

ENSAYO DE MUTAGENICIDAD DE UN COMPUESTO CON ACTIVIDAD BRONCODILATADORA

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Lic. Ada de las Cagigas,* Lic. Daysi Carvajal,*
Lic. Nélida Castillo** y Lic. Virgen Milián**

RESUMEN

El asma bronquial es una enfermedad de alta prevalencia en nuestro país, que se convierte en un azote para los niños fundamentalmente por debajo de los 5 años, donde constituye una de las causas mayores de ingreso y limita al paciente de sus actividades cotidianas. En este trabajo se evaluó la mutagenicidad del compuesto 8 nicotinamidopiridoquinazolona, que demostró buena actividad antiasmática en cobayos, con el uso del ensayo de Ames y la fracción microsomal hepática obtenida de ratas Sprague Dawley, este compuesto resultó ser un mutágeno directo capaz de producir mutaciones tanto del tipo de corrimiento del marco de lectura como sustitución de pares de bases.

INTRODUCCION

En Cuba, el asma bronquial es una enfermedad de alta prevalencia (8,2 %), lo que nos da una idea de que existen alrededor de 800 000 personas asmáticas.¹

El asma puede ser definida como una condición de hiperreactividad bronquial que presentan algunos individuos, consistente en el estrechamiento de las vías aéreas bronquiales.² Algunos autores refieren que es el sexo masculino el más afectado durante la infancia;^{1,3,4} en cuanto a la edad se plantea la aparición de síntomas en edades tempranas, con cifras de alrededor del 40 % en el primer año y del 57 % durante el segundo año.⁵ Aunque la mortalidad es baja, constituye una de las causas de ingreso más alta por debajo de los 5 años en nuestros hospitales;⁶ además, el niño asmático se convierte en un ser protegido, al que muy frecuentemente se le niega expansionarse libremente por temor a una crisis.

* Licenciada en Bioquímica.

** Licenciada en Química.

Debido a la variabilidad de la respuesta del paciente asmático frente a las drogas que actualmente se usan en el tratamiento de esta enfermedad, las reacciones secundarias o tóxicas, la taquifilaxis, la tolerancia que se observa con el uso de estas drogas y la búsqueda de nuevas sustancias, continúa siendo el objetivo de investigaciones importantes que se realizan con el fin de mejorar el arsenal terapéutico con que se dispone en la actualidad.⁷

Las piridoquinazolonas son estudiadas actualmente para su posible utilización como drogas antiastmáticas, dentro de éstas se encuentra el (2-amino-11H-piridoquinazolin-11-ona), 2APQ, compuesto que produce broncodilatación in vitro e in vivo, que es capaz de inhibir el broncoespasmo inducido por histamina en dosis similares a la aminofilina,⁸ el cual, al ser evaluada su respuesta mutagénica, resultó ser positiva, y se incrementó su respuesta en presencia de la fracción microsomal hepática.⁹

Como la molécula de piridoquinazolona sin sustituyentes no mostró efecto mutagénico en ninguna de las 5 cepas de *Salmonella typhimurium* con o sin activación metabólica, se realizó la síntesis de otros derivados como la 8APQ y su amida,¹⁰ a los cuales se les evaluó su riesgo mutagénico (figuras 1 y 2).

En nuestro trabajo mostramos los resultados de la evaluación de la amida (8 nicotinamidopiridoquinazolona), con la utilización del test de Ames.

MATERIAL Y METODO

Las cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas fueron: TA1535, TA1537, TA1538, TA98 y TA100; estas cepas son mutantes auxotróficos para la histidina, y además tienen otras mutaciones adicionales como una detección en el gen que codifica para un sistema de reparación por escisión del ADN, lo que incrementa grandemente la sensibilidad para la detección del mutágeno; una mutación en un gen que codifica para polisacáridos presentes en la pared bacteriana, por lo que se incrementa la permeabilidad a macromoléculas foráneas incapaces de penetrar a través de la pared normal. Las cepas TA98 y TA100 portan además el plásmido PKM101, que le confiere resistencia al

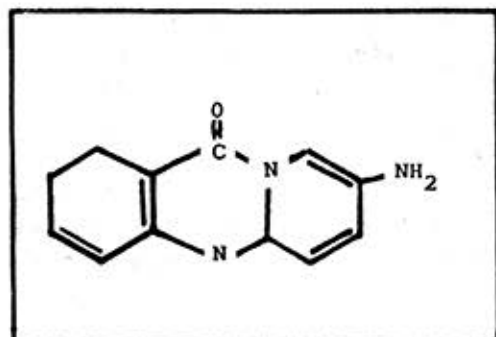


FIGURA 1. (8 APQ) 1-8- NH_2 - 11H (2,1-b) quinazolin - 11 - óna.

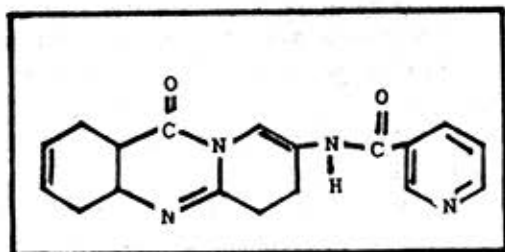


FIGURA 2. Nicotinamida del 8 APQ.

ampicillin, el cual incrementa la mutagénesis a través del mecanismo de reparación por error prone. Las cepas TA1537, TA1538 y TA98 detectan mutágenos que causan corrimiento del marco de lectura, mientras que la TA1535 y la TA100 detectan mutágenos que producen sustitución de pares de bases.

La fracción microsomal hepática fue obtenida de ratas Sprague Dawley de 200 g de peso, el agente inductor utilizado fue el aroclor 1254, administrado en dosis única (500 mg/kg por vía intraperitoneal 5 días antes del sacrificio), el hígado fue extraído con material estéril y frío, posteriormente homogeneizado y centrifugado a 9 000 g, el sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso.

Se probaron 5 concentraciones del producto disuelto en dimetilsulfóxido, por el método de incorporación en placa (II).

Los controles fueron montados con las cepas y el solvente; el número de revertantes por placas se consideró significativo cuando aumentó 2 veces el valor de los revertantes del control.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla se muestran los valores obtenidos después de 48 horas de incubación a 37°C de las placas que contenían el compuesto y las células, en presencia o no de la fracción S_9 .

TABLA. Mutagenicidad de la 8 nicotinamidopiridoquinazolona en las cepas de Salmonella typhimurium TA1435, TA1537, TA1538, TA98 y TA100 con o sin S_9

Concentración µg/placa	TA1535		TA1537		TA1538		TA98		TA100	
	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9
0	5	7	9	8	6	5	13	15	45	50
50	5	8	9	9	8	8	15	16	47	50
100	6	7	8	9	7	8	14	15	48	53
500	5	9	7	8	22*	25*	13	30*	51	50
1 000	15*	16*	7	9	60*	81*	15	38*	55	65
2 000	10*	15*	8	7	124*	132*	30*	35*	91*	104

En las concentraciones menores, para ninguna cepa los revertantes por placas rebasaron 2 veces la espontánea de las mismas, en la concentración de 500 µg/placas hay una marcada respuesta positiva en la cepa TA1538 y un valor limitrofe en la TA98 en presencia del S_9 . En la concentración de 1 000 µg/placa aparece respuesta positiva en la cepa TA1535, y a la mayor concentración hay respuesta limitrofe en la TA100, en presencia o ausencia del S_9 .

Este compuesto es capaz de inducir ambos tipos de mutaciones, aunque las mejores respuestas se obtuvieron en las cepas que detectan corrimiento del marco de lectura, tal es el caso de la TA1538. Este es un compuesto capaz de producir daño genotóxico directamente, sin la necesidad de transformación metabólica en el organismo para convertirse en un metabolito reactivo, por medio del sistema enzimático de las monoxinasas de función múltiple, aunque en presencia de la fracción S_9 (que es donde estas enzimas se hallan contenidas) la respuesta se encuentra amplificada. Estas enzimas no sólo son capaces de catalizar reacciones donde el compuesto sea activado, sino que además ellas intervienen en reacciones de detoxificación por medio de las cuales los compuestos son llevados a formas no reactivas y eliminados del organismo, por ello, en ocasiones, en presencia de la fracción S_9 se puede observar disminución de la respuesta.

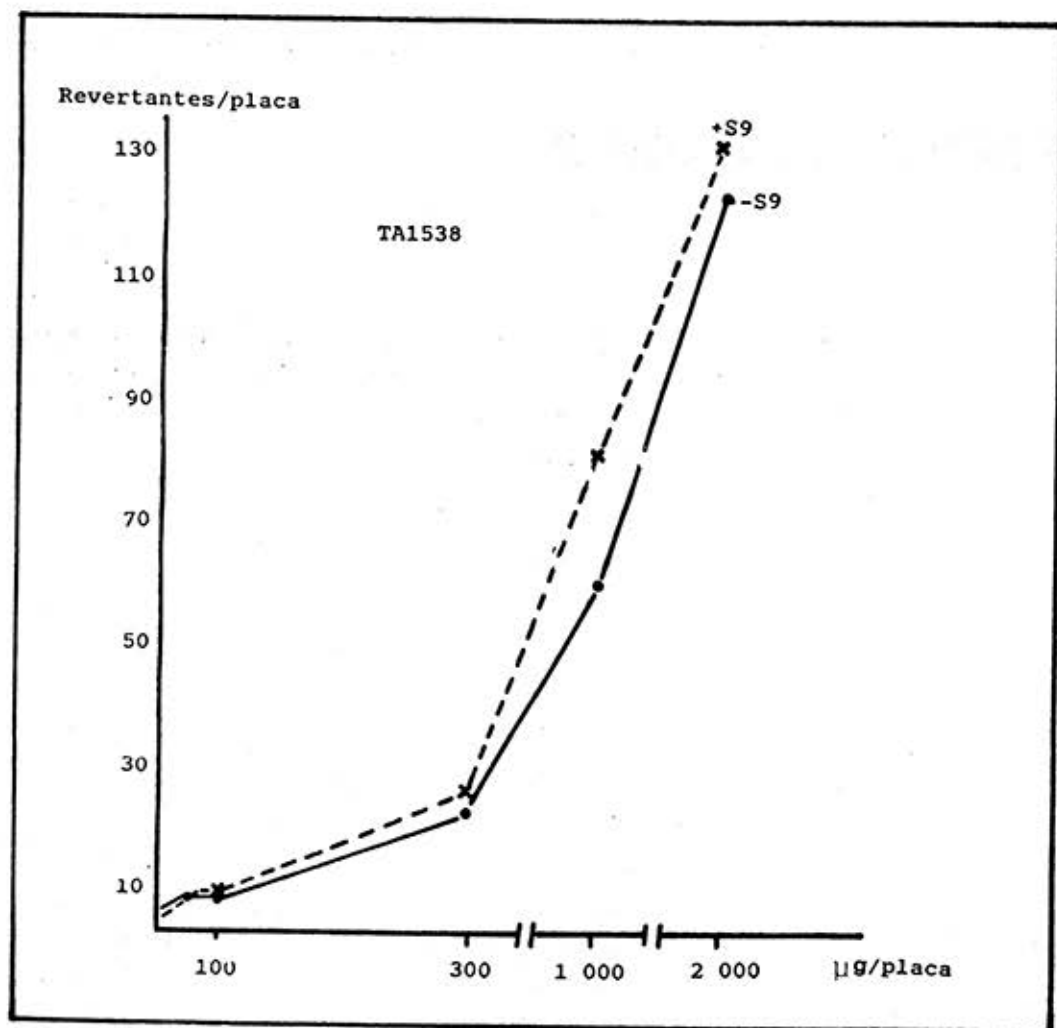


FIGURA 3. Revertantes por placa.

En la figura 3 se muestra el ploteo de los valores de revertantes obtenidos para la cepa TA1538 contra la concentración del compuesto expresada en $\mu\text{g/placa}$. Podemos observar en el gráfico cómo se produce un aumento del número de colonias revertantes por placa con la dosis; éste se hace más evidente en presencia de la fracción microsomal S_9 .

CONCLUSIONES

Este compuesto, a pesar de mostrar una buena actividad antiinflamatoria y antiasmática en cobayos, ha demostrado ser un mutágeno capaz de producir daño en las moléculas biológicas del organismo, por lo que no podrá ser utilizado con fines terapéuticos en humanos, donde una alteración fijada traería consecuencias no sólo para el individuo sino también para su descendencia. Proponemos la búsqueda de otros derivados que conserven sus propiedades farmacológicas y donde sea eliminado el efecto mutagénico.

SUMMARY

Bronchial asthma is a high prevalent disease in our country, which becomes a whip for children, mainly for those under five years, being one of the main causes of hospitalization and limits patient in daily activities. Mutagenicity of 8-nicotinamidepyridoquinazalone compound, which demonstrated good antiasthmatic activity in guinea pigs, was evaluated in this paper using Ames assay and hepatic microsomal fraction obtained from Sprague Dawley rats. This compound resulted to be a direct mutagen able to produce mutations either of the type of reading frame running or replacement of base pairs.

RESUME

L'asthme bronchique est une maladie à haute prévalence à notre pays, qui devient un fléau pour les enfants, notamment au-dessous 5 ans. Elle constitue l'une des causes les plus importantes d'hospitalisation et limite le malade dans les activités quotidiennes. Dans ce travail on a évalué la mutagénicité du composé 8-nicotinamido-pirido-quinazalone, qui a démontré une bonne activité antiasthmatic chez des cobayes, en employant l'essai d'Ames et la fraction microsomale hépatique obtenue de rats Sprague Dawley. Ce composé s'est révélé comme un mutagène direct susceptible de produire des mutations aussi bien du type de déplacement du cadre de lecture que de substitution de paires de bases.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. RODRIGUEZ DE LA VEGA, A.; F. TEJEIRO: Investigación de la prevalencia nacional de asma bronquial en Cuba. Rev Cubana Adm Salud 9: 95-118, junio, 1983.
2. CHARPIN, J.; J. OREHEK: General orientations of the physiopathologie of asthma. Respiration 42 (Suppl): 1-3, 1981.
3. SPEIZER, P. E.: Aspectos epidemiológicos del asma bronquial. Sandoz Latinoamericana (Panamá). SAM-ZEN-2: 7-12, 1983.

4. RODRIGUEZ DE LA VEGA, A.: Investigación sobre la prevalencia y herencia de asma bronquial en San Antonio de los Baños. Rev Cubana Med 14 (3): 399-423, mayo-junio, 1975.
5. ELLIS, E. F.: Asthma in early life. In: Text book of Pediatropov. Vaughan et al. (Eds.): 11th ed. Philadelphia, pp. 627-635, 1979.
6. PEREZ, E.: Niveles séricos de teofilina en un grupo de 20 niños asmáticos. Tesis de grado en Pediatría. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana, 1987.
7. ARRUZAZABALA, M. L.: Efectos y mecanismos de acción de varias drogas profilácticas antiasmáticas en el músculo liso intestinal y de vías aéreas de animales de experimentación. Tesis de Candidatura. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, 1983.
8. ARRUZAZABALA, M. L. ET AL.: Propiedades broncodilatadoras de un derivado de las piridoquinazolonas. Rev Ciencias Biológicas 13: 2, 1982.
9. JIMENEZ, M. A.; M. TORROELLA: Mutagenicidad de algunas piridoquinazolonas. Rev Ciencias Biológicas, 13: 2, 1982.
10. PELLON, R.; L. RODES: Proceso de producción de la 11-H-pirido (2.1-b) 11 quinazolona y derivados. Patente No. 34250, República de Cuba, 1975.
11. MARON, D. M.; B. N. AMES: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research 113: 173-215, 1983.

Recibido: 21 de octubre de 1987. Aprobado: 24 de noviembre de 1987.

Lic. Ada de las Cajigas. CENIC. Ave. 25 No. 15204, Ciudad de La Habana 11600, Cuba.