

## METODOS DE INVESTIGACION DE LOS CARCINOGENOS AMBIENTALES.

**Paloma Rodríguez Almagro**

Licenciada en Medicina.

El prototipo de cáncer producido por el medio ambiente es el cáncer profesional. Representa un alto porcentaje del total de casos de cancer y es producido por carcinógenos químicos o físicos con los que contacta el trabajador. Tales cánceres no se desarrollan sin la intervención de estos carcinógenos y aparece por tanto un patrón epidemiológico especial. Su principal órgano de actuación difiere según las propiedades intrínsecas del carcinógeno, y depende también de la zona de contacto; la mayoría de los cánceres profesionales, sin embargo, afectan a la piel, pulmones y vejiga.

La liberación de residuos industriales en el aire, agua y suelo, representa un alto riesgo ambiental de producción de cancer, ya que proporciona una gran cantidad de carcinógenos que han contribuido al aumento de frecuencia del cáncer de pulmón y vejiga. En este sentido, debemos mencionar la existencia de los cánceres de vecindad, que afectan a las personas que viven en los alrededores de ciertas industrias.

Un programa útil de profilaxis y control preventivo del cancer profesional incluye la aplicación de medidas sanitarias e higiénicas y procedimientos técnicos que permitan reducir o eliminar el contacto de los trabajadores con la sustancia carcinógena, así como detectar la posible existencia de carcinógenos, aún desconocidos. Para este fin son importantes los análisis periódicos de aire, polvo de suelo, etc., en los lugares de trabajo. El procedimiento de eliminación de residuos, debe asegurar que los materiales liberados al medio ambiente no sean cancerígenos.

La única forma de eliminar el riesgo cancerígeno es evitando el uso y la producción de los carcinóge-

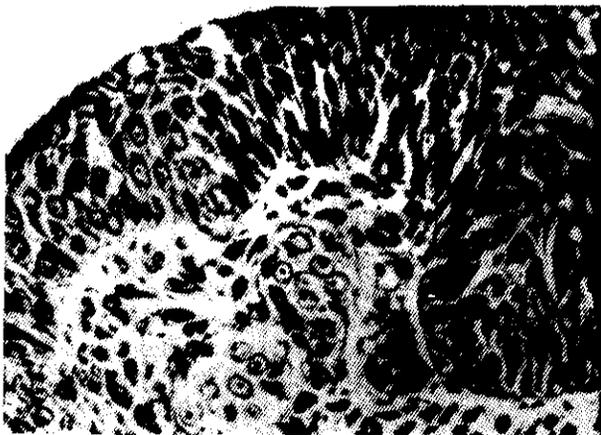
nos, medida que se ha puesto en práctica para una serie de sustancias como la 2 naftilamina y 4 aminodifenilo, entre otras.

Este trabajo trata de exponer cuales son los métodos actualmente utilizados en la detección de sustancias químicas con poder carcinógeno.

Los experimentos realizados hasta ahora permiten distinguir: 1° Una cierta proporción de cánceres humanos invariablemente atribuidos a sustancias químicas conocidas; 2° Un gran número de sustancias químicas identificadas como posibles carcinógenos para el hombre, pero solo de modo experimental.

Los tipos de pruebas utilizadas podemos dividirlos en:

- Experimentos a largo plazo.
- Experimentos a corto plazo.



*Carcinoma escamoso en bronquio de un perro que ha fumado 6.210 cigarrillos.*

*Tomada de Hammond, E.C.: Effects of cigarette smoking on dogs. Cancer 21; 78, 1971.*

## EXPERIMENTOS A LARGO PLAZO

### Estudios epidemiológicos:

La mayoría de las sustancias químicas comprobadas como causantes de cancer en el hombre fueron encontradas en exposiciones ocupacionales o médicas, a altas dosis y en grupos de población relativamente pequeños y fácilmente identificables. Son los que arrojan una mayor fiabilidad. Sin embargo, estos métodos tienen graves limitaciones, como son el hecho de que las exposiciones individuales a fac-

tores de riesgo no pueden ser debidamente controladas, la influencia de factores confusos, el gran tamaño de las poblaciones estudiadas y su escasa sensibilidad. Dado estas limitaciones, la identificación de sustancias químicas posiblemente cancerígenas se basa principalmente en el resultado de los tests experimentales.

### Pruebas sobre animales experimentales:

Basadas en observar los efectos de los posibles carcinógenos sobre animales de experimentación, utilizando un número limitado de animales y exponiéndolos a dosis altas para aumentar así la sensibilidad de las pruebas.

La mayoría de las sustancias químicas cancerígenas para el hombre, lo son también para una o más de las especies de animales experimentados, y además, la evidencia de carcinogénesis experimental ha precedido en muchos casos a observaciones en humanos.

En el año 1971 se inició un programa de investigación por la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cancer), que abarcó el estudio de 442 sustancias. Consistió en la elaboración de monografías sobre compuestos individuales o grupos de compuestos, o procesos industriales, las cuales están en continua revisión y ampliación.

De la correlación entre datos humanos y pruebas a largo plazo sobre animales podemos sacar las siguientes conclusiones:

- 1°) La mayoría de las sustancias químicas para las cuales existe suficiente evidencia de carcinogénesis en humanos, y aquellas para las cuales existe evidencia probable, se demuestra que son cancerígenos en los animales de experimentación.
- 2°) En algunos casos, la evidencia experimental de carcinogenicidad precedió a observaciones humanas.
- 3°) Los carcinógenos pueden afectar al mismo órgano en humanos y en animales, pero esto no es en absoluto una regla.
- 4°) La evidencia de un efecto carcinógeno en el animal es frecuentemente obtenida por una vía de exposición distinta a la que se da en el hombre. Aunque parece lógico que los animales deben ser expuestos a través de las mismas vías por las que penetra el carcinógeno

en los humanos, esto no es siempre posible. La vía subcutánea es la más frecuentemente usada en el animal, y es altamente fiable para predecir que una sustancia va a ser carcinógeno cuando se administre por otras vías.

## Resultados obtenidos por tests a largo plazo sobre animales, en ausencia de datos humanos:

Según el criterio de la IARC, las sustancias químicas para las que existe "evidencia suficiente" de carcinógenosis en animales de experimentación deben considerarse como carcinógenas para el hombre; y aquellas para las que solo existe "evidencia limitada" requieren mayor número de investigaciones experimentales para considerarlas como cancerígenas en el hombre. Se considera que existe "evidencia suficiente", cuando se obtienen uno o más de los siguientes resultados:

- Tumores malignos en múltiples especies.
- Tumores malignos en múltiples experimentos.
- Tumores malignos en grado poco usual (en relación con la incidencia, lugar, tipo o precocidad.)

"Evidencia limitada" significa que se obtienen datos relevantes pero limitados y que se refieren a una sola especie o experimento, o los tumores que aparecen son difíciles de clasificar como malignos por criterios histológicos.

Esta división es útil para facilitar la labor de los organismos oficiales encargados de la prevención primaria del cancer.

## EXPERIMENTOS A CORTO PLAZO

### Generalidades:

Las sustancias químicas industriales básicas son tan numerosas y las formulaciones tan variadas, que resultaría imposible evaluar su riesgo potencial por las vías de la experimentación animal prolongada y repetitiva, cuyas conclusiones son por tanto, diferidas. Por esta razón los experimentos a corto plazo, relativamente menos costosos, que permiten poner en evidencia el poder mutágeno y sospechar las propiedades carcinógenas de una sustancia química, son ampliamente utilizados.

En efecto, numerosos carcinógenos químicos

son conocidos por ser igualmente mutágenos y viceversa. El estudio del poder mutágeno de un producto es un índice del riesgo carcinógeno general y del peligro que representa a priori para el hombre.

### Fiabilidad:

La utilización de una combinación apropiada de este tipo de pruebas facilitan una mayor fiabilidad que la utilización de una sola de ellas. La fiabilidad de las mismas es función directa de su sensibilidad (capacidad para identificar carcinógenos), su especificidad (poder de discriminar entre carcinógenos y no carcinógenos) y su valor predictivo. Sin embargo, el valor predictivo de una prueba es también una función de la proporción de carcinógenos que existe en el grupo de sustancias analizadas.

Exponemos a continuación los resultados con la prueba de salmonella/microsoma:

	Ejemplo 1	Ejemplo 2
Sensibilidad.....	90%	90%
Especificidad.....	87%	90%
Valor predictivo.....	92%	8'3%
Proporción de carcinógenos...	62%	1%

Ejemplo 1 --300 sustancias químicas de las cuales el 62% eran carcinógenas.

Ejemplo 2 --1.000 sustancias químicas de las cuales solo el 11% eran carcinógenas. La prueba predijo que 108 eran carcinógenos, mientras que solamente 9 lo fueron realmente.

### Utilidad:

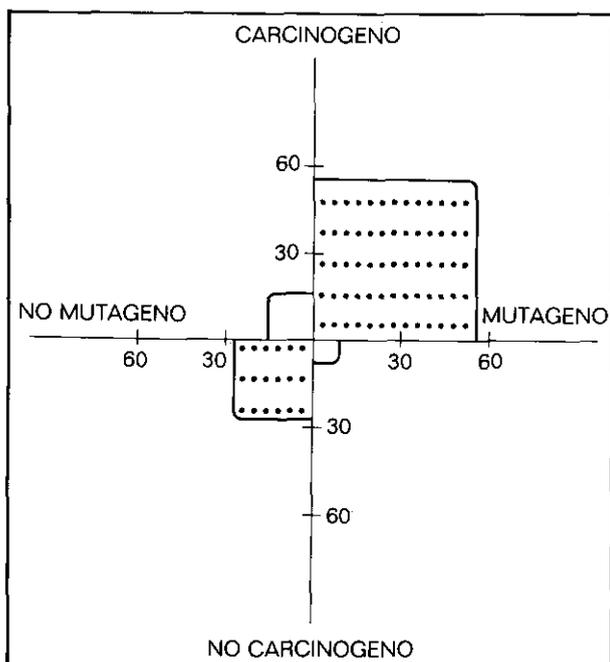
Son usados como técnica de screening para detectar y aislar sustancias químicas potencialmente peligrosas, entre las miles a las que los hombres estamos expuestos. Esta constituye su principal finalidad.

Ya que se obtiene información cuantitativa (curvas dosis-respuesta) los tests son bastante valorables como ensayo biológico para identificar y purificar componentes mutagénicos en mezclas complejas. Este aspecto fué reflejado en un estudio realizado sobre la actividad mutagénica de condensados de humos de cigarrillos (el condensado de menos de 0,01 cigarrillo, puede ser detectado fácilmente). Recientemente se ha encontrado considerable actividad

mutagénica en la mayoría de los tintes comerciales para el cabello, y algunos de estos compuestos mutagénicos se han identificado. También se ha demostrado que existe considerable actividad mutagénica en el hollín del aire de la ciudad.

La puesta en evidencia de las propiedades mutágenas puede efectuarse sobre los microorganismos. Los mutágenos químicos actúan a nivel del material genético de las células, el ADN, cuya composición y estructura siguen un mismo modelo en todos los seres vivos. El ADN presentado en estado difuso en la célula, es fácilmente accesible y permite determinar exactamente los tipos de mutaciones inducidas y alteraciones en la secuencia o sustitución de una base. Las bacterias ofrecen la ventaja de crecer en una escala de tiempo apreciable en horas. Los conocimientos actuales tienden a probar que las sustancias mutágenas para las bacterias lo son también para organismos superiores y viceversa.

La sustancia puede ser directa o indirectamente mutágena (debiendo entonces ser metabolizada para actuar como tal). Se debe paliar la ausencia de cier-



#### Correlación entre carcinógeno y mutágeno.

Extraído de "Vality of mutagenicity test using microbes a rapid screening method environmental carcinogens" T. Sugimura-IARC scientific. Publications n.º 12 p. 96)

tos sistemas enzimáticos en la bacteria por diferentes procedimientos:

- Utilización de homogeneizados de hígado de rata.
- Sistema del hospedador intermediario: el compuesto a testar es administrado a un animal. Posteriormente los organismos indicadores (bacterias, levaduras, mohos) son inyectados en la cavidad intraperitoneal; después de un lapso de tiempo que permite varias multiplicaciones celulares, las colonias bacterianas son recuperadas y sembradas, y la frecuencia de mutaciones evaluada en relación a un testigo.
- Detección de metabolitos carcinógenos en la orina de animales a los cuales se les hace ingerir el producto sospechoso: el producto metabolizado es excretado en la orina bajo la forma de metabolitos conjugados a un glucurónido. Tras la acción de la beta glucuronidasa que rompe esta unión, las orinas son testadas en el sistema Salmonella typhimurium por ejemplo.

De entre varios tests que utilizan especies bacterianas distintas, el test de Ames es el más ampliamente utilizado, realizándose sobre distintas cepas de Salmonella typhimurium, y es el que parece detectar mayor número de agentes mutágenos, dando los mejores resultados; aunque en prácticas de despistaje debe completarse con otros tests que utilizan:

- otros microorganismos: E. Coli deficiente en ADN polimerasa (Rosenkan, E. Coli W P2, Saccharomyces Cerevisiae, etc)
- otros sistemas de activación metabólica (hospedador intermediario, metabolitos en orina).

#### TEST DE AMES

Se basa en la propiedad que tienen la mayoría de las sustancias carcinógenas de provocar mutaciones reversas sobre cepas de Salmonella typhimurium (S.T), mutaciones que se traducen por modificaciones del carácter nutricional: las cepas de S.T. auxotrofas para la histidina se transforman en cepas prototrofas; la bacteria, capaz de fabricar el enzima que le permite la síntesis de la histidina, se desarrolla entonces en un medio sin histidina. Estas mutaciones pueden producirse espontáneamente, pero su número es mayor bajo la acción de un mutágeno.

Las salmonellas llamadas promutágenas o procarcinógenas, precisan una transformación metabólica para revelar sus propiedades. Bajo la acción de varios sistemas enzimáticos el compuesto inicial se transforma en carcinógeno último, agente electrófilo que actúa sobre los grupos nucleofílicos de los ácidos nucleicos provocando mutaciones. Los sistemas enzimáticos oxidativos capaces de efectuar esta activación se localizan principalmente en los microsomas hepáticos, aunque existen también en otros tejidos como pulmón, tubo digestivo y riñón. Se utiliza principalmente el hígado de rata a las que se suele administrar productos inductores que aumentan la síntesis proteica y estimulan la actividad enzimática; en particular aumento del citocromo P450 a nivel microsomal. Se utilizan dos inductores:

- fenobarbital
- hidrocarburos policíclicos aromáticos, como el metilcolantreno.

Los HPA (hidrocarburos policíclicos aromáticos) estimulan la 2-hidroxilación de bifenilos; y el fenobarbital la 4-hidroxilación pero muy poco la 2-hidroxilación.

La mayoría de los enzimas hepáticos se activan más cuando los inductores se administran conjuntamente.

El Aroclor 1254, mezcla de bifenilos policlorados, es un excelente inductor que persiste mucho tiempo en el organismo, pero presenta el inconveniente de ser resistente a la degradación biológica.

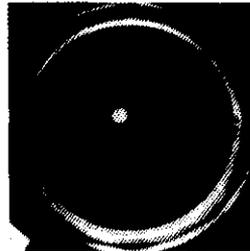
Los extractos así preparados son añadidos al medio al mismo tiempo que el producto a testar.

## MATERIAL Y METODO.

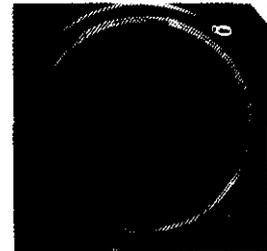
### 1º) Cepas bacterianas

Las cepas elegidas por Ames presentan diferentes tipos de mutaciones a nivel del operon histidina. Las cepas TA 100 y TA 1535 detectan los mutágenos que provocan una sustitución a nivel de los pares de bases (agentes alquilantes). Las cepas TA 98, TA 1537 y TA 1538 detectan mutágenos responsables de una alteración en el cuadro de lectura que resulta de la inserción o delección de un par de bases en el ADN (la estructura de estos agentes es tal que pueden intercalarse en las secuencias de bases y estabilizarlas).

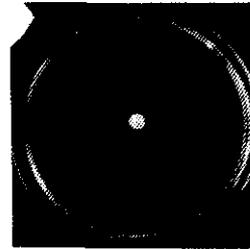
Las cepas presentan otras mutaciones suple-



TA 98: Mutantes espontáneos



TA 98: 2 Aminoantraceno 20 µg (59 PMCA)



TA 100: Mutantes espontáneos



TA 100: Aflatoxina B<sub>1</sub> 0,1 µg (59 PMCA)

mentarias que aumentan la sensibilidad a los agentes mutágenos:

- a) mutación rfa: deficiencia en lipopolisacáridos de membrana, que aumenta la permeabilidad celular a los distintos agentes mutágenos a los que se somete. Esta mutación afecta a las 5 cepas citadas que pierden por tanto su poder patógeno.
- b) introducción de una delección a nivel de la región uvr B del cromosoma; permite la supresión del "sistema de reparación" de las moléculas de ADN dañadas. Esta mutación estabiliza las delecciones aumentando así la sensibilidad a los mutágenos.
- c) introducción de un factor de resistencia a la ampicilina: factor R, debido a la presencia de un plásmido pKM 101.

### 2º) Tratamiento de las cepas

Las cepas bacterianas que se presentan en discos impregnados de medio nutritivo, son puestas en cultivos en un caldo nutritivo Difco al que se añade CINa y agitadas una noche a 37°C; 0,6 ml de este cultivo es repartido en pequeños tubos con 50 microlitros de dimetilsulfóxido (DMSO) y conservado a -70°C. En el momento de su empleo 50 microlitros de esta solución son puestos de nuevo en cultivo durante 15 o 16 horas a 37°C en un caldo nutritivo.

Control de cultivos:

- a) Requerimiento de histidina: las bacterias no deben desarrollarse sobre medios desprovistos de histidina.
- b) Sensibilidad al cristal violeta o al desoxicolato. Un disco de papel filtro estéril impregnado de cristal violeta o de desoxicolato de sodio es colocado sobre un gel nutritivo y todo se recubre con 0,1 ml. de cultivo en caldo nutritivo mezclado con una pequeña cantidad de agua. Después de 12 horas de incubación a 37°C, una zona clara de inhibición alrededor del disco indica la presencia de la mutación rfa.
- c) Resistencia a la ampicilina (TA 98-TA 100): presencia del factor R. Discos impregnados de ampicilina sobre agar con la cepa correspondiente. Ninguna zona de inhibición aparece si está presente el factor R.
- d) Sensibilidad a la irradiación ultravioleta: la deleción uvrB es estable. El cultivo es sometido a la acción de una lámpara germicida. Después de 12-14 horas de incubación a 37°C no debe aparecer ninguna colonia en la zona irradiada.
- e) Número de mutantes espontáneos. El número de colonias aparecidas en medios testigos sin mutágenos y sin S-9, debe ser controlado y aproximarse a los valores elegidos por Ames: 20 mutantes espontáneos para la TA 1535, 7 para la TA 1527, 25 para la TA 1538, 140 para la TA 100 y 40 para la TA 98.

### **3°) Preparación de los extractos hepáticos de rata— S9 MIX.**

La fracción microsomal hepática se prepara siguiendo la técnica preconizada por Ames: el hígado de ratas macho es conservado esteril y congelado nada más extraerlo. Después es troceado y tritado y se le añade CIK. El homogeneizado es centrifugado y los dos tercios del sobrenadante (fracción S9) son conservados estérilmente a -80°C para las pruebas posteriores. Es necesario la adición de NADP a la fracción S9, elemento indispensable para la eficacia de la mezcla. También se añade glucosa 6 fosfato y tampón fosfato que estabiliza la mezcla.

La cantidad de S9 necesaria para una mutagénesis óptima varía según el tipo de inductor. Una canti-

dad demasiado grande de S9 puede disminuir la sensibilidad.

Inducción enzimática:

- con fenobarbital sódico administrado a los animales durante una semana antes del sacrificio.
- con 3 metilcolantreno.
- fenobarbital y metilcolantreno.
- aroclor: 5 días antes del sacrificio.

Las soluciones mutágenas no solubles en agua son preparadas estérilmente en DMSO, que a una dosis inferior a 0,5 ml. por frasco, no interfiere la mutagénesis. También pueden utilizarse acetona, dioxano, etanol, a dosis inferiores a 100 microlitros.

El medio de cultivo está formado por la superposición de dos medios nutritivos:

- un agar de fondo (hard agar), compuesto por agar Difco, medio de Vogel-Bonner y glucosa.
- un agar de superficie (soft agar), compuesto por: agar Difco, NaCl y solución de histidina; trazas de histidina son necesarias para la división celular, sin la cual no se produce la mutación.

La presencia de histidina permite un desarrollo bacteriano caracterizado por un velo homogéneo formado por minúsculas colonias auxotrofas para la histidina, en cuya superficie aparecerán gruesas colonias fácilmente contables, prototrofas para la histidina. Un poder tóxico eventual del producto a testar se traduce por un aclaramiento del velo.

### **4°) Método del Plating test.**

Sobre el agar de fondo se pone la mezcla siguiente:

- agar líquido (soft agar)
- cultivo de la cepa elegida
- solución a testar
- eventualmente S9.

Una vez solidificado el agar, las placas se colocan en la estufa a 37°C. Al cabo de 48 horas las colonias prototrofas para la histidina aparecen sobre el velo bacteriano y se cuentan.

En el estudio de sustancias desconocidas, las sustancias mutágenas conocidas, sirven de testigos; las cepas de S.T. expuestas a las mismas deben lograr un número de revertantes determinado en los experimentos anteriores. Si el producto resulta ser mutágeno, es importante obtener curvas dosis respuesta, con cantidades crecientes de mutágeno.

# Medicina

		S9	-		+		P + MCA	
				50 µl	150µl	50µl	150µl	
TA 1535	mutantes espontáneos							
	vehículo							
	NmetilN' nitroNnitro guanidina 2µg							
	2 amino antra ceno 20µg							
	Producto a testar	10µg						
100µg								
500µg								
1000µg								
TA 100	mutantes espontáneos							
	vehículos							
	4NQO 1µg (nitroquinoleina)							
	MNNG 2µg							
	2AA 20µg							
	producto a testar	10µg						
µg								
500µg								
1000µg								
TA 98	mutantes espontáneos							
	vehículo							
	2AA 20µg							
	producto a testar	10µg						
		100µg						
500µg								
1000µg								
TA 1538	mutantes espontáneos							
	vehículo							
	2AA 20µg							
	producto a testar	10µg						
		100µg						
500µg								
1000µg								

Se considera que una sustancia da una respuesta negativa (no es mutágeno) cuando con dosis de 1000 microgramos (o la dosis máxima no tóxica), el número de mutantes inducidos es inferior al doble del número de mutantes espontáneos.

### 5º) Método del Spot test.

Discos de papel filtro impregnados de la solución a testar se colocan en las placas, los revertantes aparecen como anillos de colonias alrededor de cada disco.

Este test cualitativo, es muy práctico (permite medir las dosis mutágena, las cantidades óptimas de S9, y comparar los resultados con distintos tipos de inducción, diferentes órganos y animales); es menos sensible que el test clásico (plating test) y no detecta más que las sustancias difusibles en el agar.

### 6º) Resultados.

Los resultados obtenidos probando distintos carcinógenos conocidos por el método del plating test indican:

- que los mejores inductores son en la mayoría de los casos fenobarbital asociado a metilcolantreno. En este caso, la mejor tasa de mutación se obtiene con 50 microlitros de S9 por placa (mayor cantidad de aflatoxina B1).
- curvas dosis-respuesta son lineales para el 2 aminofluorano, pero en otros casos como el del metilmetano sulfonato, a partir de una cierta dosis se observa una disminución del número de mutantes.

### 7º) Protocolo general.

La presente tabla propone una ficha de recogida de datos. El método del plating test será realizado en ausencia de S9(-), en presencia de S9 proveniente de ratas no tratadas (+) o tratadas con fenobarbital y metilcolantreno (P+MCA). El número de mutantes es evaluado:

- en ausencia de todo tratamiento
- en presencia del solvente del producto a testar
- en presencia de un testigo que da resultados positivos con la cepa considerada.
- en presencia del producto desconocido, a las dosis siguientes: 10, 100, 500, 1000 microgramos.

### CONCLUSION:

La apreciación del poder carcinógeno potencial de una sustancia química, requiere una serie de tests que, tomados aisladamente, tienen un coeficiente de fiabilidad no estabilizado. Las combinaciones de tests tienden a optimizar el sistema de detección de tales propiedades. El resultado de estas investigaciones es siempre una apreciación predictiva capaz de provocar alarma, pero no de sustituir la observación epidemiológica.

### BIBLIOGRAFIA:

- *Pouvoir mutagène d'une substance sur des souches de Salmonella typhimurium: (test de Ames).* A. Hesbert, C. Cavalier, M-C. Bottin et M. Lemonier. *Archives des maladies professionnelles, de médecine du travail et de Sécurité Sociale (Paris)* 1974, 40, n.º 3-4, mars-avril pp 437-457.
- *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.* Bruce N. Ames, Joyce McCann and Edith Yamasaki. *Mutation Research*, 31 (1975) 347-364.
- *Enciclopedia de medicina, higiene y seguridad en el trabajo. Tomo 1, pp 319-322.*
- *Experimental studies in the assessment of human risk. pp 45-71.*