

Evaluación de la mutagenicidad de compuestos con actividad farmacológica empleando microorganismos. Estudio de la ciproheptadina

M. A. JIMÉNEZ MERCADAL

Lab. de Mutagenesis Ambiental, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 14 de octubre de 1981

ABSTRACT. A methodology using different *Salmonella typhimurium* strains and a post-mitochondrial rat liver fraction has been applied for evaluating the antihistaminic drug ciproheptadine. This methodology is widely used for detecting genotoxic effect of chemicals. No mutagenic effect was found using different concentrations of the compound, (10, 50, 100, 200, 400, and 500 μg per plate). These results agree with those reported by Torroella et al. using two yeast strains.

RESUMEN. La ciproheptadina, droga antihistamínica de amplio uso fue evaluada con una metodología que emplea diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* y una fracción post-mitochondrial de hígado de rata con el objetivo de conocer si presenta efecto genotóxico. Esta metodología es ampliamente utilizada en los ensayos de mutagenicidad de compuestos químicos. En las dosis que fueron empleadas (10, 50, 100, 200, 400 y 500 μg por placa) no se encontraron efectos mutagénicos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Torroella y cols. quienes emplearon dos cepas de levadura.

INTRODUCCION

Existe suficiente información en la literatura acerca del peligro para la salud humana que presentan los compuestos que dañan el material hereditario¹. Se ha descrito además que los mutágenos están relacionados con el aumento de la incidencia de enfermedades en el hombre, como son: las malformaciones congénitas, la esterilidad y otras anomalías de origen genético. También se ha sugerido su relación con la arterioesclerosis². Por otra parte, según datos de la Organización Mundial de la Salud referidos por McCann y Ames³ ha sido estimado que los factores ambientales inician alrededor del 80% de los casos de cáncer

en el hombre y es cada vez más evidente que los agentes causales de estos factores ambientales actúan probablemente mediante daño al DNA.

Después de la mitad de este siglo aparecieron en el horizonte científico una serie de metodologías que emplean microorganismos como detectores de diferentes daños de origen genético provocado por sustancias químicas, pero es en la pasada década cuando se perfeccionan estas técnicas y se generaliza su uso.

Un elevado número de cepas de *Salmonella typhimurium* incapaces de sintetizar histidina, fueron construidas por Ames y cols.⁴ con el objetivo de seleccionar un grupo que presentara una buena sensibilidad a los mutágenos independientemente de su mecanismo de acción. A esta metodología que emplea la retromutación o reversión a la histidina le fue acoplado un sistema metabólico "in vitro" que funciona en la misma placa Petri y que emplea una fracción post-mitocondrial hepática de ratas (S9) con el objeto de efectuar la biotransformación, que normalmente el hígado ejerce sobre las sustancias exógenas. Hollstein y cols.² según extensa revisión encontraron que hasta el año 1979 se habían publicado más de 400 trabajos en los que se refiere el estudio de más de 2,600 compuestos.

En nuestro laboratorio, con esta metodología se han evaluado un grupo de fármacos en uso y otras drogas en fase experimental⁵.

En este trabajo presentamos los resultados con la ciproheptadina, droga antihistamínica, de amplio uso en nuestro país. Este fármaco había sido estudiado en nuestro laboratorio empleando dos cepas de levadura, por Torroella y cols.⁶ y mostraron que no presentaba propiedades mutágenas.

Dada la reconocida sensibilidad de las cepas de *Salmonella* y su eficiente sistema de activación metabólica se consideró de interés evaluarla en este sistema.

MATERIALES Y METODOS

Compuesto. La ciproheptadina fue obtenida en forma pura en los laboratorios de medicamentos "Reynaldo Gutiérrez" de Ciudad Habana, de un lote procedente de Hungría.

Cepas de bacteria. Cinco cepas de *Salmonella typhimurium* fueron empleadas. Dos de ellas (TA-100 y TA-1535) detectan mutaciones de sustitución de pares de base y en las otras tres (TA-98, TA-1537 y TA-1538) que detectan mutágenos de tipo frameshift, es decir, corrimiento del marco de lectura.

Metabolismo "in vitro" de la droga. Fue empleada una fracción post-mitocondrial hepática de ratas tratadas con AROCLOR 1254 preparada según Ames y cols.⁴ y conservadas hasta su uso, en Nitrógeno Líquido. La actividad biológica de esta fracción fue chequeada periódicamente según técnicas de Brodie y Axelrod⁷ y mediante la evaluación de la capacidad de transformar mutágenos a su forma activa de compuestos conocidos.

Ensayos de mutagenicidad. La ciproheptadina fue disuelta en dimetil-sulfóxido y se evaluaron 6 dosis del compuesto. El límite de las dosis estuvo dado por la toxicidad del mismo. El ensayo de mutagenicidad fue hecho según Ames y cols.⁴ Cien microlitros de suspensión celular con aproximadamente 10^8 células, 100 microlitros de solución del compuesto y 500 microlitros de la mezcla metabolizante fueron adicionados a 2 ml de agar suave, agitado y uniformemente distribuido en capa fina, en una placa de medio mínimo Vogel-Bonner. Después de solidificado, fueron incubadas las placas a 37°C, 48 horas, después de lo cual se contaron las colonias de revertantes en las placas controles y en las de tratamiento.

Los tubos de agar suave contenían una cantidad limitante de histidina que permite algunas duplicaciones de la bacteria que facilita un crecimiento de fondo diferenciable de las colonias de revertantes. Esto permite evaluar una eventual toxicidad del compuesto y el tiempo de expresión de la mutación. Cada concentración empleada se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos, dos veces.

Conjuntamente con los ensayos en presencia de la fracción hepática, se realizaron experimentos paralelos en ausencia de la misma.

Tratamiento estadístico de los datos. Los valores de revertantes por placas de dos experimentos independientes por cepa y condición, fueron evaluados según Zar⁸ analizándose si existía diferencia significativa entre los tratamientos y el control mediante un test F salido de un análisis de varianza y se observó si la pendiente de las curvas dosis efecto eran significativamente diferentes de 0,

RESULTADOS

En la Tabla I se presentan los valores experimentales obtenidos con la ciproheptadina en presencia de la fracción hepática con las cinco cepas de referencia. Puede verse que no existen diferencias significativas respecto al control para un α de 0.05.

TABLA I

Valores revertantes por placa del tratamiento con ciproheptadina en presencia de la fracción hepática

CEPAS $\mu\text{g/placa}$	TA-100 Revert/ placa $X \pm DS$	TA-98 Revert/ placa $X \pm DS$	TA-1535 Revert/ placa $X \pm DS$	TA-1537 Revert/ placa $X \pm DS$	TA-1538 Revert/ placa $X \pm DS$
Solvente	126 ± 7	33 ± 3	16 ± 4	9 ± 2	24 ± 7
DMSO					
10	115 ± 23	25 ± 5	10 ± 3	9 ± 1	34 ± 10
50	116 ± 13	25 ± 4	17 ± 1	8 ± 5	27 ± 14
100	120 ± 9	30 ± 8	16 ± 3	9 ± 2	18 ± 6
200	115 ± 6	34 ± 11	15 ± 4	5 ± 3	36 ± 4
400	126 ± 9	40 ± 10	15 ± 3	7 ± 4	42 ± 6
500	t	20 ± 5	12 ± 3	9 ± 2	30 ± 4
r	0.1961	-0.0269	-0.0737	-0.1119	0.4060
F	0.4	0.0087	0.0656	0.1524	2.3698
Evaluación Estadística	Significa- tividad				
$\alpha = 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS

Evaluación estadística. X (Media), DS (desviación standard) t concentración tóxica), NS (estadísticamente no significativo), DMSO (dimetilsulfóxido).

En la Tabla II se exponen los datos provenientes de los ensayos en ausencia de la fracción metabolizante. No se observaron diferencias significativas.

TABLA II

Valores revertantes por placa del tratamiento con ciproheptadina en ausencia de la fracción hepática

CEPA	TA-100	TA-98	TA-1535	TA-1537	TA-1538
$\mu\text{g/placa}$	Revert/ placa X $\pm$ DS	Revert/ placa X $\pm$ DS	Revert/ placa X $\pm$ DS	Revert/ placa X $\pm$ DS	Revert/ placa X $\pm$ DS
Solvente	117 $\pm$ 8	30 $\pm$ 7	9 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2
DMSO					
10	102 $\pm$ 16	21 $\pm$ 10	8 $\pm$ 3	10 $\pm$ 4	18 $\pm$ 3
50	98 $\pm$ 9	26 $\pm$ 10	12 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2	18 $\pm$ 6
100	99 $\pm$ 10	31 $\pm$ 6	8 $\pm$ 4	10 $\pm$ 3	17 $\pm$ 8
200	113 $\pm$ 11	24 $\pm$ 5	10 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3
400	t	24 $\pm$ 6	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 4	14 $\pm$ 5
500	t	t	10 $\pm$ 3	t	t
r	0.0836	-0.1886	-0.0373	-0.5086	-0.0165
F	0.0564	0.3691	0.0167	3.4896	0.0027
Evaluación Estadística	Significa- tividad				
$\alpha = 0.05$	NS	NS	NS	NS	NS

Evaluación estadística. X (Media), DS (desviación standard) t (concentración tóxica), NS (estadísticamente no significativo), DMSO (dimetilsulfóxido).

DISCUSION

Los resultados obtenidos con las cinco cepas de *Salmonella typhimurium* concuerdan con los obtenidos por Torroella y cols.⁶ cuando evaluaron la genotoxicidad de esta droga sobre las levaduras *Schizosaccharomyces pombe*, cepa P₁ y *Saccharomyces cerevisiae*, cepa D₄, las cuales responden ante mutación y conversión génica respectivamente.

Como se ha venido apuntando por diferentes autores y organizaciones internacionales, suelen, ser más peligrosos aquellos compuestos poco tóxicos pero con efecto a largo plazo como el genético, así, estamos en presencia de enemigos silenciosos de los cuales sus consecuencias se observan después de muchos años.

CONCLUSIONES

En las metodologías empleadas, la ciproheptadina no presenta propiedades mutágenas habiendo sido estudiada bajo metodologías de apreciable sensibilidad. Continúa pues, siendo de interés emprender con esta droga, metodologías que emplean células de mamíferos o animales de laboratorio.

Los ensayos de mutagenicidad en microorganismos son herramientas insustituibles en los primeros pasos de evaluación toxicológica de una droga, y esto se ha visto afirmado en los últimos años, cuando se notó que estas metodologías son capaces de detectar efectos que pasan inadvertidos a las pruebas toxicológicas de rutina.

REFERENCIAS

1. LOPRIENO N. La mutagenesi ambientale. Piccin (Ed.) Padova, Italia, 1975.
2. HOLLSTEIN M., MC CANN J., ANGELSANTO F.A. AND NICHOLS W.W. *Mutant. Res.* 65, 133, 1979.
3. MC CANN J. AND AMES B.N. The Salmonella/microsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. Hiatt H.H., Watson J.D. and Windsted (editors). *Origin of human cancer*. Cold Spring Harvor Laboratory, New York 1431-1450, 1977.
4. AMES B., MC CANN J. AND YAMAKI E. *Mutation Res.*, 31, 347, 1975.
5. JIMÉNEZ M.A. Mutagenicidad de compuestos broncodilatadores: Piridoquinazona y derivados. I Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Ciudad de la Habana, Nov. 1981.
6. TORROELLA M., FERNÁNDEZ I. Y HERRERA L. *Actualidad en Oncología*, 3, 2, 1981.
7. BRODIE B.B. AND AXELROD J. *J. Pharmacol. Exp. thr.*, 99, 171, 1950.
8. ZAR J. *Biostatistic Analysis*. Prendice Hall Inc. New York, 1974.