

88  
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RELACIONES ESTRUCTURA QUIMICA-ACTIVIDAD  
GENOTOXICA DE 7 COMPUESTOS EN CELULAS SOMATICAS  
DE LCS OJOS DE *Drosophila melanogaster* UTILIZANDO CEPAS  
CON Y SIN ACTIVIDAD METABOLICA INCREMENTADA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**JUDITH HERNANDEZ ARANDA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSARIO RODRIGUEZ ARNAIZ



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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**

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>26</b>
<b>Tablas.....</b>	<b>32</b>
<b>Gráficas.....</b>	<b>41</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>58</b>

## RESUMEN

Uno de los organismos más utilizados en Genética Toxicológica es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la cual es capaz de detectar una amplia variedad de agentes químicos que inducen mutaciones y recombinación en las células somáticas. Actualmente se ha implementado el uso de cepas con metabolismo diferencial con el propósito de valorar el efecto del metabolismo en la inducción de daño genético. Se evaluaron mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en el sistema de los ojos  $w/w^+$ , siete compuestos químicos: diclorometano (DCM), O-toluidina (O-TO), O-anisidina (O-AN), 2,4-diaminoanisol (2,4-DAA), eter-4-aminodifenílico (4-AME), 5-metil-2-tiouracilo (5-MTU) y 6-metil-2-tiouracilo (6-MTU) clasificados por la IARC-WHO (1987) en el grupo 2B, es decir como posibles carcinógenos en los seres humanos. Así mismo se trató de detectar sus posibles relaciones entre la estructura química y la actividad genotóxica. Esta prueba se basa en la utilización de las células de los discos imagales de las larvas; la interacción de los agentes químicos con los discos imagales, da lugar a un clon celular que se observa como una mancha en los ojos del adulto. Se emplearon dos cepas para la realización de la prueba: la estándar (ST) que es silvestre, y la línea Hikone-R (HK) que es resistente a pesticidas; ambas cepas tienen niveles semejantes de citocromo P-450, sin embargo la HK posee una elevada capacidad de desmetilación. Cada compuesto se probó de manera crónica por alimentación, durante los tres estadios larvarios de la mosca y hasta completar su desarrollo. Los testigos concurrentes se trataron con el solvente que consistió en una mezcla 3:1 de alcohol etílico-tween 80. Se analizaron los ojos de las hembras  $F_1$   $w/w^+$ . Se contó y clasificó la aparición de clones blancos ( $w$ ) en el contexto de los ojos silvestres ( $w^+$ ). Los resultados se valoraron mediante la prueba de  $X^2$  cuadrada de proporciones (Frei y Würigler, 1988) y las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970). Se compararon las frecuencias inducidas y el tamaño de manchas por ojo. Los compuestos probados en la presente tesis, mostraron la siguiente respuesta: a) en la cepa ST todos fueron genotóxicos excepto el 2,4-DAA, b) en la cepa HK todos fueron genotóxicos excepto el 2,4-DAA y el 5-MTU. Se detectó una relación entre la estructura química y la actividad genotóxica en las aminas aromáticas monocíclicas y en los compuestos antitiroideos: la posición orto produce daño genético (O-AN y O-TO) mientras que un amino en posición meta y un metoxi en posición para (2,4-DAA) no fue genotóxica. Los compuestos antitiroideos, en la cepa ST fueron genotóxicos (5-MTU y 6-MTU), y en la HK sólo el 6-MTU. Las cepas mostraron una sensibilidad diferencial en la biotransformación de los promutágenos estudiados, así la cepa ST detectó más eficientemente cinco de ellos (DCM, O-TO, O-AN, 5-MTU y 6-MTU), la cepa HK fue más sensible a la amina bicíclica 4-AME; ambas cepas tuvieron la misma respuesta negativa frente al 2,4-DAA.

## INTRODUCCION

La exposición de los seres vivos a agentes químicos potencialmente reactivos que están presentes en el ambiente, es muy alta. El avance tecnológico y el patrón de desarrollo socio-económico han ocasionado la producción masiva de nuevas sustancias químicas y de compuestos orgánicos sintéticos, los que constituyen hoy día, una preocupación entre los científicos, por los riesgos que ocasionan a la salud humana (Anwar et al. 1992; Neubert, 1977) (Fig. 1). Muchos de estos compuestos que están extensamente distribuidos en el ambiente, son capaces de reaccionar con macromoléculas celulares como las proteínas y los ácidos nucleicos provocando daño genético, es decir, son genotóxicos (Carriere et al. 1992).

Existen una serie de factores que intervienen en los mecanismos de acción de los compuestos químicos una vez que ingresan al organismo, lo cual plantea dificultades para su estudio, principalmente en la estimación del riesgo potencial derivado de la exposición a estos agentes.

La acción de estas sustancias depende en gran medida de sus características químicas, tales como la estructura y la posición en que se encuentren los grupos reactivos. Así, se han reconocido diferencias en los efectos genotóxicos de los grupos reactivos en posición cis y trans (Vermeulen y Breimer, 1983), y en orto y para (Shahin, 1989; Williams et al. 1989).

Ashby y Tennant (1988; 1991) compararon una serie de trabajos realizados con diversos organismos de bioensayo (*Salmonella*, rata y ratón) con el fin de estudiar una gran variedad de compuestos químicos a los que están expuestos los seres vivos y predecir la actividad genotóxica que tienen las sustancias de acuerdo a su estructura química. Evaluaron alrededor de 300 agentes químicos lo que les permitió proponer una molécula hipotética (Fig. 2), la cual lleva diferentes grupos sustituyentes clasificados como reactivos y que pueden causar daño genotóxico en los organismos. A los compuestos que llevan estos grupos reactivos, los han designado con "alerta estructural".

Los estudios acerca de la relación entre la estructura química y la actividad genotóxica ofrecen la posibilidad de identificar los principales parámetros de la estructura química de un compuesto y su actividad biológica, lo que ha permitido la búsqueda de compuestos alternativos no genotóxicos de uso indispensable y el desarrollo de productos químicos más seguros (Shahin, 1989).

Un aspecto de mayor preocupación en cuanto a la exposición de los seres vivos a estos agentes, es la alta correlación que existe entre la actividad mutagénica y la carcinogénica.

En 1969, la Organización Mundial de la Salud (WHO), a través de la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), inició un programa para evaluar la capacidad carcinogénica de una gran cantidad de compuestos químicos, estudios que se han llevado a cabo con datos epidemiológicos y organismos de bioensayo. Basada en éstos, la IARC (1987) ha clasificado a los diferentes agentes químicos en cuatro grupos, de acuerdo a las evidencias que se tienen del grado de carcinogenicidad (Fig. 3):

En el grupo 1 se encuentran los agentes que son carcinogénicos para los seres humanos, es decir, se ha establecido una relación positiva entre la exposición al compuesto y el desarrollo de un cáncer.

El grupo 2 se subdivide en: a) grupo 2A (probables carcinógenos), el cual incluye a compuestos de los cuales se tienen evidencias limitadas acerca de su carcinogenicidad en los seres humanos, ya que se tienen pocos datos de la relación entre la exposición al agente y el desarrollo de un cáncer, pero a su vez, existen suficientes estudios en animales experimentales. b) grupo 2B (posibles carcinógenos), resulta ser de gran interés, ya que en él se encuentran los compuestos químicos cuya evidencia de carcinogenicidad en humanos y en animales es limitada o insuficiente.

En el grupo 3 se encuentran los agentes químicos que no han podido ser clasificados como carcinogénicos, o que no caen en ninguno de los otros grupos.

Por último, en el grupo 4 se encuentran los compuestos químicos que probablemente no son carcinógenos, ya que no se tienen estas evidencias ni en humanos, ni en animales de bioensayo. Algunas investigaciones han mostrado evidencias del potencial carcinogénico, sin embargo, han sido consideradas insuficientes debido a que tienen limitaciones cualitativas o cuantitativas.

### **Metabolismo**

Los agentes químicos dentro del organismo pueden actuar de dos formas: 1) de manera directa, es decir, los que son reactivos por sí mismos y pueden ser detectados fácilmente en todos los sistemas de prueba; 2) de manera indirecta, es decir, que no son genotóxicos por sí mismos (promutágenos) y que requieren ser transformados por las enzimas presentes en los organismos en intermediarios reactivos electrofílicos, estos metabolitos pueden reaccionar con centros ricos en electrones (nucleofílicos) situados en el DNA, esta interacción puede producir entre otras cosas, uniones covalentes llamadas aductos, como también pueden provocar el rompimiento de las hebras del DNA. El material genético puede volver a la

normalidad si los mecanismos de reparación operan con éxito, en caso contrario, la célula portará una mutación inducida por el carcinógeno (Zijlstra, 1987) la cual se considera el paso inicial de la carcinogénesis química ya que la célula está transformada y podría originar un tumor que se manifieste clínicamente. Se han descrito otras formas de iniciación del cáncer, entre ellas está la activación de protooncogenes por diversos mecanismos, tales como mutaciones inducidas, movilización del protooncogene a una localización cromosómica diferente (translocación) con pérdida del gene supresor, y la amplificación del protooncogene (Cortinas, 1990). La mayoría de las sustancias químicas a las que están expuestos los seres vivos, pertenece a este grupo.

El metabolismo es un fenómeno biológico importante en la biotransformación de compuestos xenobióticos, los cuales no son constitutivos de los ciclos generadores de energía, ni de las reacciones de síntesis del organismo. El metabolismo, es un proceso dual mediado por las enzimas presentes en el organismo: en algunos casos, los promutágenos activados resultan ser metabolitos electrofílicos capaces de reaccionar con las macromoléculas celulares (activación), en otros casos, los productos del metabolismo pueden ser conjugados y eliminados del organismo sin producir efectos nocivos (desintoxicación) (Fig. 4).

El patrón general de la biotransformación de los agentes genotóxicos sigue básicamente dos fases, las reacciones de éstas pueden observarse en la figura 5. La fase inicial del proceso consiste en reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, que dan lugar a la transformación de estos compuestos en productos más hidrosolubles que las sustancias originales, por la adición de grupos polares a la molécula. Sin embargo, los metabolitos formados pueden ser inactivos, menos activos o en ocasiones más activos que la molécula original.

El grupo de enzimas más importante responsable de las reacciones enzimáticas de esta fase se conocen como monooxigenasas de función mixta, las cuales requieren de dos componentes: un agente reductor, la flavoproteína nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y oxígeno molecular (atmosférico). El paso clave en estas reacciones oxidativas es la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el sustrato, lo que produce un intermediario que se rompe dando lugar a la formación del producto final, estos intermediarios pueden ser químicamente muy reactivos. En términos cuantitativos, la mayoría de las reacciones oxidativas se llevan a cabo por una gran familia de isoenzimas, éste es un sistema multienzimático que se agrupa con el nombre genérico de citocromo P-450, el cual es dependiente de las monooxigenasas de función mixta y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza: se presenta en mamíferos, aves, peces, reptiles, insectos, plantas, levaduras y en algunas bacterias (Sato y Omura, 1978).

En los procariontes, el citocromo P-450 es hidrosoluble y muy inestable, se encuentra distribuido en el citoplasma a diferencia de los eucariotes, donde las proteínas del citocromo P-450 están incluidas en la bicapa lipídica del retículo endoplasmático liso. Una proteína importante asociada, la NADPH-citocromo P-450 óxido-reductasa, también está fija a esta bicapa lipídica en una relación estereoquímica de unas diez moléculas de P-450 por una de reductasa (Fig. 6a). El sustrato se une inicialmente al citocromo P-450 oxidado ( $Fe^{3+}$ ), el complejo resultante sustrato-citocromo se reduce por la reductasa y se combina luego con el oxígeno molecular, un segundo electrón y dos iones hidrógeno son cedidos por el sistema donador, los productos finales son un metabolito oxidado y agua (Fig. 6b).

Actualmente se conocen por lo menos diez familias de genes para el citocromo P-450 que constituyen la superfamilia de genes P-450. El gene ancestral para el citocromo P-450 probablemente ya se encontraba hace 1500 millones de años. Se considera que algunas de las familias de los genes P-450 han evolucionado de forma divergente debido a la exposición de los organismos a diferentes clases de ambientes, lo que llevó a la especificidad de sustratos de las enzimas P-450. Se conocen numerosos ejemplos de agentes químicos que son buenos sustratos para las enzimas codificadas por dos o más familias de genes P-450 las cuales se han apartado evolutivamente hace muchos años y se especula que muchas otras están ligadas en forma más estrecha con el P-450 primitivo y catalizan transformaciones metabólicas críticas de sustancias endógenas, incluyendo la biosíntesis de esteroides y el catabolismo de los ácidos grasos. Hasta el momento, las bases del polimorfismo genético, el número de isoenzimas citocromo P-450, el grado de microheterogeneidad de estas isoenzimas y los mecanismos que regulan la expresión de los genes, no han sido suficientemente estudiados, pero sí han permitido llegar a la conclusión de que surgieron hace millones de años como un mecanismo para contrarrestar los efectos nocivos de diversos productos naturales que se encuentran en los alimentos, como flavonas, esteroides y alcaloides (Nebert y González, 1987).

Como se mencionó, el sistema enzimático P-450 constituye el sistema oxidante de la fase I, sin embargo, la oxidación por aminooxidasas, varias hemoperoxidasas, la prostaglandina H sintetasa, la xantina oxidasa y la alcohol deshidrogenasa también es importante.

Por otra parte la biotransformación de ésteres, amidas y la de compuestos polipeptídicos, se lleva a cabo por hidrólisis, mientras que los compuestos con grupos nitro y grupos azo son biotransformados por reacciones de reducción.

La segunda fase del metabolismo ocurre cuando los compuestos o sus metabolitos producidos en la primera fase, se combinan con las sustancias endógenas presentes en los



organismos, tales como glucuronato, sulfato, acetato o algún aminoácido; este evento se conoce como conjugación o síntesis, y da lugar a productos que pueden ser desactivados y eliminados del organismo por la orina o por las heces (Hart y Turturro, 1988; Vogel et al. 1991).

Las reacciones de conjugación que forman glucurónidos son catalizadas por las glucuroniltransferasas localizadas también en el retículo endoplasmático. Estas enzimas emplean uridín difosfato-glucuronato como donador de glucuronato. Los glucurónidos constituyen la mayor parte de los metabolitos generados por numerosos fármacos que contienen fenol, alcohol o un grupo carboxilato, en general son inactivos y mediante un sistema de transporte de iones pueden ser excretados. Los glucurónidos formados a partir de ácidos carboxílicos son fácilmente hidrolizables. La conjugación de aminas aromáticas con ácido acético (usando acetil coenzima A como donador de acetilo) implica la participación de varias N-acetil transferasas. Los ácidos carboxílicos aromáticos, como el ácido salicílico, pueden ser inactivados por conjugación con glicina. Otras reacciones incluyen la conjugación de los compuestos fenólicos con sulfato y O-, S- y N-metilación de aminas y fenoles como por ejemplo la adrenalina (Goodman et al. 1990).

### Sistemas de prueba

La investigación de los efectos genotóxicos causados por los agentes químicos ambientales en los seres vivos, se realiza a través de bioensayos. Estos se basan en el empleo de organismos, que se seleccionan de acuerdo a diversos parámetros tales como: la sensibilidad y la reproducibilidad. Los modelos biológicos cubren la escala evolutiva, desde procariontes hasta mamíferos lo que permite clasificar cualitativamente a los compuestos genotóxicos. Además es posible estudiar los mecanismos básicos de biotransformación. Entre los métodos de bioensayo más utilizados en Genética Toxicológica se encuentra el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Este es uno de los bioensayos más rápido, versátil y eficiente, con el que puede analizarse un amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes ambientales, tanto en células germinales como en células somáticas (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992).

Los análisis bioquímicos realizados tanto en larvas como en organismos adultos de *Drosophila melanogaster*, han revelado que posee una alta capacidad de activación-desintoxicación gracias a la presencia del paquete enzimático P-450, el cual puede biotransformar diferentes agentes químicos (Baars et al. 1980; Hållström et al. 1982). Este sistema parece estar involucrado también en diferentes procesos fisiológicos, que incluyen, el metabolismo de una amplia variedad de sustratos endógenos como las hormonas, jugando

así, un papel importante en el crecimiento y desarrollo (Kulkarni y Hodgson, 1980; Arinc et al. 1991; Hodgson y Randy, 1991).

El sistema citocromo P-450 de estos organismos se encuentra distribuido en mayores concentraciones en el intestino medio, en los cuerpos grasos y en los túbulos de malpigio. A nivel subcelular, las monooxigenasas se encuentran localizadas principalmente en el retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias.

Los trabajos de Zijlstra (1987) realizados en moscas silvestres y en moscas resistentes a insecticidas evidenciaron algunas características básicas de su sistema enzimático, así como su capacidad de hidroxilación y desmetilación de diversos xenobióticos.

Actualmente se sabe que: a) los niveles de citocromo P-450 en moscas silvestres y moscas resistentes a insecticidas son similares: del orden de 2 a 2.3 nmol/g de moscas. b) las cepas que son resistentes a insecticidas, tienen una capacidad mayor de desmetilación que las cepas silvestres, por lo que se les ha denominado, cepas con actividad metabólica incrementada. c) no hay una relación directa entre la capacidad de hidroxilación de xenobióticos y la resistencia a insecticidas. d) las diferencias en la capacidad de biotransformación de estas cepas, pueden ser la causa de la variación en la respuesta frente a los agentes tóxicos y xenobióticos (Zijlstra, 1987).

La regulación genética de estas enzimas es compleja; los pocos estudios que se han hecho a nivel molecular, han puesto en evidencia que el gene responsable del metabolismo de ciertos compuestos tóxicos y de la resistencia a insecticidas, se encuentra localizado en el cromosoma 2 de *Drosophila melanogaster* (Hällström et al. 1982 y 1984).

Una de las pruebas que se han implementado con este organismo para la caracterización de promutágenos y agentes de acción directa, es la prueba de mutación y recombinación somáticas, SMART (por sus siglas en Inglés: Somatic Mutation and Recombination Test) la que muestrea gran cantidad de células somáticas con la ventaja de que al ser un ensayo *in vivo*, se dan de manera natural los procesos metabólicos. Las pruebas somáticas adquieren cada vez mayor importancia debido a que existe una correlación entre la actividad recombinogénica de los compuestos químicos y la carcinogénesis (Vogel y Szakmary, 1990).

Esta prueba se basa en la utilización de las células de los discos imagales de las larvas, los cuales se encuentran determinados genéticamente y permanecen en un número reducido hasta que el organismo entra en la metamorfosis, durante la cual se producen una serie de divisiones mitóticas que darán origen a las distintas partes del cuerpo del organismo adulto:

alas, ojos, labrum, genitales, etc.

Si durante las etapas larvarias, algún agente químico llega a interactuar con las células de los discos imagales, puede ocurrir una alteración que modifique su información y dará lugar a un clon celular que será observado como una mancha en el adulto, cuando se emplean los marcadores fenotípicos apropiados. Por otro lado, los clones serán de mayor tamaño si son inducidos al inicio de la vida larvaria, mientras que los producidos en el segundo y tercer estadio serán sucesivamente más pequeños.

El sistema SMART puede detectar un amplio espectro de alteraciones genéticas, ya que, las mutaciones puntuales, las deleciones, la recombinación mitótica y la pérdida cromosómica, son eventos que pueden dar lugar a la formación de un clon mutante (Vogel, 1987a; Vogel and Zijlstra 1987).

La prueba SMART fué desarrollada en un principio empleando los marcadores *mwh* y *flr*<sup>3</sup> para las células de los discos imagales de las alas de este insecto. La validación de esta prueba, ha sido amplia (Graf et al. 1984; Delgado, 1990) obteniéndose resultados claros del potencial mutagénico de diferentes compuestos químicos (Rodríguez-Arnaiz et al. 1992).

Posteriormente, se propuso implementar esta prueba en los discos imagales de los ojos. El ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*, consta de unidades elementales llamadas omatidias, estas células se dividen continuamente a lo largo de los distintos periodos larvarios, encontrándose así, cerca de 20 células precursoras de las omatidias en el primer estadio, 100-150 células en el segundo y finalmente de 780 a 800 en el tercero. En el organismo adulto, una omatidia está formada básicamente por 8 células fotorreceptoras (células R) y un complemento de células accesorias (Fig. 7).

El fotorreceptor es una neurona sensorial elongada que lleva una cerda fotosensible; el rabdómero se encuentra ubicado en la parte central de esta estructura y consta de dos tipos de receptores, los receptores externos (R1-R6) que adquieren un patrón asimétrico trapezoidal y receptores internos (R7 y R8) que se encuentran a lo largo de el eje central. Sobre esta capa de receptores, están las células del cono y las células pigmentarias primarias, las cuales dan lugar a la córnea. Rodeando cada omatidia, se localizan las células accesorias llamadas células pigmentarias secundarias, estas células contienen pteridinas y omocromos, pigmentos que confieren el característico color rojizo de los ojos de las moscas silvestres (Ready, 1989).

Se han utilizado varios marcadores fenotípicos de los ojos para la realización de la

prueba de mutación somática y recombinación mitótica (Würgler y Vogel, 1986):

a) white-white coral ( $w/w^{wc}$  ojos blancos-rosa coral): en esta prueba se evalúan en las hembras heterocigotas, la aparición de manchas blancas o rosa coral producto de mutaciones génicas o deleciones y manchas gemelas, es decir blancas y rosa coral, en el caso de que ocurra recombinación mitótica entre el locus white y el centrómero. La desventaja de este sistema es que los clones que afectan menos de cuatro omatidias, no se detectan fácilmente.

b) el inestable white-zeste ( $w/w^{z}$  ojos blancos-amarillo limón): este sistema fue propuesto por Rasmuson y Green en 1974 y se basa en la mutación recesiva white y la inestable zeste. Muchos mutágenos pueden provocar una interacción entre white y zeste, dando lugar a que zeste revierta y se manifieste de forma silvestre; se originan manchas rojas en el contexto del ojo blanco, sin embargo esto puede ocurrir espontáneamente con una frecuencia muy alta.

c) white-ivory ( $w/w^{i}$  ojos blancos-café tabaco): prueba desarrollada por Green et al. (1986), se basa en que algunos mutágenos son capaces de causar una reversión del alelo white ivory al tipo silvestre, por lo que se construyeron cepas que portaban cuadruplicado el locus white ivory. Estos eventos de reversión son detectados como manchas rojas en los ojos café tabaco de la mosca. Con este modelo el análisis de los clones es difícil, además de que sólo se han logrado detectar algunos mutágenos que pueden inducir este tipo de reversiones, por lo cual su uso se limita.

d) Una variación de la prueba, es el sistema de mosaico en ojo  $w/w'$  que emplea marcadores fácilmente detectables como el mutante white ( $w$ =ojo blanco) y el silvestre ( $w'$ =ojo rojo) (Vogel, 1987a) en el cual se evalúa la aparición de clones blancos en el contexto rojo de los ojos silvestres, que son observados como manchas que corresponden a omatidias afectadas. Esta prueba ha sido validada también en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias, mostrando ser una prueba sensible y consistente en su respuesta frente a distintas clases de mutágenos de referencia, los que se detectan aún a bajas concentraciones (Ordaz, 1991).

Recientemente esta prueba se ha mejorado con el uso de diversas cepas resistentes a pesticidas, las que han mostrado poseer una capacidad alta de biotransformación (Vogel et al. 1991). De estas cepas, la Hikone-R, ha mostrado un buen desempeño frente a diversos mutágenos de referencia, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas aromáticas (Rodríguez-Arnaiz et al. 1993).

## Agentes químicos

Los siete agentes químicos seleccionados en el presente trabajo, son promutágenos (del grupo 2B) a los cuales están expuestos ocupacionalmente los seres humanos en la industria textil y farmacéutica, también están expuestos los individuos que emplean algunos de estos compuestos con fines cosméticos o terapéuticos. Sus estructuras químicas presentan alerta estructural (de acuerdo a Ashby y Tennant, 1988), sin embargo, los estudios que se tienen acerca de sus efectos genotóxicos son insuficientes y han sido clasificados como posibles carcinógenos por la Organización Mundial de la Salud (IARC, 1987) (Fig. 8).

Los compuestos químicos analizados en esta tesis son: 1) un compuesto alifático clorado (DCM), 2) un grupo de compuestos químicos que pertenece a las aminas aromáticas, tres monocíclicas (O-TO, O-AN, 2,4-DAA) y una bicíclica (4-AME), y 3) dos agentes químicos con la misma fórmula y el grupo metilo en diferente posición (5-MTU y 6-MTU).

El diclorometano (DCM), es un solvente alifático y clorado que se emplea principalmente como removedor de pinturas y en el procesamiento de alimentos, además, es auxiliar en la industria farmacéutica. Los compuestos clorados alifáticos tales como el dicloroetano, el dicloropropeno, así como el diclorometano, han mostrado ser mutagénicos en diversos sistemas de prueba. En *Drosophila melanogaster* inducen mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (Lee et al. 1983), sin embargo, no se tienen estudios en células somáticas. Es un compuesto genotóxico en ratón, cuando se administra por inhalación (durante 10 días a 4000 y 8000 ppm), induce intercambio de cromátidas hermanas en células de pulmón, que es un órgano blanco primario para la inducción de tumores; también provoca aberraciones cromosómicas y micronúcleos en sangre periférica; se sabe que en los seres humanos se distribuye rápidamente en el cuerpo y aunque es uno de los hidrocarburos clorados menos tóxicos, por su acción depresiva a nivel del sistema nervioso central puede provocar daños severos (Allen et al. 1990).

Se probaron cuatro compuestos que pertenecen al grupo de las aminas aromáticas (AA). Estos agentes químicos han sido muy difíciles de detectar en las pruebas de *Drosophila melanogaster* que emplean células germinales, como la de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) y la de pérdida parcial o total de cromosomas sexuales (SCLT). En la prueba SLRL, se evalúa la inducción de daño en los 800 loci del cromosoma X para lo cual se requiere el análisis de alrededor de 7,000 cromosomas. Con las pruebas de células germinales se ha obtenido una respuesta débil positiva para algunas AA (Vogel, 1987b y Vogel et al. 1991), mientras que en la prueba de SMART se analizan 500 ojos y se evalúa 1 locus del cromosoma X con un número de células elevado (800 omatúdias por ojo, lo cual corresponde a 400,000 omatúdias analizadas por concentración), con un costo de alrededor de un orden de magnitud menor.

La orto-toluidina (O-TO), es una amina aromática que se ha utilizado por más de cien años como intermediario en la industria textil, para crear colores firmes a prueba de ácidos; más de noventa y tres pinturas y pigmentos se producen a partir de la O-TO. También se emplea en la producción de cosméticos y fármacos (Danford, 1991). Los niveles de exposición máxima permitida son de 3 a 22 mg/m<sup>2</sup> ó 5 ppm (IARC, 1987).

La O-TO es un compuesto que da resultados negativos en pruebas con bacterias, sólo se detectan efectos positivos cuando se agrega la fracción S9 del hígado de mamíferos. Se ha demostrado que es un clastógeno (agente que induce rompimientos en los cromosomas) en rata y ratón después de exposiciones prolongadas; induce aneuploidías (cambios en el número de cromosomas) en células de mamífero en cultivo y en hongos; en *Drosophila melanogaster* no se tienen resultados claros de su acción (Danford, 1991).

La orto-anisidina (O-AN), es un compuesto químico usado en la manufactura de colorantes. Se absorbe y metaboliza rápidamente en ratas y ratones cuando se administra por vía intravenosa, provocando metahemoglobinemia (Ashby et al. 1991; Ashby, 1992). En *Salmonella typhimurium* en cepas con niveles elevados de N-Acetiltransferasa, y con la fracción S9 de hígado de hamster, es mutagénica; su activación se realiza por oxidación (Thompson et al. 1992). Se desconocen sus efectos en *Drosophila melanogaster*.

El 2,4-Diaminoanisól (2,4-DAA), es un agente utilizado en la preparación de colorantes, principalmente en tintes de pelo y como inhibidor de la corrosión del acero (Index Merck, 1989). En ratas y ratones, induce tumores en hígado y estómago. En *Salmonella typhimurium* es mutagénico (Ashby y Tennant, 1991). No hay referencias de sus efectos genotóxicos en *Drosophila melanogaster*.

El eter-4-aminodifenílico (4-AME), es una amina aromática del grupo de las anilinas. Los pocos estudios que se tienen de este compuesto indican que es mutagénico en *Salmonella typhimurium*, que induce carcinomas y adenomas en hígado así como tumores en las glándulas tiroidea y pituitaria de ratas y ratones (Ashby y Tennant, 1991).

Por último, el metiltiouracilo (MTU), es un compuesto terapéutico, que inhibe la formación de hormonas tiroideas. El grupo metilo puede estar en posición 5 (5-MTU) o en 6 (6-MTU). La tiroidea produce dos tipos de hormonas, las cuales son derivadas de la tiroxina y contienen yodo: la tiroxina y la triyodotironina. La tiourea y sus derivados que contienen un grupo tiureileno constituyen la mayoría de los agentes antitiroideos conocidos que son efectivos en el ser humano. Entre estos compuestos se encuentra el metiltiouracilo que interfiere con la incorporación de yodo en la biosíntesis de yodotironinas. Los compuestos

antitiroideos tienen una acción muy breve ya que su vida media es corta, de 2 a 13 horas, por lo cual suelen usarse dosis muy altas, de 100 a 500 mg cada ocho horas (Goodman et al. 1990).

Estos agentes químicos que se emplean en la clínica, no presentan evidencias de su mutagenicidad en ningún sistema de prueba, particularmente, en *Drosophila melanogaster* no han sido evaluados y en seres humanos, no se conoce si tiene efectos carcinogénicos.

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Determinar si los siete compuestos seleccionados del grupo 2B, son genotóxicos en *Drosophila melanogaster* utilizando la prueba SMART w/w\*.
- 2) Detectar las posibles relaciones estructura química-actividad genotóxica.
- 3) Valorar el papel del metabolismo en la biotransformación de los promutágenos estudiados, utilizando una cepa silvestre y una resistente a pesticidas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Agentes químicos**

Los compuestos químicos probados fueron los siguientes: diclorometano (DCM) de Sigma Chemical Company, O-toluidina (O-TO), O-anisidina (O-AN) y 2,4-diaminoanisol sulfato hidratado (2,4-DAA), de Aldrich Chemical Company Inc; eter-4-aminodifenilico (4-AME), 5-metil-2-tiouracilo (5-MTU) y 6-metil-2-tiouracilo (6-MTU) de Sigma Chemical Company.

### **Cepas de *Drosophila melanogaster***

Se emplearon dos líneas para la realización de la prueba: la línea estándar (ST), que es silvestre, tiene capacidad de biotransformación, no posee actividad metabólica incrementada y la línea Hikone-R (HK), que fue aislada en Japón, se caracteriza por tener actividad metabólica incrementada, es decir que es resistente a pesticidas y posee una elevada capacidad de desmetilación. Ambas cepas fueron proporcionadas por el Dr. E.W. Vogel de la Universidad de Leiden, Holanda. Estas cepas, tienen las siguientes características fenotípicas: las hembras de ambas son de ojos blancos y cuerpo silvestre. Los machos de la cepa ST tienen ojos rojos y cuerpo amarillo, los de la cepa HK son silvestres. Los marcadores genéticos de las cepas ojos blancos (w) y cuerpo amarillo (y) se indujeron con etil-metano-sulfonato, mediante la prueba del locus específico. El marcador para cuerpo amarillo, no proporciona información para este ensayo, pero permite distinguir a los descendientes de los progenitores.

### **Sistema de cruzas**

La craza se realizó entre hembras de ojos blancos (w=1-1.5 c.m) y machos de ojos rojos (w') de su línea correspondiente, en medio de cultivo que contenía los compuestos sujetos a prueba. Cinco días después de realizada la craza, se retiraron los progenitores, la generación resultante se desarrolló en aproximadamente 12 días. Los cultivos se mantuvieron a 25°C y a 60% de humedad relativa.

### **Pruebas de toxicidad**

En experimentos preliminares, se determinó la toxicidad de los compuestos. Se observaron cualitativamente en los cultivos parámetros tales como: inhibición en la ovoposición, absorción de huevos, larvas y pupas, retraso en el desarrollo y número de



individuos que completaron éste. También se analizaron los ojos de las hembras, si éstos presentaban omatidias deformadas y un elevado número de manchas que no permitía un análisis apropiado del daño inducido, entonces, se seleccionó la concentración a la cual no se presentaron dichos efectos, siendo ésta la más alta empleada. Se probaron al menos dos concentraciones por debajo de la anterior con el propósito de conocer si existía una relación concentración-respuesta. Con algunos compuestos como el DCM, la O-AN y el 4-AME, se probaron más concentraciones con el fin de obtener la concentración más baja en la que hubiera un efecto genotóxico.

### **Procedimiento experimental**

Las sustancias, fueron disueltas en una solución 3:1 de alcohol etílico-tween 80, se calentó durante diez minutos y posteriormente se mezclaron de forma homogénea en el medio de cultivo para *Drosophila melanogaster* (Rodríguez-Arnaiz y Ramos, 1992). Los cultivos fueron expuestos crónicamente durante los tres estadios larvarios de la mosca y hasta completar su desarrollo. Se realizaron dos series experimentales por compuesto. Los testigos concurrentes se trataron con la solución de alcohol etílico-tween 80.

### **Análisis microscópico**

Las moscas se colocaron en una solución consistente de 90 partes de etanol al 70%, una parte de tween 80 y 9 partes de agua destilada (Vogel et al. 1987b). Se analizaron los ojos de las hembras F<sub>1</sub> procedentes de la cruce antes descrita bajo un microscopio estereoscópico a 120X y con iluminación artificial de una fibra óptica (Dolan-Jenner Industries, Inc.).

La aparición de clones blancos (w) en el contexto de los ojos silvestres (w<sup>+</sup>), se observan como manchas. Las manchas se cuentan y clasifican; se consideran de un origen independiente si dos manchas se encuentran separadas por cuatro o más hileras de omatidias silvestres. El número de ojos examinados para los testigos fue de 500 a 900 y en los tratados de 180 a 900 en función del número de moscas que completaron su desarrollo.

### **Clasificación de los datos**

Para evaluar el efecto genotóxico de los compuestos utilizados, se hace una distinción entre manchas chicas y grandes (Vogel, 1992). Las chicas tienen de 2 a 4 omatidias afectadas mientras que las grandes tienen más de cuatro. Las manchas totales se obtienen sumando las manchas chicas y las grandes.

El porcentaje de manchas por ojo se obtiene dividiendo el número de manchas (chicas, grandes o totales) entre el número de ojos analizados multiplicado por 100, mientras que para la frecuencia inducida se resta el porcentaje de manchas totales por ojo de los grupos tratados, del encontrado en los testigos concurrentes.

### **Análisis estadístico**

La valoración estadística se realizó de acuerdo al método propuesto por Frei y Würzler (1988), el cual se basa en contrastar dos hipótesis mediante la comparación de las frecuencias de mutación encontradas en las series testigos con respecto a las tratadas.

La contrastación de dos hipótesis, permite evaluar el daño causado por el agente químico y diferenciar un resultado positivo, débil positivo, indeterminado o negativo en un experimento.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) señala, que no hay diferencias entre la frecuencia de mutación en las series testigos y las tratadas. Si en estas últimas, la frecuencia de mutación basal se incrementa de manera que sea estadísticamente significativa, la  $H_0$  se rechaza.

La hipótesis alternativa ( $H_a$ ) postula, que en las series tratadas hay un incremento estadístico igual a "m" veces la frecuencia basal. Si el agente químico no produce el incremento estadístico significativo en las series tratadas, la  $H_a$  se rechaza.

El valor "m", es el número de veces que debe aumentar la frecuencia de mutación de la serie testigo; "m" es igual a 2 para las manchas chicas y totales ya que su frecuencia de aparición es alta, e igual a 5 para las grandes debido a que su frecuencia es relativamente baja (Graf et al. 1984).

Si se acepta la  $H_0$  y se rechaza la  $H_a$  el resultado indica que el compuesto es negativo (-), por el contrario, si se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ , el compuesto es positivo (+) y será por lo tanto genotóxico, por otro lado, si las dos hipótesis se rechazan, el compuesto se considera débil positivo (d) y si ambas son aceptadas, el resultado es indeterminado.

La contrastación de las dos hipótesis se realiza por separado mediante la  $X^2$  de proporciones a un nivel de significancia de 0.05; se utilizaron además las tablas de Kastenbaum-Bowman (1970) para confirmar los resultados.

## RESULTADOS

Para cada compuesto se realizaron dos series de experimentos, al no se observarse diferencias significativas ( $P=0.05$ ) entre éstas, se procedió a sumar los resultados obtenidos en ambas.

En los testigos concurrentes, que se trataron con la solución 3:1 de alcohol etílico-tween 80, se encontró un porcentaje promedio de mutación espontánea de  $10.1 \pm 1.6$  para la cepa ST y de  $12.0 \pm 1.3$  para la cepa HK (Tabla 1 y Gráfica 1).

Los datos obtenidos, se analizaron estadísticamente para evaluar el efecto causado por los agentes químicos. Los resultados se muestran en las tablas 2 a la 8. El símbolo (+) indica efecto positivo, el (d) débil positivo, la ausencia de símbolo indica que la respuesta fue similar a la del testigo.

### Diclorometano

Este solvente no mostró ser tóxico para las moscas. Se buscó como base para su análisis, la concentración menor a la cual se observaban efectos genotóxicos y se probaron tres más altas para observar la respuesta en relación con la concentración. Las concentraciones utilizadas fueron: 50, 100, 250 y 500 mM.

Se observó una respuesta positiva para manchas chicas y totales en la cepa ST, la HK sólo bioactivó el compuesto a partir de 100 mM; sin embargo, para manchas grandes, el resultado es diferente en ambas; para la cepa ST fue negativo en todas las concentraciones. En la cepa HK fue negativo a 50 mM, positivo en 100 y 250 mM y débil positivo a 500 (Tabla 2 y Gráfica 2). La frecuencia inducida de manchas fue ligeramente mayor para la cepa ST en todas las concentraciones (Gráfica 3).

### O-Toluidina

Este compuesto se probó en las siguientes concentraciones: 1, 2.5 y 5 mM, a concentraciones mayores hubo una clara reducción de la viabilidad huevo-adulto.

La respuesta fue positiva para manchas chicas y totales en todas las concentraciones empleadas y en las dos cepas. En cuanto a las manchas grandes, en la cepa ST los resultados fueron negativos para todas las concentraciones y en la cepa HK sólo se obtuvieron resultados positivos a 5 mM (Tabla 3 y Gráfica 4).

La frecuencia inducida de manchas es similar en las dos cepas en 1 mM, pero en 2.5 y 5 mM, esta frecuencia es mayor para la cepa ST (Gráfica 5).

### **O-Anisidina**

Este compuesto fue tóxico para las moscas a concentraciones mayores de 5 mM, se observaron numerosas manchas y omatidias deformadas. Resultó ser claramente positivo para manchas chicas y totales en todas las concentraciones empleadas en las dos cepas; para manchas grandes, en la cepa ST fue negativo a 0.5 y a 1 mM y positivo en 2.5 y a 5 mM, en la cepa HK fue negativo a 0.5 y positivo en las demás concentraciones (Tabla 4 y Gráfica 6).

La O-anisidina mostró inducir un mayor número de manchas por ojo en la cepa ST, sin embargo, la cepa HK fue más consistente en su respuesta (Gráfica 7).

### **2,4-Diaminoanisol**

Este agente químico a concentraciones de 1mM y 5 mM fue muy tóxico, dando lugar a omatidias deformadas y a retraso en el desarrollo por lo que se probó a 0.1, 0.25 y 0.5mM. Sólo se encontraron resultados positivos en la cepa ST para manchas chicas y totales a 0.25 mM (Tabla 5 y Gráfica 8).

A la concentración más baja que fue de 0.1mM la cepa HK tuvo una mayor sensibilidad a este compuesto, a 0.25 y a 0.5 mM la cepa ST mostró una frecuencia inducida de manchas mayor que la cepa HK; sin embargo, no resultó ser genotóxico para ambas cepas (Gráfica 9).

### **Eter-4-Aminodifenilico**

Con este agente químico, se observó un número elevado de omatidias afectadas y deformadas a concentraciones mayores de 5 mM, lo que hacía imposible la evaluación del daño. Las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 5mM.

En las dos cepas se encontraron resultados positivos para manchas chicas y totales a las concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 5 mM y resultados negativos para todos los tipos de manchas en la concentración más baja que fue de 0.1 mM. En la cepa ST, para manchas grandes fue negativo a 0.25 y a 1 mM y positivo a 0.5 y 5 mM. En la cepa HK para manchas grandes los resultados fueron positivos sólo a 0.5, 1 y 5 mM (Tabla 6 y Gráfica 10).

La frecuencia inducida de manchas mostró una relación concentración-respuesta en ambas cepas, sin embargo, en la HK tuvo un mayor efecto genotóxico (Gráfica 11).

### **5-Metiltiouracilo**

Este antitúroideo se probó a 0.1, 0.25 y 0.5 mM debido a que a mayores concentraciones se inhibía la ovoposición de las moscas, además de provocar la aborción de los huevos y larvas.

Para la cepa ST se observó una respuesta positiva únicamente para manchas chicas y totales en la concentración más alta. Los resultados fueron negativos para todos los tipos de manchas en la cepa HK (Tabla 7 y Gráfica 12).

La frecuencia inducida de manchas aunque fue ligeramente mayor en la cepa ST, no resultó ser estadísticamente significativa (Gráfica 13).

### **6-Metiltiouracilo**

EL 6-metiltiouracilo fue probado a las mismas concentraciones que el 5-Metiltiouracilo ya que provocó efectos de toxicidad similares.

Para la cepa ST fue positivo en todas las concentraciones y para los diferentes tipos de manchas, a excepción de las manchas grandes a 0.1 mM y a 0.5 mM. En la cepa HK se observa para las manchas chicas y totales una respuesta negativa a 0.1 mM, débil positiva a 0.25 mM y positiva a 0.5 mM, en cuanto a las manchas grandes, fue negativa a todas las concentraciones probadas (Tabla 8 y Gráfica 14).

La frecuencia inducida de manchas fue mayor en la cepa ST (Gráfica 15).

## DISCUSION

La biotransformación enzimática de los agentes xenobióticos es de gran importancia ya que puede realizarse de acuerdo a las propiedades estructurales de los compuestos químicos en combinación con una serie de factores, tales como:

1) La posición estereoquímica de los sustituyentes, que afectan la probabilidad de reacciones de desintoxicación (Vermeulen y Breimer, 1983; Shahin, 1989; Williams et al. 1989).

2) las regiones hidrofóbicas de una molécula que pueden influir en las uniones con enzimas o en el transporte a través de la membrana para unirse o intercalarse al DNA.

3) la estructura química del compuesto sea ésta alifática o aromática, lo que puede estar relacionado con el potencial de intercalación en el material genético. Hoy día se sabe que existen diferencias en cuanto a la genotoxicidad de los compuestos alifáticos y los aromáticos. Entre los primeros, los que son clorados, han mostrado ser mutagénicos, entre los segundos, el número de anillos aromáticos, así como la posición y el número de grupos amino son determinantes tanto en la toxicidad como en los efectos genéticos observados (Ashby y Tennant, 1988 y 1991; Ashby et al. 1989; Hatch et al. 1992).

Entre esta serie de factores, los estereoquímicos, juegan un papel significativo en la predisposición a un efecto genotóxico. La estereoselectividad, es decir, las reacciones enzimáticas preferenciales que generan uno o varios productos los cuales se pueden formar más rápidamente y en mayor proporción que otros, es un factor importante en el metabolismo de los xenobióticos (Vermeulen y Breimer, 1983). Cuando los compuestos químicos poseen isómeros, es decir, compuestos que difieren en la orientación en el espacio de los sustituyentes (Juaristi, 1989) tienen considerables diferencias en sus propiedades biológicas, pueden ser eliminados a diferentes velocidades, como es el caso del anestésico hexobarbital que en el hombre, el isómero más activo, tiene una vida media de eliminación aproximadamente tres veces más prolongada que la del isómero menos activo (Vermeulen y Breimer, 1983).

Los productos del metabolismo estereoselectivo son también de importancia desde el punto de vista toxicológico, ya que se ha demostrado que en contraste con los isómeros trans, los cis, muestran una significativa actividad mutagénica. Varias enzimas tales como las monooxidasas, las epóxido hidrolasas, así como las glutatión transferasas poseen selectividad por sus sustratos y por sus productos, dando lugar algunas veces a la activación de compuestos xenobióticos. Uno de los ejemplos que ilustran la acción estereoselectiva de

enzimas, es el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos vía el paquete enzimático P-450 dependiente de las monooxigenasas. Una de las isoformas de esta enzima, llamada P-450c, cataliza con alta estereoselectividad la epoxidación del benzo(a)pireno a tres óxidos de benzo(a)pireno regioisoméricos, de los cuales uno sólo de los tres es considerado como el más potente estereoisómero capaz de iniciar tumores (Vermeulen y Breimer, 1983).

Los compuestos químicos analizados en esta tesis son: 1) un compuesto alifático clorado (DCM), 2) un grupo de compuestos químicos que pertenece a las aminas aromáticas, tres monocíclicas (O-TO, O-AN, 2,4-DAA) y una bicíclica (4-AME), y 3) dos agentes químicos con la misma fórmula y el grupo metilo en diferente posición (5-MTU y 6-MTU).

Se considera que el dicloro metano, es el menos tóxico de los metanos clorados. Se metaboliza a través de la glutatión transferasa y en el sistema P-450 dependiente de monooxigenasas, generando dos metabolitos potencialmente genotóxicos: el s-clorometilglutión y el formaldehído (Green, 1983).

Se ha demostrado que el formaldehído, como metabolito del dicloro metano puede formar ligamentos cruzados entre el DNA y las proteínas en el hígado de ratón, jugando un papel importante en el efecto carcinogénico de este compuesto, sin embargo, la formación de estos ligamentos es dependiente de la actividad de la glutatión transferasa. Se ha establecido que en especies tales como hamsters y humanos se tienen rangos mucho más bajos de esta vía metabólica y no pueden generarse concentraciones genotóxicamente significativas de formaldehído (Casanova et al. 1992).

Por otra parte, el producto intermediario en el metabolismo del dicloro metano por el sistema P-450, es el formilo, que da lugar a formaldehído y además a monóxido de carbono, éstos producen efectos mutagénicos en *Salmonella typhimurium*, cuando se prueban como metabolitos generados durante la biotransformación de este compuesto (Benyajati et al. 1983; Alderson, 1985).

Este compuesto fue empleado a concentraciones muy altas y no mostró efectos tóxicos en las moscas, lo que está en relación con la estructura química. Los resultados obtenidos con el dicloro metano indican que en la cepa ST fue genotóxico a la concentración más baja utilizada (50 mM), mientras que la cepa HK mostró efectos genotóxicos hasta 100 mM, indicando que esta última, logró desintoxicar al compuesto a bajas concentraciones ya que a altas concentraciones (500 mM) la respuesta es similar en ambas (Gráficas 16 y 17). Es muy probable que se hayan producido cantidades suficientes de formaldehído, compuesto que es genotóxico en *Drosophila melanogaster* (Auerbach et al. 1977).

Las anilinas monocíclicas, como la o-toluidina y la o-anisidina son potentes carcinógenos en roedores (Asbhy y Tennant, 1991). Las correlaciones entre las características estructurales de estas aminas aromáticas y el daño genotóxico no han sido claras, sin embargo, se ha descrito que son mutagénicas y carcinogénicas cuando sus grupos sustituyentes están en posición orto, y por el contrario no lo son cuando están en posición meta y para (Shahin, 1989; Yoshimi et al. 1988).

Estos compuestos son promutágenos (de acción indirecta), ya que las respuestas positivas obtenidas en muchos sistemas de prueba, requieren de la adición de algún sistema metabólico externo o del uso de células con metabolismo intrínseco.

La biotransformación de la o-toluidina y la o-anisidina se lleva a cabo a través de reacciones de oxidación; la N-oxidación, da lugar a la bioactivación del compuesto químico, a diferencia de la C-oxidación que es una reacción de desintoxicación. La N-oxidación de la o-toluidina genera una serie de metabolitos secundarios; la N-hidroxy-o-toluidina, la N-acetil-o-toluidina, el o-nitrosotolueno, la N-acetoxo-N-acetil-o-toluidina, la N-acetil-N-hidroxy-o-toluidina y la 2-hidroxi-6-metil-acetanilidina; estos compuestos son mutagénicos en *Salmonella typhimurium* en presencia de la fracción S9 de hígado de mamífero; mientras que el o-azotolueno y el o-azoxytolueno, son negativos en el mismo sistema de prueba (Danford, 1991).

En *Drosophila melanogaster* se han obtenido resultados positivos para la o-toluidina en SMART ala a dosis de 1 y 5 mg/ml; en SMART ojo usando los marcadores white-zeste a 1 mM y con los marcadores white-white coral con 0.1 mg/ml (Batiste-Alentorn et al. 1991); en el presente estudio la O-TO mostró ser genotóxica en todas las concentraciones probadas y en las dos cepas.

La oxidación de la o-anisidina es esencial para la activación de este compuesto, esta reacción puede ser catalizada por la prostaglandina H sintetasa, que es una enzima con actividad de peroxidasa, en mamíferos se encuentra en varios tejidos y órganos, principalmente en la vejiga, que es el órgano blanco para muchas aminas aromáticas. Estas reacciones de oxidación generan los siguientes metabolitos secundarios: la diimina y la quinoneimina, que no son mutagénicos en bacterias (Thompson et al. 1992). En este estudio se obtuvieron resultados positivos desde la concentración más baja de O-AN que fue de 0.5 mM.

Si se compara el porcentaje de manchas por ojo inducido por los dos compuestos, la o-anisidina, resultó producir una mayor frecuencia de manchas a una menor concentración que la o-toluidina, debido posiblemente a la configuración estereoquímica de la primera. En



relación a las cepas, ambas biotransformaron eficientemente estas aminas aromáticas.

El 2,4-diaminoanisol, es también una amina aromática monocíclica relacionada con la o-toluidina y la o-anisidina, sin embargo tiene además otro grupo amino en posición meta, y un grupo metoxi en posición para (Fig. 8). Sus características son muy interesantes debido a su semejanza en grupos funcionales con la o-anisidina, sin embargo este compuesto fue negativo, lo que puede deberse a la posición estereoquímica de los grupos reactivos. Otras anilinas con la misma configuración pero con dos grupos metoxi, como la 2,4-dimetoxianilina no son genotóxicas en rata y ratón (Ashby et al. 1991). Este compuesto químico no mostró ser genotóxico en *Drosophila*, sin embargo su toxicidad fue muy alta, ya que no permitió el desarrollo de los organismos a concentraciones mayores a 1 mM.

No se ha estudiado como se metaboliza el 2,4-diaminoanisol, pero el mecanismo que esté implicado actúa de forma similar en las dos cepas, ya que el número de manchas por ojo fue semejante en los grupos testigos y en los grupos tratados, las frecuencias obtenidas no son significativamente distintas (Tabla 5).

Otra amina aromática que pertenece al igual que las anteriores al grupo de las anilinas, es el eter-4-aminodifenílico, es el único de los compuestos probados que tiene dos anillos aromáticos, ésta constitución química es la que le confiere el potente efecto genotóxico, esta amina bicíclica fue eficientemente biotransformada por las dos cepas, aunque en la HK el efecto fue mayor, y además, se observó una clara relación concentración-respuesta.

No se tienen estudios de qué vía metabólica está involucrada en el metabolismo de este compuesto. En este trabajo, la cepa HK mostró activar más efectivamente esta amina aromática bicíclica que la ST, lo que podría estar relacionado con alguna de las isoformas del citocromo P-450, ya que ambas poseen niveles de éste similares.

Los dos últimos compuestos analizados muestran una estructura química más compleja, cuentan con dos grupos imino, un azufre en posición 2 y un oxígeno, características que ambos comparten, sólo difirieron en la posición del grupo metilo: 5-metil-2-tiouracilo y 6-metil-2-tiouracilo.

No se tienen evidencias suficientes acerca de la mutagenicidad de estos compuestos de uso terapéutico. Las concentraciones probadas fueron realmente bajas en comparación con las dosis que se administran clínicamente debido a que a concentraciones mayores se observan efectos tóxicos en las moscas, sin embargo, los resultados de este trabajo, indican que la posición del grupo metilo es fundamental en su genotoxicidad, ya que el

5-metilouracilo fue negativo, mientras que el 6-metilouracilo fue positivo en todas las concentraciones para manchas chicas y totales en la cepa ST.

Las diferencias observadas en las cepas pueden estar asociadas con una mayor capacidad de desintoxicación del metabolito reactivo, hecho que es evidente en la cepa resistente a insecticidas. Actualmente los compuestos antitiroideos en uso clínico son el propiltiouracilo y el metimazol; el metiltiouracilo es menos potente, por lo que ya no se le encuentra en el mercado.

La estadística, es una herramienta útil en la clasificación de un agente químico como genotóxico. No hay que perder de vista la relación que debe existir entre el significado biológico y el significado estadístico, ambos relacionados con la potencia genotóxica, la toxicidad, la concentración y el tipo de exposición a la cual se valoran los agentes químicos: seis de los siete promutágenos estudiados fueron probados en condiciones biológicamente significativas, es decir, en concentraciones a las cuales los seres vivos pueden estar expuestos en condiciones normales, mientras que uno de ellos (DCM), solamente dió una respuesta estadísticamente significativa en concentraciones elevadas, dos ordenes de magnitud mayores, que las que se utilizaron para probar los otros seis compuestos.

Los agentes químicos mostraron diferentes rangos de toxicidad, lo cual determinó las concentraciones probadas. Para establecer la sensibilidad de las cepas frente a las sustancias químicas, se empleó la concentración más baja para cada compuesto en la cual se observaron efectos genotóxicos en alguna o ambas cepas; así el orden obtenido para la cepa ST fue: 6-MTU>O-AN>4-AME>O-TO=DCM>5-MTU=2,4-DAA y para la HK: 4-AME>O-TO=O-AN. En la gráfica 16 se puede observar este orden de sensibilidad; la cepa ST fue sensible a todos los compuestos probados, siendo la O-AN y el 6-MTU los más potentes. El 6-MTU mostró desde 0.1 mM sus efectos genotóxicos, sin embargo éste pudo ser desintoxicado por la cepa HK.

La respuesta genotóxica de las moscas cambia cuando las concentraciones son más altas, la cepa ST tiene el siguiente orden de sensibilidad: 4-AME>O-AN>O-TO>DCM=6-MTU>5-MTU y la cepa HK: 4-AME>O-AN>O-TO=DCM>6-MTU. La potencia de los compuestos en la producción del daño genotóxico, se observa en la gráfica 17 donde se muestra la frecuencia inducida de manchas totales por los siete compuestos, puede notarse que la amina aromática bicíclica (4-AME) produjo una respuesta estadísticamente significativa entre ambas cepas.

Las relaciones de estructura química-actividad genotóxica se establecen cuando en los compuestos químicos los grupos sustituyentes se encuentran en diferente posición esteroquímica. En el presente trabajo las aminas aromáticas estudiadas tienen diferentes

grupos sustituyentes, así la O-AN y la O-TO tienen en posición orto la primera un grupo metoxi y la segunda un grupo metilo; ambas resultaron genotóxicas. La presencia de dos grupos sustituyentes un amino en posición meta y un metoxi en posición para (2,4-DAA) no mostraron inducir cambios genéticos en el sistema de prueba empleado.

Los compuestos químicos más relacionados estructuralmente en el presente trabajo son el 5-MTU y el 6-MTU, los que tienen el grupo metilo en diferente posición, la cepa ST biotransformó los antiúroideos, independientemente de la posición del grupo metilo, mientras que la HK sólo activó al agente terapéutico que tiene el metilo en posición 6.

Un resumen de los resultados obtenidos con los siete compuestos analizados en esta tesis y la respuesta en la cepa estándar y la resistente a insecticidas, se encuentran en la tabla 9. Estos resultados muestran una respuesta diferencial entre las dos cepas; la causa de esta variabilidad, por su importancia, puede dar lugar a un amplio tema de estudio.

Algunos de los factores que pueden determinar la respuesta diferencial son: el metabolismo individual, y la capacidad de reparación del daño al DNA (Brusick, 1987).

Se considera que un individuo está expuesto a un agente químico cuando éste se introduce al organismo por cualquiera de las vías de ingreso; la concentración de los compuestos químicos en el organismo generalmente disminuye ya que pueden ser excretados y/o biotransformados. En este trabajo, la forma de exposición de los organismos de bioensayo a los agentes químicos fue crónica, lo cual permite utilizar concentraciones subtóxicas y asegura la presencia del promutágeno durante los estadios larvarios, ya que el huevo y la pupa ni absorben, ni metabolizan los compuestos químicos que están en el medio de cultivo.

La capacidad para metabolizar alguna sustancia en particular, puede variar en cada organismo ya que se ha demostrado que la sensibilidad diferencial puede deberse al polimorfismo en el metabolismo de los agentes xenobióticos, presente en los genes del citocromo P-450 (Nebert y González, 1990). Los organismos resistentes a insecticidas han desarrollado, diferentes modificaciones a nivel metabólico, como pueden ser una estereoselectividad enzimática o bien una mayor capacidad para realizar diferentes reacciones que den lugar tanto a la desintoxicación como a la activación de diferentes sustratos.

Por último, las sustancias xenobióticas al ser biotransformadas, pueden causar lesiones en el material genético, sin embargo, éstas pueden ser reparadas enzimáticamente por mecanismos libres de errores, en cuyo caso la alteración inicial desaparece; o sujeta a errores,

mecanismo por el cual se fijan las mutaciones y se transmiten a las siguientes generaciones celulares. La reparación depende del tipo de interacción que se establece entre el compuesto químico ó su metabolito reactivo con el DNA, y de la capacidad enzimática del organismo expuesto (Bohr et al. 1987).

La interacción de los compuestos químicos con los discos imagales durante los tres estadios larvarios de la mosca, puede causar una alteración genética, dando lugar a un clon celular que se observa como una mancha en el adulto. Los compuestos que requieren ser metabolizados, inducen clones pequeños, es decir, el daño suele ocurrir cuando se han generado los metabolitos reactivos que actúan al final del desarrollo del disco imagal; mientras que las manchas grandes se originan cuando el compuesto actúa de manera directa en las primeras etapas larvarias. Los compuestos analizados en el presente trabajo son de acción indirecta, por lo que las manchas chicas (Fig. 9) se presentaron con una frecuencia mayor que las manchas grandes (Fig. 10).

La prueba de SMART w/w\* es reproducible en su respuesta ya que los resultados de los diferentes experimentos son consistentes, tiene la ventaja de utilizar cepas con metabolismo diferencial y analizar la variabilidad en la respuesta de los organismos frente a un amplio espectro de agentes químicos que han sido difíciles de evaluar en células germinales de *Drosophila melanogaster*, tales como las aminas aromáticas monocíclicas y bicíclicas, además la mosca es capaz de detectar compuestos de vida media corta como el metiluracilo.

## **CONCLUSIONES**

1. Los compuestos probados en la presente tesis, mostraron la siguiente respuesta:

- a) en la cepa ST todos fueron positivos excepto el 2,4-DAA.
- b) en la cepa HK todos fueron positivos excepto el 2,4-DAA y el 5-MTU.

2. Se detectó una relación de estructura química-actividad genotóxica en las aminas aromáticas (O-TO, O-AN y 2,4-DAA) y en los compuestos antitiroideos (5-MTU y 6-MTU).

3. Las cepas mostraron una sensibilidad diferencial en la biotransformación de los promutágenos estudiados.

## BIBLIOGRAFIA

Alderson, T. (1985) Formaldehyde-induced mutagenesis: a novel mechanism for its action. *Mutation Res.* 154: 101-110.

Allen, J., A. Kligerman, J. Campbell, B.W. Collins., G. Erexson., F. Kari y E. Zeiger (1990) Cytogenetic analyses of mice exposed to dichloromethane. *Environ. Mol. Mutag.* 15: 221-228.

Anwar, W., W. A. William., A. Massoud., J. M. Gentile y J. Ashby (1992) Summary recommendations that have an impact on genetic toxicology research in developing countries: First International Conference on Environmental Mutagens in Human population at risk. *Mutation Res.* 272: 83-88.

Arinc, E., J.B. Schenkman y E. Hodgson (1991) Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds. Plenum Press. NATO ASI Series. Vol 202. 497p.

Ashby, J y R.W. Tennant (1988) Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicator of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Res.* 204: 17-115.

Ashby, J., R.W. Tennant., E. Zeiger y S. Stasiewicz (1989) Classification according to chemical structure, mutagenicity to *Salmonella* and level of carcinogenicity of a further 42 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Res.* 223: 73-103.

Ashby, J., P.A. Lefevre., H. Tinwell, G. Brunborg., P. Schmezer., B. Pool-zobel., R. Shanu-Wilson., J.A. Holme., E.J. Soderlund., D. Gulati y J.P. Wojciechowki (1991) The non-genotoxicity to rodents of the potent rodent bladder carcinogens O-anisidine and P-cresidine. *Mutation Res.* 250: 115-133.

Ashby, J y R.W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. National Toxicology Program. *Mutation Res.* 257: 229-306.

Ashby, J. (1992) The non-genotoxicity of o-anisidine: further comments. *Mutation Res.* 279: 225-226.

Auerbach, C., M. Moutschen-Dahmen y J. Moutschen (1977) Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. *Mutation Res.* 39: 317-362.

Baars, A.J., W.G.H. Blijleven., G.R. Mohn., A.T. Natarajan y D.D. Breimer (1980) Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutation Res.* 72: 257-264.

Baúste-Alentorn, M., N. Xamena., A. Creus y R. Marcos (1991) Genotoxicity studies with the unstable zeste-white (uz) system of *Drosophila melanogaster*: results with ten carcinogenic compounds. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 120-125.

Benyajati, C., A. R. Place y W. Sofer (1983) Formaldehyde mutagenesis in *Drosophila* molecular analysis of ADH negative mutants. *Mutation Res.* 111: 1-7.

Bohr, V., D. Phillips y P. Hanawalt (1987) Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.* 47: 6426-6436.

Brusick, D. (1987) Principles of Genetic Toxicology. Segunda ed. Plenum Press N.Y. 284p.

Carriere, V., I. De Waziers., Y.A. Courtis., J.P. Leroux y P.H.

Beaune (1992) Cytochrome P450 induction and mutagenicity of 2-aminanthracene (2AA) in rat liver and gut. *Mutation Res.* 268: 11-20.

Casanova, M., D.F. Deyo y H.D'A. Heck (1992) Dichloromethane (methylene chloride): Metabolism to formaldehyde and formation of DNA-protein cross-links in B6C3F1 mice and syrian golden hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114: 162-165.

Cortinas, C. (1990) Cáncer: Herencia y ambiente. Fondo de Cultura Económica, S.A. México, 101p.

Danford, N. (1991) The genetic toxicology of ortho-toluidine. *Mutation Res.* 258: 207-236.

Delgado, R. A. (1990) Daño genético inducido por mutágenos positivos en células del ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 75 p.

Frei, H y F.E. Würgler (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutation Res.* 203: 297-308.

Gangolli, S.D y J.C. Phillips (1988) The metabolism and disposition of xenobiotics. En: *Experimental toxicology: The basic principles*. Anderson, D y D.M. Conning (Eds). Royal Society of Chemistry. pp 130-178.

Goodman, G.A., W.T. Rall., S.A. Nies y P. Taylor (1990) *The pharmacological basis of therapeutics*. Panamericana. Octava edición. 1811 p.

Graf, U., F.E. Würgler., A.J. Katz., H. Frei., H. Juon., C.B. Hall y P.G. Kale (1984). Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6: 153-188.

Green, T. (1983) The metabolic activation of dichloro methane and chlorofluoromethane in bacterial mutation assay using *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 118: 277-288.

Green, M.M., T.T. Todo., H. Ryo y K. Fujikawa (1986) Genetic and molecular basis for a simple *Drosophila melanogaster* somatic system that detects environmental mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6667-6671.

Hällström, I., J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and genetically determined variation in the level induction of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 92: 61-168.

Hällström, I., A. Blanck y S. Atuma (1984) Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Chemical. Pharmacol.* 33: 13-20.

Hart, R.W y A. Turturro (1988) Current views of the biology of cancer. En: *Carcinogen Risk Assessment*. Travis, C.C (Ed). Plenum Press. pp 19-33.

Hatch, F.T., M.G. Knize., D.H. Moore y J.S. Felton (1992) Quantitative correlation of mutagenic and carcinogenic potencies for heterocyclic amines. *Mutation Res.* 271: 269-287.

Hodgson, E y R. Randy (1991) Insect cytochrome P450. En: *Molecular aspects of monooxygenases and bioactivation of toxic compounds*. Arinc, E., J.B. Schenkman y E.



Hodgson (Eds). Vol 202. Plenum Press. Nato ASI Series. pp 75-91.

IARC (WHO) (1987). Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC monographs. Vols 1-42, supplement 7. 440 p.

Index Merck (1989) Encyclopedy of chemical and drugs. Published by Merck and Co. 1606 p.

Juaristi, E. (1989) Introducción a la estereoquímica y al análisis conformacional. Centro de estudios avanzados del IPN. 296 p.

Kastenbaum, M.A y K.O. Bowman (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* 9: 527-549.

Koren, H. (1991) Handbook of environmental health and safety: principles and practices. Lewis Publishers, Inc. Vol I. 604 p.

Kulkarni, A.P y E. Hodgson (1980) Multiplicity of cytochrome P-450 in microsomal membranes from the housefly, *Musca domestica*. *Biochem. Biophys. Acta.* 632:573-588.

Lee, W.R., S. Abrahamson., R. Valencia., E.S. Von Halle., F.E. Würgler y S. Zimmering (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 23: 183-279.

Nebert, D.W y F.J. González (1987) P-450 genes: structure, evolution y regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945-993.

Neubert, D. (1977) Nature and levels of chemical environmental mutagens, industrial exposure and population at risk. En: *Progress in Genetic Toxicology*. Scott, D., B.A. Bridges y F.H. Sobels (Eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp 95-112.

Ordaz, T.M.G. (1991) Valoración de la prueba para detección de mutación y recombinación somática (SMART) en las células del ojo de *Drosophila melanogaster*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 96 p.

Rasmuson, B y M.M. Green (1974) Genetic instability in *Drosophila melanogaster*. a mutable tandem duplication. *Mol. Gen. Genet.* 133: 249-260.

Ready, D.F. (1989) A multifaceted approach to neural development. *TINS*. 12: 102-110.

Rodríguez-Arnaiz, R y M.P. Ramos (1992) *Drosophila* como sistema para detectar agentes genotóxicos. Serie de Genética: los pequeños manuales. Prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 50p.

Rodríguez-Arnaiz, R., M.P. Ramos y S. Zimmering (1992) Evaluation in *Drosophila melanogaster* of the mutagenic potential of furfural in the mei-9<sup>a</sup> test for chromosome loss in germ-line cells and the wing spot test for mutational activity in somatic cells. *Mutation Res.* 280: 75-80.

Rodríguez-Arnaiz, R., E.W. Vogel y A. Szakmary (1993) Genetic variability in *Drosophila*: strong strains differences in the bioactivation of six procarcinogens (Enviado a *Mutagenesis*).

Sato, R y Omura T (1978) Cytochrome P-450. Academic Press. 233 p.

Shahin, M. M. (1989) The importance of analyzing structure-activity relationships in mutagenicity studies. *Mutation Res.* 221: 165-180.

Thompson, D.C., P.D. Josephy., J.W.K. Chu y T.E. Eling (1992) Enhanced mutagenicity of anisidine isomers in bacterial strains containing elevated N-acetyltransferase activity. *Mutation Res.* 279: 83-89.

Vermeulen, N.P.E y D.D. Breimer (1983) Stereoselectivity in drugs and xenobiotic metabolism. En: *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*. Ariëns, E.J., W. Soudijn y W. M. Timmermans (Eds). Blackwell Scientific Publications. pp 33-55.

Vogel, E.W. (1987a) Somatic Mutation and Recombination Test SMART in *Drosophila melanogaster*. The w/w' eye mosaic technique: Description of its basic application. Comunicación personal. Department of radiation genetics and chemical mutagenesis. Sylvius Laboratory. Leiden. 21p.

Vogel, E.W. (1987b) Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell states. *Mutation Res* 180: 189-200.

Vogel, E.W y J.A. Zijlstra (1987) Mechanistic and methodological aspects of chemically induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res. 182: 243-264.

Vogel, E.W y A. Szakmary (1990) Basic principles and evaluation of results of assays measuring genotoxic damage in somatic cells of *Drosophila*. En: Mutation and the environment. Parte B. Wiley-Liss. pp 149-158.

Vogel, E.W., J.M. Nivard y J.A. Zijlstra (1991) Variation in spontaneous and induced mitotic recombination in different *Drosophila* populations: a pilot study on the effects of poliaromatic hydrocarbons in six newly constructed tester strains. Mutation Res. 250: 292-298.

Vogel, E.W (1992) Test for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. Mutation Res. 284: 159-175.

Williams, G.M., H. Mori y C.A. Mc Queen (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals. Mutation Res. 221: 263-286.

Würgler, F.E y E.W. Vogel (1986) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. En: Chemical mutagens:

principles and methods for their detection. De serres, F.J (Ed). Plenum Press. Vol 10. pp 1-72.

Yoshimi, N., S. Surgié., H. Iwata., K. Niwa., H. Mori., C. Hashida y H. Shimizu (1988) The genotoxicity of variety of aniline derivates in a DNA repair test with primary cultured rat hepatocytes. Mutation Res. 206: 183-191.

Zijlstra, J.A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Krips Repro Meppel. 192 p.

Tabla 1. Número de manchas/ojo obtenidas en los testigos de las cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.

CEPA	# DE OJOS	M A N C H A S			
		Chicas	Grandes	Totales	%
ST	800	49	12	61	7.6
	828	7	12	83	10.0
	562	4	16	61	10.8
	500	4	7	53	10.6
	500	46	7	53	10.6
	536	40	7	47	8.7
	500	61	3	64	12.8
Total	4226	358	64	422	10.1 ± 1.6
HK	724	6	19	80	11.0
	904	85	23	108	11.9
	574	55	11	66	11.4
	540	62	17	79	14.6
	540	50	7	57	10.5
	500	42	18	60	12.0
	584	59	15	74	12.6
Total	4366	414	110	524	12.0 ± 1.3

**Tabla 2. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con diclorometano a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.**

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>						Frecuencia
		Chicas %		Grandes %		Totales %		Inducida
<b>CEPA ST</b>								
Testigo	562	45	8.0	16	2.8	61	10.8	
50	500	81	16.2+	16	3.2	97	19.4+	8.6
100	500	110	22.0+	11	2.2	121	24.2+	13.4
250	446	100	22.4+	13	3.0	113	25.4+	14.6
500	324	85	26.2+	17	5.2	102	31.4+	20.6
<b>CEPA HK</b>								
Testigo	574	55	9.6	11	1.9	66	11.5	
50	510	76	14.9	12	2.3	88	17.2	5.7
100	500	84	16.8+	33	6.6+	117	23.4+	11.9
250	506	79	15.6+	30	5.9+	109	21.5+	10.0
500	486	126	25.9+	24	4.9d	150	30.8+	19.3

<sup>a</sup> p=0.05 + = positivo, d = débil positivo

Tabla 3. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con orto-toluidina a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>						Frecuencia Inducida
		Chicas %		Grandes %		Totales %		
CEPA ST								
Testigo	800	49	6.1	12	1.5	61	7.6	
1	750	115	15.3+	7	0.9	122	16.2+	8.6
2.5	502	127	25.3+	12	2.4	139	27.7+	20.1
5	192	67	34.9+	3	1.5	70	36.5+	28.8
CEPA HK								
Testigo	724	61	8.4	19	2.6	80	11.0	
1	678	102	15.0+	29	4.3	131	19.3+	8.3
2.5	572	86	15.0+	16	2.8	102	17.8+	6.8
5	480	118	24.6+	28	5.8+	146	30.4+	19.4

<sup>a</sup> P=0.05 + = positivo, d = débil positivo

**Tabla 4. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con orto-anisidina a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.**

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>						Frecuencia Inducida
		Chicas %		Grandes %		Totales %		
<b>CEPA ST</b>								
Testigo	828	71	8.6	12	1.4	83	10.0	
0.5	600	123	20.5+	17	2.8	140	23.3+	13.3
1	722	133	18.4+	21	2.9	154	21.3+	11.3
2.5	572	160	28.0+	35	6.1+	195	34.1+	24.1
5	180	80	44.4+	15	8.3+	95	52.7+	42.7
<b>CEPA HK</b>								
Testigo	904	85	9.4	23	2.5	108	11.9	
0.5	550	96	17.4+	14	2.5	110	20.0+	8.1
1	908	242	26.6+	43	4.7+	285	31.3+	19.4
2.5	502	170	33.9+	38	7.5+	208	41.4+	29.5
5	500	200	40.0+	41	8.2+	241	48.2+	36.3

<sup>a</sup> p=0.05 + = positivo, d = débil positivo

Tabla 5. Número y frecuencia de manchas/ ojo obtenidas al tratar con 2,4-diaminoanisol a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>			Frecuencia Inducida
		Chicas %	Grandes %	Totales %	
<b>CEPA ST</b>					
Testigo	500	46 9.2	7 1.4	53 10.6	
0.1	448	47 10.5	8 1.8	55 12.3	1.7
0.25	500	75 15.0+	3 0.6	78 15.6+	5.0
0.5	500	65 13.0	8 1.6	73 14.6	4.0
<b>CEPA HK</b>					
Testigo	540	50 9.2	7 1.3	57 10.5	
0.1	500	59 11.8	6 1.2	65 13.0	2.5
0.25	476	64 13.4	4 0.8	68 14.2	3.7
0.5	500	57 11.4	11 2.2	68 13.6	3.1

<sup>a</sup> P=0.05 + = positivo, d = débil positivo



Tabla 6. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con eter-4-aminodifenilico a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>						Frecuencia
		Chicas %		Grandes %		Totales %		Inducida
<b>CEPA ST</b>								
Testigo	500	46	9.2	7	1.4	53	10.6	
0.1	506	54	10.6	8	1.6	62	12.2	1.6
0.25	500	92	18.4+	9	1.8	101	20.2+	9.6
0.5	508	193	38.0+	20	3.9+	213	41.9+	31.3
1	476	175	36.8+	12	2.5	187	39.3+	28.7
5	500	424	84.8	34	6.8+	458	91.6+	81.0
<b>CEPA HK</b>								
Testigo	540	62	11.5	17	3.1	79	14.6	
0.1	446	62	13.9	9	2.0	71	15.9	1.3
0.25	500	116	23.2+	23	4.6	139	27.8+	13.2
0.5	500	227	45.4+	35	7.0+	262	52.4+	37.8
1	436	305	70.0+	30	6.8+	335	76.8+	62.2
5	384	505	131.5+	50	13.0+	555	144.5+	129.9

<sup>a</sup> p=0.05 + = positivo, d = débil positivo

**Tabla 7. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con 5-metilthiouracilo a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.**

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>			Frecuencia
		Chicas %	Grandes %	Totales %	Inducida
<b>CEPA ST</b>					
Testigo	536	40 7.5	7 1.3	47 8.8	
0.1	500	50 10.0	8 1.6	58 11.6	2.8
0.25	500	66 13.2	3 0.6	69 13.8	5.0
0.5	500	76 15.2+	9 1.8	85 17.0+	8.2
<b>CEPA HK</b>					
Testigo	500	42 8.4	18 3.6	60 12.0	
0.1	520	47 9.0	7 1.3	54 10.3	
0.25	500	43 8.6	7 1.4	50 10.0	
0.5	500	49 9.8	14 2.8	63 12.6	0.6

<sup>a</sup> P=0.05 + = positivo, d = débil positivo

**Tabla 8. Número y frecuencia de manchas/ojo obtenidas al tratar con 6-metilouracilo a cepas de *Drosophila melanogaster* con metabolismo diferencial.**

CONC. [mM]	# DE OJOS	M A N C H A S <sup>a</sup>						Frecuencia
		Chicas %		Grandes %		Totales %		Inducida
<b>CEPA ST</b>								
Testigo	500	61	12.2	3	0.6	64	12.8	
0.1	512	128	25.0+	5	1.0	133	26.0+	13.2
0.25	502	136	27.0+	16	3.2+	152	30.2+	17.4
0.5	500	146	29.2+	12	2.4	158	31.6+	18.8
<b>CEPA HK</b>								
Testigo	584	59	10.1	15	2.6	74	12.7	
0.1	500	58	11.6	4	0.8	62	12.4	
0.25	500	73	14.6d	15	3.0	88	17.6d	4.9
0.5	450	85	18.9+	9	2.0	94	20.9+	8.2

<sup>a</sup> P=0.05 + = positivo, d = débil positivo

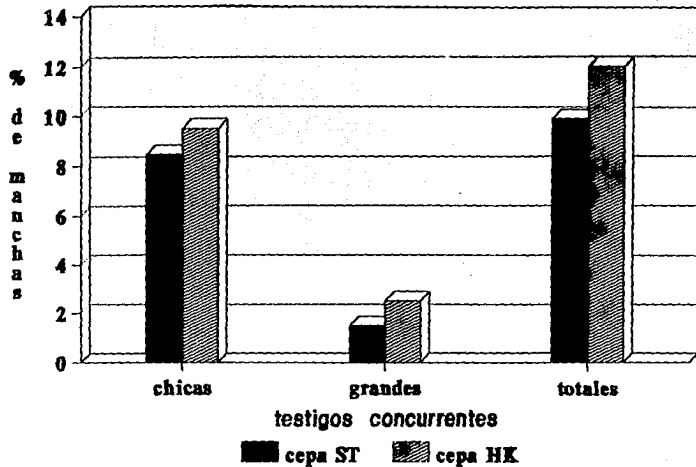
Tabla 9. Respuesta de las cepas ST y HK frente a los 7 compuestos químicos analizados.

COMPUESTO	ANALISIS ESTADISTICO*		RELACION CONCENTRACION RESPUESTA**		SENSIBILIDAD
	ST	HK	ST	HK	
CEPA					ST HK
MBC	+	+	SI	NO	ST>HK
O-TO	+	+	SI	NO	ST>HK
O-AN	+	+	NO	SI	ST>HK
2,4-DAA	-	-	NO	NO	ST=HK
4-AME	+	+	NO	SI	ST<HK
5-MTU	+	-	SI	NO	ST>HK
6-MTU	+	+	SI	SI	ST>HK

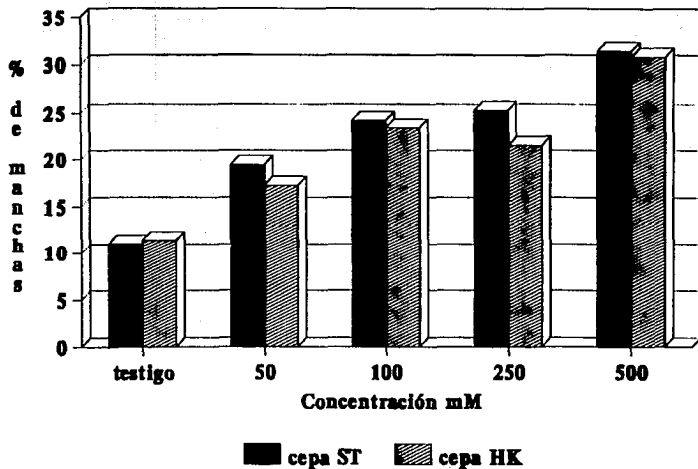
\* En base a la concentración más alta

\*\* En base a la concentración más baja

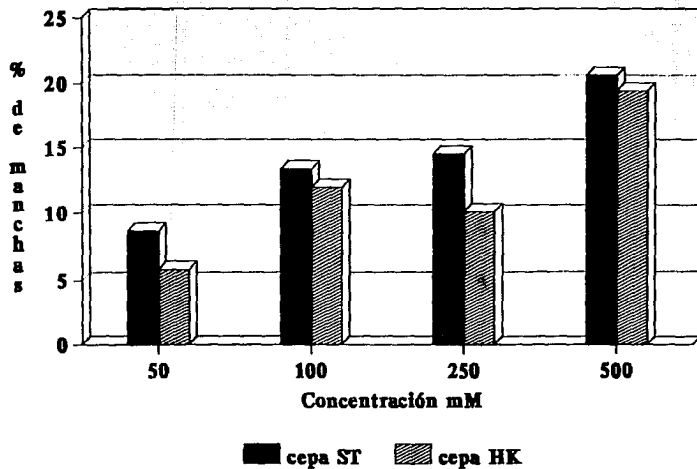
**Gráfica 1. Frecuencia de manchas chicas grandes y totales obtenidas en los testigos concurrentes en las cepas ST y HK**



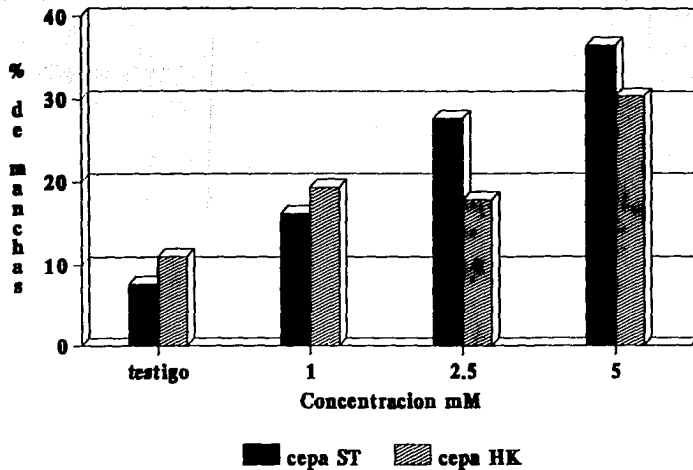
**Gráfica 2. Frecuencia de manchas totales inducidas por DCM en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



**Gráfica 3. Frecuencia inducida de manchas totales por DCM en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***

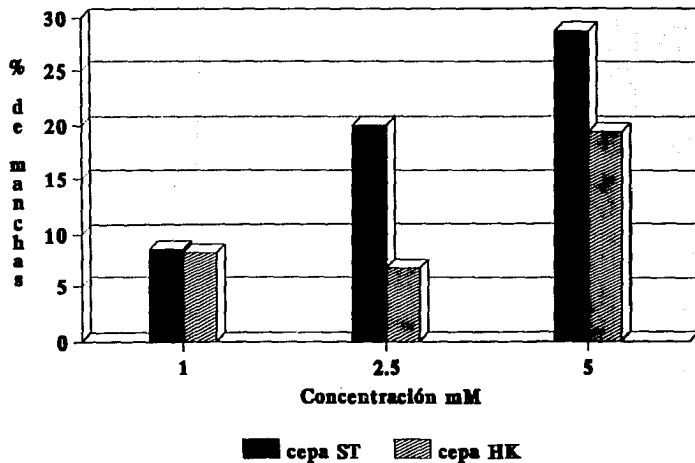


**Gráfica 4. Frecuencia de manchas totales inducidas por O-TO en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***

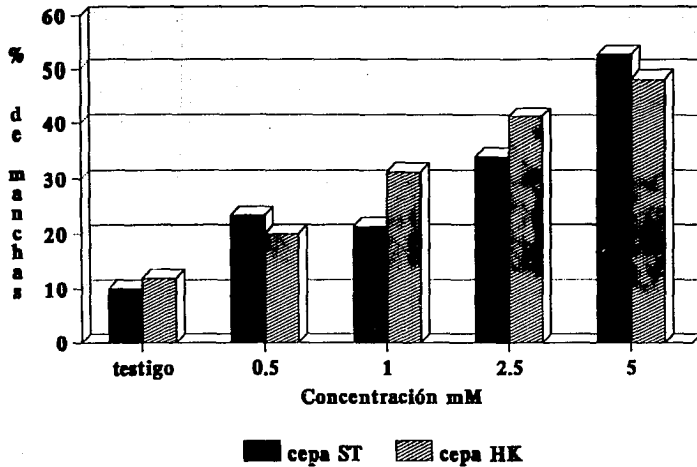




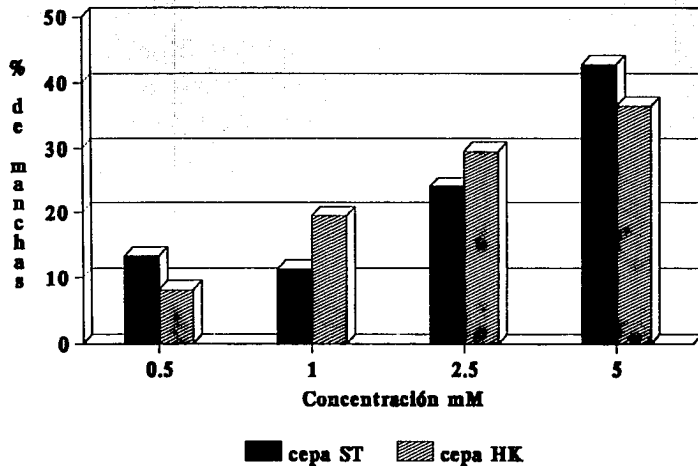
**Gráfica 5. Frecuencia inducida de manchas totales por O-TO en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



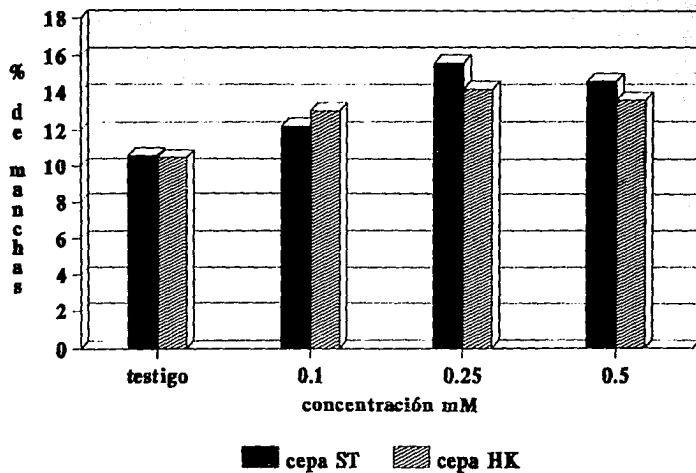
**Gráfica 6. Frecuencia de manchas totales inducidas por O-AN en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



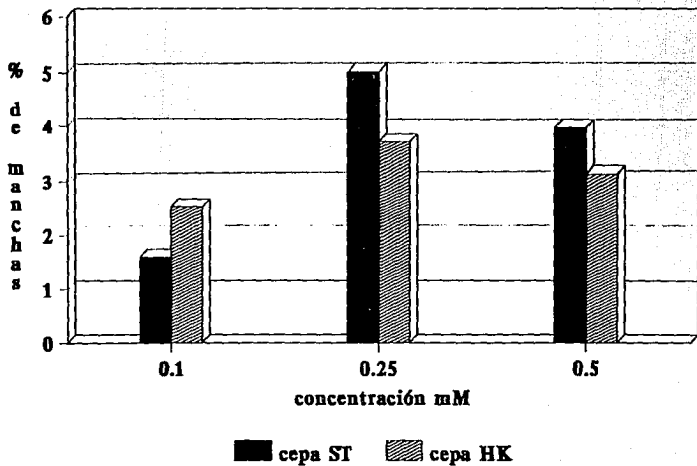
**Gráfica 7. Frecuencia inducida de manchas totales por O-AN en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



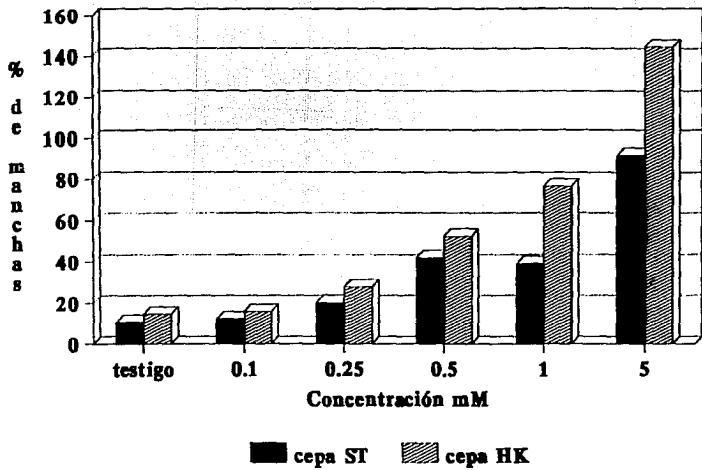
**Gráfica 8. Frecuencia de manchas totales inducidas por 2,4-DAA en las cepas ST y HK en *Drosophila melanogaster***



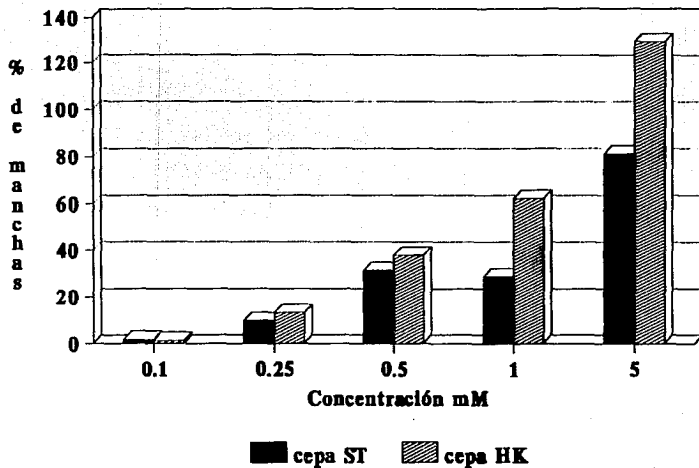
**Gráfica 9. Frecuencia inducida de manchas totales por 2,4-DAA en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



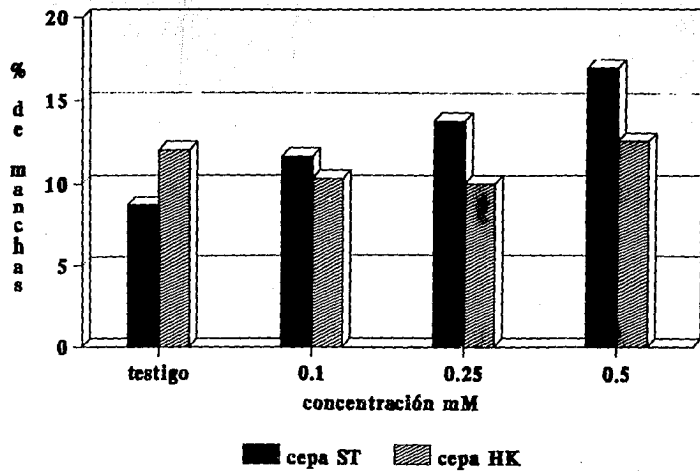
**Gráfica 10. Frecuencia de manchas  
totales inducidas por 4-AME en las cepas  
ST y HK de *Drosophila melanogaster***



**Gráfica 11. Frecuencia inducida de manchas totales por 4-AME en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***

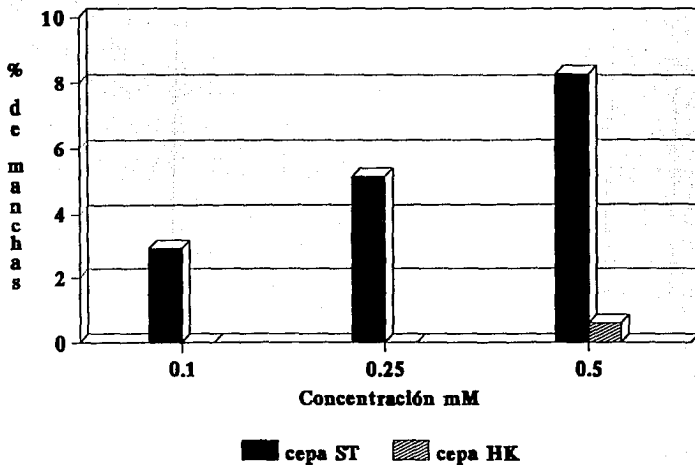


**Gráfica 12. Frecuencia de manchas  
totales inducidas por 5-MTU en las cepas  
ST y HK de *Drosophila melanogaster***

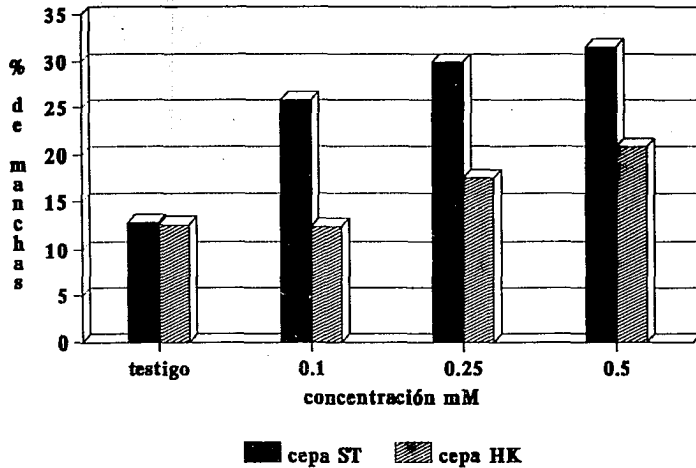




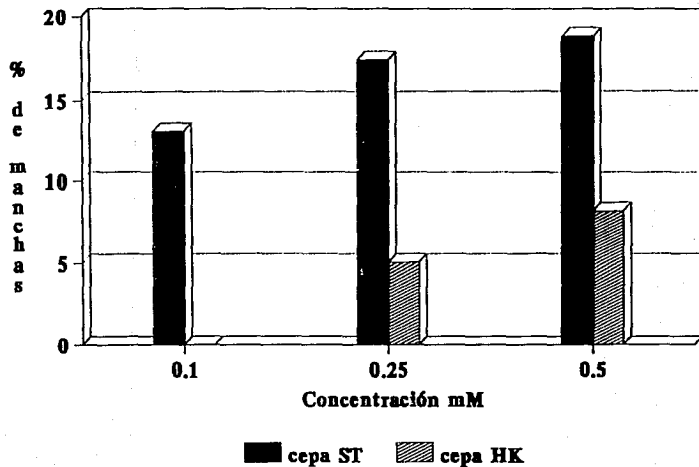
**Gráfica 13. Frecuencia inducida de manchas totales por 5-MTU en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster***



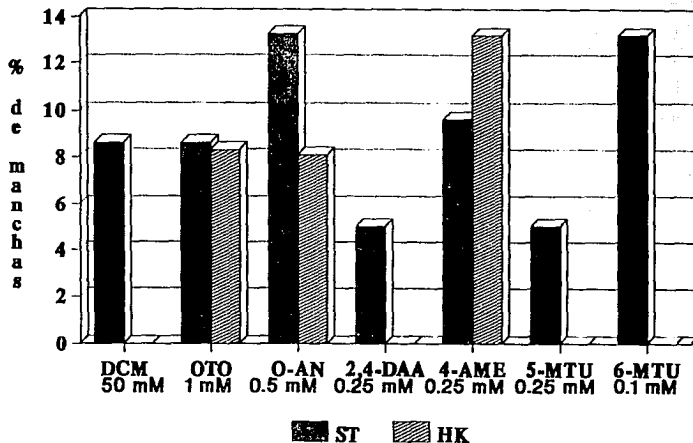
**Gráfica 14. Frecuencia de manchas  
totales inducidas por 6-MTU en las cepas  
ST y HK de *Drosophila melanogaster***



Gráfica 15. Frecuencia inducida de manchas totales por 6-MTU en las cepas ST y HK de *Drosophila melanogaster*

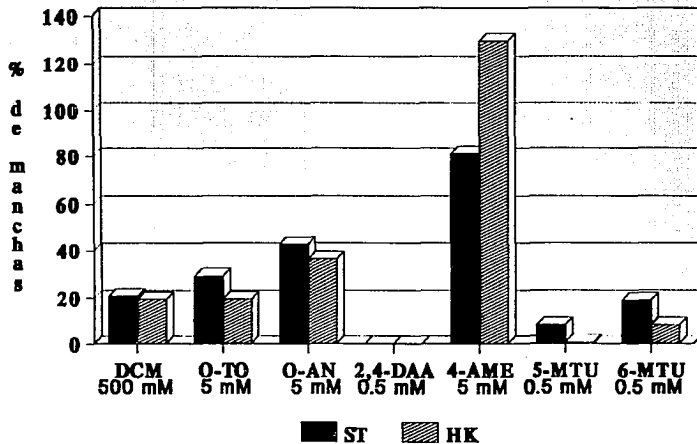


**Gráfica 16. Frecuencia inducida de manchas totales por los siete compuestos en las cepas ST y HK**



**Se graficó la concentración más baja estadísticamente significativa**

**Gráfica 17. Frecuencia inducida de manchas totales por los siete compuestos en las cepas ST y HK**



Se graficó la concentración más alta estadísticamente significativa

Fig.1 Representación esquemática de las vías de dispersión de los contaminantes ambientales (tomado de Koren, 1991)

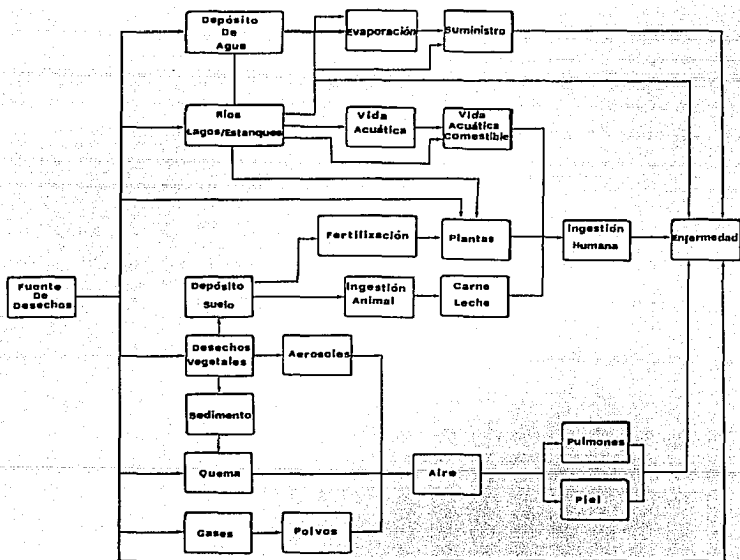
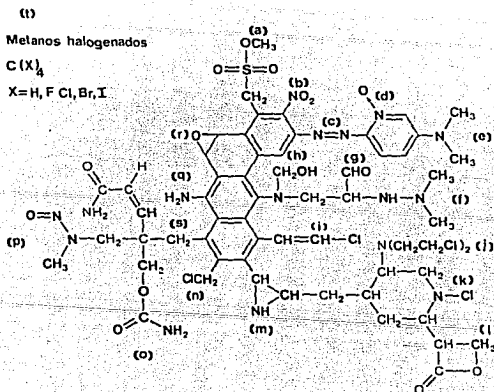


Fig.2 Modelo de una molécula hipotética, la cual porta los diferentes grupos sustituyentes considerados con alerta estructural. a) alquil ester de ácido fosfónico o sulfónico, b) grupos nitroaromáticos, c) grupos azoaromáticos, d) anillos aromáticos N-óxidos, e) grupos aromáticos mono y dialquilaminos, f) alquilhidrazinas, g) alquilaldehidos, h) derivados de N-metilol, i) monohaloalquenos, j) la familia de N y S mostazas, K) N-cloroaminas, l) propiolactonas y propiosulfonas, m) derivados aziridinílicos aromáticos y alifáticos, n) sustituyentes primarios alquilados aromáticos y alifáticos, o) derivados de uretanos, p) alquil N-nitrosaminas, q) aminas aromáticas y sus esters y N-hidroxi derivados, r) epóxidos alifáticos y óxidos aromáticos, s) centro de reactividad de Michael, t) halomonocarbonos (tomado de Ashby y Tennant 1988, 1991)



**Fig.3 Clasificación de los compuestos carcinogénicos de acuerdo a la organización mundial de la salud (tomado de IARC-WHO, 1987)**

GRUPO	CARACTERISTICAS
1	Agentes carcinogénicos para los seres humanos: Suficientes evidencias de su carcinogenicidad.
2A	Agentes probablemente carcinogénicos: Evidencias limitadas en los seres humanos y suficientes en organismos de experimentación.
2B	Agentes posiblemente carcinogénicos: Evidencias limitadas en los seres humanos e insuficientes en organismos de experimentación.
3	Los agentes no han sido clasificados como carcinogénicos, se incluyen todos los que no caen en las otras categorías.
4	Agentes probablemente no carcinogénicos: Evidencias suficientes en los seres humanos y en los organismos de experimentación en cuanto a la ausencia de carcinogénesis de algunos compuestos. Sin embargo de otros no se tienen evidencias suficientes acerca de sus efectos negativos.



**Fig.4 Vías metabólicas de los compuestos xenobióticos**  
 (tomado de Gangolli y Phillips, 1988)

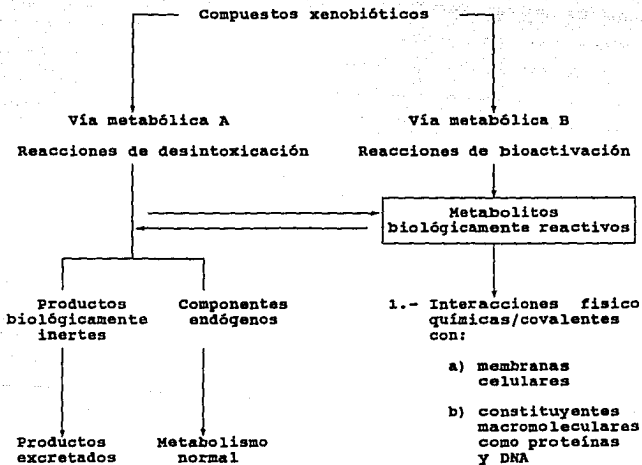
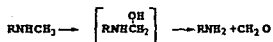


Fig.5 Reacciones de biotransformación de los compuestos xenobióticos (tomado de Goodman et al. 1990)

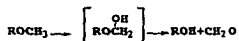
## I. REACCIONES OXIDATIVAS

EJEMPLO

### 1) N- y O-Desalquilación



Desipramida

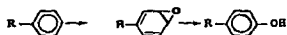


Fenacetina

### 2) Hidroxilación de cadenas laterales alifática y aromática

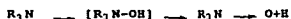


Penobarbital



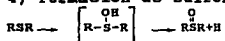
Fenitoína

### 3) N-Oxidación



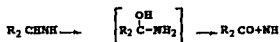
Guanetidina

### 4) Formación de sulfóxido



Clorpromazina

### 5) Desaminación de aminas



Anfetamina

### 6) Desulfuración



Tiobarbital

## II. Hidrólisis de ésteres y amidas



Procaína

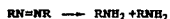


Lidocaína

Continuación de la Figura 5.

III. Reducción

1) Azorreducción

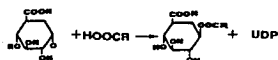


2) Nitrorreducción

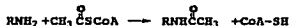


IV. Reacciones de conjugación

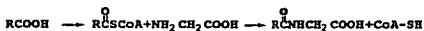
1) Glucuronidación (éster y éster)



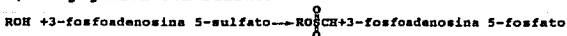
2) Acetilación



3) Conjugación con glicina



4) Conjugación con sulfato



5) O-, S- y N-Metilación



X = O, S, N

EJEMPLO

Prontosil

Cloranfenicol

Acetaminofeno

Naproxeno

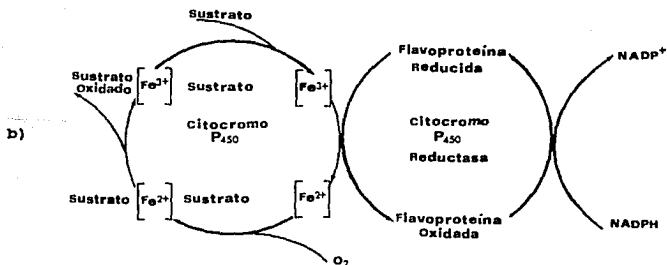
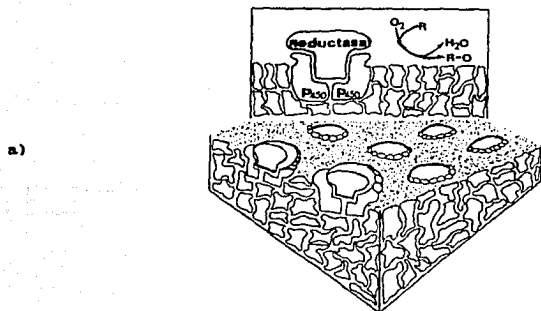
Isoniazida

Acido salicílico

Esteroides

Noradrenalina

Fig.6 a) Estructura tridimensional del sistema enzimático P-450 en el retículo endoplasmático (R representa el sustrato)  
 b) componentes principales (tomado de Nebert y González, 1987)



**Fig.7 Estructura de una omatidia de *Drosophila melanogaster* (tomado de Ready, 1989)**

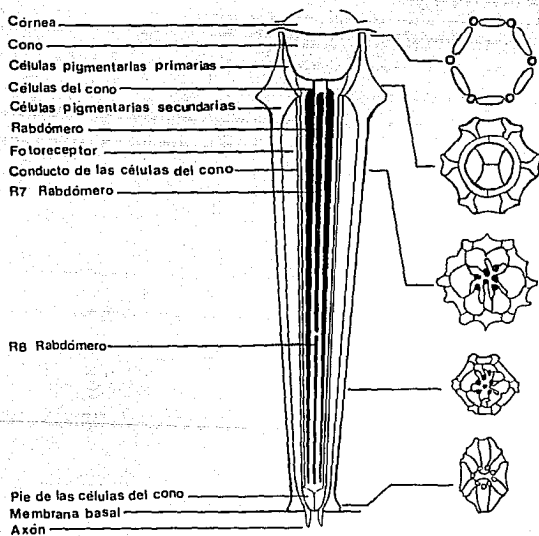




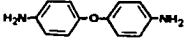




Fig.8 Características de los compuestos químicos utilizados (tomado de Ashby y Tennant 1991 y de Hatch et al. 1992)

FORMULA	ALERTA ESTRUCTURAL	# ANILLOS AROMATICOS	#GRUPOS AMINO/IMINO
DCM 	+	0	0
O-TO 	+	1	1
O-AN 	+	1	1
2,4-DAA 	+	1	2
4-AME 	+	2	2
5-MTU 	+	1	2
6-MTU 	+	1	2

**Fig.9 Manchas chicas a) dos omatidias afectadas  
b) tres omatidias afectadas**

a)



b)

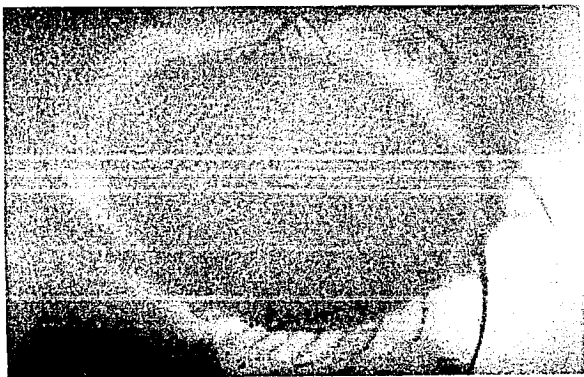


Fig.10 Manchas grandes a) aproximadamente 40 omatidias afectadas, b) aproximadamente 300 omatidias afectadas

a)



b)

