

Ensayo de actividad antimutagénica de un nuevo neuroesteroide sintético (3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona)

David Calderón G¹, Eugene Bratoeff T², Elena Ramírez L², Víctor Dorado G³, Ernestina Hernández G⁴, Francisca Trujillo Jiménez⁴

RESUMEN

Las progestinas sintéticas son esteroides empleadas para diferentes tipos de cáncer y terapias hormonales, y están relacionadas con la aparición de daños sobre el ADN. **Objetivo:** evaluar la actividad antimutagénica del nuevo esteroide sintético 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona, que tuvo efecto sobre los niveles de 5-HIAA en cerebro, en estudios previos. **Material y métodos:** la actividad antimutagénica se evaluó mediante la prueba de Ames, usando las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100. El rango de concentraciones utilizado fue de 1ng a 1mg. **Resultado:** el esteroide evaluado presentó ligera toxicidad en presencia de la máxima concentración (1mg/placa) vs la cepa TA100 y no mostró actividad mutagénica en las dosis evaluadas en el ensayo biológico. Los resultados sugieren que el nuevo neuroesteroide sintético 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona, no posee actividad mutagénica y puede ser considerado un candidato con nuevas perspectivas en el tratamiento de la salud.

Palabras clave: antimutagenicidad, antiandrógenos, neuroesteroide, prueba de ames.

Antimutagenic assay of new 3 α -acetoxy-5,6-epoxy-16-pregnén-20-one synthetic neurosteroid

ABSTRACT

Synthetic progestins are used in different types of cancer and hormonal replacement therapy, and in recent studies they have been linked to DNA adduct formation in steroid therapies. The purpose of the present study was to evaluate the anti-mutagenic activity of a new synthetic neurosteroid, 3 α -acetoxy-5,6-epoxy-16-pregnén-20-one, that altered 5-HIAA levels on the brain in previous studies. Its anti-mutagenic activity was evaluated by Ames assay using *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100; A range of 1ng-1mg doses were evaluated. It was found that 3 α -acetoxy-5,6-epoxy-16-pregnén-20-one showed slight toxicity against the TA100 strain in the maximum concentration (1mg/plate) and did not show mutagenicity in this test system with any of the doses evaluated. These results suggest that 3 α -acetoxy-5,6-epoxy-16-pregnén-20-one did not possess mutagenic activity and might be useful as a promising candidate for new applications in human healthcare.

Key words: antimutagenicity, antiandrogen, neurosteroid, bacterial reverse mutation assay.

Los esteroides son biomoléculas con estructura base del ciclopentanoperhidrofenantreno¹. Dos esteroides derivados del colesterol, son testosterona y progesteron². La testosterona se convierte en 5 α -dihidrotestosterona por la enzima 5 α -reductasa³, provocando varios desórdenes en el sistema endocrino (SE). Avances recientes han revelado

gran variedad de mecanismos celulares inesperados por los cuales, los esteroides, mejor conocidos como neuroesteroideos, impactan sobre el perfil sináptico del núcleo hipotalámico, que resulta crítico para el control de la reproducción⁴.

El diseño de un nuevo esteroide esta condicionado

por mecanismos bioquímicos incluidos en la etiología de la enfermedad. Con respecto a las patologías del sistema endocrino, el conocimiento puede ser obtenido con actividad enzimática y concentración de receptores específicos⁵. El mecanismo de algunos esteroides incluye la contribución de receptores o sitios activos presentes en los carbonos C₃, C₁₆ y C₁₇⁶, las trienonas tienen una estructura coplanar que les permite reaccionar con rapidez con la enzima y al mismo tiempo aumentar la actividad inhibitoria. De aquí que se logre sintetizar un nuevo esteroide que cumple con las características anteriores. Y con el cual, se realizó un estudio reciente en un modelo animal, observando alteraciones importantes sobre los niveles del ácido 5-hidroxi-indol acético (5-HIAA) en cerebro⁷, principal metabolito del sistema serotoninérgico.

El acetato de ciproterona (ACP) fue el primer antianandrógeno usado para el tratamiento de cáncer de próstata y ha sido relacionado con alteración o daño al ADN, sugiriendo un incremento en el riesgo para el desarrollo de malformaciones⁸, además de que la frecuencia en las mutaciones se ha incrementado con el uso de dosis altas de ACP⁹. Las progestinas sintéticas como ACP son usadas en diferentes tipos de cáncer y terapias de reemplazo hormonal¹⁰. ACP fue reportado por ser genotóxico *in vitro* en linfocitos humanos, al generar radicales libres mediante reacción nucleofílica¹¹. En general, las sustancias mutagénicas son capaces de inducir recombinaciones debido a que son estimuladas por daño al ADN¹².

En la actualidad no existe un tratamiento efectivo y que no provoque efectos adversos para los desordenes causados por la enzima 5 α -dihidrotestosterona; de aquí la importancia de evaluar la actividad antimutagénica de un nuevo esteroide sintético con previa actividad farmacológica en cerebro de un modelo animal, que permita buscar nuevas y efectivas terapias para combatir enfermedades andrógenodependientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Nuevo esteroide sintético (3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona) figura 1, peso molecular 372.498, fórmula

Recibido: 23 abril 2010. Aceptado: 3 mayo 2010.

¹Laboratorio de Neuroquímica. Instituto Nacional de Pediatría (INP). SSA. ²Laboratorio de Química Farmacéutica. Facultad de Química. UNAM. ³Laboratorio Toxicología Genética, ⁴Laboratorio Farmacología. INP. SSA. Correspondencia: David Calderón Guzmán. Laboratorio de Neuroquímica. Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto”. Instituto Nacional de Pediatría. Av. Iman # 1, Col. Insurgentes Cuicuilco. 04530 México, D.F. E-mail: solodavid2001@yahoo.com.mx

condensada C₂₃H₃₂O₄ y soluble en dimetilsulfoxido (DMSO) sintetizado por el doctor Eugene Bratoeff, Laboratorio Química Farmacéutica, Facultad de Química. UNAM. (Las sustancias de referencia y los mutágenos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO. USA).

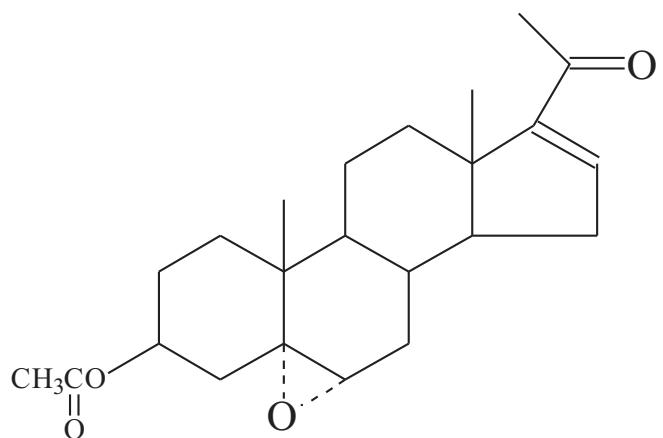


Figura 1. Estructura química de 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-one.

Sistema de activación metabólica S-9

La fracción del sobrenadante de hígado de rata (S9) inducido por fenobarbital/5,6-benzoflavona, fue comprado de Moltox (Molecular Toxicology, Boone, NC, USA). La mezcla fue preparada agregando 500 μ l de buffer de fosfato 0.2M (NaH₂PO₄ y Na₂HPO₄), 130 μ l de agua desionizada, 100 μ l de KCl 0.33M, 80 μ l MgCl₂ 0.1M, 100 μ l fracción S-9, 50 μ l glucosa-6-fosfato 0.1M y 40 μ l NADP 0.1M. La mezcla fue mantenida en frío durante su uso¹³.

Ensayo de mutagenicidad

La mutagenicidad de 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona fue ensayada con la prueba de mutagenicidad de bacterias, usando el método de placa, reportado por Maron y Ames¹³. En el experimento, la toxicidad fue evaluada como una reducción en el número de colonias revertantes. Para asegurar que la toxicidad no interfirió con la respuesta inhibitoria, se utilizó la concentración más alta del rango de concentración superior. Las soluciones de 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnén-20-ona fueron preparadas en diluciones seriadas usando dimetilsulfóxido (DMSO). El control positivo consistió de 2-aminoantraceno (2AA en DMSO, para las cepas TA98 y TA100 sin fracción S-9). El agar bacteriológico y el caldo nutritivo fueron obtenidos de oxoid (Basingstoke, Hampshire, England). Una alícuota de 100 μ l de suspensión de bacterias cultivadas, 50 μ l de solución del esteroide en la concentración deseada, 500 μ l de la mezcla de fracción

S-9 o buffer de fosfato 0.1M, se agregaron a 2 ml de agar conteniendo 10% de histidina/biotina 0.5mM para las cepas TA98 y TA100. Las colonias revertantes y células viables que fueron visibles se contaron en las placas después de incubarse durante 72 hs a 37°C. Los experimentos se repitieron por duplicado y cada concentración se evaluó por triplicado. La respuesta positiva de la prueba fue definida como un incremento en el número de colonias revertantes de cada cepa, en presencia o ausencia de la fracción de activación metabólica.

Análisis estadístico

Todos los valores fueron reportados en promedio \pm desviación estándar. Se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA) con sus respectivos contrastes, y la $p<0.05$ fue considerada con diferencias significativas¹⁴.

RESULTADOS

Tabla 1. Antimutagenicidad de 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnen-20-ona para *Salmonella Typhimurium* TA100 con y sin activación metabólica (S-9) contra mutágeno directo (n=6 placas).

Prueba (substitución de pares de bases)	Conc. μ g/placa	Número de colonias revertantes (promedio \pm DE.)
(vehículo)		157.33 \pm 17.62
Mutágeno		180.00 \pm 21.70
Sin S-9		190.33 \pm 34.82
1000		144.00 \pm 31.24
0		205.67 \pm 12.90
0.001		201.00 \pm 10.44
0.10		187.00 \pm 18.08
10		189.00 \pm 6.56
1000		*136.00 \pm 26.00
		ligera toxicidad

Vehículo = DMSO 50 μ l; Mutágeno: 2-aminoanthraceno (500 μ l); Activación metabólica (S-9, 500 μ l). * $p<0.05$ vs mutágeno

Tabla 2. Antimutagenicidad de 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnen-20-ona para *Salmonella Typhimurium* TA98 con y sin activación metabólica (S-9) contra mutágeno directo (n=6 placas).

Prueba (mutación por desplazamiento)	Conc. μ g/placa	Número de colonias revertantes (promedio \pm DE.)
(vehículo)		31.67 \pm 2.52
Mutágeno		39.67 \pm 5.03
Sin S-9		50.33 \pm 4.04
1000		32.33 \pm 4.62
0		58.33 \pm 2.08
0.001		53.33 \pm 2.08
0.10		45.00 \pm 7.94
10		53.33 \pm 9.81
1000		53.00 \pm 8.66

Vehículo = DMSO 50 μ l; mutágeno: 2-aminoanthraceno (500 μ l); activación metabólica (S-9, 500 μ l).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a que las hormonas esteroides juegan un papel clave en la patofisiología de varios desórdenes del cerebro, mediante reacciones de aromatización del anillo A

esteroidal la reducción enzimática de enlaces de hidrógeno de la misma estructura¹⁵, es indispensable realizar más estudios relacionados con neuroesteroideos sintéticos, además, de que existe poca o nula información en este campo.

Respecto a la prueba de mutagenicidad del nuevo esteroide sintético, 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnen-20-ona, en presencia ó ausencia de activación metabólica, no se indujo actividad mutagénica en las cepas de TA98 y TA100 de *Salmonella Typhimurium*, aunque en la cepa de TA100 se observó ligera toxicidad a la máxima concentración del esteroide evaluado, sugiriendo que el compuesto estudiado puede ser utilizado sin riesgo en enfermedades relacionadas con esteroides de carácter androgénico¹⁶.

Por otra parte, debido a que la extrapolación de los datos experimentales a los humanos es compleja, es necesaria la evaluación de la genotoxicidad, ya sea positiva o negativa. Los estudios *in vitro* e *in vivo* con genotoxicidad positiva, no necesariamente representan un riesgo para los humanos, pero si resulta negativa, es muy relevante cuando de trata de esteroides y de fármacos de elevada potencia en general¹⁷. Las concentraciones plasmáticas de esteroides en humanos son con frecuencia en el rango de nanogramos o picogramos por ml, por este motivo resulta complicado determinar el efecto de los niveles plasmáticos de esteroides en la prueba de genotoxicidad *in vivo*. No hay suficientes estudios acerca del daño provocado por la toxicidad y mutagenicidad de nuevos esteroides sintéticos en hombres, y el presente estudio representa sólo una pequeña parte de estudios futuros.

En base a los resultados del presente ensayo de mutación bacteriana, claramente se demostró que el compuesto 3 α -acetoxi-5,6-epoxi-16-pregnen-20-ona, con y sin activación metabólica, no presentó actividad mutagénica, en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella Typhimurium*. Este esteroide sintético es un posible candidato para aplicaciones futuras en la salud.

REFERENCIAS

1. Robel E, Baulieu EE. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab* 1994; 5:1-8.
2. Calderón GD, Barragán MG, Espitia VI, Hernández GE, Santamaría AD, Juárez OH. Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 94:369-73.
3. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T. FK143 a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: *in vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52:357-63.
4. McCarthy MM, Schwarz JM, Wright CL, Dean SL. Mechanisms mediating oestradiol modulation of the developing brain. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(6):777-83.
5. Raynaud JP, Fiet J, Le Goff JM, Martin PM, Moguilewsky M, Ojasoo T. Design of antiandrogen and their mechanisms of action: A case study (Anandron). *Hormone Res* 1987; 28:230-41.
6. Flores E, Brattoeff E, Cabeza M, Ramírez E, Quiroz A, Heuze I.

- Steroid 5alpha-reductase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2003; 3(3):225-37.
- 7. Calderón GD, Bratoeff E, Ramírez LE, Osnaya BN, García AR, Barragán MG, Hernández GE, Juárez OH. Effects of two new steroids and cyproterone on some biomarkers of oxidative stress and serotonergic system on rat prostate and brain. *Andrología* 2009; 41:29-34.
 - 8. Hinkel A, Berges RR, Pannek J, Achulze H, Senge T. Cyproterone acetate in the treatment of advanced prostatic cancer: retrospective analysis of liver toxicity in the long-term follow-up of 89 patients. *Eur Urol* 1996; 30(4):464-70.
 - 9. Krebs O, Schafer B, Wolff T, Oesterle D, Deml E, Sund M, Favor J. The DNA damaging drug cyproterone acetate causes gene mutations and induces glutathine-S-transferase P in the liver of female Big Blue. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 241-5.
 - 10. Siddique YH, Beg T, Afzal M. Protective effect of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) against norgestrel induced genotoxic damage. *Toxicol in vitro* 2006; 20:227-33.
 - 11. Siddique YH, Afzal M. Genotoxic potential of cyproterone acetate: a possible role of reactive oxygen species. *Toxicol in vitro* 2005; 19:63-8.
 - 12. Fahrig R. Anti-mutagenic agents are also co-recombinogenic and can be converted into co-mutagens. *Mutation Research* 1996; 350:59-67.
 - 13. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113:173-215.
 - 14. Castilla SL. *Estadística simplificada para la investigación en Ciencias de la Salud*. Editorial Trillas. México, D.F. 1995.
 - 15. Reddy DS. Mass spectrometric assay and physiological-pharmacological activity of androgenic neurosteroids. *Neurochem Int* 2008; 52(4-5):541-53.
 - 16. Bratoeff E, Ramirez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5alpha-reductase inhibitors. *Curr Med Chem* 1999; 6:1107-23.
 - 17. Joosten HFP, Van Acker FAA, Van den Dobelsteen DJ, Horbach GJMJ, Krajnc El. Genotoxicity and hormonal steroids. *Toxicology Letters* 2004; 151:113-34.