

52  
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

Facultad de Ciencias

INDUCCION DE MICRONUCLEOS EN MEDULA  
OSEA E HIGADO FETAL DE RATON POR LA  
POSIBLE FORMACION ENDOGENA DE UN COM-  
PUESTO N'NITROSO A PARTIR DE PIPERAZINA  
Y NITRITO DE SODIO

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**B I O L O G O**

P r e s e n t a

**NORMA ESPINOSA SANCHEZ**

1990

**TESIS CON  
FALTA 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

INTRODUCCION	1
--------------	---

## GENERALIDADES

Compuestos N-Nitrosos	6
Prueba de micronúcleos	10
Prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón	15
Prueba de micronúcleos transplacentaria	17
Características generales de la piperazina	24

## MATERIALES Y METODOS

### 1 MATERIALES

1.1. Compuestos químicos	31
1.2. Material biológico	31

### 2. METODOS

2.1. Obtención de hembras con embarazo sincronizado.	31
2.2. Identificación de hembras embarazadas	32
2.3. Preparación de soluciones	32
2.4. Tratamientos	33
2.5. Procesamiento de muestras	33
2.6. Análisis al microscopio	36
2.7. Análisis estadístico	37

RESULTADOS

38

DISCUSION Y CONCLUSION

44

BIBLIOGRAFIA

46

## INTRODUCCION.

El hombre ha estado expuesto desde la prehistoria a contaminantes naturales y artificiales que pueden causarle daño al material genético y de ésta forma ser un riesgo para la salud. El rápido crecimiento de las industrias durante el presente siglo ha tenido como consecuencia la producción y la utilización de miles de compuestos químicos, muchos de los cuales son potencialmente peligrosos para los seres humanos. Se han descargado cantidades sustanciales de tales compuestos en el ambiente en forma de emisiones transportadas por el aire y de desechos líquidos ó sólidos. Por otra parte, diversos compuestos químicos, tales como los plaguicidas, se han aplicado deliberadamente a diversos medios a fin de controlar la difusión de enfermedades transmitidas por vectores o aumentar la producción de alimentos para la creciente población mundial. No cabe duda de que muchos productos químicos han aportado al hombre beneficios netos sin embargo en algunos casos, los daños ambientales causados han sido mayores que los beneficios conseguidos.

En lo que respecta a la población en general, los alimentos y el agua potable son las principales fuentes de exposición a la mayoría de los productos químicos tóxicos. Tales sustancias llegan a los alimentos humanos por muchas vías. Algunas los contaminan directamente en las fases de preparación o elaboración. Otras pasan del suelo a las plantas y de éstas, por conducto de los animales herbívoros a la carne o a la leche. Por otro lado, podemos destacar que los medicamentos pueden dar lugar a reacciones adversas en los individuos expuestos a regímenes terapéuticos prolongados, así como en aquéllos que reciben trata-

mientos repetidos o los que recurren a la automedicación. Se sabe que una tercera parte de los carcinógenos identificados para el hombre corresponden a agentes terapéuticos (1).

Diversos estudios han relacionado la acumulación a largo plazo de mutaciones con el desarrollo de cáncer (carcinogénesis) y de alteraciones en el desarrollo (teratogénesis) (2). Recientemente se ha encontrado una alta correlación entre actividad carcinogénica y mutagénica; al menos un 90 a 95% de los carcinógenos químicos estudiados son también mutágenos, aunque la relación inversa no se conoce (3).

Se han acumulado evidencias epidemiológicas que muestran que la mayoría de los cánceres están asociados a factores ambientales y estilos de vida, tales como radiaciones, procesos de trabajo, hábitos alimenticios, hábito de fumar, etc. (4, 5, 6).

De los contaminantes ambientales encontrados en la naturaleza, los compuestos N-Nitroso han despertado un gran interés debido a que de las 300 sustancias de este tipo que han sido estudiadas, aproximadamente el 90% de ellas produjeron tumores en 40 especies animales incluyendo a los primates (7), además de que se sospecha que las nitrosaminas son iniciadores del proceso de carcinogénesis en el humano (8). También presentan un riesgo genotóxico durante el desarrollo prenatal, ya que a través de estudios experimentales realizados en ratones, se ha observado la formación endógena de tales compuestos a partir de amidas o aminas y nitritos, dando origen a carcinógenos activos transplacentariamente (9 y 10). Las principales fuentes de compuestos N-Nitroso o de sus precursores

(amidas o aminas y nitritos) la constituyen los alimentos, el agua y los medicamentos aminados.

En México las enfermedades parasitarias son consideradas un problema de salud pública, los medicamentos contra esos padecimientos tienen por lo tanto un elevado consumo en nuestro país. La piperazina, una amina secundaria, es una droga antihelmíntica ampliamente utilizada, se sabe que la administración simultánea de piperazina y nitrito de sodio puede conducir a la formación endógena de N-nitrosopiperazinas carcinogénicas, como lo señalan los trabajos de Greenblatt y Mirvish, quienes observaron la aparición de adenomas de pulmón en ratones tratados con esos compuestos (11). Garcia y colabs. mencionan que en las ratas que recibieron tratamientos con N-mononitrosopiperazina se encontraron tumores en varios órganos (12) y se ha demostrado que la N'-N'-dinitrosopiperazina es un carcinógeno transplacentario en ratón (10).

La evaluación de la capacidad carcinogénica de los compuestos químicos es realizada en pruebas que son relativamente laboriosas, costosas y de larga duración, por lo que actualmente se considera a las pruebas de mutagénesis como la primera etapa en la selección de dichos compuestos. Estas pruebas resultan valiosas por su facilidad de realización y reproducción, relativa economía y corta duración (Tabla # 1).

Entre ellas, la prueba de micronúcleos en medula ósea de ratón ha sido elegida en el presente estudio, debido a que se emplean mamíferos, lo cual nos proporciona una mayor información sobre lo que puede pasar en un organismo superior y porque junto con el ensayo de Ames han sido ampliamente recomendadas como las pruebas fundamentales

para la identificación de mutágenos (13). Sin embargo, se han reportado resultados negativos cuando han sido probadas nitrosaminas en esta prueba, por lo cual se ha propuesto a la prueba de micronúcleos en hígado fetal de ratón como una alternativa cuando sean evaluados compuestos que requieran activación metabólica, como por ejemplo las nitrosaminas.

Considerando lo anterior, se propuso realizar este estudio, cuyo objetivo es:

Evaluar si la piperazina administrada en forma simultánea con el nitrito de sodio llevan a la formación endógena de N-nitrosopiperazinas en concentraciones suficientes para inducir la formación de micronúcleos en médula ósea adulta e hígado fetal de ratón.



TABLA 1  
DIFERENTES SISTEMAS DE PRUEBA DE MUTAGENOS IN VIVO E IN VITRO

CELULAS SOMATICAS		CELULAS GERMINALES	
IN VITRO	IN VIVO	IN VIVO	
<u>MUTACIONES GENICAS</u>			
PRUEBAS EN :			
1 BACTERIAS	1 PRUEBA DE LA MANCHA EN RATON (SPOT TEST)	1 RECESIVOS LETALES EN DROSOFILA	
2 LEVADURAS		2 PRUEBA DE LOCUS EN RATON	
3 HONGOS		3 ANOMALIAS EN EL ESPERMATOZOIDE EN F <sub>1</sub>	
4 CELULAS DE MAMIFERO			
<u>MUTACIONES CROMOSOMICAS</u>			
1 FIBROBLASTOS DE MAMIFERO	1 MICRONUCLEOS EN RATA Y RATON	1 DOMINANTES LETALES Y PERDIDA DEL X EN DROSOFILA	
2 LINFOCITOS HUMANOS	2 CITOGENETICA EN MEDULA OSEA EN RATA Y RATON	2 TRANSLOCACIONES HEREDABLES EN RATON	
		3 DOMINANTES LETALES EN RATA Y RATON	
		4 CITOGENETICA EN ESPERMATOCITOS	
		5 NO DISYUNCION	
<u>INDICADORES DE EFECTO BIOLOGICO</u>			
1 SINTESIS DE ADN NO PROGRAMADA CELULAS DE MAMIFERO	1 SINTESIS DE ADN NO PROGRAMADA HEPATOCITOS Y OTROS	1 SINTESIS DE ADN NO PROGRAMADA ADUCTOS Y RUPTURAS DE ADN, INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN RATON	
2 ADUCTOS Y RUPTURAS DEL ADN CELULAS DE MAMIFERO	2 ADUCTOS Y RUPTURAS DEL ADN DIFERENTES TEJIDOS		
3 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN CELULAS DE MAMIFERO	3 ALQUILACION HEMOGLOBINA		
4 CONVERSION GENICA Y RECOMBINACION EN LEVADURA	4 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN TEJIDOS		

## COMPUESTOS N-NITROSOS.

En 1956 Magee y Barnes describieron la inducción de tumores en hígado de rata debido al consumo de una nitrosamina llamada dimetilnitrosamina (8). A partir de ese hallazgo, numerosas investigaciones se han realizado con el fin de conocer los efectos biológicos de más de 300 compuestos N-nitroso y se reportó que cerca del 90% de ellos produjeron tumores en 40 especies animales, incluyendo primates (7). Lo anterior desencadenó una gran preocupación debido a que los humanos están expuestos a compuestos N-nitroso de fuentes exógenas y endógenas a través de nitrosación de precursores amino ingeridos e inhalados.

Los compuestos N-nitroso se definen químicamente como el producto de la reacción catalítica a pH ácido entre el ion nitrito y diferentes compuestos nitrogenados. Estos compuestos se subdividen en nitrosaminas y nitrosamidas de acuerdo con el compuesto nitrogenado que ha dado lugar a su formación (14, 15, 16 y 17).

La reacción de nitrosación de los compuestos aminados que dan lugar a la formación de compuestos N-nitroso se lleva a cabo con agentes nitrosantes como óxidos de nitrógeno (NO, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), cloruro o bromuro de nitrilo (NOCl, NOBr), sulfuro de nitrilo y de tetrafluoroborato de nitrilo (NOF<sub>4</sub>BO<sub>4</sub>) (16).

Las nitrosaminas y nitrosamidas difieren en lo que respecta a su actividad mutagénica. Existe información abundante señalando que, por lo general, las nitrosaminas son premutágenos que requieren ser activados metabólicamente para inducir mutaciones. De ahí que en sistemas

biológicos para investigación, carentes de las enzimas encargadas de su biotransformación se requiera acoplar homogéneos de tejidos que contengan dichas enzimas (por lo general hígado de rata). Por el contrario, en pruebas in vivo con roedores e insectos, son activados endógenamente (18 y 19).

Las nitrosamidas por el contrario son compuestos químicamente activos y pueden ser detectados prácticamente en cualquier sistema de prueba sin necesidad de ser biotransformados (20 y 21).

La actividad mutagénica de los compuestos N-nitroso se debe especialmente a su capacidad de alquilar el ADN (21).

Las nitrosamidas son agentes alquilantes directos y son capaces de inducir cáncer y tumores cerca del sitio de aplicación. Las nitrosaminas al no ser activas por sí solas no producen tumores en el sitio cercano a su aplicación, ya que deben ser transformados metabólicamente. Así pues, su vía de administración no influye en su especificidad por algún órgano. La especificidad de las nitrosaminas por un sitio blanco depende más bien de factores tales como la naturaleza química del compuesto, la dosis empleada y la especie animal en la cual se administre el compuesto (20).

Los compuestos carcinogénicos N-nitroso se han detectado en diferentes fuentes a las cuáles el hombre está expuesto. Posiblemente la más importante la constituyen los alimentos tales como embutidos, algunos quesos, leche descremada en polvo, pescados y carnes en donde dichos compuestos se pudieron haber formado durante los procesos

de cocción. Los productos preservados contienen una gran cantidad de nitrosaminas y de sus precursores, ya que durante su manufactura son tratados con nitrito de sodio. Se han detectado también en algunos de los aditivos y saborizantes de alimentos como la salsa de soya y la pimienta negra o blanca. Las bebidas fermentadas son otra fuente principal de nitrosaminas, como por ejemplo, el whisky, el ron y la cerveza. (17 y 22).

La exposición ocupacional a nitrosaminas, aunque restringida a una parte de la población es importante debido a las altas concentraciones que estos compuestos pueden alcanzar en el ambiente de trabajo, como en la industria del hule y del curtido (23).

El tabaco que se ha identificado como uno de los principales factores etiológicos del cáncer en el humano, es una de las principales formas de exposición exógena de nitrosaminas volátiles en los fumadores activos y pasivos. Estas nitrosaminas específicas del tabaco pueden formarse durante la práctica de fumar o de mascar tabaco y se ha puesto en evidencia que son carcinogénicas en animales de laboratorio (5).

Los medicamentos también contribuyen en una forma importante a la exposición a nitrosaminas y sus precursores, su posible acción como mutágenos o carcinogénos, hace imprescindible su estudio.

Se han reportado efectos carcinogénicos en animales después de la administración de amidas y aminas y nitritos indicando la formación de compuestos N-nitroso *in vivo* (9, 11 y 24).

La posibilidad de que los compuestos N-nitroso puedan formarse en el estómago humano a partir de amidas o aminas y nitrito podría darnos una respuesta parcial de la etiología de cánceres.

Los nitratos y nitritos que se encuentran en el agua grancs, vegetales, en conservadores de alimentos, etc., y los nitritos formados por medio de la acción bacteriana (reducción de nitratos a nitritos), en condiciones apropiadas pueden intervenir en las reacciones de nitrosación de aminas llevando a la formación de nitrosaminas.

Algunas sustancias pueden catalizar la formación de compuestos N-Nitrosos, por ejemplo, el tiocianato, el cual está presente en la saliva humana y el ácido clorogénico, un constituyente del café. Por otro lado, otras sustancias tales como los taninos, el ácido ascórbico (vitamina "C") y el tocoferol (vitamina "E") parecen ser efectivos inhibidores de la nitrosación de aminas (25, 26 y 27).

## PRUEBA DE MICRONUCLEOS.

Para entender como se realiza esta prueba es necesario describir que son y que características poseen los micronúcleos. Estos son fragmentos de cromatina que se producen como resultado de un retraso en la anafase y en el curso de la telofase el material que no migró a los polos queda incluido en una u otra célula hija; ahí puede fusionarse con el núcleo principal o ser transformado en uno o varios pequeños núcleos secundarios, los cuales por regla general son mucho más pequeños que el núcleo principal y éstos reciben el nombre de micronúcleos (28, 29 y 30).

El retraso en la anafase puede ocurrir por dos mecanismos principalmente:

a) Por rompimiento cromosómico, que se traduce en la formación de fragmentos acéntricos y de cromosomas di o multicéntricos conectados por puentes (31, 32, 29 y 33).

b) Por segregación cromosómica defectuosa, debida al mal funcionamiento del aparato mitótico que ocasiona el retraso de cromosomas completos (29).

Los micronúcleos eventualmente desaparecen debido a la acción de nucleasas y proteasas citoplásmicas, pero persisten por un periodo de tiempo considerable (34). Presentan algunas ventajas importantes: 1) se pueden observar en interfase, en contraste con los daños cromosómicos que solo pueden ser detectados en metafase o anafase; 2) son sencillos de contar y el número de células analizadas puede ser muy grande y 3) el análisis de una muestra única es suficiente para detectar aberraciones producidas en cualquiera de las fases del ciclo celular.

Los micronúcleos pueden observarse en diferentes tipos celulares de la médula ósea como por ejemplo: mieloblastos mielocitos y eritoblastos; sin embargo es difícil su observación debido a que pueden confundirse con segmentación nuclear normal o también pueden quedar enmascarados por el núcleo principal. Por lo tanto los micronúcleos en células nucleadas no son evaluados. En esta prueba la detección de micronúcleos es realizada en células anucleadas conocidas como eritrocitos policromáticos (POL). Los cuales se originan de una célula llamada hemocitoblasto. El desarrollo de un eritrocito se divide en un cierto número de etapas, pero debe entenderse que el proceso es continuo. Las etapas del desarrollo eritrocítico para la diferenciación del hemocitoblasto son proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, normoblasto o eritroblasto ortocromático, reticulocito o eritrocito policromático y eritrocito maduro o normocito (fig. 1). El desarrollo de un eritrocito maduro requiere solamente de unos tres días en los humanos; y los principales procesos que intervienen en la diferenciación del eritrocito son la reducción del volumen, la condensación de la cromatina nuclear, finalmente la pérdida del núcleo y de los organelos celulares con la adquisición de hemoglobina (35).

La diferenciación entre un eritrocito policromático y un normocito es posible debido a que los primeros no pierden sus ribosomas y cuando se tiñen en forma supravital con azul de crecil brillante, este material aparece como una red interna muy fina o retículo; por lo contrario, cuando se tiñen con colorantes tipo giemsa presentan un color gris-azuloso que contrasta con los eritrocitos maduros que después de la disolución de sus ribosomas se tiñen de rosa-naranja. Por otra parte, los eritrocitos policro-

máticos son ligeramente más grandes que los normocitos o eritrocitos maduros.

El desarrollo de los eritrocitos en los fetos de mamíferos es realizada en la membrana vitelina durante el séptimo y octavo día de gestación y es la única fuente de células rojas hasta el día once. La hematopoyesis activa en hígado, bazo y médula ósea ocurre después del noveno día, cuando la circulación ha sido establecida. A partir del día diez y hasta el nacimiento el hígado es el principal sitio de formación de la sangre. Los precursores eritroides en el hígado son completamente similares a aquellos encontrados en médula ósea.

Los micronúcleos no sólo han sido analizados en médula ósea e hígado fetal de ratón, sino en diversos sistemas biológicos como se muestra en la tabla # 2.



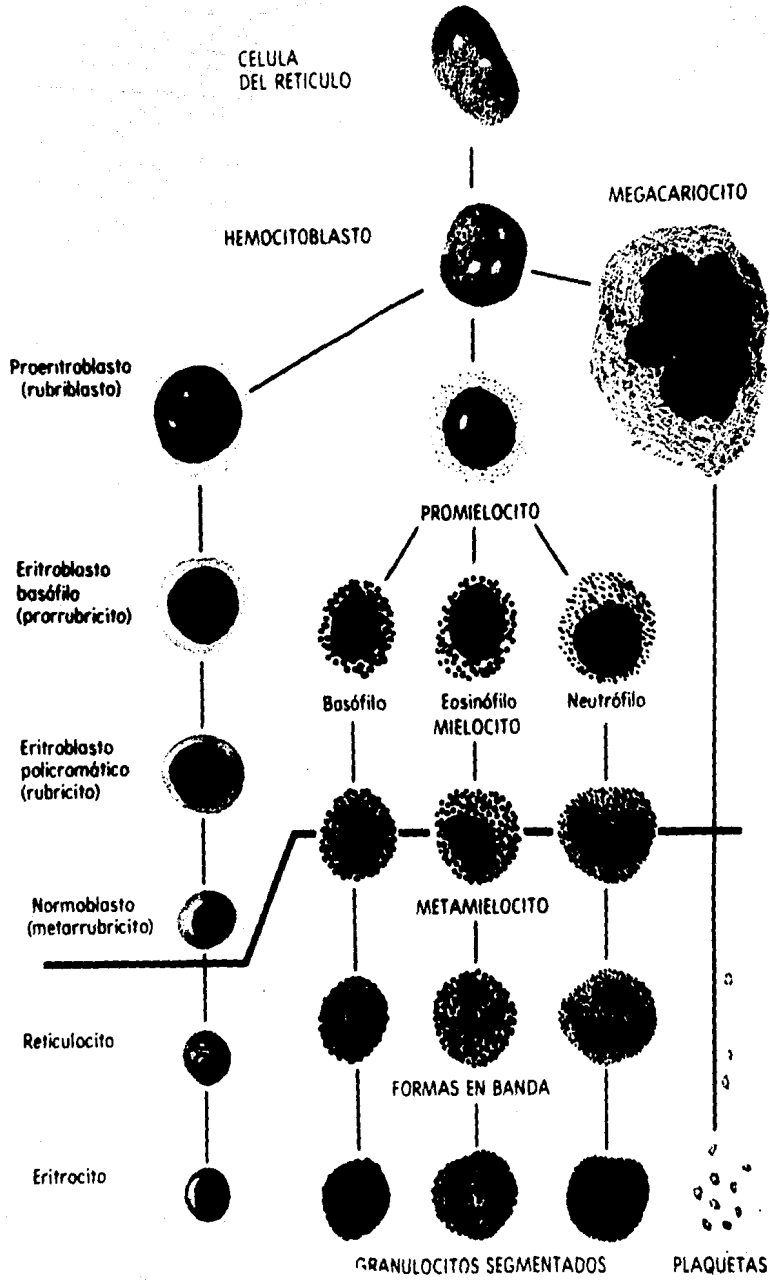


Figura # 1

TABLA 2

SISTEMAS BIOLÓGICOS DONDE HAN SIDO ANALIZADOS LOS  
MICRONUCLEOS

I PLANTAS

*Allium cepa*  
*Allium sativum*  
*Tradescantia*  
*Vicia faba*

II CELULAS EN CULTIVO

Linfocitos y fibroblastos de mamíferos  
Linfocitos y líneas celulares en cultivo

III MAMÍFEROS

a) Células germinales  
Espermátidas  
b) Células somáticas  
Células hepáticas en fetos y adulto  
Sangre  
Médula ósea

IV HUMANOS IN VIVO

Médula ósea

## PRUEBA DE MICRONUCLEOS EN MEDULA OSEA.

En el año de 1973 Schmid propuso evaluar el daño citogenético por medio de la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón (28, 29 y 30).

Heddle en ese mismo año, recomendó este método como sustituto del análisis de aberraciones cromosómicas en metafase, debido a la facilidad y rapidez del análisis de las células (34).

Von Ledenburg y Schmid observaron que la sensibilidad de la prueba se incrementa si los micronúcleos son analizados en eritrocitos policromáticos (36). La prueba es ampliamente utilizada y junto con la prueba de Ames puede servir para la detección de carcinógenos (37). En una comparación entre las dos pruebas se observó que ambas tienen la misma especificidad aunque en algunas ocasiones el ensayo de Ames puede ser mas sensible. En la prueba de micronúcleos se logran efectos a un nivel cromosómico no cubierto por ensayos bacterianos. La prueba de Ames solo refleja mutaciones puntuales mientras que la prueba de micronúcleos responde a agentes que rompen cromosomas o que provocan no disyunción (38).

La Agencia para la Protección del Ambiente de los Estados Unidos (EPA) en 1983, convocó a un grupo de investigadores a evaluar los sistemas existentes de detección de mutágenos, los cuales determinaron que la prueba de micronúcleos tiene la capacidad de detectar agentes carcinogénicos y que con el protocolo recomendado se podría detectar hasta el 70% de los mutágenos conocidos.

MacGregor y colabs., en 1987, diseñaron la guía del ensayo de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de mamíferos y marcaron los criterios para la realización de ésta (39). Trabajos recientes utilizan al ratón como sujeto de experimentación, sin embargo, existen otras especies animales en las que se realiza esta prueba.

Diversos aspectos han sido estudiados con respecto a este ensayo: diferencias entre sexos, entre cepas de ratón y entre rutas de administración de los compuestos; han sido evaluados por el grupo de estudios colaborativos de la prueba de micronúcleos (40, 41 y 42).

Las ventajas de la prueba son: es un estudio *in vivo* en mamíferos cuya técnica es fácil, rápida y relativamente económica; el análisis al microscopio es sencillo; la frecuencia espontánea de micronúcleos es baja y constante en las diferentes especies; además de que los micronúcleos permanecen durante todo el ciclo celular y la evaluación del estado proliferativo de la médula puede dar una orientación con respecto a la toxicidad de los compuestos en estudio.

Sin embargo esta prueba tiene algunas limitaciones por ejemplo, si se requiere saber el daño cromosómico específico, esta prueba es insuficiente; no detecta agentes que: a) no rompan cromosomas, b) que no causen retardo cromosómico en anafase; c) que produzcan rearrreglos cromosómicos sin presencia de fragmentos; d) que no lleguen a la célula blanco en suficiente concentración y e) que actúen específicamente en ciertos tejidos o tipos celulares que no sean la médula ósea (43, 44 y 45).

## PRUEBA DE MICRONUCLEOS TRANSPLACENTARIA.

La prueba de micronúcleos aplicada a eritrocitos policromáticos en médula ósea de ratones, es una alternativa eficiente al análisis de metafase para la detección de daño citogenético *in vivo* de células somáticas de mamífero, sin embargo, ha sido criticada por razones de pérdida de sensibilidad, cuando se están probando mutágenos que requieren activación en tejidos específicos, por ejemplo el hígado, la cual no es realizada por células de la médula ósea. También en el caso de que el metabolito activo se produzca, pero que no alcance las concentraciones efectivas en la circulación sanguínea por poseer una vida media corta. (45).

Cole y colabs. en 1979 recomendaron que la selección de químicos genotóxicos que requieren activación metabólica, sea realizada en ratones por medio de exposición transplacentaria en células de hígado fetal debido a que las células sanguíneas fetales a partir del décimo día de gestación se desarrollan en el hígado al lado de hepatocitos, los cuales metabolizan premutágenos y/o carcinógenos (46).

Los mismos autores en 1981 realizaron estudios sobre cinética celular de los eritrocitos, remarcando la importancia en los siguientes factores: duración del ciclo celular, proporción del ciclo ocupado por replicación cromosómica, duración del tiempo entre la última mitosis y la expulsión nuclear, y la vida media de los eritrocitos policromáticos. En la figura # 2 se observa que en la médula ósea de ratones adultos, ocurren cerca de siete ciclos de división celular durante la transición de proeritroblastos a eritrocitos. Cada ciclo dura de 10 a 11

horas y la última mitosis se termina aproximadamente 10 horas antes de que los normoblastos o eritroblastos ortocromáticos pierdan su núcleo y entonces se transformen en eritrocitos policromáticos. En el hígado fetal la producción de eritrocitos es considerablemente más rápida. Solo 3 o 4 divisiones celulares ocurren dentro de las poblaciones celulares, cada una dura cerca de 6 horas y transcurre el mismo tiempo entre la terminación de la última mitosis y la formación de eritrocitos policromáticos. En ambos tejidos los últimos dos ciclos celulares ocurren durante las etapas de maduración celular de eritroblasto basófilo y policromatófilo. Los parámetros del ciclo celular en eritroblastos de 16 días en ratón son G<sub>1</sub> 0.5 h, S 4.0 h, G<sub>2</sub> 1.5h y en médula ósea son G<sub>1</sub> 1.0 h, S 7.5 h, G<sub>2</sub> 1.5 h. La vida media de los eritrocitos policromáticos son similares a los tiempos de duración de los ciclos celulares de sus eritroblastos ancestrales (47). Propusieron que la expresión óptima de daño cromatídico y cromosómico ocurre si el agente tóxico alcanza concentraciones efectivas durante el penúltimo ciclo celular de maduración eritroblástica. Por lo que recomendaron que la recuperación de células de médula ósea materna sea realizada 24 horas después del tratamiento y para hígado fetal en un tiempo de 15 a 18 horas (18).

Un año después realizaron un protocolo de múltiples tratamientos, administrando el compuesto químico en tres ocasiones, es decir, 27, 21 y 15 horas antes de la recuperación de los eritrocitos policromáticos. Se observó que cuando se expone el hígado fetal durante varios ciclos celulares consecutivos, la respuesta se amplifica (19).

t(hr.) -80 -70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 0 +10

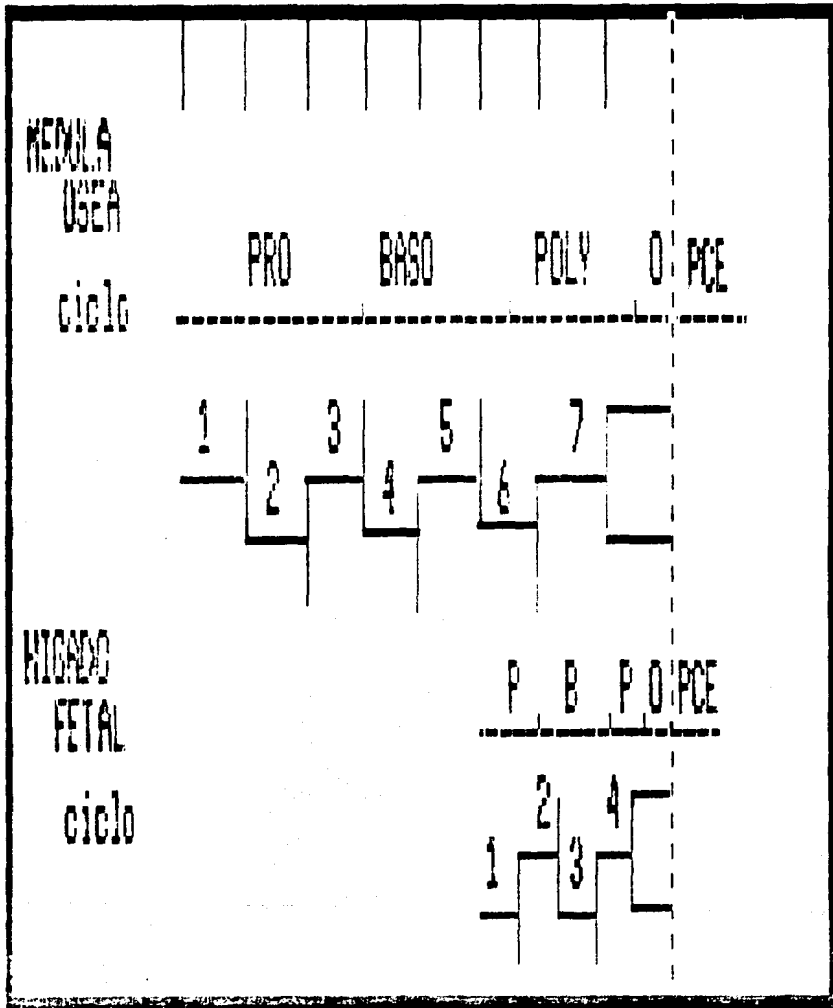


FIG. 2

En 1983 los investigadores arriba mencionados compararon la habilidad de 6 compuestos químicos (la mitomicina C, la procarbazona, el metil metano sulfonato, la ciclofosfamida, el benzolalpireno y la dietilnitrosamina, los cuales difieren en su reacción con ADN y en su necesidad de activación metabólica) para inducir micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas en células eritroides en desarrollo en el hígado fetal de ratón durante el último cuarto de gestación. En esta etapa de desarrollo la capacidad metabólica del hígado fetal excede a la capacidad de la médula ósea adulta. Los resultados mostraron que las dosis mínimas detectadas como potencialmente genotóxicas son similares en ambas pruebas (con excepción de un compuesto, la procarbazona). Cuando fueron expuestos *in vitro* los hígados fetales aislados, la respuesta de los compuestos fue relacionada directamente con aquella encontrada de la exposición *in vivo*, indicando el papel del hígado fetal en la activación metabólica. Reportaron que ambas pruebas podrían ser complementarias para estudios de efectos genotóxicos de exposición en útero a químicos que dañan el ADN (48).

Cole y cols. (1982) mencionaron que las pruebas citogenéticas *in vivo* de corta duración realizadas con animales adultos, son pobres predictores de riesgo de nitrosaminas (posibles iniciadores de tumores humanos), debido a que las células de médula ósea y linfoides no activan este tipo de compuestos y los productos del metabolismo hepático probablemente no sobreviven en la circulación en su forma activa. Sin embargo, al probar una nitrosamina carcinogénica llamada dietilnitrosamina (DEN), utilizando la prueba de micronúcleos transplacentaria en ratón, se demostró que DEN causó rompimientos cromosómicos e indujo a la formación de micronúcleos en



eritrocitos policromáticos de hígado fetal así como de sangre neonatal. La respuesta máxima fue encontrada entre las 30 y 36 horas después del tratamiento, en contraste con el periodo de 12 a 15 horas observado con la mitomicina C y la radiación  $\gamma$  (48). Parece ser que en roedores DEN es metabolizada lentamente después de una inyección intraperitoneal y una cantidad mínima es excretada. Las células micronucleadas pueden por lo tanto representar el daño al DNA acumulado durante 3-4 ciclos celulares (49).

En la actualidad una cantidad de compuestos químicos relativamente pequeña ha sido evaluada por éste sistema (Tabla # 3); a pesar de que esta prueba puede evaluar metabolitos de vida corta que son producidos por células hepáticas, con una mayor sensibilidad que la médula ósea y de la importancia que representa el problema de la mutagenesis transplacentaria (50, 45 y 51).

TABLA 3

COMPUESTO	VIA DE ADMON.	DIA DE TRATAMIENTO	RECUPERACION *		RESULTADOS			REFERENCIA
			MO	HF	MO	HF	SF	
MC	i. p.	15-18	30	12	+	+		46
PC	i. p.	15-16	36	24	+	+	+	46
Radiación $\gamma$	i. p.	15-16	24	12	+	+		18
MMS	i. p.	15-16	24	18	+	+		18
Bl(a)P	i. p.	15-16	48	30	+	+		18
DEN	i. p.	15-17		36		+	+	49
MMS	i. p.	15-17		27		+	+	19
CF	i. p.	16	24	24	+	+		48
DEN	i. p.	16	24	24	-	+		48
MNNG	i. p.	13		18		+		51
MNNG	s. c.	13		18		+		51
MNNG	i. v.	13		18		+		51
MNNG	p. o.	13		18		-		51
DES	i. p.	17				-		52
Carbadox	i. p. p. o.	15		18		+	+	50
Olaquinox	i. p. p. o.	15		18		+	+	50
Ciadox	i. p. p. o.	15		18		-	-	50
Arecolina	i. p.	17		45			+	53
Benceno	p. o.		18	21	+	+		54

ver abreviaturas en la página siguiente.

Abreviaturas: B[a]P, benzofalpireno; CF, ciclofosfamida; DEN, dietilnitrosamina; DES, dietilestilbestrol; MC, mitomicina C; MNNG, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina; MMS, metil metano sulfonato; PC, procarbazona

i.p. intraperitoneal, i.v. intravenosa, p.o. oral, s.c. subcutánea

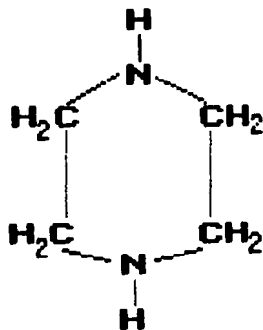
MO, Médula ósea

HF, hígado fetal

SF, sanfre fetal

\* El tiempo de recuperación anotado en la presente tabla es en el que se observó la máxima respuesta.

## CARACTERISTICAS GENERALES DE LA PIPERAZINA



La piperazina es una droga antihelmíntica que se utilizó desde 1949 como un medicamento altamente efectivo contra *Ascaris lumbricoides* y *Enterobius (Oxyuris) vermicularis* (55 y 56).

Produce parálisis y flacidez en el músculo de *A. lumbricoides* y como consecuencia de los movimientos peristálticos, las lombrices pueden expulsarse. Bloquea la respuesta del músculo de éstas a la acetilcolina, alterando la permeabilidad de la membrana celular a los iones que son responsables del mantenimiento del potencial de reposo por lo que reduce la movilidad de las lombrices y por ende el peligro de migración.

La piperazina tiene la capacidad de ser rápidamente absorbida por el tracto intestinal, así una porción de la droga absorbida es degradada y la restante es excretada en la orina.

En cuanto a su toxicidad y efectos secundarios se ha visto que en estudios con pacientes que han recibido tratamientos de piperazina por varios días no se ha manifestado ninguna anormalidad. Muy ocasionalmente se presentaron náuseas, vómito, diarrea y otras reacciones alérgicas. Además no se han reportado problemas con el uso del medicamento durante el embarazo y lactancia (56).

La piperazina se administra oralmente y esta disponible en tabletas de 500 mg. o en suspensión con 100 mg/ml.

Para atacar a las siguientes enfermedades se han recomendado las dosis que a continuación se citan :

ASCARIASIS	Adultos: 3.5 g. una vez al día por dos días seguidos.
	Niños: 75 mg/Kg. (máximo 3.5 g.) una vez al día por dos días consecutivos.
ENTEROBIASIS	Adultos y niños: 65 mg/Kg. (máximo 2.5 g.) una vez al día durante siete días seguidos.

Precauciones y contraindicaciones.- No se recomienda hacer uso de la piperazina en pacientes con epilepsia, alteraciones renales e insuficiencia hepática.

## ANTECEDENTES SOBRE ESTUDIOS DE MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD.

La piperazina se puede nitrosar rápidamente *in vitro*, y en animales experimentales se ha observado la formación endógena de dos N-nitrosopiperazinas: la N-mononitrosopiperazina (MNPZ) y la N'-N'-dinitrosopiperazina (DNPZ) (16).

En estudios con ratones realizados por Melvin Greenblatt y Sidney S. Mirvish en 1972, reportaron que la administración simultánea de piperazina (0.69-18.75 g/Kg en el alimento) y nitrito de sodio (0.05-20 g/l en el agua del bebedero) durante un período de 20 a 25 semanas, sacrificando a los animales después de 10 a 13 semanas, indujo la formación de adenomas en pulmón. No sucede lo anterior cuando se trata a los animales con piperazina sola, o con nitrito de sodio solo. Tampoco cuando son tratados con nitrato de sodio ó con piperazina y nitrato de sodio simultáneamente. También se reportó que la mononitrosopiperazina utilizada como control positivo en este trabajo, es carcinogénica en ratón (11).

M. Börzsönyi y colabs. (1980) realizaron una investigación para conocer los efectos que produce la dinitrosopiperazina, la cual fue sintetizada a partir de un fungicida llamado Triforin. Se utilizaron en este trabajo ratones adultos de ambos sexos, hembras gestantes y hembras en período de lactación. Los resultados mostraron que la dinitrosopiperazina puede atravesar la placenta y llegar hasta los fetos o pasar a través de la leche materna, produciendo tumores en hígado, pulmón y leucemias de tipo linfoide en la descendencia cuando alcanza la madurez o llegar a ser muy tóxica y provocar la muerte. La apari-

ción de tumores en los ratones adultos fue observada en un periodo más corto comparado con el tiempo en que fueron encontrados los tumores en el grupo control. La incidencia de tumores fue mas alta en los ratones expuestos a través de la madre que en los adultos. De esta forma se demostró que la dinitrosopiperazina es un carcinógeno transplacentario en ratones (10).

Se ha observado que en ratas la mononitrosopiperazina administrada en el agua del bebedero, con un tratamiento agudo produjo degeneración de células de hígado y de riñón, degeneración vacuolar sobre el epitelio de los túbulos colectores, congestión pulmonar y edema alveolar; y en tratamientos crónicos, indujo una gran variedad de tumores en diferentes órganos (12).

Las nitrosaminas 1-nitroso-4-metilpiperazina, 1,4-dinitrosopiperazina y 1-nitrosopiperazina en las cuales no se había observado actividad mutagénica en el sistema de *Salmonella typhimurium*, fueron probadas mediante el sistema vía hospedero, en el cual se utilizaron ratones a los cuales se inyectó la bacteria en forma intraperitoneal y el compuesto por vía intramuscular. Los resultados mostraron que los tres compuestos son mutagénicos, ya que dan una dosis respuesta positiva en relación al número de colonias revertantes de *S. typhimurium*. Cuando fueron probados únicamente los compuestos en la bacteria, se obtuvieron resultados negativos, lo cual parece indicar que las bacterias no poseen las enzimas necesarias para metabolizar esas sustancias y convertirlas en sus formas activas. La piperazina y la N-metilpiperazina fueron utilizadas como controles negativos, parece ser que la presencia de un grupo nitroso es esencial para que se forme un metabolito mutagénico (57).

Cuando se probaron algunos derivados de N-nitrosopiperazinas con el ensayo de Ames en presencia o ausencia de S9 (homogenado de hígado de rata) y fenobarbital, se observó que todas las sustancias requieren de activación metabólica para que muestren actividad mutagénica (58).

Andrews y colabs. (1978) mencionaron que existe una relación entre la actividad mutagénica y carcinogénica de las nitrosaminas cíclicas entre las que se encuentran varios derivados de N-nitrosopiperazinas (ver tabla # 4) (59).

En experimentos con ratones realizados recientemente en nuestro laboratorio se mostró que la piperazina reacciona *in vivo* con el nitrito de sodio, formándose un compuesto mutagénico que puede ser retenido en el organismo, excretándolo después en forma de un derivado glucorónido. La detección de mutágenos en la orina de los ratones por medio del Ensayo de Ames puede ser un dato indicativo de que los organismos estuvieron expuestos a los derivados nitrosados carcinogénicos de la piperazina. Se observó que la excreción urinaria de los mutágenos en los animales se incrementa en forma directamente proporcional a la concentración del nitrito de sodio, así como también al aumentar el número de tratamientos (60).

Para determinar si la ingestión de piperazina puede llevar a la formación endógena de N-Nitrosopiperazinas en humanos, Bellander *et al* en 1985 realizaron un estudio en el cual se administró en forma oral 480 mg de piperazina a cuatro voluntarios. Se encontró que aproximadamente 140 a 230  $\mu\text{g/l}$  de mononitrosopiperazina son formados en el estómago y que cerca del 10% de esa cantidad es excretada en la orina sin ningún cambio, por lo que el resto pudo



haber sido metabolizado o excretado en heces. Cuando se mezcló la piperazina con 2 g de ácido ascórbico antes de la administración, la concentración de mononitrosopiperazina en el jugo gástrico decreció y la excreción de ésta en la orina fue de un 20 a 77%. Se detectó que de un 21 a 36% de la dosis de piperazina ingerida (480 mg) es excretada en la orina y por lo tanto esta fracción se escapa de las reacciones de nitrosación. No hubo indicios de mononitrosopiperazina ni de dinitrosopiperazina en la sangre y como ésta última no se encontró en ninguna de las muestras, se piensa que se pudo haber formado pero en una concentración muy baja y después se metabolizó (61).

En un trabajo posterior de Bellander *et al* se reportó que la formación endógena de mononitrosopiperazina se llevó a cabo en trabajadores expuestos a piperazina, en los cuales se detectó la nitrosamina en muestras de orina (62). En otra ocasión expusieron a 12 voluntarios durante 8 horas a 0.3 mg de piperazina/m<sup>3</sup> y se controló la concentración de nitratos y ascorbatos en la dieta, lo anterior se hizo para determinar de que manera los nitratos y ascorbatos intervienen en la formación de la mononitrosopiperazina. Se encontró que en los sujetos con dietas altas en nitratos había una concentración mayor de mononitrosopiperazina que en aquéllos en los que su dieta consistía de bajo contenido de nitratos, así como de alto contenido de ascorbatos (63).

TABLA 4

RELACION ENTRE ACTIVIDAD MUTAGENICA Y CARCINOGENICA DE  
DERIVADOS DE N-NITROSOPIPERAZINAS (59).

COMPUESTO	CARCINOGE NICIDAD	MUTAGENI CIDAD
Dinitrosopiperazina	+	+
Dinitrosohomopiperazina	+	+
2-metil-dinitrosopiperazina	+	+
2,5-dimetil-dinitrosopiperazina	+	+
2,6-dimetil-dinitrosopiperazina	+	+

## MATERIALES Y METODOS.

### 1. MATERIALES.

#### 1.1 Compuestos químicos.

Fosfato de potasio monobásico (Baker); fosfato de sodio dibásico (Baker); glicina (Merck); hexahidrato de piperazina (Wintrop); metanol (Baker); metil metano sulfonato (Sigma); nitrito de sodio (Baker) y suero fetal bovino (Microlab).

#### 1.2 Material biológico.

Ratones hembras de la cepa CD1 de 9 a 11 semanas de edad.

Ratones machos de la cepa CD1 de 10 a 12 semanas de edad.

### 2. METODOS.

#### 2.1 Obtención de hembras con embarazo sincronizado.

2.1.1 Condicionamiento: se realizó de acuerdo a lo descrito por Whitten (64 y 65). A cuatro grupos de 20 hembras se les colocó en una jaula en ausencia de machos durante 15 días, para provocar el anestro fisiológico.

2.1.2 Estimulación: se colocó en la jaula que contenía a las 20 hembras a un macho separado físicamente (en una jaula pequeña) para que éste actuara como estimulador visual y olfativo durante 48 horas. De esta manera se indujo el comienzo del ciclo estral.

2.1.3 Apareo: se introdujo un macho en una jaula durante 48 horas para que marcara su territorio, después se metieron 2 hembras previamente condicionadas y estimuladas en la jaula y se dejaron transcurrir 24 horas para que realizaran la cópula.

## 2.2 Identificación de hembras embarazadas.

Se utilizaron dos criterios para identificar a las hembras embarazadas:

2.2.1 Observación del tapón vaginal el día cero, es decir, un día después del apareo. El tapón vaginal está formado por la mezcla de las secreciones de las glándulas vesiculares y coagulativas del macho, por lo que su presencia indica que la hembra se apareó.

2.2.2 Control de peso corporal, tomándose en cuenta el peso inicial (día cero) y el del día 13 de gestación. Se calculó el porcentaje de incremento en este lapso y se determinó el porcentaje mínimo de aumento (25%) para calificar como positivo el embarazo.

## 2.3 Preparación de soluciones.

Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de la administración. Dado que se trabajó con compuestos hidrosolubles, todas las sustancias se disolvieron en agua.

## 2.4 Tratamientos.

### 2.4.1 Experimento # 1.

Con el fin de estandarizar la prueba y obtener una dosis-respuesta positiva, se administró metil metano sulfonato (un mutágeno conocido) el día 16 de embarazo, 18 horas antes del sacrificio, a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal. El grupo control recibió solamente el vehículo (agua destilada). El número de animales por grupo de tratamiento fué de 3 ratones hembras.

### 2.4.2 Experimento # 2.

Se administró nitrito de sodio el día 16 de embarazo, 24 horas antes del sacrificio, a las dosis de 0.42, 0.85, 1.7, 3.4 y 20 mg/Kg de peso, por vía oral forzada a través de sonda.

### 2.4.3 Experimento # 3.

Se realizaron dos esquemas de tratamiento:

A) Se trataron por vía oral 3 ratones por grupo el día 16 de gestación, 24 horas antes del sacrificio, el grupo uno recibió nitrito de sodio (20 mg/Kg), el grupo dos piperazina (65 mg/Kg) y el grupo tres nitrito de sodio (20 mg/Kg) y piperazina (65 mg/Kg) simultáneamente.

B) Se trataron por vía oral 3 ratones por grupo el día 15 de gestación, 36 horas antes del sacrificio a los siguientes grupos: el primero recibió nitrito de sodio (0.85 mg/Kg); el segundo, nitrito de sodio (20 mg/Kg); el tercero, piperazina (65 mg/Kg); el cuarto, nitrito de sodio (0.85 mg/Kg) y piperazina (65 mg/Kg) y el quinto, nitrito de sodio (20 mg/Kg) y piperazina (65 mg/Kg).

#### 2.4.4 Experimento # 4.

Se realizaron tratamientos múltiples por vía oral a 3 ratones por grupo, el día 16 de gestación, 27, 21 y 15 horas antes del sacrificio, administrando al grupo uno, piperazina (65 mg/Kg); al grupo dos, nitrito de sodio (20 mg/Kg) y al grupo tres, piperazina (65 mg/Kg) simultáneamente con nitrito de sodio (20 mg/Kg).

#### 2.5 Procesamiento de muestras.

##### 2.5.1 Médula ósea.

Se tomaron muestras de médula ósea después del sacrificio del animal según la técnica reportada por Schmid (29 y 30):

Se extrajeron los femures cortando cuidadosamente desde la región proximal, cercana a los huesos pélvicos hasta la región distal debajo de la rodilla. Se limpiaron los huesos con una gasa hasta quedar libres de músculos.

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

Se insertó en la cavidad del hueso una jeringa de 1 ml con 0.2 ml de suero fetal bovino, inactivado a 56 °C durante 30 minutos y filtrado por millipore 0.45  $\mu$ .

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

Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos.

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

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

Se codificaron las laminillas.

Veinticuatro horas después de la preparación de las laminillas se fijaron en metanol absoluto por 5 min y se tificaron por 20 min en Giemsa al 5% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M (0.71 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.68 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1000 ml de agua destilada), ajustando el pH a 6.8.

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

### 2.5.2 Hígados fetales.

Después de sacrificar al animal se le hizo un corte ventral y se extrajeron dos fetos.

Al feto se le hizo una insición ventral y se extrajo el hígado, órgano que se encuentra muy desarrollado y por lo tanto se observa con rapidez.

El hígado se introdujo a un tubo de centrifuga que contenía 3 ml de suero fetal bovino.

Con ayuda de una pipeta Pasteur el hígado se resuspendió, absorbiendo y expulsando todo el material hasta que se formó una suspensión fina.

Se dejó reposar el tubo durante unos minutos para que sedimentaran los tejidos grandes y se decantó el sobrenadante en un tubo de centrifuga limpio.

Se centrifugó a 500 rpm durante 10 minutos.

Se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur.

Se codificaron las laminillas, se realizó el frotis, se fijó y se tiñó en la misma forma que las muestras de médula ósea.

### 2.6 Análisis al microscopio.

Se analizaron 2000 eritrocitos policromáticos por ratón en cada uno de los tejidos (médula ósea e hígado fetal). El análisis se hizo tomando en cuenta las células con micronúcleos sin importar cuantos tenían.



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

## 2.7 Análisis estadístico.

Se utilizaron las tablas de Kastenbaum y Bowman para el análisis de los resultados (66).

## RESULTADOS.

Con el propósito de estandarizar la prueba de micronúcleos transplacentaria en nuestro laboratorio, se utilizó metil metano sulfonato, un compuesto que en estudios previos ha incrementado la frecuencia de micronúcleos en hígado fetal de ratón (18 y 19). En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del análisis de micronúcleos realizado a las 18 horas después de administrar a un grupo de ratones este compuesto en concentraciones de 25, 50 y 100 mg/Kg de peso. Se puede observar que tanto en la médula ósea como en el hígado fetal la frecuencia de micronúcleos aumenta con respecto a la dosis.

Investigaciones recientes han señalado que el nitrito de sodio posee propiedades mutagénicas (67 y 68). D. Luca *et al* (1987) mostraron que este compuesto es capaz de inducir la formación de micronúcleos en médula ósea de ratón. Se diseñó un experimento que tuvo como finalidad la identificación de la dosis adecuada de nitrito de sodio que no incrementara la frecuencia de micronúcleos en hígado fetal de ratón. Los resultados de este experimento se resumen en la tabla 6 en donde se puede observar que con ninguna de las dosis empleadas se alteró la frecuencia de micronúcleos con respecto al control.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos cuando se administró piperazina y nitrito de sodio simultáneamente, con el fin de inducir la formación endógena de un compuesto N-nitroso. Los ratones recibieron una dosis y se sacrificaron en dos periodos (24 y 36 horas después del tratamiento). Además del grupo de ratones control que recibió agua destilada, se incluyeron otros grupos controles que se trataron tanto con nitrito de sodio (0.85 y 20

mg/Kg) como piperazina (65 mg/kg) por separado. En ninguno de los grupos evaluados se observó que la frecuencia de micronúcleos se incrementara significativamente con respecto al control.

Cuando se intensificó el tratamiento y se administró piperazina (65 mg/Kg) y nitrito de sodio (20 mg/Kg) en forma simultánea, 27, 21 y 15 horas antes del sacrificio se observó que la frecuencia de micronúcleos se mantenía similar al control, lo cual se muestra en la tabla 8.

TABLA 5

FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MN) EN LOS ERITROCITOS POLICROMATICOS (POL) DE MEDULA OSEA E HIGADO FETAL DE RATON DESPUES DE UN TRATAMIENTO SIMPLE VIA INTRAPERITONEAL CON METIL METANO SULFONATO EL DIA 16 DE GESTACION.

TEJIDO	COMPUESTO	DOSIS mg/Kg	POL CON MN	PORCENTAJE POL CON MN	RESULTADO ESTADISTICO
M E D U L A O S E A	CONTROL	--	16	0.26	-
	M M S	25	30	0.50	-
	M M S	50	64	1.06	+
	M M S	100	96	1.60	+
H I G A D O F E T A L	CONTROL	--	22	0.18	-
	M M S	25	66	0.55	+
	M M S	50	391	3.25	+
	M M S	100	698	5.80	+

Se analizaron en médula ósea tres animales por grupo y 2000 POL por animal. En hígado fetal fueron tres animales por grupo, dos fetos por camada y 2000 POL por feto.

p < 0.01

TABLA 6

FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MN) EN LOS ERITROCITOS POLICROMATICOS (POL) DE MEDULA OSEA E HIGADO FETAL DE RATON DESPUES DE UN TRATAMIENTO SIMPLE POR VIA ORAL CON NITRITO DE SODIO (NaNO<sub>2</sub>) EL DIA 16 DE GESTACION.

TEJIDO	COMPUESTO	DOSIS mg/Kg	POL CON MN	PORCENTAJE POL CON MN	RESULTADO ESTADISTICO
M E D U L A O S E A	CONTROL	--	3	0.05	-
	NaNO <sub>2</sub>	0.42	9	0.15	-
	NaNO <sub>2</sub>	0.85	8	0.13	-
	NaNO <sub>2</sub>	1.70	2	0.03	-
	NaNO <sub>2</sub>	3.40	3	0.05	-
	NaNO <sub>2</sub>	20.00	5	0.08	-
H I G A D O F E T A L	CONTROL	--	20	0.16	-
	NaNO <sub>2</sub>	0.42	27	0.22	-
	NaNO <sub>2</sub>	0.85	11	0.09	-
	NaNO <sub>2</sub>	1.70	7	0.06	-
	NaNO <sub>2</sub>	3.40	6	0.05	-
	NaNO <sub>2</sub>	20.00	9	0.07	-

Se analizaron en médula ósea tres animales por grupo y 2000 POL por animal. En hígado fetal fueron tres animales por grupo, dos fetos por camada y 2000 POL por feto.

p < 0.01

TABLA 7

FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MN) EN LOS ERITROCITOS POLICROMATICOS (POL) DE MEDULA OSEA E HIGADO FETAL DE RATON DESPUES DE UN TRATAMIENTO SIMPLE POR VIA ORAL CON PIPERAZINA Y NITRITO DE SODIO ( $\text{NaNO}_2$ ) LOS DIAS 15 Y 16 DE GESTACION.

TEJIDO	COMPUESTO	TIEMPO DE EXP. horas	DOSIS mg/Kg	POL CON MN	PORCENTAJE POL CON MN	RESULTADO ESTADIS-TICO
M E D U L A  O S E A	$\text{NaNO}_2$	24	20	14	0.23	-
	PIPERAZINA	24	65	15	0.24	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	24	20-65	11	0.18	-
	$\text{NaNO}_2$	36	0.85	8	0.13	-
	$\text{NaNO}_2$	36	20	21	0.35	-
	PIPERAZINA	36	65	23	0.36	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	36	0.85-65	20	0.33	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	36	20-65	21	0.35	-
	CONTROL	36	--	10	0.16	-
H I G A D O  F E T A L	$\text{NaNO}_2$	24	20	27	0.22	-
	PIPERAZINA	24	65	26	0.21	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	24	20-65	24	0.20	-
	$\text{NaNO}_2$	36	0.85	20	0.16	-
	$\text{NaNO}_2$	36	20	28	0.23	-
	PIPERAZINA	36	65	17	0.14	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	36	0.85-65	18	0.15	-
	PIPERAZINA y $\text{NaNO}_2$	36	20-65	18	0.15	-
	CONTROL	36	--	16	0.13	-

$p < 0.01$

**TABLA 8**

FRECUENCIA DE MICRONUCLEOS (MN) EN LOS ERITROCITOS POLICROMATICOS (POL) DE HIGADO FETAL DE RATON DESPUES DE UN TRATAMIENTO MULTIPLE ( 27, 21 Y 15 HORAS) POR VIA ORAL CON PIPERAZINA Y NITRITO DE SODIO ( $\text{NaNO}_2$ ) EL DIA 16 DE GESTACION.

TEJIDO	COMPUESTO	DOSIS mg/Kg	POL CON MN	PORCENTAJE POL CON MN	RESULTADO ESTADISTICO
H I F E T A D A L	CONTROL	--	20	0.16	-
	$\text{NaNO}_2$	20	21	0.17	-
	PIPERAZINA	65	17	0.14	-
	$\text{NaNO}_2$ y	20-65	22	0.18	-
	PIPERAZINA				

Se analizaron tres animales por grupo, dos fetos por camada y 2000 POL por feto.

$p < 0.01$

## DISCUSION Y CONCLUSION.

Algunos estudios reportan que la mononitrosopiperazina y la dinitrosopiperazina son carcinógenos, los cuales pueden originarse de la reacción entre la piperazina y el nitrito de sodio (11, 61, 62 y 63). En nuestro laboratorio se ha observado en experimento con ratones, que esas sustancias reaccionan *in vivo* y forman un compuesto mutagénico que se excreta en la orina en forma de derivado glucoronido y que manifiesta su efecto al incrementar el número de colonias revertantes de *Salmonella typhimurium*. (60). Nos pareció importante tomar como modelo a la piperazina y el nitrito de sodio y evaluar si la formación endógena de nitrosopiperazinas, de acuerdo con lo señalado por Cole y colabs., puede ser detectada con mayor facilidad por el hígado fetal de ratón (49), ya que las nitrosaminas no han mostrado ser mutagénicas en estudios citogenéticos en médula ósea de mamíferos. La evaluación de éstos compuestos en pruebas más sencillas que las de carcinogénesis podría representar el contar con un número mayor de compuestos estudiados en un tiempo menor y con un costo inferior.

Varias nitrosaminas han mostrado que se metabolizan de una manera muy lenta, observándose que la frecuencia de micronúcleos en hígado fetal se incrementa de 30 a 36 horas después de su aplicación [por ejemplo la dietilnitrosamina (49)].

En el presente estudio se administró en una ocasión la piperazina (65 mg/Kg) y el nitrito de sodio (0.85 y 20 mg/Kg) simultáneamente, recuperando las muestras a las 24 y 36 horas después del tratamiento, sin embargo, la frecuencia basal de micronúcleos no se incremento con respec-



to al control. Podemos suponer que una sola aplicación de los compuestos no fue suficiente para formar los derivados nitrosados; o bien se produjeron en concentraciones mínimas y sus efectos no se manifestaron.

Con el fin de incrementar la sensibilidad de la prueba se realizó un tratamiento múltiple, pero en estas condiciones la frecuencia de micronúcleos fue similar al control. Lo anterior podría deberse a que la concentración de nitrito de sodio no fue la indicada para que la reacción de nitrificación se llevara a cabo. Se ha reportado que la cinética de nitrosación *in vivo* esté determinada por la concentración de la amina, multiplicada por la concentración del nitrito a la segunda potencia (17). Por otro lado, D. Luca (1987) reportó que el nitrito de sodio tiene efectos tóxicos en médula ósea de ratón, lo que limita al presente estudio, ya que si se aumenta la concentración de nitrito de sodio, pudiera tener un efecto tóxico y de esta manera enmascarar el daño producido por el compuesto formado endogenamente

Cole reportó que la prueba de micronúcleos transplantaria es más sensible que la de médula ósea para detectar nitrosaminas, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio nos muestran que en las condiciones evaluadas, la prueba de micronúcleos en hígado fetal de ratón no es lo suficientemente sensible como para detectar el compuesto carcinogénico que se forma a partir de la piperazina y el nitrito de sodio.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Tomatis, L., Agthe, C., Bartsch, H., Huff, J., Montesano, R. Saracci, R., Walker, E. y J. Wilbourn. 1978. Evaluation of the carcinogenicity of chemicals. A review of the monograph program of the International Agency for Research in Cancer. *Cancer Research*. 38: 877-885.
2. Kalter, H. 1971. Correlations between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals. In: *Chemical Mutagens Principles and Methods for their detection*. Ed. A. Hollaender. 1: 57.
3. de Serres, F.J. 1978. Introduction: Utilization of higher plant systems as monitors of environmental mutagens. *Environmental Health Perspectives*. 27: 3-6.
4. Ames, B. N. 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*. 221: 1256-1263.
5. Hoffman, D. y J. D. Adams. 1981. Carcinogenic tobacco specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers. *Cancer Research*. 41(11): 4305-4308.
6. Poirier, S., Oshima, H., et. al. 1987. Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, South China and Greenland, high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Int. J. Cancer*. 39: 293-295.
7. Bartsch, H., Ohshima, H., Nair, J., Pignatelli, B. y S. Calmels. 1986. Modifiers of endogenous nitrosamine synthesis and metabolism. In M. Sankel, E.

- Hartman, R. Kada and A. Hollander. Antimutagens and Anticarcinogenesis Mechanisms. Plenum Press. New York and London. 87-102.
- 8 Magee, P.N. y J.M. Barnes. 1956. The production of malignant primary hepatic tumours in rat by feeding dimethylnitrosamine. Br. J. Cancer. 10: 114-122.
  9. Börzsönyi, M., Pinter, A., Surgan, A. y G. Török. 1978. Carcinogenic effect of a guanidine pesticide administered with nitrite on adult mice, and on the offspring after prenatal exposure. Cancer Letters. 5: 107-113.
  10. Börzsönyi, M., Török, G., A. Pintér, A. Surján, L. Nádasdi y P. Roller. 1980. Carcinogenic effect of dinitrosopiperazine in adult swiss mice and after transplacental or translactational exposure. Cancer Research. 40: 2925-2927.
  11. Greenblatt, M. y S.S. Mirvish. 1972. Dose-response studies with concurrent administration of piperazine and sodium nitrite to strain of mice. Journal of the National Cancer Institute. 49: 119-124.
  12. García, H., Keefer, L., Lijinsky, W. y C.E.M. Wenyon. 1970. Carcinogenicity of Nitrosothiomorpholine and 1-Nitrosopiperazine in rats. Z. Krebsforsch 74: 179-184
  13. Ashby, J. y P.W. Tennant. 1968. Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/N.P. Mutation Research 204 (1): 17-115.

14. Fielder, W. 1975. The occurrence and determination of N-Nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 31: 352-360.
15. Lijinsky, W., Conrad, E. y Van de Bogart. 1972. Carcinogenic nitrosamines formed by drug/nitrit interactions. *Nature*. 239: 165-167.
16. Mirvish, S.S. 1975. Formation of N-Nitroso compounds: Chemistry, Kinetics and in vivo occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 31: 325-351.
17. Scanlan, R.A. 1983. Formation and occurrence of nitrosamines in food. *Cancer Research*. 43: 2435-2440.
18. Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole J. y C.F. Arlett. 1981. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Mutation Research*. 80: 141-157.
19. Cole, R. J., Aghamohammadi, Z., Cole, J. y L. Henderson. 1982. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. Multiple-dose regimes in the transplacental micronucleus test. *Mutation Research*. 105: 115-120.
20. Schmähl, D. y M. Habs. 1980. Carcinogenicity of N-Nitroso compounds. *Oncology*. 37: 237-242.
21. Shank, R. 1975. Toxicology of N-Nitroso compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 31: 361-368.

22. Sugimura, T. y S. Sato. 1983. Mutagens-carcinogens in food. *Cancer Research (Suppl. 43)*: 2451.
23. Lijinsky, W. y S.S. Epstein. 1970. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*. 25: 21-23.
24. Lijinsky, W. 1980. Significance of *in vivo* formation of N-Nitroso compounds. *Oncology*. 37: 21-23.
25. Barale, R., Zucconi, D. Bertani, R. and N. Loprieno. 1983. Vegetables inhibit, *in vivo*, the mutagenicity of nitrite combined with nitrosable compounds. *Mutation Research*. 120: 145-150.
26. Mirvish, S.S. 1986. Effects of vitamins C and E on N-Nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer. *Cancer*. 58: 1842-1850.
27. World Health Organization. 1978. Nitrates, nitrites and N-Nitroso compounds. Health criteria documents 5.
28. Schmid, W. 1973. Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. 1973. *Agents and Actions*. 3(2): 77-85.
29. Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research*. 31: 9-15.
30. Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In *Chemical Mutagens*, Vo. 4, ed. A. Hollaender, Plenum Press, New York., 31-53 pp.

31. Countryman, P.I. y J.A. Heddle. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*. 41: 321-332.
32. Heddle, J.A. y A.V. Carrano. 1977. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by  $\gamma$ -irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research*. 44: 63-69.
33. Sudharsan-Raj, A. y J.A. Heddle. 1980. Simultaneous detection of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges. *Mutation Research*. 78: 253-260.
34. Heddle, J.A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*. 18: 187-190.
35. Leeson, C.R. y Leeson, T.S. 1977. *Histología*. Nueva Editorial Interamericana, 6a ed. México, D.F.
36. Von Ledebur, M. y W. Schmid. 1973. The micronucleus test, Methodological aspects. *Mutation Research*. 19: 109-117.
37. Shelby, M.D. 1988. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutation Research*. 204(1): 3-15.
38. Jenssen, D. y C. Ramel. 1980. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutation Research* 75: 191-202.

39. MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R. y D. Wild. 1987. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*. 189: 103-112.
40. Collaborative Study Group for the micronucleus test. 1986. Sex difference in the micronucleus test. *Mutation Research*. 172: 151-163.
41. Collaborative Study Group for the micronucleus test. 1988. Strain difference in the micronucleus test. *Mutation Research*. 204: 307-316.
42. Collaborative Study Group for the micronucleus test. 1989. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. *Mutation Research*. 223(4): 329-344.
43. Jiménez, Y.I. 1984. Comparación de la actividad genotóxica de ciclofosfamida y niclosamida en médula ósea de ratón. Tesis. UNAN. México. 45 p.
44. Proudlock, R.J. y J.A. Allen. 1986. Micronuclei and other nuclear anomalies induced in various organs by diethylnitrosamine and 7,12 dimethylbenzoflanthracene. *Mutation Research*. 174: 141-143.
45. Stoyel, C.J. y A.M. Clark. 1980. The transplacental micronucleus test. *Mutation Research*. 74: 393-398.

46. Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole J. y C.F. Arlett. 1979. Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test. *Nature*. 277: 317-318.
47. Tarbutt, R.G. y R.J. Cole. 1970. Cell population kinetics of erythroid tissue in the liver of foetal mice. *J. Embryol. exp. Morph.* 24(2): 429-446.
48. Cole, R.J., Cole, J., Henderson, L., Taylor, N.A., Arlett, C.F. y T. Regan. 1983. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts. *Mutation Research*. 113: 61-75.
49. Cole, R.J., Taylor, N.A., Cole, J., Henderson, L. y C.F. Arlett. 1982. Short-term tests for transplacentally active carcinogens. Sensitivity of the transplacental micronucleus test to diethylnitrosamine. *Mutation Research*. 104: 165-171.
50. Cihák, R. y M. Vontorková. 1985. Cytogenetic effects of quinoxaline-1-4-dioxide-type growth-promoting agents. III Transplacental micronucleus test in mice. *Mutation Research*. 144: 81-84.
51. Yamamoto, K.I. y Kikuchi. 1984. Induction of micronuclei in mouse fetal liver after exposure in utero to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutation Research*. 128: 173-179.
52. Henderson, L. y T. Regan. 1985. Effects of diethylstilboestrol-dipropionate on SCEs, micronuclei, cytotoxicity, aneuploidy and cell proliferation.



tion in maternal and foetal mouse cells treated in vivo. Mutation Research. 144: 27-31.

53. Sinha, A. y A.R. Rao, 1985. Transplacental micronucleus inducing ability of arecoline, a betel nut alkaloid, in mice. Mutation Research. 158: 193-194.
54. Ciranni, R., Barale, R., Marrazzini, A. y N. Loprieno. 1988. Benzene and the genotoxicity of its metabolites. I. Transplacental activity in mouse fetuses and in their dams. Mutation Research. 208: 61-67.
55. Drugs for parasitic infections. 1988. The medical letter. 30: 15-24.
56. Goodman, L.S. y A.G. Gilman. 1980. The pharmacological basis of therapeutics. 6th. ed. MacMillan Co. New York. 1023-1024 pp.
57. Zeiger, E., Legator, M.S. y W. Lijinsky. 1972. Mutagenicity of N-Nitrosopiperazines for *Salmonella typhimurium* in the host-mediated assay. Cancer Res. 32: 1598-1599.
58. Kameswar, R.T., Young, J.A., Lijinsky, W. y J. L. Epler. 1978. Mutagenicity of N-nitrosopiperazine derivatives in *Salmonella typhimurium*. Mutation Research 57: 127-134.
59. Andrews, A.W., Lenita H. Thibault y W. Lijinsky. 1978. The relationship between mutagenicity and carcinogenicity of some nitrosamines. Mutation Research. 51: 319-326.

60. Arriaga Alba M. 1988. Estudio de la actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* de compuestos N-nitrosos derivados de medicamentos antiparasitarios aminados. Tesis doctoral. UNAM. México, D.F.
61. Bellander, T., Bengt-Göran Österdahl y L. Harmar. 1985. Formation of N-Mononitrosopiperazine in the stomach and its excretion in the urine after oral intake of piperazine. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 80: 193-198.
62. Bellander, T., Bengt-Göran Österdahl y L. Harmar. 1984. N-Mononitrosopiperazine in urine after occupational exposure to piperazine. In *N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer* (IARC Scientific Publications No. 57), I.K. O'Neill, R.C. von Borstel, C.T. Miller, J. Long, y H. Bartsch, eds. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 553-555.
63. Bellander, T., Bengt-Göran Österdahl y L. Harmar. 1988. Excretion of N-Mononitrosopiperazine after low level exposure to piperazine in air: effects of dietary nitrate and ascorbate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 93: 281-287.
64. Hafez, E.S.E. 1970. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea and Febiger, Philadelphia. 299-306 pp.
65. Whittingham, D.G. y M.J. Wood. 1983. The mouse in biomedical Research. American College of Laboratory animal medicine press. Vol. III, Cap. 9.

66. Kastenbaum, M.A. y K.O. Bowman. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*. 9: 527-549.
67. Luca, D., Cotor, F.I., Luca, V. y L. Raileanu. 1987. *In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Research*. 189: 333-339.
68. Soheir M. El Nahas, Morton Globus y Swani Vethama-ny-Globus. 1984. Chromosomal aberrations induced by sodium nitrite in bone marrow of adult rats and liver cells of transplacentally exposed embryos. *J. of Toxicology and Environmental Health*. 13: 643-647.