# **Evaluación de la genotoxicidad de cuatro corticoesteroides de uso tópico mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratón**

Molina-Noyola L.D. a, Valdez-Aburto P. a, Zavala-Cerna M. G. a, Ramos-Ibarra M. L. a, Lara-Acevedo A. C. b, Herrera-Figueroa J.A. b, Flores-García A b, Torres-Bugarín O. a.

a Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Juan Palomar Arias 44670, Guadalajara, JAL. CP45100. daniel\_mn123@hotmail.com, penelopeval\_1@hotmail.com, oliviatorres@hotmail.com, g\_zavala\_78@hotmail.com, affloresg@gmail.com.

bUniversidad Autónoma de Nayarit, Universidad de la Cultura Amado Nervo S/N, Tepic, NAY. C.P. 63001. lara\_acevedo@hotmail.com, georgeponcho@hotmail.com.

**RESUMEN**

**INTRODUCCIÓN:** La piel es una barrera que se encuentra expuesta a mutágenos y carcinógenos, como los fármacos. Los corticoesteroides administrados vía tópica son frecuentemente prescritos y al aplicarlos se adhieren a los queratinocitos y se liberan en 24 horas. Actúan sobre receptores celulares citosólicos, y nucleares e inducen lipocortinas que tienen acción antifosfolipasa A2, inhiben citocinas esto induce acción antiinflamatoria, vasoconstrictora, antiproliferativa e inmunosupresora, lo que genera utilidad y los efectos secundarios., la información sobre la genotoxicidad de corticoesteroides tópicos es escasa. **METODOLOGÍA:** Se formaron 13 grupos con 6 ratones machos (Balb-C): 1) petrolato, 300 mg, del 2-13) se les aplicó tres dosis de crema 300, 150 y 75 mg; 2-4) Hidrocortisona 1%, 5-7) Betametasona, 8-10) Metilprednisolona y 11-13) Clobetasol.Se rasuro la espalda de cada ratón (2cm2), se administró el compuesto cada 24h/5 días, se tomó una gota de sangre de la punta de la cola por 9 días, se realizó un frotis, este se fijó (alcohol 80%/10 minutos), se tiñó con naranja de acridina y se analizó al microscopio (100x). Por muestra se contabilizaron eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 eritrocitos, eritrocitos policromáticos (EPC) y EPC micronucleados en 1000 células. **RESULTADOS:** En todos los compuesto se observó mayor frecuencia de EMN al 2do o 3er día de aplicación (p>0.01) y a mayor dosis citotoxicidad. **DISCUSIÓN:** Normalmente no se vigila el uso de los corticoesteriodes tópicos, sin embargo se evidencia que estos compuestos llegan a médula ósea y provocan pérdida e inestabilidad de material genético.

**ANTECEDENTES**

La piel es la principal barrera entre el cuerpo y el medio externo, por tanto se entiende que se encuentra continuamente expuesta a agentes citotóxicos, mutágenos, carcinógenos y genotóxicos, dentro de los que se incluyen algunos fármacos administrados vía tópica Lazaro, 2010. Específicamente el daño genotóxico es silente y frecuentemente los métodos para evaluarlo son costosos, complicados e invasivos; la técnica de micronúcleos (MN) es una opción ideal para monitorizar poblaciones en riesgo, es confiable, altamente informativa, rápida, sencilla, económica, mínimamente invasiva, además no es necesario el cultivo celular, ni el sacrificio del organismo, Torres-Bugarin, 2007; Zúñiga-González, 2000; 2001, entre otras aplicaciones, esta técnica es empleada para evaluar el efecto genotóxico de compuestos aplicados tópicamente en el ratón Zúñiga González, 2002, Oliveira-Martins, 2007, Flores-García, 2011. **La prueba de micronúcleos;** Los MN son biomarcadores de efecto y se localizan en el citoplasma en donde se observan como pequeñas masas de cromatina similares al núcleo pero mas pequeños de ahí su nombre, se forman durante la metafase–anafase, son cromosomas completos rezagados por daño al uso mitótico o fragmentos de cromosomas sin centrómero, en ambos casos no lograron incorporarse al núcleo de las células hijas lo que deriva en la aparición de estas estructuras Schmid, 1975. En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, cuya forma es redonda o almendrada, su diámetro varía desde 1/20 a un 1/5 (0.4 a 1.6 μ) del tamaño normal del eritrocito (6 a 8 μ de diámetro) Schmid, 1975. El conteo de la frecuencia de MN es un biomarcador ampliamente usado para estimar el daño genotóxico causado por agentes físicos, químicos o biológicos Torres-Bugarin, 2014. Originalmente, la prueba de MN fue desarrollada en eritrocitos de médula ósea de ratones para evaluar compuestos administrados por vía intraperitoneal, posteriormente se modificó para evaluar daño genotóxico secundario a la aplicación de agentes por diversas vías, en distintos tejidos y especies; como eritrocitos de sangre periférica tanto de ratón como de otras especies Zúñiga-González, 1996; 2000; 2001, células exfoliadas de mucosa bucal Torres Bugarín, 2014; Bonassi, 2011, vaginales de humano Ambroise, 2013 y otros organismos Ornelas-Aguirre, 2006, Zúñiga-González, 2003, así como en células descamadas de anfibios Zamora Pérez, 2004, entre muchos otros. Así la prueba de MN se utilizó en diversos ensayos en los que se determinó el efecto micronucleogénico de algunos compuestos aplicados tópicamente en sangre periférica de ratón, lo que evidenció la absorción percutánea de algunos compuestos como el 5-Fluorouracilo Zúñiga González, 2002, Ciclofosfamida Oliveira-Martins, 2007, Pirfenidone Alcántar-Díaz, 2012, pesticidas Schop, 1990, aceites minerales lubricantes e incluso fototerapia Zuñiga-González, 2012. Estos son compuestos que se diseminaron hacia los capilares que irrigan la dermis e incluso hasta médula ósea después de ser aplicados tópicamente. Por tanto está demostrado que esta prueba es una excelente herramienta para evaluar contaminantes ambientales o medicamentos que causen genotóxicidad o citotóxicidad a través de exposición cutánea. Por otra parte, al realizar la prueba de MN en sangre periférica se cuenta con la disponibilidad de eritrocitos policromáticos (EPC) que son eritrocitos jóvenes que en 24 horas alcanzarán su madurez y se transformarán en eritrocitos normocromático, estos se identifican por la variación en su coloración que refleja la presencia de RNA Schmid, 1975 . Entonces la presencia de MN en EPC (EPCMN) de sangre periférica es consecuencia del daño ocurrido al material genético en las 24 horas previas Schmid, 1975, Heddle, 1991, por tanto, la frecuencia de EPC se utiliza como parámetro para determinar citotoxicidad, ya que la proporción de EPC presentes en sangre periférica es constante en cada especie, pero suele disminuirse si el individuo recibe compuestos citotóxicos que interfieran con la hematopoyesis de médula ósea y provoquen mielosupresión Udroiu, 2006. **Corticosteroides tópicos;** Los corticosteroides son derivados de las hormonas liberadas por las glándulas suprarrenales, las formas sintéticas son elaboradas a partir de la hidrocortisona o del cortisol, si bien su acción es solamente sintomática, son los medicamentos tópicos mayormente prescritos en la atención primaria y de uso frecuente, incluso son considerados como imprescindibles Guerra-Tapia, 2001, y es por sus efectos antiinflamatorio, antiprurítico, antiproliferativo, vasoconstrictor e inmunosupresor, que son útiles en los tratamientos de procesos inflamatorios que no son secundarios a infecciones, sin embargo, el uso inadecuado o prolongado son factores de alto riesgo para efectos indeseados locales o sistémicos, reversibles e irreversibles, especialmente en niños pequeños y ancianos Khalid, 2007. Los efectos benéficos como adversos dependen básicamente de la potencia del corticosteroide, así como del área del cuerpo tratada, la extensión de la dermatosis y de la duración del tratamiento Vatti, 2013, Ballona, 2003; Alejandre-Lázaro, 2010. Desde 1952 la industria farmacéutica está buscando mejorar su perfil farmacológico, para ello se realizan innumerables cambios en estos compuesto con el fin de aumentar la penetrabilidad cutánea y la potencia y a su vez disminuir los efectos secundarios Lázaro, 2010.

Así entonces los distintos corticosteroides cuentan con una estructura química que difiere en ciertos grupos funcionales, esto les confiere penetrabilidad cutánea, potencia (medida por el grado de penetrabilidad y afinidad a los receptores) y efectos secundarios distintos dependiendo de la molécula. Los corticosteroides tópicos se clasifican según su potencia y eficiencia clínica en cuatro grupos, subdivididos a su vez en siete clases: los de la clase I son los más potentes y los de la clase VII los más débiles Ballona, 2003. El anillo básico de los esteroides ciclopentanoperhidrofenantreno es modificado mediante diferentes procesos como la halogenación y/o esterificación para mejorar su efectividad. Entre las primeras moléculas obtenidas mediante el proceso de halogenación fueron la Fluocinolona y Beclometasona, esta modificación potencia la actividad de los esteroides además se protege de la acción de las enzimas epidérmicas; en los esteroides de segunda generación la adición de acetónidos y alfa o beta metilación (dexametasona y betametasona) aumenta la penetrabilidad y la actividad antinflamatoria y se disminuyen los efectos mineralocorticoides, la modificación con grupos lipofílicos permite mayor grado de penetrabilidad como es el caso del 17 valerato de betametasona y 17 propionato de clobetasol considerado como esteroide de alta potencia, Ballona, 2003. La doble halogenación permite la máxima potencia como ocurre con el clobetasol y la mometasona, en cambio la esterificación permite aumentar la liposolubilidad y penetración de los esteroides, por lo tanto estos corticosteroides pueden ser convertidos en piel a metabolitos inactivos que al llegar a la circulación sistémica carecen de sus efectos habituales y en teoría tendrían nulos efectos adversos, a este grupo de compuestos se les denomina tópicos suaves o de baja potencia Ballona, 2003.

El mecanismo de acción de los corticosteroides tópicos es diverso debido a que los esteroides son moléculas poco hidrofóbicas capaces de atravesar las membranas por difusión simple o a través de receptores específicos. El mecanismo molecular involucrado descrito en la acción antiinflamatoria es la traslocación de dímeros hacia núcleo (receptor-esteroide) y la unión de este al ADN y el subsecuente incremento de la transcripción de genes que codifican proteínas antiinflamatorias o bien la inhibición de la producción de proteínas inflamatorias. Otro mecanismo es a nivel de membranas celulares mediante la inhibición de la fosfolipasa A2 mediante la acción de la lipocortina y el subsecuente bloqueo en la liberación del ácido araquidonicode la membrana celular lo que a su vez impide la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. En relación a la actividad inmunosupresora los corticosteroides, se ha observado que ocasionan disminución de las células de Langerhans, inhiben los linfocitos T vía inducción de apoptosis y bloqueo del ciclo celular Ballona, 2003.

Debido a que poco se conoce sobre los efectos genotóxicos y citotóxicos de los corticosteroides tópicos, el objetivo del presente estudio fue analizar tales efectos mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratones Balb-C con exposición a diferentes corticosteroides tópicos (Hidrocortisona, Metilprednisolona, Betametasona y Clobetasol, Cuadro 1).

**MATERIAL Y MÉTODO**

**Animales**: Se trabajó con 78 ratones machos sanos de la cepa Balb-C de 5 a 6 semanas de edad, peso promedio 14.9 ± 2.4 g, los animales fueron proporcionados por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica de Occidente en Guadalajara, Jalisco, México, el manejo de los animales fue acorde a los criterios éticos establecidos por los artículos del 121 al 126 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el proyecto fue registrado en la Universidad Autónoma de Guadalajara con el no. 5-031-080-01-010. **Grupos de trabajo**: Los ratones fueron asignados al azar a uno de 13 grupos y cada grupo se conformó con 6 ratones, cada organismo se colocó individualmente en una jaula de policarbonato: Grupo 1) se le administró Petrolato 300 mg [control negativo], a los grupos del 2-13) se les aplicó tres dosis de crema 300, 150 y 75 mg; grupos 2-4) Hidrocortisona 1%, grupos 5-7) Betametasona, 8-10) Metilprednisolona y grupos 11-13) Clobetasol. Se rasuro 2cm2 de la espalda de cada ratón, se administró el compuesto cada 24h por 5 días. **Toma y procesamiento de muestras**: Se tomó una gota de sangre de la punta de la cola por 9 días con la que se realizó un frotis, (702 muestras en total), los frotis se fijaron en etanol al 80% por 10 minutos, se tiñeron con naranja de acridina y se analizaron al microscopio equipado con florescencia y bajo el objetivo de inmersión. Por muestra se contabilizaron eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 eritrocitos, eritrocitos policromáticos (EPC) y EPC micronucleados en 1000 células, todos estos procedimientos se llevaron acaba de acuerdo a los establecido por Zúñiga 2003. **Análisis estadístico**: Para la estadística descriptiva se utilizó promedio y desviación estándar (DS) para la estadística inferencial sobre la variación en las medias se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, como alternativa no paramétrica la prueba de Kruskal Wallis y para el análisis en bloques respecto al tiempo de tratamiento la prueba de ANOVA de dos vías con la realización pos-prueba de Bonferroni, mediante GraphPadPrism Versión 5.

**RESULTADOS**

Al analizar los datos se observó de manera general que todos los compuesto inducen la formación de EMN dentro de los tres primeros tres días de aplicación (p>0.01), sin detectarse efecto genotóxico a las 24 h de aplicación, para luego producirse mielodepreción ya que se disminuye la frecuencia de EPC, la que se asocia a la dosis del compuesto de tal manera que a mayor dosis mayor citotoxicidad (Figura 1). **Hidrocortisona**: Al analizar el efecto citotóxico de este compuesto evaluado mediante la frecuencia de EPC se pudo identificar que estos se incrementaron linealmente durante los 3 primeros días de aplicación para luego provocarse descenso por debajo de la muestra basal, lo que indica mielosupresión a partir del 4 día de aplicación, efecto que se mantiene incluso una vez suspendida la aplicación, cabe señalar que este fenómeno fue más claro en la dosis más baja (75 mg). Mientras que la frecuencia de EMN independientemente de la dosis se incrementa durante el transcurso de los 5 días de aplicación del medicamento, para disminuir sin llegar a la frecuencia basal. **Metilprednisolona**: Este compuesto mostró ligeras variaciones en la frecuencia de EPC a lo largo del experimento sin ser estadísticamente significativas, sin embargo en la frecuencia de los EMN se identifica incremento variable hasta alcanzar su pico máximo en el día 5 que corresponde al último día de aplicación del medicamente, para luego disminuir ligeramente pero sin llegar al valor basal. **Betametasona**: Este compuesto mostro efecto citotóxico después de concluido el periodo de aplicación, lo que llama la atención es que independiente de la dosis el efecto genotóxico es claro (p=0.01), incluso se observa aumento lineal dosis-respuesta del día 1 al 5, para después disminuir sin alcanzar la línea control en el día 9. **Clobetasol:** Indujo ligera citotoxicidad después de los 5 días de aplicación incluso a mayor dosis menor frecuencia de EPC, en relación a los EMN, no muestra efecto genotóxico.



**CONCLUSIONES**

Cabe señalar que normalmente no se vigila el uso de los corticosteriodes tópicos, y con este trabajo se demuestra que estos compuestos aun que se catalogan como de acción suave y la literatura describe que se metabolizan el estrato corneo de la dermis estos resultados arrojan que aun estos compuestos son capaces de penetrar a medula ósea donde causan citotoxicidad efecto expuesto por la disminución en la producción de EPC además de inestabilidad genómica, mostrado por la formación de EMN.

**BIBLIOGRAFÍA**

* Guerra Tapia A. El impacto de los nuevos corticoesteroides tópicos en el tratamiento de la dermatitis atópica. Actas Dermosifiliogr. 2001. 92:483-488.
* Ballona Chambergo R., et al., Corticoides tópicos en pediatría: Una puesta al día. Dermatología Peruna. 2003. 13; 3: 163-170.
* Bonassi S, *et al.,* The HUmanMicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. Mutation Research Reviews. 2011. 728:88-97.
* Heddle JA, *et al.,* Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ Mol Mutagen. 1991;18:277-291.
* Lang R, Reimann R. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication :Examination for the induction of gene mutation using the Ames Salmonella/Microsome test and the HGPRT test in V/) cells Environ Mol Mutagen. 1993; 21: 272-304.
* Schmid W. The micronucleus tests. Mutat Res. 1995; 31:9-15.
* Torres-Bugarín O, *et al.,* Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. Bol. Med. Hosp Infant Mex. 1999. 56,4: 212-217.
* Torres-Bugarín O., *et al*., Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. Br. J. Sports. Med. 2007. 41, 592-596.
* Olivia Torres-Bugarín, *et al*., Potential uses, limitations and basic procedures of Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. Disease Markers. 2014; 2014:956835. Epub 2014 Feb 4.
* Udroiu I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Review AquaticToxicology. 2006; 79: 201–204.
* Zamora-Perez AL, *et al*., Induction of Micronucleated Cells in the Shed Skin of Salamanders (Ambystoma sp.) Treated With Colchicine or Cyclophosphamide. Environ Mol Mutagen. 2004; 44: 436–440.
* Zúñiga-González G., et al., Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. Mutat. Res. 2000; 467, 99-103.
* Zúñiga-González G., *et al.,* Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans Spontaneous micronuclei in 43 species. Mutat Res. 2001; 494, 161-167.
* Zúñiga-González G, *et al.*, Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats Environ Mol Mutagen. 2003; 42(4):306-310.
* Zúñiga-González GM, *et al*., Induction of micronucleatederythrocytes in mouse peripheralbloodaftercutaneousapplication of 5-fluorouracil. ArchMed Res. 2003; 34(2):141-4.
* Torres-Bugarin O, et al., Procedimientos básicos de la prueba de micronucleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. El Residente. 2013; 8(1).
* Zúñiga-González G., *et al*., Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. Mutat. Res. 1996; 369, 123-127.
* [Ambroise MM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Ambroise%20MM%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=24022306), *et al*., Predictive Value of Micronucleus Count in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Carcinoma. [Turk Patoloji Derg.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022306) 2013;29(3):171-8.
* Ornelas-Aguirre JM, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez AL, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Zúñiga-González GM. [Micronucleus induction by metronidazole in rat vaginal mucosa.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16628750).Environ Mol Mutagen. 2006 Jun;47(5):352-6.
* Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Alvarez-Moya C, Torres-Bugarín O. [Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673876) Environ Mol Mutagen. 2003;42(4):306-10
* Zúñiga-González G, et al., Induction of Micronucleated Erythrocytes in Mouse Peripheral Blood. Arch Med Res. 2003; 34.
* Oliveira-Martins CR, Grisolia CK. [Determination of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood reticulocytes of mice treated topically with different lubricant oils and cyclophosphamide.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17985309) Genet Mol Res. 2007 Sep 30;6(3):566-74.
* Khalid A. *et al*., Topical corticosteroids in infants: prescribing pattern and prescribing errors in Bahrain. Sequeira.Pharm World Sci. 2007; 29:395–399.
* Vatti RR, Ali F, Teuber S, Chang C, Gershwin ME. Hypersensitivity Reactions to Corticosteroids. Clinic Rev AllergImmunol. 2013. 1-12.