos llamados flegmacinas y anhidroflegmacinas obtenidas de *Cassia torosa* (Figura 4) semejantes estructuralmente a la T-514 de *Karwinskia humboldtiana*, han sido patentados como agentes antineoplásicos (Takahashi y cols., 1977).

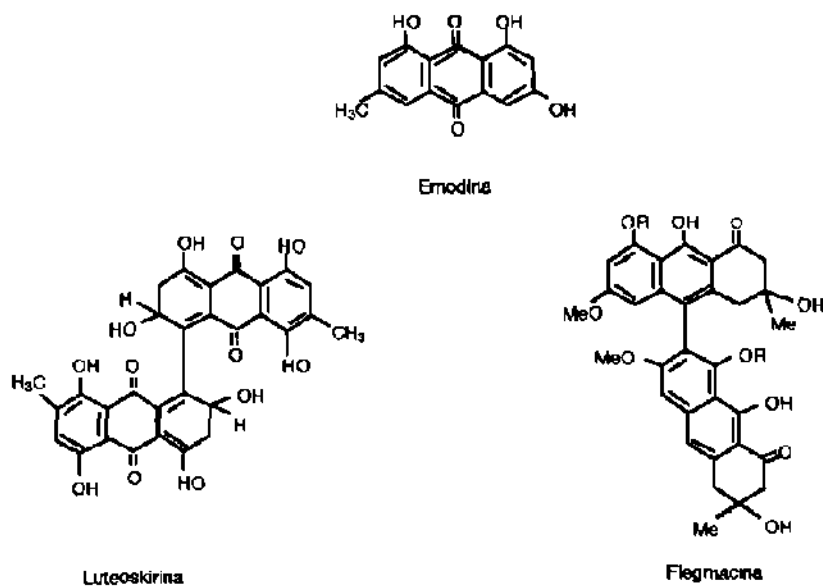


Figura 4. Estructuras químicas de algunos compuestos antracenónicos y antraquinónicos.

2.5. *Karwinskia humboldtiana*

La familia Rhamnaceae agrupa al género *Karwinskia* conocido en nuestro país como tullidora, coyotillo, capulincillo o cacatsi. Esta planta se encuentra en hábitats semi desérticos y crece ampliamente en México, suroeste de Estados Unidos y algunas localidades de América Central. Durante los meses de Febrero a Noviembre, el arbusto produce drupas oscuras las cuales son dulces, debido a la presencia de glucosa en el mesocarpo. El principio tóxico se ha encontrado en las semillas del fruto del cual se han identificado y aislado cuatro antracenas diméricas denominadas por su peso molecular como T-496, T-514, T-516 y T-544 (Dreyer y cols, 1975).

Cuando accidentalmente se ingieren los frutos se produce una intoxicación caracterizada por una parálisis similar al síndrome de Guillian-Barre. El cuadro clínico se desarrolla a los 15 días aproximadamente después de la ingestión, con una neuropatía progresiva, con una parálisis ascendente, la cual puede terminar en muerte por paro respiratorio; si los pacientes sobreviven, la recuperación es lenta, pero completa (Escobar y Nieto, 1965; Dewan y cols., 1965).

Desde 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se inició una línea de investigación con el fin de estudiar las propiedades químicas y biológicas de esta planta. Se inició con el aislamiento de los productos biológicamente activos del fruto de *K. humboldtiana* (Guerrero y cols., 1987), posteriormente se realizaron estudios sobre la intoxicación aguda experimental en animales, con fruto maduro o con las toxinas purificadas. Los resultados revelaron que la T-544 causaba el daño neurológico y la T-514 (Figura 5) era capaz de afectar el pulmón y el hígado (Bermúdez y cols., 1986); además la ingestión del fruto maduro (0.70% de T-544 y 0.29% de T-514) producía lesiones en hígado y pulmones, las cuales causaban la muerte de los animales (Bermúdez y cols. 1992).

Esta toxicidad se ha correlacionado con los hallazgos en cultivos primarios de hígado y piel de rata, en los cuales se observó que los hepatocitos mostraron mayor sensibilidad a ambas toxinas T-514 y T-544 que los queratinocitos, siendo la T-514 más hepatotóxica *in vitro* que la T-544 (Garza Ocañas y cols., 1992).

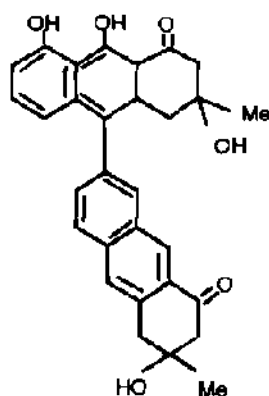


Figura 5. Estructura química de la T-514.

El efecto *in vitro* de la toxina T-514 se analizó en líneas celulares benignas y neoplásicas de hígado, pulmón y colon, de origen humano, y se comparó con medicamentos anti-neoplásicos conocidos; la toxina mostró toxicidad selectiva hacia las células tumorales, de manera similar al 5-Fluoruracilo, la Epidoxorrubicina y la Mitomicina-C; por lo que con base en estos resultados, se propuso que la T-514 podría tener actividad anti-neoplásica (Piñeyro y cols., 1994).

En 1993, la T-514 fue aceptada en el Programa de Desarrollo de Medicamentos del Instituto Nacional del Cáncer en E.U. Inicialmente fue incluida en las pruebas de selección *in vitro* en líneas celulares y recientemente mostró actividad antitumoral *in vivo* en el modelo "Hollow Fiber", el cual consiste en introducir fibras delgadas que contienen células tumorales en ratones, estos son tratados posteriormente con la T-514, y se extraen las fibras para que crezcan en cultivo y se determina su viabilidad. Posteriormente se evaluó en el programa de tumores *in vivo* ("xenografts"), el cual consiste en implantar células tumorales en ratones inmunodeficientes, se administró la T-514 (4, 6 y 9 mg/kg) vía intraperitoneal y se monitoreó el peso del animal y su mortalidad en un tiempo definido. Actualmente se está reevaluando en

los modelos de tumor de colon y de sistema nervioso central en los cuales mostró moderada actividad antitumoral.

Estudios bioquímicos y de ultraestructura han señalado que la toxina T-514 produce a dosis subletales (0.5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) , un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levadura *in vivo*. (Sepúlveda y cols., 1992). Por lo que recientemente se le ha denominado "peroxisomicina A₁" (Moreno-Sepúlveda y cols. (1995). Los mismos autores reportaron el efecto inhibitorio de la T-514 y otras antracenonas relacionadas sobre la actividad de la catalasa hepática *in vitro*, enzima de origen exclusivamente peroxisomal. En contraste con este reporte, se demostró que la T-514 no inhibe la actividad de la catalasa tisular por lo que concluyeron que la catalasa *in situ* e *in vivo* pudiera estar protegida por algún factor desconocido contra el efecto inhibitorio de la peroxisomicina A₁ (Moreno-Sepúlveda y cols. 1997). También se observó un incremento en la actividad específica de la NADPH-citocromo-P-450 reductasa en hígados de ratas tratadas con una dosis aguda de T-514, resultados que indican que la T-514 puede actuar como un inductor enzimático microsomal (Guerrero-Olazarán y Viader-Salvadó, 1996).

Se han aislado tres antracenonas diméricas de otras especies del género *Karwinskia*: la T-516, el isómero de la T-514 (peroxisomicina A₃), el isómero de posición de la toxina 514 (peroxisomicina B₃) (Rivas y cols., 1990) y el diasteroisómero denominado peroxisomicina A2 obtenido de *K. parvifolia* (Waksman y Ramírez, 1992).

Martínez y cols. (1997) estudiaron el daño producido por el diasteroisómero de la T-514 en ratones CD1 y observaron un grado menor de daño en hígado y pulmones, en comparación con las extensas lesiones observadas con la T-514.

CAPITULO 3

EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

3.1 Generalidades

La sangre es uno de los tejidos más accesibles del humano y el crecimiento potencial es excelente después de la estimulación por un mitógeno. También es uno de los más fáciles de estudiar debido a que las células tienen un ciclo celular bien caracterizado. La sangre contiene diferentes tipos celulares. Las células blancas (leucocitos) son células nucleadas, de manera que poseen DNA y si se inducen a dividirse, proporcionan figuras mitóticas. Los tipos de células blancas presentes en la sangre periférica son: granulocitos, monocitos y linfocitos; existen subtipos de linfocitos. Estos tipos diferentes no pueden identificarse morfológicamente, pero con el uso de marcadores de superficie se pueden reconocer.

Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células, los linfocitos B en la inmunidad humoral y las células NK tienen actividad citotóxica. Existen varios subtipos de linfocitos T como los T ayudadores, los T supresores y los T citotóxicos. En un adulto normal, alrededor del 70 % de los linfocitos circulantes ($1.5-4 \times 10^9$ por litro) son células T, el resto son linfocitos B (Gosden y cols., 1992).

La proliferación linfocitaria inducida por los antígenos tiene lugar normalmente fuera de la sangre y del conducto torácico, y puede visualizarse *in vitro* al cultivar células linfoides junto con antígenos específicos. Las lectinas mitógenas (proteínas que se unen formando enlaces cruzados en los residuos hidrocarbonados específicos de la superficie celular) estimulan policlonalmente a las células linfoides. Estas lectinas mitógenas (mitógenos) se derivan de varias plantas y bacterias. Su empleo *in vitro* ha demostrado que la activación de las células T y B da lugar a la producción de citocinas, como interleucinas, así como a la expresión de receptores para citocinas; ello conduce a las células hacia el ciclo celular (proliferación) y, finalmente, hacia la función efectora (maduración).

La activación linfocitaria, ya sea por antígenos o mitógenos, da lugar a modificaciones intracelulares y al desarrollo ulterior en el sentido de un linfoblasto. Se cree que la estimulación por mitógenos de los linfocitos *in vitro* imita la serie de hechos que tienen lugar *in vivo* tras su estimulación por los antígenos específicos.

Las células T y B se activan por mitógenos diferentes. Así, la fitohemaglutinina (PHA) y la concavalina A (Con-A) estimulan a las células T humanas y murinas. Los lipopolisacáridos (LPS) estimulan las células B murinas. El mitógeno de fitolaca americana estimula tanto las células T como las B humanas (Roitt y cols., 1991).

El cultivo de linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizado como sistema de prueba para evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas y radiaciones (Obe y cols., 1975; Ostrosky-Wegman y cols., 1988), además se pueden evaluar los efectos de las sustancias sobre la proliferación celular (Gebhart, 1981; Ostrosky-Wegman y cols., 1991). En el cultivo de linfocitos se ha demostrado la presencia de

subpoblaciones y se ha determinado el tiempo del ciclo celular el cual puede variar en función de las condiciones de cultivo (Mutchnick y cols.,1980; Consebatt y Mutchnick.,1990), la edad de los donadores (Schneider y cols.,1982), el estado de salud (Ortiz y Betancourt,1990) y cuando se agregan ciertos agentes químicos (Morimoto y Wolff,1980).

3.2. El Ciclo Celular

El proceso de la formación de nuevas células depende del paso de cada una de ellas a través de tres procesos: crecimiento, duplicación del DNA y división celular, los cuales integran lo que comúnmente se define como ciclo celular. Las fases del ciclo celular fueron propuestas originalmente por Howard y Pelc en 1953, estos autores consideraron que un ciclo comienza cuando una célula termina la mitosis y finaliza con la siguiente división; así al tiempo entre la división celular y el comienzo de la síntesis del DNA se le llamó G_1 (del inglés gap). Al período de duplicación del DNA se le llamó fase S (de síntesis), al lapso comprendido entre la síntesis y la mitosis subsecuente se le denominó G_2 y por último al periodo de división celular fase M.

G_1 , S y G_2 son estadios de continuo crecimiento celular y comprenden la interfase. La fase G_0 existe como una parte del ciclo de vida de las células eucarióticas, en el cual ellas permanecen en un estado de "inactividad" con relación a la fase S (Figura 6). En las células de mamíferos, el control del crecimiento celular se ejerce principalmente en la fase G_1 . Son críticos los factores que modulan la salida de G_0 y la progresión hacia G_1 para determinar la velocidad del crecimiento en general. Los puntos de restricción son pausas en el ciclo celular durante los cuales se revisa la fidelidad de la duplicación del DNA y la precisión

de la segregación de los cromosomas. Las pausas en los puntos de restricción permiten corregir y reparar la información genética con el fin de que cada célula hija reciba un complemento completo de información genética idéntica de la célula madre (Murakami y cols., 1995).

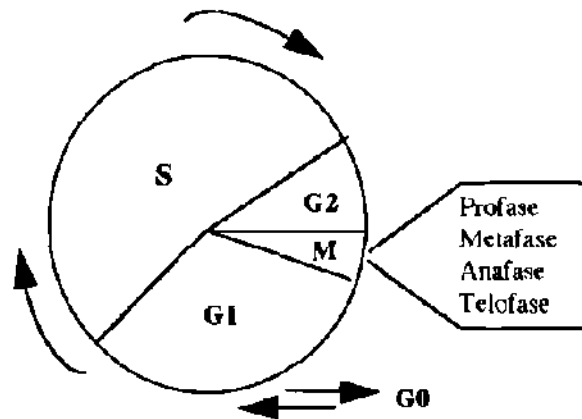


Figura 6. Diagrama del ciclo celular que muestra las proporciones ocupadas para cada fase. (Dean y Danford, 1984).

Se han descrito varias clases de ciclinas en G_1 y sus cinasas dependientes de ciclinas (*cdks*), las cuales son consideradas integradores de las señales que median a los factores de crecimiento del ciclo celular. Los factores de crecimiento actúan en la fase G_1 del ciclo celular al unirse a receptores específicos de la superficie de la célula, los cuales inician la cascada de señales que finalmente gobiernan la transcripción de genes de respuesta temprana inmediata y retardada.

Las decisiones de las células para entrar a la fase de síntesis del DNA (S) o para detenerse en G_1 y diferenciarse son determinadas muy probablemente por genes los cuales retrasan temporalmente su inducción y que dependen de factores de crecimiento. En la fase G_1 tardía, las señales que son inducidas por los factores de crecimiento, deben converger en el reloj del ciclo celular, una máquina compuesta de

ciclinas, cdk's, sus cinasas reguladoras y fosfatasas, con lo cual se asegura el compromiso de las células para entrar a la fase S. Una vez que se ha tomado la decisión para replicar el DNA cromosómico, sin embargo, las células se vuelven refractarias a las señales que inducen los factores de crecimiento y en cambio, dependen del funcionamiento intrínseco del reloj del ciclo celular para regular la progresión hacia la mitosis o fase M (Sherr, 1993).

Los cromosomas son descondensados durante G_1 , S y G_2 y posteriormente emplezan a condensarse durante la profase. Solo durante la metafase se vuelven visibles como cuerpos discretos. Bajo condiciones favorables, el tiempo del ciclo celular es casi constante. Sin embargo, la presencia de agentes tóxicos pueden prolongar importantemente G_1 o provocar que las células entren a G_0 temporalmente y por lo tanto, extender la duración del ciclo celular (Dean y Danford, 1984).

3.3. Aberraciones Cromosómicas

Las Aberraciones Cromosómicas (AC) inducidas por agentes químicos o físicos pueden estudiarse en cualquier población celular en ciclo o, si no está en ciclo, que pueda ser estimulada por un agente mitogénico. Para estudios de AC en humanos sólo se dispone de dos tipos de células a las que se puede tener acceso de una manera práctica. Estas son las células de médula ósea, las cuales son una población en ciclo; y los linfocitos de sangre periférica, los cuales normalmente no se están dividiendo pero cuya división puede ser estimulada *in vitro* cultivándolos con un mitógeno como la PHA.

Desde la observación de Moorhead de que los linfocitos podían estimularse con un mitógeno como la PHA y poder observarlos en metafase (Moorhead y cols., 1960) se ha obtenido una gran cantidad de datos sobre la inducción de alteraciones por radiaciones y agentes químicos utilizando este sistema (Preston y cols., 1981).

El daño al DNA inducido por agentes químicos en linfocitos no ciclantes no se convertirá en aberraciones hasta que las células sean estimuladas para entrar en ciclo y empezar la duplicación del DNA. Dado que el daño al DNA puede ser reparado en las células en la fase G_0 , así como en G_1 , la frecuencia de aberraciones no será necesariamente proporcional a la cantidad del daño inducido al DNA sino más bien a la cantidad de daño que se mantiene en el momento de la duplicación (WHO, 1985). Además el grado de reparación del DNA está influenciado por la fase del ciclo celular durante el tiempo de exposición al agente químico (Parshad y col., 1982), ya que el daño puede ocurrir en cualquier fase y dependerá de que se repare o no, el que permanezca.

3.4. Intercambios de Cromátidas Hermanas

Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) ocurren durante la duplicación semiconservadora del material genético cuyo proceso probablemente involucre rompimientos, recombinación y reunión de DNA, aunque las bases moleculares no se han dilucidado en forma precisa (Carrano y cols., 1978). En el laboratorio los ICH se pueden observar en cualquier célula que haya completado dos ciclos duplicativos en presencia de un marcador análogo de algún nucleótido.

Estos fueron observados por primera vez utilizando timidina tritlada (Taylor y cols., 1957)

Los estudios realizados por numerosos grupos mostraron que varios clastógenos fuertes eran capaces de inducir un incremento en la frecuencia de ICH, por lo que esta técnica se empezó a utilizar en la detección de mutágenos tanto *in vivo* como *in vitro*. El Síndrome de Bloom, entidad autosómica recesiva, con predisposición al cáncer y con fragilidad cromosómica, presenta una frecuencia de intercambios de 15 a 20 veces mayor que la considerada normal, lo cual constituye un nexo particular entre las mutaciones génicas, el fenómeno de transformación neoplásica y el comportamiento cromosómico (Salamanca, 1990).

Perry y Wolf (1974) mejoraron esta metodología con el uso de bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo no radiactivo de la timina. El mecanismo de formación más aceptado hasta el momento está explicado en la hipótesis propuesta por Painter (1980). Este modelo se basa en la posibilidad de que los rompimientos de la doble hebra de DNA ocurran frecuentemente en las conexiones de zonas de duplicación o replicones adyacentes durante la duplicación. Este principio se apoya en la evidencia de que ciertas enzimas, las topoisomerasas, en células de mamíferos, inducen y reúnen los rompimientos. Ocasionalmente, en lugar de una reunión normal, el rompimiento es sellado por la reunión de hebras hijas de una molécula duplicada a la molécula no duplicada.

En la Figura 7A se muestra la duplicación normal del DNA. Primero ocurre la separación de las hebras de la doble hélice con la síntesis de nuevo DNA a lo largo de cada hebra paterna. Después se forma una superhélice de la doble hélice conforme se alarga la horquilla de replicación.

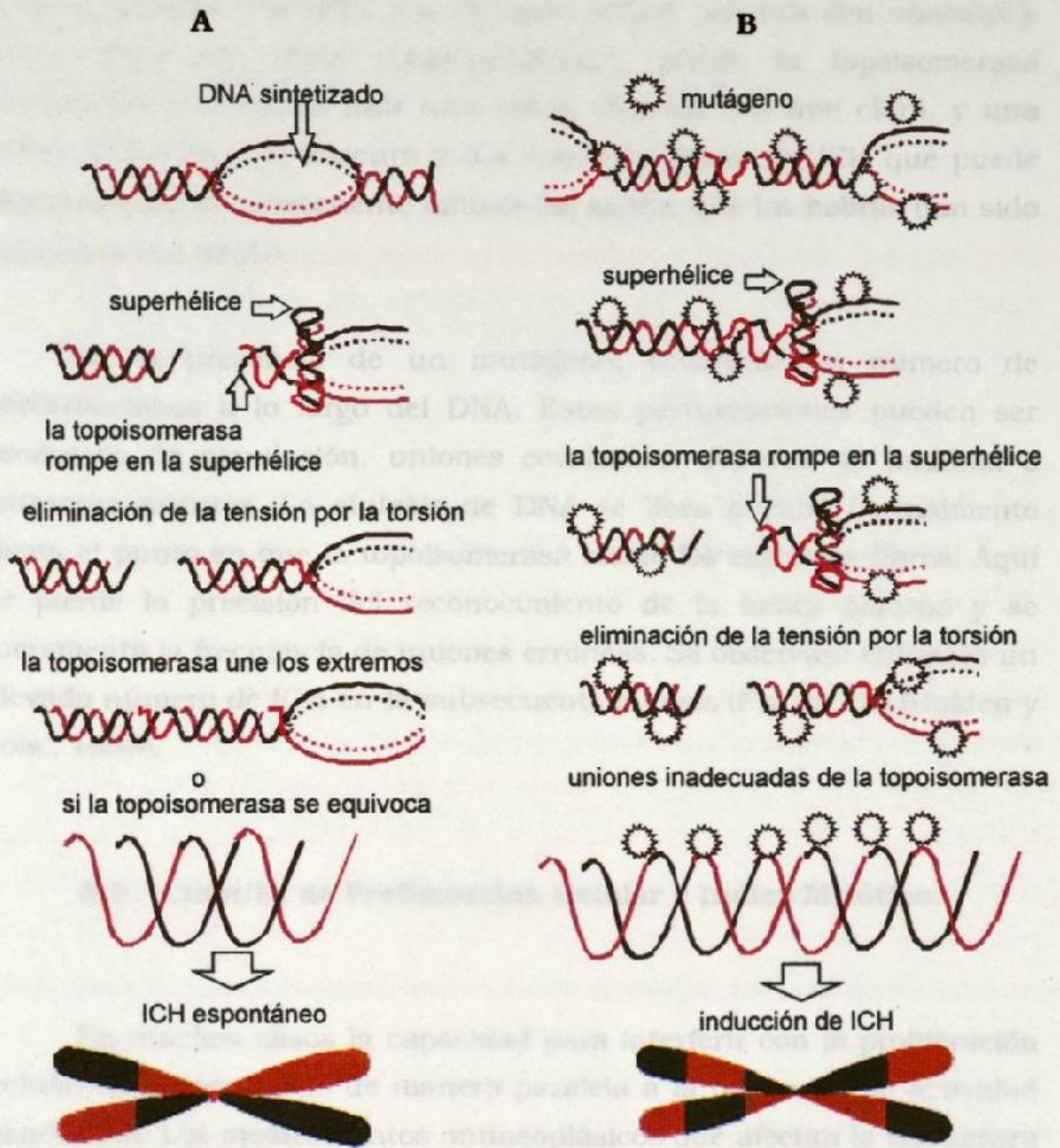


Figura 7. Representación esquemática de un modelo para el mecanismo de ICH espontáneo (A) e inducido por mutágenos (B). (Holden y cols., 1989)

La topoisomerasa rompe la doble hélice en la superhélice, y permite que las hebras se desenrollen y se elimine la tensión por la

torsión. La segunda función de la topoisomerasa es la de reunir las dos hebras paternas del DNA, por ejemplo, hebra oscura con oscura y hebra clara con clara. Ocasionalmente, puede la topoisomerasa equivocarse y entonces unir una hebra oscura con una clara, y una hebra clara con una oscura y dar como resultado un ICH que puede observarse en la subsecuente mitosis (se asume que las hebras han sido marcadas con BrdU).

En la presencia de un mutágeno, ocurrirán un número de perturbaciones a lo largo del DNA. Estas perturbaciones pueden ser productos de alquilación, uniones covalentes, dímeros de timidina o entrecruzamientos. La síntesis de DNA se lleva a cabo normalmente hasta el punto en que la topoisomerasa reúne los extremos libres. Aquí se pierde la precisión del reconocimiento de la hebra paterna y se incrementa la frecuencia de uniones erróneas. Se observará entonces un elevado número de ICH en la subsecuente mitosis (Figura 7B) (Holden y cols., 1989).

3.5. Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico.

En muchos casos la capacidad para interferir con la proliferación celular se ha estudiado de manera paralela a la búsqueda de actividad genotóxica. Los medicamentos antineoplásicos que afectan la estructura del DNA, también son capaces de retrasar la Cinética de Proliferación Celular (CPC).

Se han reportado inhibiciones que aumentan con la dosis en cultivos de linfocitos tratados con una amplia variedad de sustancias, en particular, los medicamentos antineoplásicos. Para producir este

efecto, no tienen necesariamente que interactuar con el DNA, sino que también pueden afectar proteínas asociadas con la regulación del ciclo celular, o bien, con el aparato mitótico.

Si las células se cultivan en presencia de BrdU durante el primer ciclo celular, cada cadena de la doble hélice del DNA sintetiza su cadena complementaria incorporando esta base. Durante la mitosis, las cromátidas hermanas no se distinguen entre sí por tener la misma composición química, es decir, un filamento original y otro que contiene BrdU.

Después del segundo ciclo celular, y por lo tanto de una segunda síntesis de DNA, cada cadena del DNA de un cromosoma servirá a su vez de molde a copiar con lo que se obtendrán dos tipos de cromátidas, en una existirán dos cadenas químicamente distintas, mientras que en la otra ambas cadenas tendrán BrdU en lugar de timina. En esta metafase, las cromátidas del cromosoma serán químicamente diferentes, lo que se puede poner de manifiesto por la tinción que dan cuando se agrega el colorante 33258 de Hoechst, compuesto derivado del benzimidazol que tiñe al DNA normal pero no aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por BrdU. Los cromosomas muestran una cromátida con fluorescencia más intensa y otra opaca (Figura 8).

Una ventaja de usar el método de fluorescencia más Giemsa en los estudios de genotoxicidad es que es posible analizar en paralelo el daño en la estructura del DNA y sus efectos en la progresión de la división celular. Esto ha llevado a algunas correlaciones entre ambos fenómenos como es el hecho que aquellos agentes que inducen daño cromosómico severo producen también una reducción en la velocidad de proliferación celular.

3.6 Activación metabólica

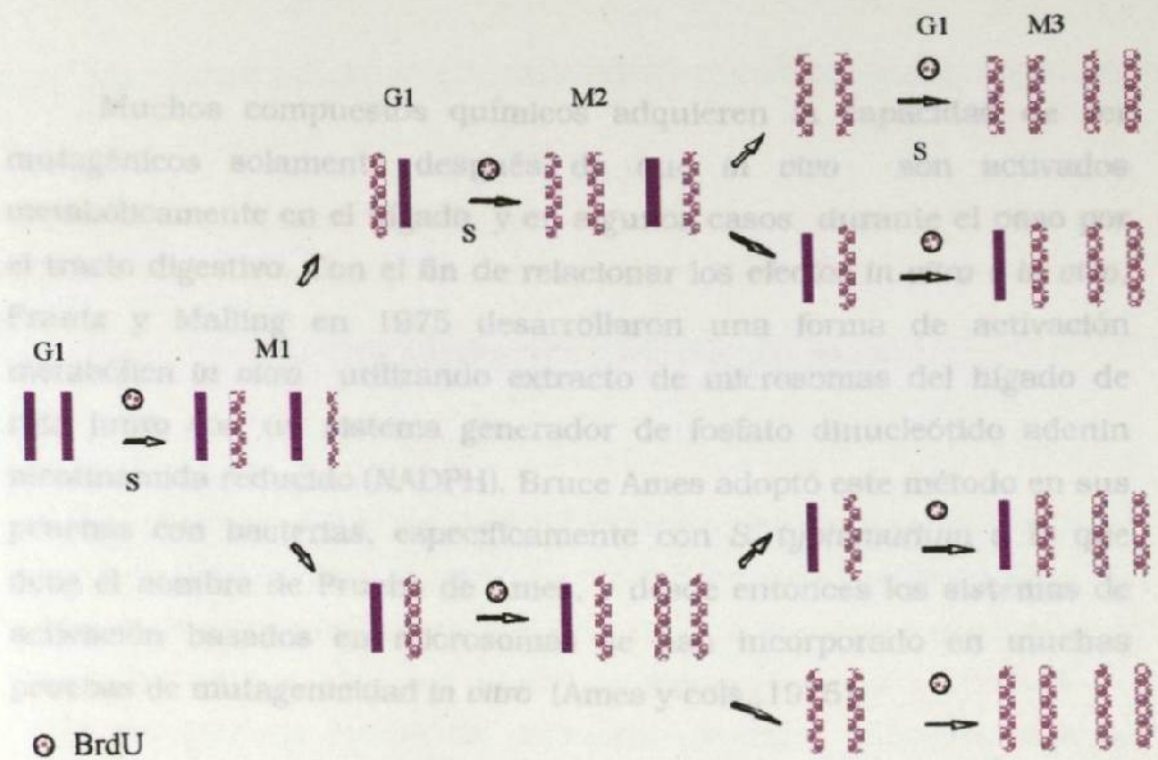


Figura 8. Incorporación de BrdU para el análisis de la Cinética de Proliferación Celular (CPC). Metafases en primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) divisiones.

El Índice Mitótico (IM) es un parámetro que determina el porcentaje de células que están en mitosis. El índice mitótico ha sido utilizado para la evaluación del crecimiento de cultivos y vacunas desde los años 60, pero recientemente de nuevo se ha utilizado en la investigación de mecanismos de toxicidad, sobre todo de fármacos con actividad citotóxica (Rojas y cols., 1992).

3.6 Activación metabólica

Muchos compuestos químicos adquieren la capacidad de ser mutagénicos solamente después de que *in vivo* son activados metabólicamente en el hígado y en algunos casos durante el paso por el tracto digestivo. Con el fin de relacionar los efectos *in vitro* e *in vivo*, Frantz y Malling en 1975 desarrollaron una forma de activación metabólica *in vitro* utilizando extracto de microsomas del hígado de rata junto con un sistema generador de fosfato dinucleótido adenín nicotinamida reducido (NADPH). Bruce Ames adoptó este método en sus pruebas con bacterias, específicamente con *S. typhimurium* a lo que debe el nombre de Prueba de Ames, y desde entonces los sistemas de activación basados en microsomas se han incorporado en muchas pruebas de mutagenicidad *in vitro* (Ames y cols., 1975).

Aunque han sido exitosos los estudios *in vivo* de mutágenos directos e indirectos y los estudios *in vitro* de mutágenos directos realizados en linfocitos humanos, los ensayos *in vitro* de mutágenos que requieren activación se han restringido debido a los efectos tóxicos de la preparación microsomal sobre los linfocitos (White y Heskett, 1980). Las cepas de *S. typhimurium* empleadas para el ensayo general de mutagénesis contienen mutaciones en el operón de la histidina. Además de esta mutación contienen mutaciones que incrementan importantemente su capacidad para detectar mutágenos, como es el aumento en la permeabilidad y en el sistema de reparación por escisión. La cepa TA 1537 se usa para detectar varios tipos de mutágenos que se intercalan en el DNA corriendo el apareamiento de las bases. En la TA98 y en la TA100 ambas ocurre corrimiento en la lectura de bases por formación de aductos y por inserciones o deleciones de bases respectivamente (Maron y Ames, 1983).

CAPITULO 4

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los esfuerzos más importantes del tratamiento contra el cáncer es el desarrollar nuevos agentes con actividad antineoplásica. El Instituto Nacional del Cáncer de E.U. (NCI) reporta que entre 1990 y 1992, se probaron cerca de 27,000 compuestos químicos definidos y miles de extractos crudos de productos naturales, más importantes, con base en los resultados *in vitro*, aproximadamente cerca del 4 % de estas sustancias se han referido para su posterior ensayo. De estos, cerca de 1000 continuaron la segunda evaluación *in vitro* e *in vivo*. (Greever y cols. 1992)

En el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., están en desarrollo una serie de pruebas dirigidas a investigar la potencial acción antineoplásica de la T-514. Ya que en México es necesario importar productos útiles en el tratamiento contra el cáncer y el costo de los mismos es muy elevado, el desarrollo de compuestos antineoplásicos a bajo costo ha adquirido alta prioridad en nuestro país.

La mayoría de los agentes antineoplásicos empleados en la terapéutica actúan mediante mecanismos de citotoxicidad y genotoxicidad. Algunos de ellos, interactúan con el DNA, de esta forma

impiden la duplicación de las células cancerosas.

Se ha planteado que la T-514 pudiera emplearse como un agente antineoplásico con base en los antecedentes que se han descrito en relación a su acción sobre líneas celulares, sin embargo es de particular importancia el analizar su **genotoxicidad** así como sus efectos sobre la proliferación celular que puedan revelar si la actividad citostática de dicho compuesto sigue el mismo patrón de los agentes quimioterapéuticos que interactúan con el DNA.

Por otra parte, los datos en la literatura acerca de la mutagenicidad y genotoxicidad de los derivados antracenónicos y antraquinónicos, se reportan principalmente en bacterias; los datos en sistemas de mamíferos son escasos. La investigación que se realizó en linfocitos humanos *in vitro* sobre este derivado antracenónico, la T-514, conforma ya uno de los documentos pioneros para este grupo de compuestos naturales.

4.1 Hipótesis de Trabajo

La T-514 es capaz de dañar el DNA, lo cual se puede detectar como mutaciones génicas (microlesiones) en microorganismos y como macrolesiones en células eucarióticas.

4.2. Objetivo General de Trabajo

Evaluar el potencial genotóxico de la T-514 sobre linfocitos humanos *in vitro* y en el sistema de Ames.

4.2.1. Objetivos Específicos

1) Analizar los efectos de la toxina T-514 en cultivos de linfocitos humanos evaluando los siguientes parámetros:

-El DNA, determinando la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y de intercambios de cromátidas hermanas

-La proliferación celular, evaluando la capacidad de proliferación con base en la cinética de proliferación celular, la proporción de células en metafase (índice mitótico) y sobre las otras fases del ciclo celular mediante la citometría de flujo.

2) Investigar la capacidad de la toxina para producir mutaciones en *Salmonella typhimurium*.

3) Investigar si la T-514 requiere de una activación metabólica para actuar como genotóxico en linfocitos y *Salmonella* mediante la evaluación de los mismos parámetros arriba mencionados en presencia de enzimas microsomales.

CAPITULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Linfocitos Humanos

5.1.1. Donadores

Se obtuvo sangre periférica heparinizada por venopunción de ocho donadores sanos, con una edad promedio de 30.7 años con los siguientes criterios de inclusión: sujetos mayores de 18 años, de ambos sexos y de condición saludable. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de exposición reciente y directa a plaguicidas, sustancias químicas u hormonas; *estar bajo tratamiento médico; ser fumador y haber estado expuesto a rayos X en el mes anterior a la toma de la muestra.*

5.1.2. Cultivo de linfocitos

Los cultivos se realizaron por duplicado para cada tratamiento. A cada cultivo se le agregó 0.5 ml de sangre completa en medio de cultivo RPMI 1640 (Flowlab) complementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) y 32 μ M de BrdU; Sigma) y se estimularon con PHA (Microlab). El volumen final fue de 7 ml. No se adicionaron antibióticos (Montero y cols., 1993). Los

tratamientos fueron agregados a los cultivos a las 48 hrs de incubación. Las concentraciones se eligieron de acuerdo a lo establecido por Dean y Danford (1984): 1) que la concentración más alta demostrara evidencia de inhibición mitótica y 2) que los intervalos de las concentraciones fueran la mitad del logaritmo de las mismas.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. A las 70 hrs de incubación se agregó a cada cultivo 0.2 ml de colcemida (10µg/ml; Microlab) y la incubación continuó por 2 hrs más. Los cultivos se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de KCL 0.075 M y se mantuvieron a 37°C durante 20 min, enseguida se centrifugaron a 1,200 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células fueron fijadas resuspendiendo con solución de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1). El lavado con solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un paquete celular blanco, el cual se resuspendió en solución fijadora y se guardó a 4°C.

5.1.3. Preparación de laminillas

Los paquetes celulares se centrifugaron después de 24 hrs, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 0.5 ml de la misma solución fijadora. Con una pipeta Pasteur se homogeneizó la suspensión y se goteó sobre portaobjetos limpios previamente sumergidos en alcohol etílico absoluto a 4°C los cuales se secaron a la flama y posteriormente se observaron en un microscopio óptico con un sistema de contraste de fases para asegurarse de obtener una buena dispersión de los cromosomas (Figura 9).

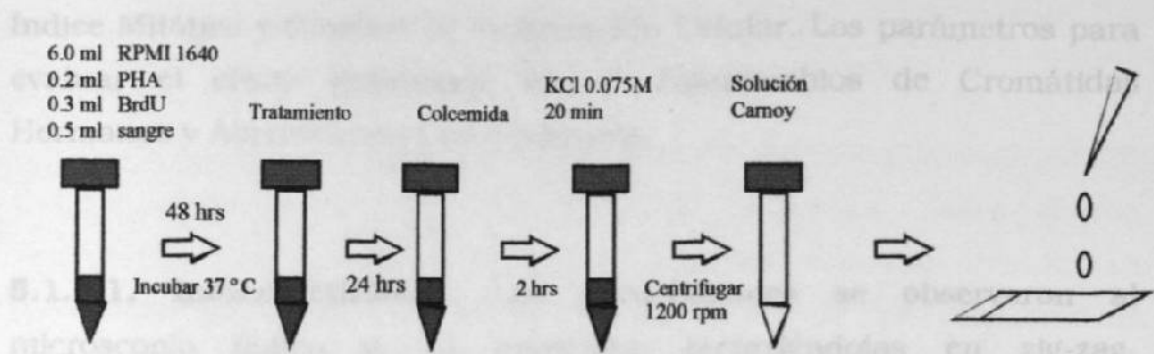


Figura 9. Esquema del cultivo de linfocitos.

5.1.4. Tinción

Las laminillas se sumergieron en una solución de Hoechst 33258 (1 mg/ml) en agua destilada por 30 min en ausencia de luz, se lavaron en agua corriente y se secaron. Posteriormente se cubrieron con solución amortiguadora de fosfatos (Na₂HPO₄ 66 mM, KH₂PO₄ 66 mM, pH 6.8) y se expusieron a luz negra por 1:30 hrs. Las laminillas fueron lavadas en la misma solución amortiguadora y se sumergieron en una solución de Giemsa (Merck) al 4% en solución amortiguadora de fosfatos por 3 min, se lavaron en agua corriente y se secaron (Perry y Wolff, 1974).

5.1.5. Análisis microscópico

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico de campo claro (Olympus CH/CHK) a 200 y 1000 aumentos. Todas las preparaciones se codificaron, de manera que fueron analizadas en ciego. Los parámetros para evaluar la capacidad de proliferación fueron:

Indice Mitótico y Cinética de Proliferación Celular. Los parámetros para evaluar el efecto genotóxico fueron: Intercambios de Cromátidas Hermanas y Aberraciones Cromosómicas.

5.1.5.1. Índice Mitótico. Las preparaciones se observaron al microscopio óptico a 20 aumentos recorriéndolas en zig-zag, comenzando de la parte central de la laminilla para contar un total de dos mil núcleos y de ellos determinar cuántos estaban en división (metafase). Se registraron como núcleos aquéllos que podían ser reconocidos por su morfología, de forma aproximadamente esférica, de tinción clara y de tamaño relativamente grande. Como metafase se señalaron a las agrupaciones de cromosomas bien definidas con un número mayor de 30 cromosomas:

$$IM = \frac{\text{Número total de metafases}}{\text{Número total de células evaluadas}}$$

La inhibición del índice mitótico (IIM) producido por la toxina se calculó como:

$$IIM = 100 - \frac{IM \text{ del tratamiento} \times 100}{IM \text{ del control}}$$

5.1.5.2. Cinética de Proliferación Celular. Cien metafases consecutivas con 44-46 cromosomas se observaron al microscopio de campo claro, clasificándolas como primera división (M1) aquéllas cuyos cromosomas se encontraron teñidos de oscuro, segunda división (M2) aquéllas metafases en las cuales todos sus cromosomas estaban conformados por una cromátida oscura y una clara, y tercera división (M3) a las que contenían metafases con los dos patrones anteriormente mencionados. La proporción obtenida se usó para calcular el índice de replicación de acuerdo con la fórmula:

$$IR = \frac{1(\# M1) + 2(\# M2) + 3(\# M3)}{\text{Número de metafases observadas}}$$

5.1.5.3. Intercambios de Cromátidas Hermanas. Estos fueron establecidos por el análisis de 25 metafases en segunda división. La frecuencia por célula se obtuvo por la suma de los intercambios presentes en cada cromosoma de la metafase con 44-46 cromosomas. Para cada cromosoma se sumaron los intercambios terminales, aquellos que se localizaron en los extremos con valor de uno, y los intercambios intersticiales, situados en la zona intermedia, con valor de 2 debido a que su formación requiere el doble de eventos que los terminales (Figura 10) (Latt, 1981).

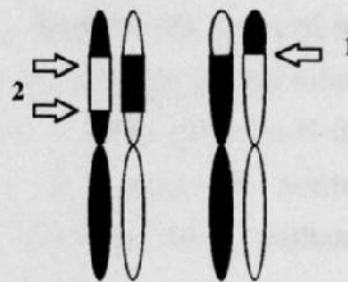


Figura 10. Esquema de los intercambios y su valor.

5.1.5.4. Aberraciones Cromosómicas.

El análisis de aberraciones cromosómicas se realizó en 100 metafases consecutivas de primera división (M1). Todas con 45 o más centrómeros. El daño cromosómico (Ostrosky, 1991) se clasificó como:

brechas (discontinuidades de DNA cuya distancia es menor al ancho de la cromátida.) cromatídicas o cromosómicas.

rompimientos: (discontinuidades del DNA cuya distancia es más ancha que la cromátida) cromatídicos o cromosómicos.

intercambios (rearrreglos anormales entre los brazos de uno o más cromosomas) cromatídicos: como cuadrirradiales o trirradiales o cromosómicos (dicéntricos, anillos, translocaciones).

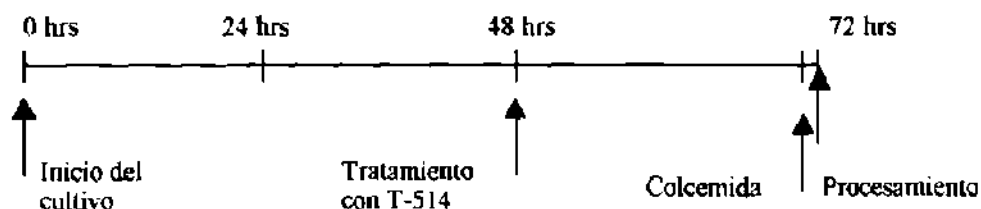
5.1.6. Activación metabólica

El homogenado hepático que contiene las enzimas microsomales o fracción "S9" (sobrenadante producto de la centrifugación a 9 000 g) se obtuvo de la casa Moltox Inc. (USA) y cumplía con las siguientes características: especie: rata; cepa: Sprague-Dawley; sexo: macho; buffer: KCl 0.15 M volumen: 2.1 ml, pH 7.4; agente inductor: Aroclor 1254. Cuando la fracción "S9" se combina con los siguientes cofactores y soluciones se forma la **mezcla S9**, la cual se preparó inmediatamente antes de cada experimento: 20% de la fracción S9, MgCl₂ 8 mM, nicotinadenina-difosfato (NADP) 4 mM, glucosa-6-fosfato (G-6-P) 5 mM y de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 . La solución de los cofactores se filtró utilizando una unidad swinex (Millipore Corp.) equipada con una membrana de 0.2 µm de poro y por último se le agregó la fracción S9 (White y Hesketh, 1980).

5.1.7. Tratamientos

Sin activación metabólica . La T-514 se disolvió en etanol 80% y se agregó a los cultivos (50 µL) después de 48 hrs de incubación cuando una gran proporción de células están en la fase de síntesis del ciclo celular y pueden ser más sensibles al daño químico. Se utilizaron las siguientes concentraciones: 1 µM, 5 µM y 10 µM; incubando por 24 hrs

más, hasta completar el tiempo de incubación de 72 hrs (Esquema 1).



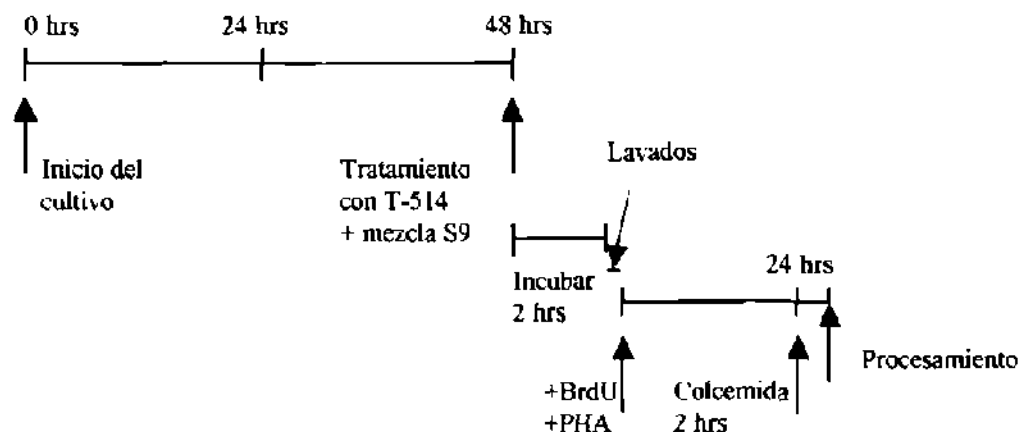
Esquema 1. Diseño experimental sin activación metabólica.

Como control positivo se empleó la Mitomicina-C (MM-C), en un volumen de 50 μ L, a la concentración final en el cultivo de 1 μ M. La MM-C es un agente alquilante bifuncional el cual produce aberraciones cromosómicas e inhibición mitótica. Este compuesto fue seleccionado porque ha demostrado su acción genotóxica y citostática tanto en animales como en humanos (Crooke y Bradner, 1976; Ostrosky y cols., 1988; Rojas y cols., 1992). El control negativo contenía solvente, etanol al 80% (50 μ L). Al cultivo testigo no se le adicionó algún compuesto. El volumen final en cada tubo fué de 7 ml.

Con activación metabólica . Después de 48 hrs de incubación, se agregó a los cultivos 0.5 ml de la mezcla S9 junto con la mismas concentraciones de T-514 usadas en los tratamientos sin activación metabólica, en un volumen final de 5 ml. La incubación continuó por 2 hrs y las muestras se lavaron dos veces con medio de cultivo. Posteriormente al sobrenadante se agregó medio fresco conteniendo PHA y BrdU, y las células se volvieron a incubar por 24 hrs (Esquema 2).

Se utilizó Ciclofosfamida (CP) como control positivo a la concentración de 40 μ M, diluida en agua estéril. La CP es una mostaza nitrogenada que fué sintetizada para ser específicamente activada por las células tumorales que contenían una enzima capaz de romper la

unión Nitrógeno-Fósforo en la molécula. Por lo tanto el compuesto es relativamente inerte hasta que se activa por el sistema P-450 en el hígado, así como en los tumores (Smith y Reynard, 1993). El primer metabolito es la 4-hidroxi-ciclofosfamida, responsable de la acción mutagénica. A los controles negativos se les agregó mezcla S9 (0.5 ml) y etanol 80% como solvente (50 µL).



Esquema 2. Diseño experimental con activación metabólica

5.1.8. Análisis Estadístico

La prueba estadística de χ^2 se utilizó para el análisis de aberraciones cromosómicas (Richardson y cols., 1989).

La prueba de t de Student se empleó para comparar las diferencias de cada tratamiento con respecto al control, para el índice mitótico, el índice de replicación y para las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas (Mehnert y cols., 1984; Richardson y cols., 1989; Hartman y Spelt, 1994).

5.1.9. Citometría de Flujo

Para la medición del contenido del DNA por citometría de flujo, las poblaciones celulares se dispersan en una suspensión celular y se tiñen con un colorante fluorescente, p.e. Ioduro de Propidio, el cual se une al DNA en todas las fases del ciclo celular. Las células luego pasan de una en una (a través de una región sensora por el frente de un detector) donde su fluorescencia se mide y se asume que es proporcional al contenido de DNA celular (Dean y cols., 1982).

Cuando las células normales son teñidas y evaluadas por citometría de flujo, la mayoría de ellas estarán en la fase G_0/G_1 , y emitirán luz en una frecuencia uniforme. Las células que tienen casi el doble de su DNA están en la fase G_2+M , emitirán luz con el doble de intensidad de las células G_0/G_1 . Si el número de células se grafica contra la intensidad de luz emitida, y si se usa una escala lineal, se obtiene el histograma de la Figura 11A. Las células que entran al ciclo celular y pasan por la fase S sintetizarán DNA. La cantidad de DNA durante la fase S variará entre $1x$ y $2x$ (donde x es la cantidad normal de DNA de una célula diploide). Entonces, emitirán luz que estará en su rango de intensidad entre los picos de G_0/G_1 y G_2+M (Figura 11B).

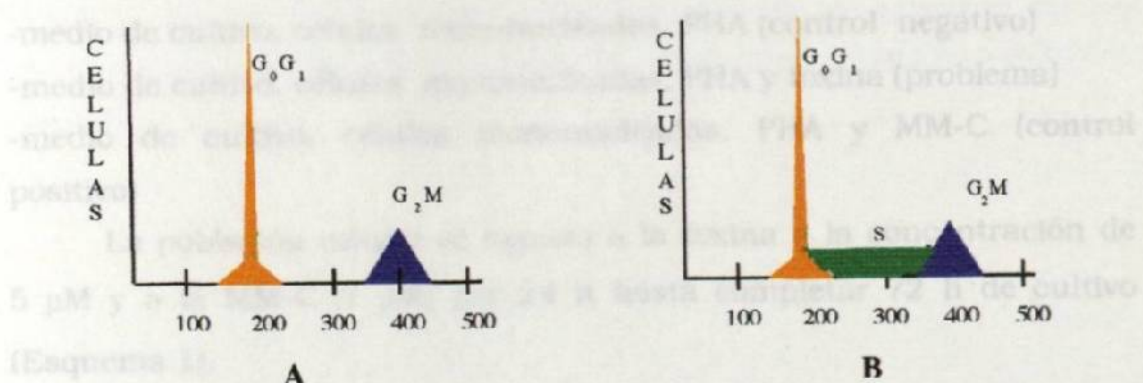


Figura 11. Intensidad de fluorescencia relativa. A. En células somáticas que no están dividiéndose. B. En células que están dividiéndose.

5.1.9.1. Obtención de células mononucleadas. Las muestras de sangre venosa se obtuvieron de dos donadores sanos de sexo masculino (donador 11 y donador 12) siguiendo los mismos criterios de exclusión. Se separaron las células mononucleadas de 60 ml de sangre, mediante centrifugación con gradiente de Fycoll-Hypaque (Sigma,Co.), durante 30 min a 1600 rpm. Se recuperó el plasma en tubos estériles; luego se recuperó la capa de células blancas, la cual se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con aminoácidos no esenciales 10 mM y L-glutamina 200mM, y se centrifugó a 1200 rpm para lavar los restos del Fycoll-Hypaque.

Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de medio RPMI-1640 complementado. Se tomó una muestra de 50 μ l de esta suspensión y se diluyó en una proporción 1:250 con diluyente (Abbot Company) del contador de células (Cell-Dyn-900) para posteriormente realizar el conteo en este aparato.

La densidad celular se ajustó a 5×10^6 células en 5 ml de volumen total. Se distribuyeron las células en tubos 12 x 75 mm estériles, por duplicado de la siguiente manera:

- medio de cultivo y células mononucleadas (testigo)
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA (control negativo)
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA y toxina (problema)
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA y MM-C (control positivo)

La población celular se expuso a la toxina a la concentración de 5 μ M y a la MM-C (1 μ M) por 24 h hasta completar 72 h de cultivo (Esquema 1).

5.1.9.2. Tinción.

Las células se fijaron con solución amortiguadora de sacarosa y citrato de sodio en DMSO. Las suspensiones celulares se llevaron a centrifugación a 1600 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se decantó cuidadosamente. Se agregó un volumen de 250 µl de solución amortiguadora de tripsina a cada tubo y suavemente se mezcló, y se mantuvieron en reposo por 10 min para que se llevara a cabo la reacción de digestión de membranas celulares y citoesqueleto. Se agregó un volumen de 200 µl de una solución amortiguadora que contiene inhibidor de tripsina y ribonucleasa A (para digerir el RNA), se mezcló suavemente y por 10 min se incubó. No se removieron ambas soluciones. Posteriormente, se adicionó un volumen de 200 µl de la solución de Ioduro de Propidio (2°-8°C), se mezcló suavemente y se incubó por 10 min en la oscuridad y en el refrigerador. Las muestras se filtraron a través de una malla de nylon de 50 µm a tubos 12 x 75 mm.

Los tubos se mantuvieron almacenados a 2°-8° C en la oscuridad hasta su análisis citométrico. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSort (Beckton Dickinson) equipado con el software CellFIT, del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.. Se empleó el modelo SOBR (Suma de la Amplitud de los Rectángulos) para estimar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

5.2. Cultivos de *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames)

Se emplearon tres cepas de *Salmonella typhimurium*, la TA98, TA100 y TA1537. Se siguió el método de incorporación en agar descrito por Maron y Ames (1983) de la siguiente manera: a un tubo que contenía 2 ml de agar de superficie (líquido a 45°C) se le agregó 0.1 ml de cultivo de bacterias, mantenidas la noche anterior en agitación y en medio nutriente, y 0.1 ml de T-514 a varias concentraciones, disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de agitar la mezcla, se vertió sobre las cajas de Petri que contenían agar mínimo Vogel-Bonner. Se dispersó el material de forma homogénea y se llevaron a incubar por 48 h a 37 °C (Figura 10).

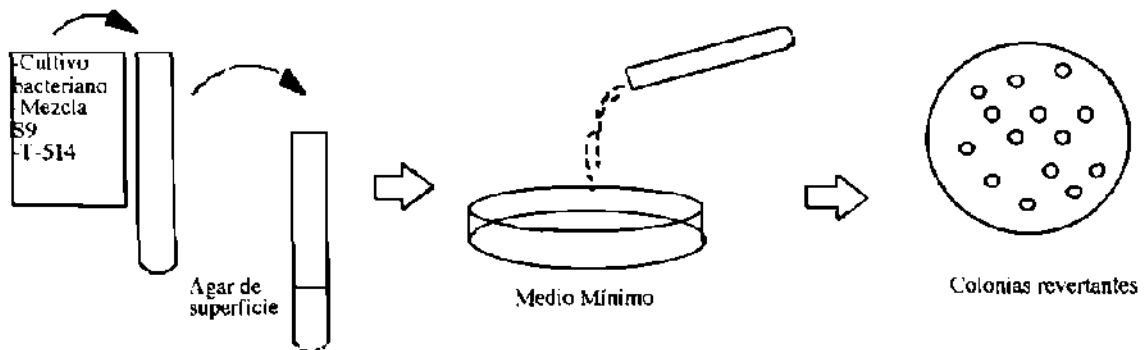


Figura 10. Esquema del procedimiento para la detección de mutágenos en *Salmonella typhimurium*

Los controles positivos empleados fueron 9-aminoacridina (9-AAC) y ácido Pricolónico (Ac.PC) disueltos en DMSO. Los testigos contenían medio de cultivo y bacterias, a los controles negativos se les adicionó el solvente DMSO.

Para los ensayos con activación metabólica, se siguió el método de preincubación por 20 minutos (Yahagi y cols. 1975). Se agregó 0.5 ml de la mezcla S9 (30% de la fracción S9, $MgCl_2$ 8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, G-6-P 5 mM y de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4), la toxina y el cultivo de la cepa en el agar de superficie. El control positivo fue 2-aminoantraceno (2-AA) disuelto en DMSO, los controles negativos contenían solvente (DMSO) y mezcla S9.

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1 Cultivo de Linfocitos Humanos

6.1.1. Aberraciones cromosómicas

6.1.1.1. Sin Activación Metabólica. En la Tabla 1 se muestran las observaciones para cada concentración de la T-514 y para cada uno de los tipos de aberraciones evaluadas. En el extremo derecho se indica la suma de las aberraciones sin considerar las brechas (B). Se considera que la identificación de las brechas es subjetiva y que no constituyen aberraciones reales. Se ha sugerido que las brechas sean contabilizadas y reportadas, pero no se usan en la evaluación del estudio.

Se observa que para los donadores 1, 2 y 4 la concentración de T-514 de 10 μ M resultó tóxica ya que el número de metafases en primera división (100) no fue suficiente para este análisis. No se encontraron diferencias con respecto a las aberraciones complejas (RC). Se analizó una concentración de MM-C (10 μ M), a la cual produjo aberraciones estructurales, principalmente rompimientos cromatídicos.

TABLA 1. FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES EN LINFOCITOS

	Conc. μM	Aberraciones / 100 células						Total sin brechas
		B'	B''	R'	R''	RC	D	
donador 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	0	0	0	1
	5	0	0	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
donador 2	0	2	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	5	1	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
donador 3	0	0	0	1	0	0	0	1
	1	0	2	0	0	0	0	0
	5	3	0	1	0	0	0	1
	10	0	0	1	0	0	0	1
donador 4	0	2	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	1	1	0	3
	5	0	0	1	0	0	2	3
	10	0	0	nm	nm	nm	nm	nm
MM-C ^a	10	0	2	8	6	0	1	15

B: brecha.

R: rompimiento

RC: rearrreglo complejo

^a : valor de un solo donador

Donadores 1 y 3 sexo femenino

Donadores 2 y 4 sexo masculino

'cromatídico, "cromosómico

nm: no se encontraron metafases

D: dicéntricos

Con respecto a los rompimientos totales (R' y R''), sin considerar las brechas (B) no fueron evidentes diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada concentración (Figura 13).

El donador 4 mostró el mismo número de rompimientos totales, en las concentraciones de 1 y 5 μM , sin embargo, es importante señalar que a la concentración de 5 μM , presentó dos cromosomas dicéntricos en 100 metafases analizadas, frecuencia alta, ya que la frecuencia