

102
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DE TRES COMPUESTOS DEL GRUPO DE LAS AZIDAS EN CELULAS SOMATICAS de *Drosophila melanogaster*.

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

MARIA DE JESUS ISLAS GUZMAN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES.



FACULTAD DE CIENCIAS

MEXICO, D. F. SEPTIEMBRE 1996

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Comparación de la actividad genotóxica de tres compuestos del grupo de las Azidas en células somáticas de Drosophila melanogaster".

realizado por María de Jesús Islas Guzmán

con número de cuenta 7821432-1 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Patricia Ramos Morales

Propietario Dra. Patricia Guevara Fefer

Propietario Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

Suplente Biol. María Guadalupe Ordaz Téllez

Suplente Biol. Edna González César

FACULTAD DE CIENCIAS

Comité Académico de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIAS

Con todo mi amor, admiración y respeto a mi madre, por ser ejemplo de bondad, por su apoyo y comprensión en todos los momentos de mi vida.

A mis hermanos y hermanas por su cariño y su alegría, especialmente a Soni por ser mi mejor amiga y consejera en los buenos y malos tiempos.

A mis sobrinos: Omar, Laura, Brenda y Karen por darme tanta alegría.

A Bruno por ser alguien especial en mi vida.

Con cariño a mis tías: Julia, Ofelia y Lucía por su gran ayuda en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi agradecimiento y admiración a la Dra. Patricia Ramos Morales por darme la oportunidad de realizar el presente trabajo, por su comprensión y paciencia.

A los sinodales:
Dra. Patricia Guevara Fefer
Biol. Miguel Angel Meneses Pérez
Biol. Ma. Guadalupe Ordaz Téllez
Biol. Edna González César
Por sus valiosos comentarios y su atención.

A Edna por su gran amistad y por su ayuda incondicional durante la realización de este trabajo.

A Julián por su ayuda en el trabajo de computadora.

A la Sra. Guadalupe Garduño "Pituka" de quien he aprendido tanto.

A la Sra. Cristina García, por su comprensión y apoyo.

A Rosa Alejandrina por ser amiga incondicional.

A todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Genética: Irma, Armando, Adriana, Yola, Juan Carlos, Pati O., Pati An., Mosés, Hugo, Yadira, Blanca, Judith, Héctor y Sergio. Por su compañerismo y apoyo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética "Theodosius Dobzhansky" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE

| | |
|--------------------------------|-----------|
| RESUMEN | ii |
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIAL Y METODO | 46 |
| RESULTADOS | 53 |
| DISCUSION | 62 |
| CONCLUSIONES | 68 |
| BIBLIOGRAFIA | 69 |

RESUMEN

La valoración del daño genético potencial que los factores ambientales diversos pueden producir en los seres vivos es cada vez más relevante. La interacción de estos factores con el material hereditario (Acido desoxirribonucleico, ADN), involucra aspectos como: las características fisicoquímicas de la sustancia, la forma e intensidad de la exposición, la edad del organismo afectado y su estado nutricional, sexo y hábitos, entre otros. En combinación con estos factores, el metabolismo propio de los organismos tiene un papel crucial en la eliminación o activación de las sustancias que ingresan al organismo, además de que su funcionamiento particular depende del tipo de enzimas que posee.

Los compuestos del grupo de las azidas tienen amplia aplicación en la medicina, la industria y la investigación, sin embargo, poco se conoce acerca de su potencial genotóxico, así como su(s) posible(s) mecanismo(s) de acción; particularmente en relación con el hombre, éstos no han sido suficientemente estudiados.

En este trabajo se valoró la respuesta genotóxica de tres azidas: isoniazida, pirazinamida y tiosemicarbazida, mediante la prueba SMART en células de las alas de Drosophila melanogaster.

Se obtuvieron larvas de la cruda de hembras flr¹/TM3, Ser x machos mwh/mwh, éstas fueron expuestas a los compuestos indicados mediante un tratamiento semicrónico (48 horas). Se probaron concentraciones en un rango de 0.14 a 2 mM. Como disolvente y testigo negativo se utilizó agua destilada. Por cada tratamiento se realizaron tres repeticiones. Cuando se obtuvieron las moscas adultas, se procedió a registrar el número y tipo de manchas por mosca. El análisis estadístico se realizó mediante el programa de cómputo SMART, a un nivel de significación de 0.05.

Las tres sustancias mostraron alta toxicidad pero débil actividad mutagénica en el sistema de prueba utilizado. Isoniazida únicamente indujo manchas chicas a 1.5 y 2 mM, y manchas totales a 2 mM ($P < 0.05$); pirazinamida resultó cualitativamente menos tóxica e incrementó la frecuencia de manchas totales sólo a 2 mM; tiosemicarbazida indujo manchas grandes a 0.88 y 1.5 mM, y manchas gemelas a 0.63 mM. En comparación con otro compuesto del grupo, azida de sodio, el cual induce recombinación mitótica en células de las alas de Drosophila como respuesta al daño inducido, las tres sustancias probadas en el presente trabajo sólo producen una débil respuesta genotóxica en este organismo.

INTRODUCCION

La composición química del ambiente ha alcanzado una enorme complejidad al generarse una gama de productos químicos con la finalidad de soportar el desarrollo económico de la actualidad. Aproximadamente, cuatro millones de sustancias químicas han sido sintetizadas o aisladas a partir de productos naturales. Las más usadas son alrededor de 60 mil, de las cuales, unas 4 mil se utilizan en las fórmulas de los medicamentos, y más de 5 mil en la industria alimentaria (Albert, 1988).

La comercialización de los compuestos orgánicos es cada día mayor, por lo que la inversión económica en este rubro alcanza cifras considerables que incrementan la capacidad de producción e impulsan a la tecnología a grandes cambios, producto de los acelerados procesos de investigación. En ciertas condiciones, algunas de estas sustancias pueden tener efectos adversos en los organismos incluyendo al hombre, como se ha mostrado en estudios realizados en animales y en algunos reportes de tipo epidemiológico (Casarett y Doull, 1975; Brusick 1987 y 1988).

Entre las diferentes rutas por las que los agentes químicos llegan al hombre, suelen haber una o más de una, que constituyan la principal vía de exposición, de tal forma que el conocimiento de éstas, facilita la vigilancia del medio para adoptar medidas de control eficaces; por lo que resulta de gran interés en el campo de la investigación conocer el impacto de los diversos compuestos tóxicos en las poblaciones, y en particular, él o los efectos provocados en el hombre, para establecer límites de seguridad en la

exposición que reduzcan la probabilidad de sufrir algún tipo de daño durante su uso (OMS, 1986).

La toxicología estudia el impacto que las diferentes sustancias producen en los seres vivos, y la naturaleza de él o los mecanismos por los que estas alteraciones son producidas. También se relaciona con la evaluación cuantitativa de la severidad y frecuencia de los efectos provocados en relación con la forma de exposición de los organismos. Así, participa en la valoración de sustancias usadas en la medicina con fines diagnósticos, preventivos y terapéuticos; en la industria de los alimentos, como complementos o aditivos alimentarios directos e indirectos; en la agricultura, como pesticidas, reguladores del crecimiento; y en la industria química, como materia prima, disolventes e intermediarios en la síntesis de otras sustancias y en la elaboración materiales diversos (OMS, 1986).

La toxicología se ha complementado con otras áreas del conocimiento impulsando el desarrollo de interdisciplinas como la toxicología genética, cuya función principal es instrumentar métodos y pruebas para identificar y evaluar el impacto de las sustancias químicas ambientales que al interactuar con los seres vivos puedan provocar efectos hereditarios adversos. Actualmente, la genética toxicológica también trata de seguir la secuencia de eventos que suceden a partir de la interacción primaria del agente genotóxico potencial con el material hereditario (Acido desoxirribonucleico, ADN), hasta la expresión del daño genético. Es por lo que esta disciplina se vincula estrechamente con el estudio

de la actividad mutagénica y del potencial carcinogénico de diversos compuestos (Casarett y Doull, 1975; Vogel, 1991; Lippman, 1992).

Metabolismo

La absorción de un compuesto puede ocurrir por vía oral, respiratoria, cutánea, y otras. En toxicología se emplean además rutas alternativas como la intraperitoneal, la intramuscular y la subcutánea (Fig. 1) (Zijlstra y Vogel, 1988). La naturaleza e intensidad de los efectos producidos por un compuesto químico dependen de la concentración administrada, la duración de la exposición, la absorción, distribución, excreción, y la concentración final del compuesto en él o los órganos blanco (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989).

Para que un producto químico sea absorbido, distribuido y excretado, debe atravesar las diversas membranas celulares. Una vez que el compuesto químico llega al torrente sanguíneo se distribuye a los tejidos. La velocidad de distribución a cada órgano está relacionada con el flujo sanguíneo a través del mismo, la facilidad con la que la sustancia atraviesa la pared capilar local y la membrana celular, y la afinidad que otros componentes como las proteínas del plasma puedan tener hacia el compuesto (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989).

El tracto respiratorio es la vía de entrada de diferentes sustancias extrañas contenidas en el aire, en la forma de gases, vapores, aerosoles y materia particulada de tamaño pequeño. Sólo

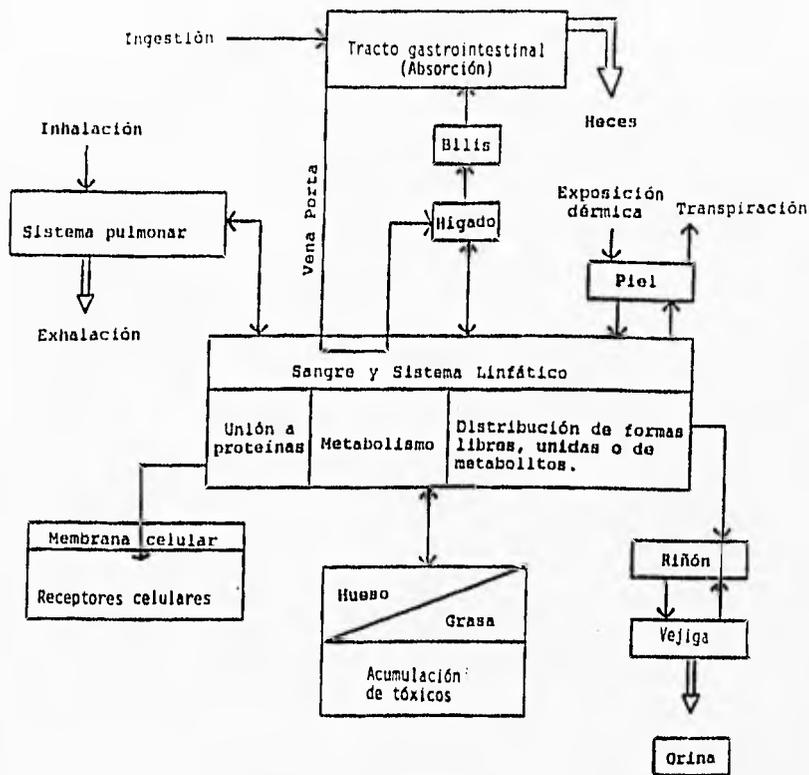


Fig. 1. Principales rutas de absorción, distribución y excreción de los compuestos tóxicos en el cuerpo humano (Modificado de Cassarett y Doull, 1975)

parte del material logra llegar a los bronquios, donde las sustancias son absorbidas por los capilares pasando al o los órganos blanco a través de la circulación. La tasa de absorción de los gases es función de la gran área alveolar, el abundante flujo sanguíneo y el estrecho contacto entre la sangre y el aire alveolar. En esta vía de entrada, la difusión pasiva de aerosoles a través de las membranas de las células alveolares reviste especial importancia (Timbrell, 1989). La piel constituye una importante barrera de protección para el organismo, sin embargo, gran variedad de tóxicos (gases y líquidos, entre otros) logran ingresar a través de ésta en cantidades suficientes para producir efectos. Muchas sustancias tóxicas alcanzan al tracto gastrointestinal junto con los alimentos y el agua, en la forma de medicamentos, o bien, son ingeridos accidentalmente. La absorción se puede llevar a cabo a todo lo largo del tracto gastrointestinal, en este aspecto es importante considerar la participación del pH en las diferentes regiones del mismo.

La cinética de cualquier sustancia química que llega al organismo implica el paso de ésta a través de las membranas, mediante mecanismos que implican la participación activa de componentes de membrana de acuerdo a las características físico-químicas del compuesto:

- afinidad a moléculas endógenas (receptores)
- polaridad
- solubilidad en lípidos
- tamaño de la molécula

Existen mecanismos definidos por medio de los cuales una sustancia atraviesa una membrana (Fig. 2). De ellos, el más importante es la difusión pasiva dependiente de un gradiente de concentración, debido a que la mayoría de los tóxicos pasan por este mecanismo; otros son: filtración a través de poros de la membrana, transporte activo y fagocitosis o pinocitosis. En los dos últimos, la célula toma parte activa en la transferencia de sustancias a través de sus membranas.

Una vez que los compuestos alcanzan el torrente sanguíneo, se combinan en mayor o menor proporción con las proteínas plasmáticas, las cuales determinan en gran medida su distribución. La concentración de un compuesto en un tejido particular depende del tipo de enlace que formen. El órgano con mayor participación en la biotransformación es el hígado, el cual, junto con el riñón tiene mayor capacidad de enlace de sustancias químicas que otros órganos, atributo que se relaciona directamente con las funciones metabólica y excretora, respectivamente. En estos órganos, se han identificado ciertas proteínas por su propiedad de enlace específico. El tipo de enlace formado puede aumentar con rapidez la concentración de un compuesto. Por ejemplo, en el hombre 30 minutos después de la administración de plomo, la concentración en el hígado es 50 veces mayor que en el plasma. Otros tejidos en los que pueden acumularse compuestos químicos son el tejido adiposo, en el caso de sustancias liposolubles; y el tejido óseo, en el que ocurre intercambio entre los tóxicos alojados en el líquido intersticial y los cristales de hidroxapatita de mineral óseo (Litter, 1986; Maldonado, 1994).

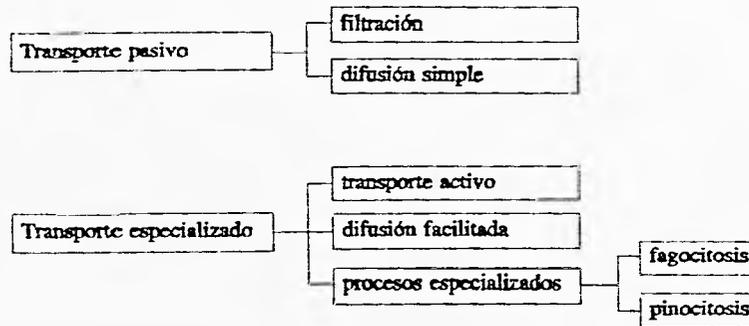


Fig. 2. Mecanismos de transporte por los cuales un compuesto atraviesa las membranas del cuerpo (Vogel, 1991)

Después de la absorción y distribución en el organismo, los agentes tóxicos son excretados, rápida o lentamente; de este hecho dependerá la magnitud del daño. En este aspecto, también están involucrados factores genéticos, fisiológicos, farmacodinámicos y ambientales, que pueden modificar no sólo la cinética de una reacción, sino además el patrón del metabolismo, y en consecuencia, la toxicidad de los mismos (Timbrell, 1989).

La principal ruta de excreción de tóxicos es por vía renal, pero el hígado y los pulmones son también órganos excretores de algunas sustancias. Además, existen rutas alternativas que participan en menor proporción pero que realizan una función relevante en la eliminación de compuestos.

De esta manera, varios factores modifican la secuencia de la participación de las diferentes vías metabólicas, como son: la concentración y forma química del compuesto; la edad, sexo y dote genética del organismo, así como el impacto del ambiente sobre ésta; observándose variaciones en la biotransformación de las sustancias extrañas y en la susceptibilidad de los inductores metabólicos.

Por la forma de interacción con las macromoléculas celulares se distinguen dos clases de compuestos genotóxicos: compuestos de acción directa y compuestos de acción indirecta (Fig. 3). Los primeros interactúan directamente con las biomoléculas (ADN, proteínas y enzimas). Los compuestos de acción indirecta son aquellos que requieren ser biotransformados a una forma reactiva que es la que ejerce su acción, estos agentes químicos también son

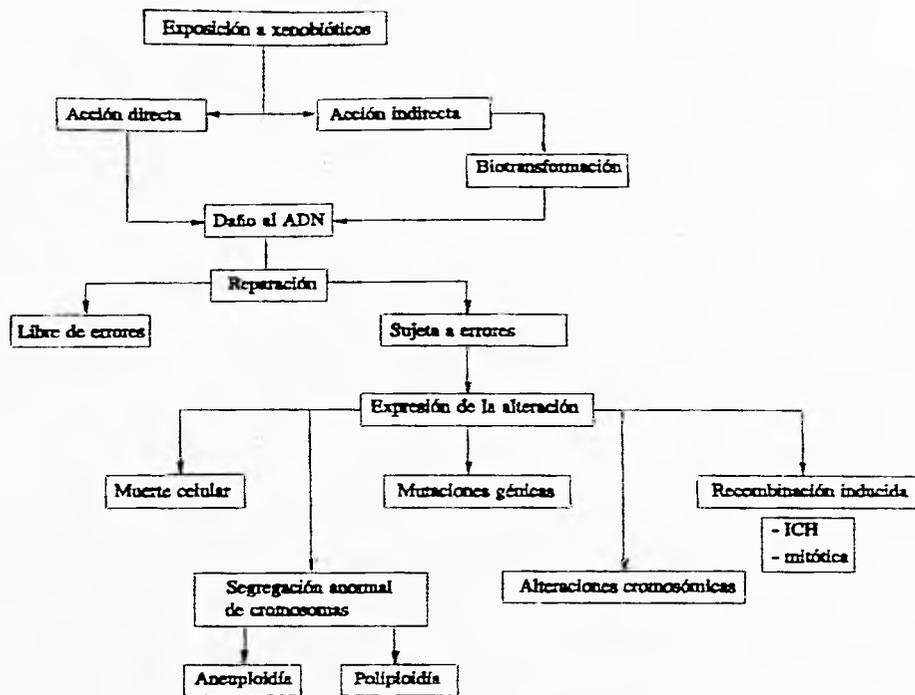


Fig. 3. Daño genético en células somáticas y germinales por exposición a agentes xenobióticos (Modificado de Brusick, 1987)

llamados compuestos precursores o promutágenos. Así, los promutágenos serán reactivos si el organismo expuesto tiene las enzimas necesarias para transformarlos a la forma reactiva. En síntesis, la biotransformación implica una serie de reacciones que modifican la estructura molecular de un compuesto, convierte los compuestos originales en metabolitos y forma conjugados hidrosolubles o más polares, que son excretados con mayor facilidad, aunque también esta transformación puede facilitar la interacción del compuesto con el ADN (Fig. 4) (Casarett y Doull, 1975; Filov *et al.*, 1979; Timbrell, 1989).

La tasa de biotransformación de una sustancia tóxica difiere de una especie a otra, e incluso entre organismos de la misma especie. Se han definido dos grupos de reacciones principales en la biotransformación de sustancias: reacciones de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y reacciones de fase II. Estas últimas involucran la formación de un compuesto (o conjugado) a partir de la sustancia precursora o su metabolito, más un metabolito o sustrato endógeno. Las reacciones de fase I, introducen un grupo funcional en la molécula de la sustancia extraña, o modifican uno preexistente haciendo a la molécula más polar, por lo que será más fácilmente excretada (Timbrell, 1989; Hayes y Laws 1991).

El sistema enzimático de hemoproteínas, citocromo P450 dependiente del NADPH (forma reducida del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido) y del oxígeno molecular, se localiza principalmente en el retículo endoplasmático liso de las células del hígado y se ha determinado que aproximadamente el 90 % de las

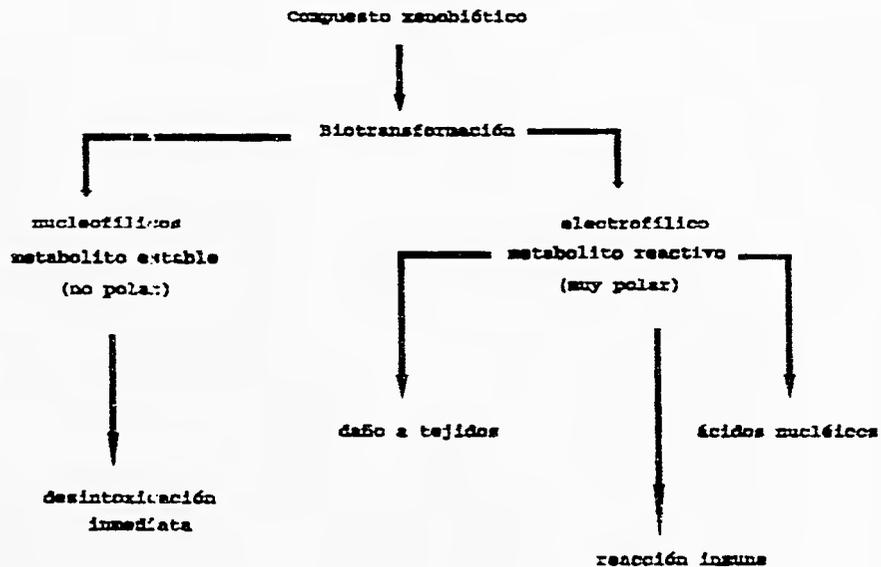


Fig. 4. Formación de metabolitos (Orozco, 1992).

reacciones de oxidación son realizadas por este sistema, entre otro tipo de reacciones (Fig. 5) (Zijlstra y Vogel, 1988).

La transformación metabólica predominante se lleva al cabo en la fracción microsómica (retículo endoplásmico liso) de las células del hígado; aunque también ocurre en menor grado en las células del tracto gastrointestinal, riñón, pulmón, placenta y sangre. La excreción, un proceso inverso a la absorción y distribución, involucra también mecanismos especializados (Casarett y Doull, 1975; Zijlstra y Vogel, 1988; Timbrell, 1989).

Por la forma en la que interaccionan los compuestos tóxicos con los ácidos nucleicos, éstos pueden clasificarse en compuestos alquilantes mono y polifuncionales, alquilantes cíclicos, intercalantes y simples no alquilantes (Fig. 6). La asociación entre el tipo de interacción que un compuesto establece con el ADN y los efectos provocados ha posibilitado además, relacionar la actividad recombinogénica de una sustancia particular con su potencial carcinogénico (Ames *et al.*, 1973; Graf *et al.*, 1984).

La investigación sobre los efectos genotóxicos que las sustancias químicas causan en los seres vivos, se realiza a través de bioensayos. Los organismos que se emplean como sistemas de prueba, se seleccionan de acuerdo a diversos parámetros como costo y duración del ensayo, sensibilidad, respuestas repetibles, capacidad de biotransformación y el nivel de expresión del daño: células germinales y/o células somáticas (Vogel, 1992).

Hidroxiación aromática
Hidroxiación alifática
N-desalquilación
O-desalquilación
S-desalquilación
S-oxidación
N-oxidación
Desalquilación de organo-metálicos
Desaminación
Desulfuración
Deshalogenación
Azoreducción
Nitrorreducción
Peroxidación
Epoxidación

Fig. 5. Reacciones atribuidas al citocromo P-450 (Tomado de Wingard et al, 1991)

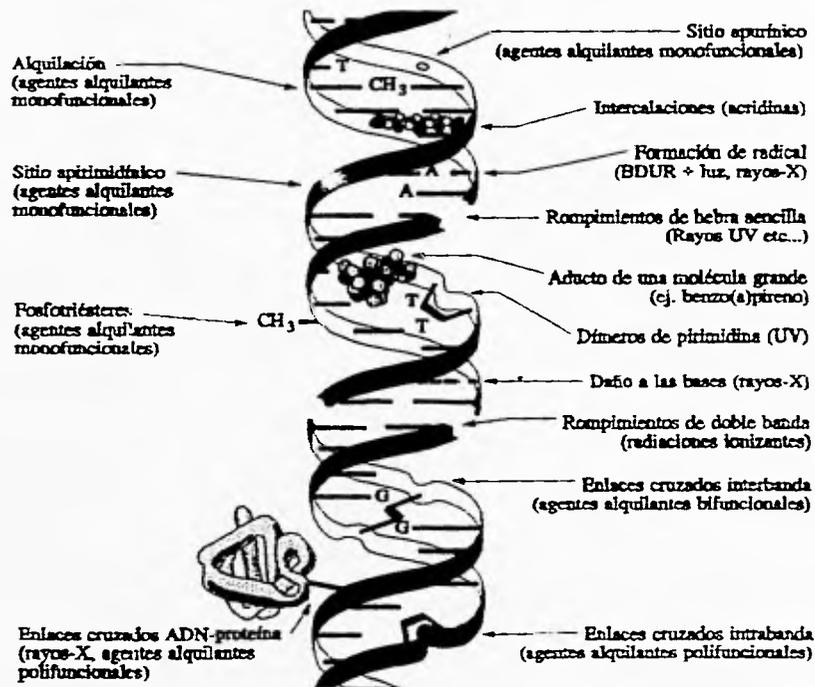


Fig. 6. Principales lesiones en el ADN (Modificado de Vogel, 1992)

Drosophila como Sistema de Prueba

Drosophila melanogaster es uno de los organismos más utilizados en la genética experimental. Tiene un ciclo de vida que va de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (25 °C y 60 % humedad, respectivamente). Reúne diversas características que hacen a la mosca de la fruta un sistema de prueba eficiente para detectar el impacto de agentes químicos y físicos en células germinales y somáticas y se dispone de numerosos mutantes con marcadores fenotípicos que facilitan el análisis genético (Lindsley y Zimm, 1992; Ramos et al., 1993). Se ha demostrado que Drosophila posee actividad metabólica similar a la contenida en la fracción S9 del hígado de mamíferos. Las células germinales presentan un metabolismo oxidativo diferencial en ciertos estadios de la maduración (Hällstrom et al., 1982; Zijlstra y Vogel, 1988). Es un modelo animal in vivo por lo que no requiere la adición de un sistema metabólico exógeno ya que tiene la capacidad de desactivar mutágenos y activar promutágenos, lo cual ha sido mostrado ampliamente tanto en estudios in vitro como in vivo (Tabla I). Los compuestos pueden administrarse a larvas y adultos por alimentación, contacto, inyección, inhalación y ducha vaginal.

La duración de los estadios de su ciclo de vida, permiten desarrollar protocolos versátiles de acuerdo al tipo de sustancia a probar y los objetivos que se planteen. Una vez que el huevo es fecundado, se inicia un periodo de embriogénesis que dura 24 h,

Tabla I. Características de Drosophila melanogaster como sistema de prueba

| Características principales que debe tener un sistema de prueba. | <u>Drosophila melanogaster</u> como sistema de prueba. |
|--|--|
| Sensible a una gran variedad de sustancias | Detecta una amplio espectro de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos y químicos en el ADN; presenta rutas de desintoxicación similares a las de mamíferos |
| Detectar bajas concentraciones de mutágenos. | Existen gran cantidad de marcadores fenotípicos que permiten analizar gran variedad de eventos |
| Reproducibilidad | Es uno de los sistemas de bioensayo más rápido y eficiente, pudiéndose realizar estudios <u>in vivo</u> o <u>in vitro</u> ; versatilidad para la elección de protocolos. |
| Corta duración | 9-10 días a 25 °C y 60% de humedad relativa. |
| Económico | Se le mantiene a bajo costo y en poco espacio; produce gran cantidad de descendencia, hasta 500 organismos por pareja |

terminado el cual, emerge una larva que pasa por tres estadios que culminan en una metamorfosis completa, la que finalmente, da lugar al adulto.

En las larvas se distinguen dos tipos de células: las células larvarias y las células imagales. Las primeras únicamente son funcionales durante la fase larvaria, se caracterizan por haber perdido la capacidad de división celular y sólo aumentan de volumen; algunas, como las de las glándulas salivales tienen cromosomas politénicos, que se originan mediante el fenómeno de endomitosis. A diferencia de las células larvarias, las células imagales se distinguen por su tamaño pequeño, constitución genética diploide y porque retienen la capacidad de división celular. Están determinadas genéticamente, pero el proceso de diferenciación se alcanza cuando la larva entra en metamorfosis, e involucra diversos mecanismos hormonales (García-Bellido y Merriam, 1971; Ramos et al., 1993).

Las células imagales están contenidas en estructuras similares a pequeños sacos llamados discos imagales, los cuales aumentan de tamaño por las divisiones mitóticas sucesivas de las células que lo forman; cada uno de estos discos ocupa una posición definida en la larva y dará origen a una estructura específica del cuerpo del adulto: ojos, antenas, alas y patas, entre otras (Fig. 7).

Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas, SMART

La prueba de mutación y recombinación somáticas, SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), emplea células de los

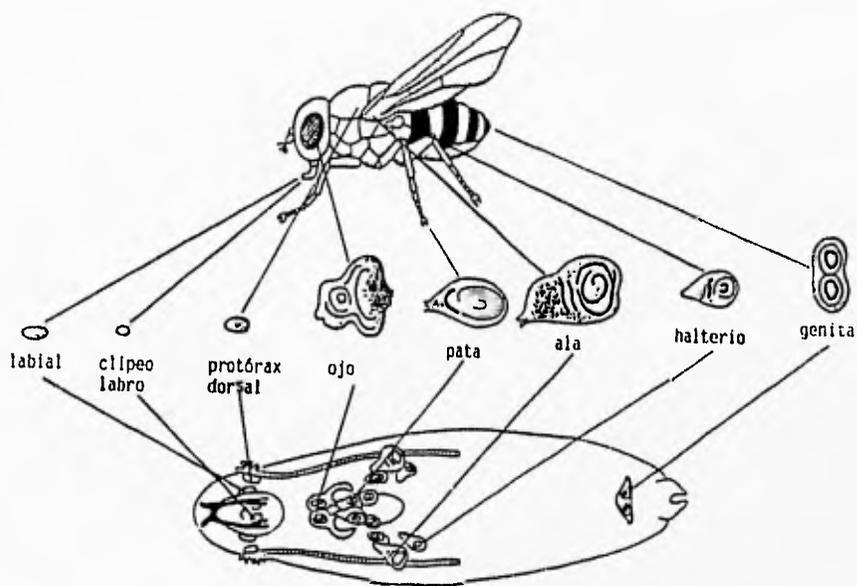


Fig. 7. Discos imagales de la larva de *Drosophila melanogaster* y estructuras que forman en el adulto.

discos imagales de las alas de Drosophila melanogaster para detectar la actividad mutagénica y recombinogénica inducida por diversos compuestos genotóxicos, particularmente la segunda actividad ha sido asociada con procesos cancerígenos, por lo que al detectar la inducción de recombinación con esta metodología se avanza en la identificación de compuestos con potencial cancerígeno.

Se utilizan larvas transheterocigóticas para marcadores fenotípicos de las alas que modifican el aspecto final de los tricomas producidos por cada célula en la mosca adulta, de tal manera que por su aspecto, los tricomas mutantes se distinguen claramente de los silvestres. De esta forma, si durante el desarrollo larvario se induce alguna alteración en una célula de los discos imagales, ésta se expresará en todas las células derivadas de la célula afectada original, lo que producirá en el adulto, la aparición de una mancha de células mutantes en un contexto de células normales. El tiempo de inducción de daño genotóxico puede estimarse por el tamaño de la mancha producida, siempre y cuando no exista muerte celular, retraso en el tiempo de división de las células involucradas o inestabilidad química del compuesto mutagénico. En larvas tratadas a la misma edad, los compuestos directos producirán manchas de mayor tamaño que los indirectos ya que los últimos requieren ser biotransformados para ser reactivos. Así, los clones producidos en el desarrollo tardío de la larva se expresarán como manchas pequeñas y los que se

produzcan en el desarrollo temprano de la alrva, originarán manchas grandes (Fig. 8) (Graf et al., 1984; Vogel, 1987; Zlijstra y Vogel, 1988).

Los marcadores utilizados se encuentran en el brazo izquierdo del cromosoma tres. El gen f1r³ (flare), es proximal al centrómero y se localiza a 39.0 unidades de mapa (u.m.), es una mutación recesiva que en condición homocigótica resulta letal. En mutantes somáticos, se expresa produciendo tricomas deformes con la apariencia de una flama. Para mantener este marcador, se utiliza el cromosoma balanceador TM3, Ser, el cual por las múltiples inversiones que presenta no permite recobrar organismos recombinantes; tiene como gen marcador a Serrate (Ser), gen dominante, letal en condición homocigótica y cuya presencia contribuye a balancear esta construcción genética debido a que las únicas moscas sobrevivientes son las heterocigotas f1r³/TM3, Ser. El segundo marcador, mwh (multiple wing hair) se localiza a 0.0 u.m., es recesivo y fenotípicamente altera el número de tricomas (pelos) por célula, produciendo más de dos tricomas por célula, en comparación con la condición silvestre, en la que sólo se forma uno por célula (Graf et al., 1984; Lindsley y Zimm, 1992).

En las larvas transheterocigotas f1r³/mwh, alteraciones como: mutación puntual, deleciones del locus silvestre de cualquiera de los marcadores, recombinación entre marcadores y la no disyunción de cromosomas darán origen a una mancha simple. Por otra parte, el centrómero funciona como un tercer marcador, de manera que los eventos de recombinación entre f1r³ y el centrómero

Desarrollo del disco del ala.

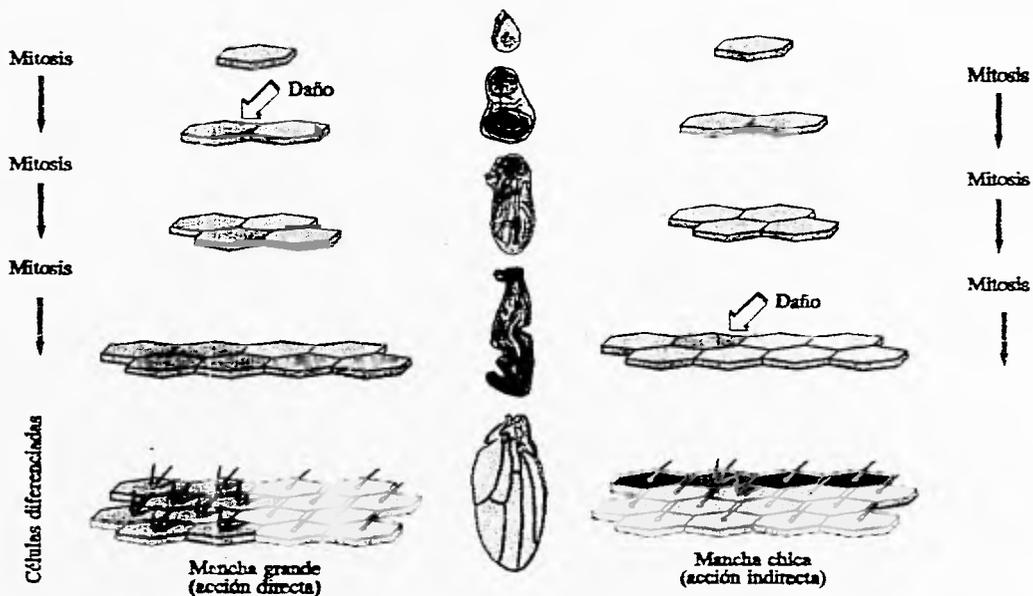


Fig. 8. Formación de clones celulares durante el desarrollo del ala (Tomado de Maldonado, 1994)

pueden ser identificados porque darán origen a una mancha gemela, es decir, con células flr y mwh formando parte de la mancha (Fig. 9) (Graf et al., 1984). De esta manera, incrementos significativos en la frecuencia de manchas gemelas indicarán que un compuesto es un posible carcinógeno. Así, la actividad genotóxica de una sustancia puede manifestarse en términos del tipo, tamaño y la frecuencia de las manchas que produce.

Agentes químicos

Los compuestos estudiados en este trabajo son derivados del grupo de las azidas. Las azidas se obtienen por la acción del ácido nitroso con las hidrazidas (Beyer y Walter, 1987; González, 1994). Pueden clasificarse en: azidas inorgánicas y azidas orgánicas, las segundas forman uniones covalentes; en las figuras 10 y 11 se muestran su clasificación y estructura general, respectivamente (Patai, 1971; Kleinhofs et al., 1978).

La exposición a derivados de azida puede ocurrir principalmente por tratamientos quimioterapéuticos, y en menor grado, de manera ocupacional. Las azidas se utilizan en la síntesis de una amplia variedad de compuestos como aminas, amidas, nitreno, iminas, triazoles y también en la síntesis de derivados nucleosídicos de azida. Algunos compuestos de azida, se han usado por su gran fotoafinidad para estudiar la unión de ligandos a las proteínas, así como en la manufactura de ciertos fármacos y productos químicos (Kleinhofs et al., 1978).

Una de las azidas más comunes, azida de sodio (NaN_3) se utiliza para generar nitrógeno en las bolsas inflables de seguridad

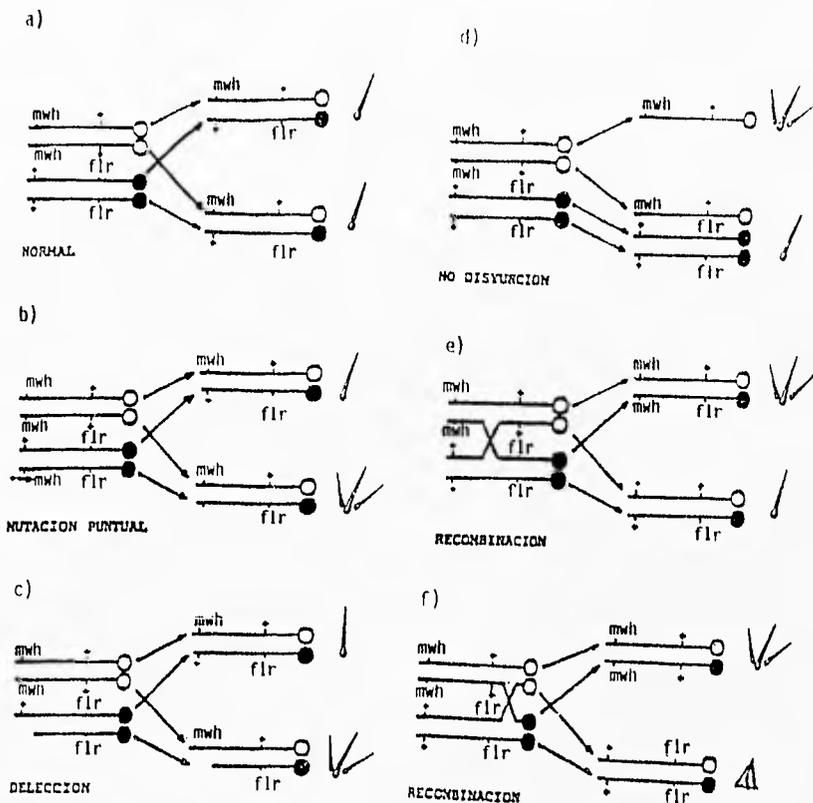


Fig. 9. Eventos genéticos que detecta SMART: a, b, c, d y e producen manchas sencillas mwh o flr; el evento en f, produce manchas gemelas.

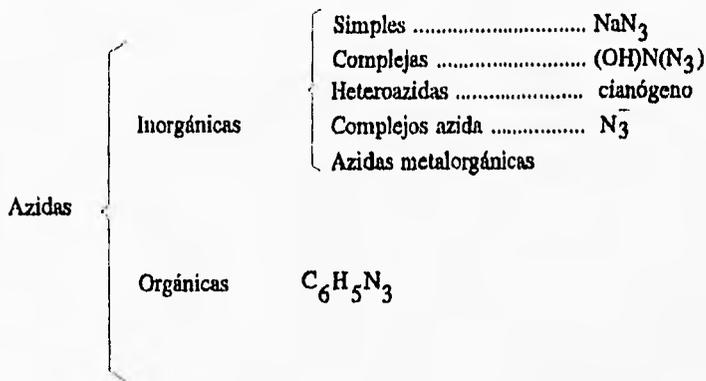


Fig. 10. Clasificación de azidas (Tomado de Kleinhofs *et al.*, 1978)

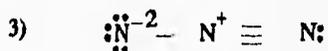
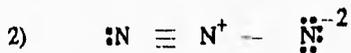
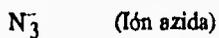


Fig. 11. Estructura o resonancia iónica del grupo azida (Tomado de Kleinholfs et al., 1978)

en la industria automotriz (Tomlinson, 1980; Index Merck, 1989), como conservador de vinos y productos de diagnóstico para medicina y, en el control de la hipertensión. Azida de sodio inhibe a la catalasa y la peroxidasa, desacopla a la citocromo oxidasa e interfiere con la respiración celular y la reacción indofenol (Kleinhofs et al., 1978; Gordon et al., 1990). En investigación se utiliza con frecuencia como un potente mutágeno de referencia en bacterias y en cebada (Kleinhofs et al., 1978). No obstante su reactividad, no es considerada genotóxica para organismos superiores y aún, se le ha atribuido potencial antimutagénico, probablemente este efecto este relacionado con la potente actividad de azida de sodio como atrapador de oxígeno excitado (oxígeno singulete, 1O_2), el cual induce daño oxidativo al ADN. Para Drosophila, azida es un promutágeno que induce mutaciones letales recesivas ligadas al sexo cuando se alimenta a machos (Kamra y Gollapudi, 1979; Owais et al., 1981). En células somáticas incrementa ligeramente la frecuencia de mutaciones cuando se administra en forma aguda (Delgado, 1990), mientras que en tratamientos subcrónicos a bajas concentraciones, azida de sodio es mutagénica e induce recombinación mitótica (González, 1994; Ramos, 1996).

En este trabajo se seleccionaron otros compuestos derivados de las azidas para determinar su potencial genotóxico en células somáticas de Drosophila: isoniazida, pirazinamida y tiosemicarbazida.

Isoniazida

Usos. La isoniazida (hidrazida del ácido nicotínico), es un derivado del ácido isonicotínico, ambos de origen sintético. Junto con la rifampicina, es una de las drogas antituberculosas más potentes. La isoniazida, también tiene aplicación en la industria como antioxidante de calentadores de agua y en la síntesis de un amplio rango de fármacos y en la síntesis de productos con fines agrícolas (Kimball, 1977).

Es un polvo blanco cristalino que se obtiene por oxidación de las α , β y γ picolinas con permanganato potásico. Tiene un punto de fusión de 171.4 °C y es muy soluble en agua a 25 °C; la LD₅₀ intraperitoneal en ratones se ha localizado a 150 mg/Kg y la intravenosa, 149 mg/Kg (Index Merk, 1989) (Fig. 12).

Absorción y distribución. La isoniazida se absorbe completamente por el tracto gastrointestinal. En la sangre, no se combina con las proteínas plasmáticas, distribuyéndose en los líquidos intra y extracelulares, de esta forma llega rápidamente a todos los tejidos del organismo.

Biotransformación y excreción. Es particularmente en la fracción microsómica de células del hígado donde isoniazida sufre diversas transformaciones: a) la principal es la acetilación que lleva a la formación de acetil-isoniazida, menos tóxica y bacteriológicamente inactiva; b) la N-metilación en pequeña escala que conduce a la inactivación del compuesto; c) por hidrólisis de la molécula de acetil-isoniazida se forma ácido isonicotínico y pequeñas cantidades de acetil-hidrazina, la cual es hepatotóxica,

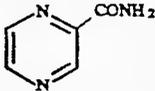
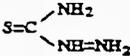
| | |
|--|--|
| <p>Isoniazida (hidrazida del ácido nicotínico)</p> | <p>O=C-NH-NH₂</p>  |
| <p>Pirazinamida</p> |  |
| <p>Tiosemicarbazida (hidrazida del ácido tiocarbámico)</p> |  |

Fig. 12. Estructura de los compuestos utilizados (Tomado de Davis, 1951; Beyer y Walter, 1987; Index Merck, 1989)

así como productos de conjugación del ácido isonicotínico con glicina, lo que produce la isonicotinil-glicina o ácido isonicotinúrico; d) transformación de isoniazida en hidrazonas; e) finalmente, la acetil-hidrazina se transforma en diacetil-hidrazina, que resulta menos tóxica (Fig. 13). En el organismo, la inactivación de la isoniazida que se produce principalmente por acetilación, procede con distinta velocidad en los individuos, debido a factores genéticos implicados en la síntesis de la enzima transacetilasa (Bönicke, 1962; Vivien et al., 1972; Ellard y Gammon, 1976; Weber, 1978); así, la conversión de isoniazida a hidrazina depende de la velocidad de acetilación particular de cada individuo (Noda et al., 1978). La isoniazida no metabolizada y sus metabolitos se excretan vía urinaria. Se ha demostrado la presencia de hidrazina libre en la orina de voluntarios que ingerieron la droga, así como en individuos tuberculosos en tratamiento con isoniazida (Jansen et al., 1980).

Genotoxicidad. Estudios realizados con un polinucleótido sintético mostraron que la isoniazida reacciona con citocín monofosfato del ADN y con los análogos de polirribonucleósidos, esta reacción cambia las propiedades del templete y puede llevar a la inhibición de la incorporación de guanósín-monofosfato, se ha propuesto que de esta manera isoniazida interfiere con la función del molde para la complementariedad en la transcripción (Klamerth, 1976). En *E. coli*, las cepas deficientes en la DNA polimerasa, son más sensibles a isoniazida que las células normales (polA) sugiriendo que este compuesto reacciona con el ADN, o durante su

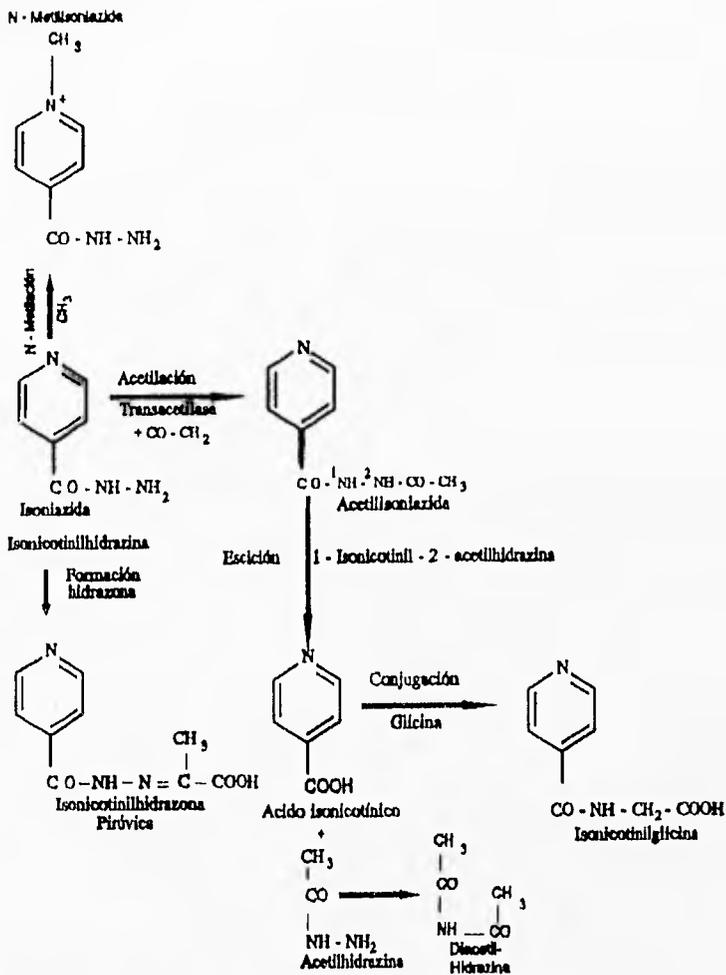


Fig. 13. Biotransformación de isoniazida
(Tomado de Litter, 1986)

replicación (Vivien et al., 1972).

En Salmonella, se han obtenido resultados contradictorios. Isoniazida aumentó el número de revertantes de his' en ausencia de activación metabólica adicional en las cepas: TA100 (uvrB', pKM101), TA92 (pKM101), TA1535 (uvrB') y G46 (tipo de reparación silvestre) a concentraciones que van de 10 a 30 mg; pero en concentraciones inferiores a 5 mg, no afectó la frecuencia de revertantes en ninguna de las cepas (Wade et al., 1980). En otro estudio utilizando las cepas G46 y TA1950, las cuales son uvrB' y no tienen el plásmido pKM101, isoniazida fué negativa (Braun et al., 1982). La preincubación de isoniazida con sobrenadante mitocondrial, mostró actividad mutagénica dependiente de la concentración en las cepas de G46 y TA1535, la más alta actividad mutagénica de isoniazida se registró en pruebas de preincubación con homogenado de hígado de hamster dorado (Ellard y Gammon, 1976); sin preincubación, los resultados fueron negativos, lo que indica que isoniazida es biotransformada a un compuesto mutagénico. La exposición del homogenado a altas temperaturas (80 °C) durante diez minutos, anuló su capacidad de biotransformación, lo cual fué demostrado por la ausencia de actividad mutagénica del compuesto frente a las cepas de Salmonella.

El paralelismo entre la mutagenicidad y la liberación de hidrazina apoya la idea de que este metabolito es responsable de los efectos genéticos observados en cepas de S. typhimurium. En experimentos con activación metabólica, utilizando microsomas de hígado de ratones pretratados con fenobarbital, se obtuvo actividad

mutagénica de isoniazida en Salmonella. Esta prueba se realizó utilizando dosis altas del compuesto (200 mg/ml). Las cepas de S. typhimurium tratadas con isoniazida sin activación metabólica mostraron resultados negativos (Noda et al., 1978). Wade et al., (1980) demostraron que a altas concentraciones (5 a 30 mg/placa) el compuesto fué activo en las cepas TA1535 y TA100 sin actividad metabólica adicional.

La no concordancia de los resultados obtenidos con isoniazida podría deberse en parte a las condiciones no estandarizadas de los laboratorios y a la fuente de las sustancias (Hüttner et al., 1979; Ordaz, 1991). Aunque el efecto de isoniazida en bacterias indica que su actividad es mayor previa complementación metabólica con homogenado de hígado de mamíferos, los resultados positivos que se han descrito en ausencia de activación metabólica sugieren la existencia de más de un mecanismo de acción para este compuesto (Propping et al., 1973).

Varios estudios han descrito el efecto clastogénico y teratogénico de isoniazida en mamíferos, tanto in vivo como in vitro, así como su acción mutagénica y carcinogénica. El mecanismo implicado en el efecto genético se relaciona con la inducción de mutaciones puntuales más que con daño cromosómico (Biancifiori y Ribacchi, 1962; Cirnu-Georgian, 1971). Los productos de la biotransformación de isoniazida en mamíferos se han detectado por preincubación con homogenados enzimáticos de diferentes especies de mamíferos. En fibroblastos humanos tratados con isoniazida se observó inhibición en la síntesis de ADN (Klein et al., 1973), sin

embargo, este efecto ha sido interpretado como consecuencia de bloqueo metabólico producido por la isoniazida, más que por daño directo al ADN (Wade et al., 1980).

Uno de los principales metabolitos de este compuesto es hidrazina y su producción a partir de isoniazida se ha detectado en una gran cantidad de especies. En pruebas con mamíferos se han observado discrepancias en relación con el efecto de isoniazida y su metabolismo.

En experimentos in vitro utilizando homogenado de hígado de ratas, no se detectó hidrólisis de isoniazida a hidrazina (Klamerth, 1976). En ratas tratadas con dosis de 90 a 550 mg/kg de isoniazida tampoco se observó formación de hidrazina en la orina, sugiriendo que este metabolito posiblemente no es producido en esta especie (Miller y Stoltz, 1978), ya que existen reportes de que la hidrazina es un potente mutágeno y carcinógeno en ratas (Severi y Biancifiori, 1968; Schöneich, 1976). Por otra parte, en ratones, después de la aplicación subcutánea de isoniazida (100 mg/kg) se registró una concentración de hidrazina por lo menos cien veces más alta que la que se detecta en seres humanos tratados con dosis de 300 mg/kg. Esto puede sugerir que en esta especie, hidrazina es el metabolito que perdura más tiempo después de la aplicación del compuesto (Schöneich, 1976). La administración de isoniazida vía inyección intraperitoneal (100 mg/kg) a ratones hembras en el noveno día de gestación no mostró efectos mutagénicos en la prueba de manchas (Spot Test). Sin embargo, cuando las hembras son pretratadas con fenobarbital por vía oral durante 8 días se

obtuvieron resultados positivos; en ambos casos, no se observaron malformaciones, ni disminución en la progenie en relación con los testigos correspondientes (Beyer et al., 1979). En ratones tratados in utero con isoniazida activada metabólicamente se obtuvieron resultados positivos (el 7.4% de la progenie fué afectada), se ha sugerido que este resultado podría ser debido a las altas concentraciones empleadas y a la liberación de hidrazina, también en este ensayo se utilizó el pretratamiento con fenobarbital para incrementar el nivel del metabolito, un tratamiento similar, pero sin activación metabólica dió resultados negativos (Herbol y Bulselmaier, 1976).

En hamsters dorados, la actividad mutagénica de este compuesto se mantiene en el límite de significancia (Braun et al., 1976). Por otro lado, la preincubación de isoniazida con homogenado de hamster dorado produce un derivado altamente mutagénico, esta discrepancia se ha interpretado con base en el comportamiento farmacocinético del compuesto generado. Se ha reportado que en la cepa de ratones NMRI isoniazida es sustancialmente convertida a hidrazina, la cual tiene vida media larga y su concentración disminuye lentamente en esta especie; por otro lado, en hamsters dorados la hidrazina producida tiene vida media corta y su concentración disminuye más rápidamente que en ratones (Braun et al., 1976). La falta de mutagenicidad de isoniazida en otras líneas de ratones ha sido explicada por el nivel del metabolito en el organismo, el cual no alcanza niveles suficientes para producir mutaciones (Whiting et al., 1979).

En estudios a largo plazo, después de tratar a 60 ratas albinas por vía oral con isoniazida (30 mg/kg) durante un año, no se encontraron diferencias en la mortalidad en relación con el grupo testigo. En otro experimento con ratas bajo las mismas condiciones, no se detectaron efectos carcinogénicos, pero sí disminuyó la progenie y fué de talla más pequeña que la del grupo testigo (Lozcalzo, 1964; Peacock y Peacock, 1966). Por otro lado, isoniazida resultó carcinogénica en ratones después de su administración oral, subcutánea e intraperitoneal, esta evidencia se comprobó de manera concluyente cuando varias cepas de ratones tratadas con dosis altas del compuesto (superiores a 80 mg/kg) desarrollaron tumores de pulmón (Jansen et al., 1980). En otro reporte, la administración intraperitoneal (durante 4 meses) de isoniazida produjo múltiples adenomas pulmonares en 45 ratones albinos (Biancifiori y Ribacchi, 1962). En otros estudios utilizando ratones, isoniazida fué carcinogénica en dosis mayores de 80 mg/kg por vía oral, subcutánea e intraperitoneal, pero a dosis inferiores a 80 mg/kg, se obtuvieron resultados negativos (Toth y Toth, 1970).

En conejos, después de aplicar 200 mg/kg de isoniazida por vía parenteral, se detectó un nivel de concentración en la sangre de 10 µgr/ml de hidrazina.

En el hombre, el mecanismo de neurotoxicidad de isoniazida, se relaciona con el metabolismo de la piridoxina o vitamina B₆. La isoniazida tiene la propiedad de inhibir la enzima piridoxalquinasa que transforma el piridoxal -forma activa de la vitamina B₆- en

sustrato (Fig. 14). El piridoxal interviene como fosfato de piridoxal en los procesos enzimáticos que controlan la transaminación y descarboxilación de los aminoácidos, lo que ocurre también en bacterias como Mycobacterium tuberculosis. Es posible que la isoniazida, por su propiedad de inhibir la piridoxalquinasa, altere por competencia de sustrato el metabolismo de los aminoácidos, sin embargo, esto último requiere ser confirmado experimentalmente. Muchas drogas reaccionan con piridoxalfosfato (PLP) vía formación de bases de Schiff. Esta reacción puede disminuir el nivel de PLP en tejidos de órganos como el cerebro, ocasionando deficiencias funcionales. En la mayoría de los casos el suplemento de vitamina B₆, revierte las consecuencias adversas de la droga (Machlin et al., 1991). Los trastornos que se producen en el metabolismo de algunos aminoácidos pueden ser los responsables de los fenómenos nerviosos que se presentan en individuos con infección de Mycobacterium tuberculosis expuestos a la droga. En algunas circunstancias la isoniazida es capaz de provocar lesiones hepáticas en humanos, aunque en ratas no se ha podido reproducir este efecto (Goodman et al., 1990). El mecanismo de hepatotoxicidad en humanos no está bien delucidado, es posible que éste se deba, no a la isoniazida misma, sino a su metabolito acetil-hidrazina (Fig. 13) que se forma en pequeñas cantidades por biotransformación, y que se sabe, es hepatotóxica (Machlin et al., 1991). Se han detectado diferentes niveles en la concentración de hidrazina en la sangre y en la orina de individuos tratados con isoniazida contra

M.

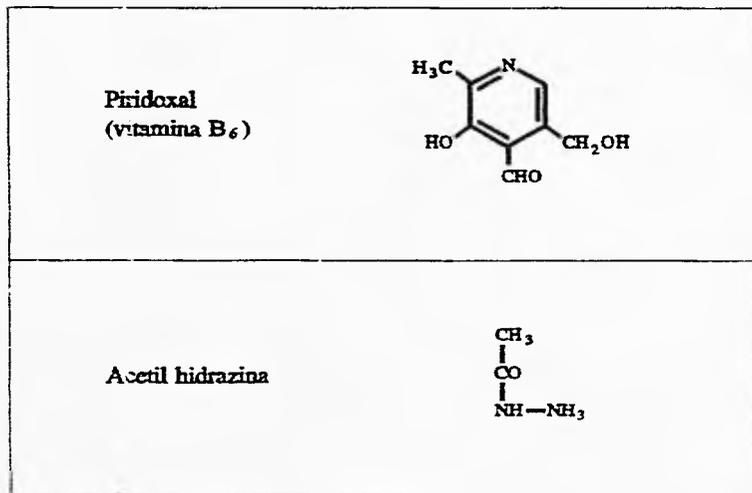


Fig. 14. Estructura del piridoxal y la acetil hidrazina
(Tomado de index Merck, 1989)

tuberculosis. La liberación de hidrazina depende de la velocidad de acetilación del individuo tratado (Noda et al., 1978). En humanos, hay una clara diferencia entre acetiladores rápidos y lentos que es determinada genéticamente por dos genes alélicos autosómicos, así, los acetiladores lentos son homocigóticos recesivos (Jansen et al., 1980; Weber, 1978; Vivien et al., 1972). Las diferencias genéticas se basan en la velocidad de síntesis de la enzima específica isoniazida-transacetilasa (Jense, 1964; Ellard y Gammon, 1976). Los acetiladores rápidos tienen cuatro veces más moléculas de transacetilasa que los acetiladores lentos. Según Röhrborn y colaboradores (1978) isoniazida no induce aberraciones cromosómicas en células somáticas y germinales de mamíferos y linfocitos humanos. Sin embargo en otro reporte, isoniazida en combinación con metil nitrosourea mostró inhibir la reparación postreplicativa en células CHO (Vogel, 1978), esta actividad inhibitoria, podría explicar los resultados positivos para mutagenicidad in vitro en los sistemas de mamíferos. También se ha sugerido que isoniazida no es mutagénica per se, sino que es un comutágeno que aumenta el daño causado por otros compuestos. Es débil la posibilidad de riesgo carcinogénico de isoniazida, sin embargo se ha observado que a altas concentraciones produce tumores de pulmón en mamíferos (Braun et al., 1984).

En resumen, la activación mutagénica de isoniazida es paralela a la formación de hidrazina en los diversos sistemas de prueba. El metabolito de isoniazida (hidrazina) se ha clasificado como un posible carcinógeno a partir de pruebas en procariontes, y como

mutágeno en cultivos celulares in vitro (Kimball, 1977). Un gran número de drogas derivadas de hidrazina se usan como psicotrópicos, citostáticos y antidepresivos (Zeller et al., 1963).

Pirazinamida

Química. La pirazinamida (hidrazina del ácido pirazinoico), es una pirazina sintética análoga de la nicotinamida, a partir de la cual se sintetiza (Beyer y Walter, 1987). La pirazinamida tiene punto de fusión de 189 - 191 °C y es soluble en agua. Se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis ya que en altas concentraciones inhibe el crecimiento de los bacilos presentes en los macrófagos. A pH neutro es inactiva pero a pH 5 inhibe el crecimiento de Mycobacterium tuberculosis. Su fórmula molecular se muestra en la figura 12.

Mecanismo de acción. No ha sido aún determinado el mecanismo de acción de pirazinamida, pero se ha observado que reduce la captación de oxígeno por el bacilo tuberculoso, haciéndolo vulnerable a las defensas del organismo, sin embargo, ésta es sólo una hipótesis que requiere de más evidencias experimentales (Propping et al., 1973).

Estructuralmente, pirazinamida es similar a la nicotinamida, por lo que es probable que interfiera con el metabolismo de ésta. Roman y Georgian (1977) han sugerido que su modo de acción puede ser similar al de isoniazida. La mayoría de las modificaciones estructurales de la pirazinamida dan lugar a la pérdida de su actividad. La sustitución del anillo pirazinoico con grupos amino,

hidroxilo, cloro o metilo, origina derivados inactivos. La sustitución de la función amida por un ácido, un éster, tioamida, nitrilo o ácido hidroxámico se asocia con su actividad tuberculostática (Goodman et al., 1990).

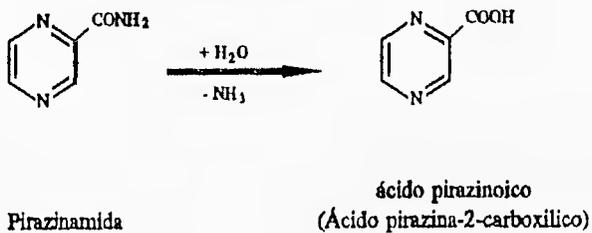
En ratas y ratones, la administración de pirazinamida a dosis elevadas produce un estado de excitación nerviosa seguido de ataxia, depresión y muerte por parálisis respiratoria. En perros, tratamientos crónicos con dosis altas producen lesiones hepáticas, acompañadas por necrosis. En el hombre, la pirazinamida produce daño hepático e hiperuricemia por disminución de la excreción renal de ácido úrico (Wingard et al., 1991).

Absorción y distribución. La pirazinamida se absorbe fácilmente cuando se administra por vía oral y parenteral. En la sangre, se le encuentra combinada con proteínas plasmáticas en alrededor del 40%, de aquí se distribuye a todos los tejidos y líquidos del organismo (Goodman et al., 1990; Wingard et al., 1991).

Biotransformación y excreción. En el organismo, la mayor parte de la pirazinamida se transforma en ácido pirazinoico (Fig. 15). La droga libre, en pequeña cantidad y su metabolito (ácido pirazinoico) se excretan en la orina (Wingard et al., 1991).

La pirazinamida biotransformada se ha empleado como inhibidor de la enzima picolinato carboxilasa al incrementar la síntesis de quinolinato, lo que a su vez, potencia el efecto de triptofano (Nasu et al., 1981).

Mutagénesis. Los daños genéticos de pirazinamida han sido poco



**Fig. 15. Biotransformación de pirazinamida
(Tomado de Litter, 1986)**

investigados. En S. tiphimurium pirazinamida en presencia de activación metabólica fué mutagénica para la cepa TA100 (Roman y Georgian, 1977), este resultado sugiere que se trata de un compuesto de acción indirecta.

En células de médula ósea de ratones tratados con pirazinamida por vía intraperitoneal, se observó disminución del índice mitótico e inducción de aberraciones cromosómicas a concentraciones equivalentes a 5, 10 y 20 veces las dosis aplicadas en terapia con humanos, que corresponden a 125, 250 y 500 mg/kg, respectivamente; las exposiciones fueron a 3, 6 y 24 horas. El mayor efecto se registró en la exposición de 3 horas, lo cual corresponde a la vida media de la droga, que se estima es de 2 a 3 horas (Braun et al., 1982; Anitha et al., 1994). En linfocitos en cultivo de ratones y humano, concentraciones altas de pirazinamida resultaron clastogénicas (Neuhäser y Chauhan, 1987), este resultado ha sido explicado con base en la posible interferencia de alguna ruta biosintética implicada en la producción del ácido tetrahidrofólico (un precursor de purinas), esta interferencia podría ser responsable del efecto mutagénico detectado (Roman y Georgian, 1977). En linfocitos humanos en cultivo, se observó daño cromosómico significativo a concentraciones de 300 y 600 µg/ml, en una relación dosis-efecto. Lo contrario ocurrió a dosis bajas, en las que la frecuencia fué reducida de manera considerable (Obe et al., 1973; Roman y Georgian, 1977). También se ha reportado incrementos en las frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de

sangre periférica de individuos tuberculosos tratados con pirazinamida (Gopal et al., 1990 y 1991).

En resumen, a nivel celular, el tipo de aberraciones cromosómicas que se ha asociado con la presencia de pirazinamida son principalmente huecos cromatídicos, rompimientos y fragmentación cromosómica. Se ha propuesto que el efecto provocado podría indicar que el compuesto actúa durante las etapas S o G₂ del ciclo celular, sin embargo su actividad podría no estar limitada a estas etapas; probablemente las lesiones producidas en S o G₂, las cuales no son reparadas en la etapa de síntesis, son importantes en la producción posterior de aberraciones (Obe et al., 1973).

Por otra parte, el análisis de esperma de ratones tratados con pirazinamida vía intraperitoneal mostró algunas anomalías morfológicas, con una clara relación dosis-efecto. No se disponen de evidencias sobre el efecto de este compuesto en el esperma de pacientes tratados oralmente con pirazinamida sola y en combinación con otras drogas (Gopal et al., 1990; Anitha et al., 1994).

Al ser pirazinamida un análogo de la nicotinamida, es probable que debido a su estructura química pueda alterar la biosíntesis de los ácidos nucleicos (Gopal et al., 1991).

Se requieren más evidencias experimentales para determinar la genotoxicidad de la pirazinamida y el riesgo que implica la exposición a este compuesto.

Tiosemicarbazida

Química. La tiosemicarbazida (TSC) pertenece a los derivados

del ácido tiocarbónico, es considerada la hidrazida de este ácido. Las hidrazidas son ampliamente usadas como inhibidores de las enzimas piridoxal fosfato, por lo que es de interés examinar el mecanismo de reacción de sus derivados. La tiosemicarbazida se puede obtener por calentamiento amónico en atmósfera de nitrógeno, con un rendimiento aproximado del 60%; su peso molecular es 92.14 y su punto de fusión, 180-184 °C (Fig. 12).

Es soluble preferentemente en agua y en menor proporción en alcohol. Su composición es: C 13.18 %; H 5.53 %; N 46.12 % y S 35.18 %; tiosemicarbazida es una base cristalina que forma sales con ácidos, se utiliza con frecuencia como producto de partida en la síntesis de compuestos heterocíclicos (Beyer y Walter, 1987; Wingard et al., 1991). La reacción más importante de la tiosemicarbazida es su condensación en disolución acuosa o alcohólica con aldehídos o cetonas, con formación de las correspondientes tiosemicarbazonas, que se usan en el tratamiento contra la tuberculosis.

En general no existen evidencias claras acerca de la genotoxicidad de TSC ni de sus derivados (tiosemicarbazonas). En pruebas de toxicidad, inhibe completamente el crecimiento in vitro de Cryptococcus hominis y en un 7 % el crecimiento de los cultivos de Aspergillus niger. En ensayos con gato, perro y rata, la LD₅₀, se ubicó en 20, 10 y 24 mg/kg respectivamente (Davis et al., 1951).

La tiosemicarbazida se ha empleado en experimentos in vivo e in vitro como inhibidor enzimático de la lisil oxidasa, glutamato decarboxilasa y sulfidril hidróximetil transferasa. La incubación

de la enzima serina hidroximetil transferasa con tiosemicarbazida inhibió la actividad enzimática casi en su totalidad (95 %) en función del tiempo y de la concentración; la pérdida de la actividad siguió un modelo bifásico de inhibición; la fase inicial fué lineal (a los 20 minutos) y fué dependiente de la concentración de tiosemicarbazida como inhibidor. A ésta le siguió una fase que se extendió por un largo período, hasta la pérdida total de la actividad; de acuerdo con estos resultados, la TSC tiene una débil unión inhibitoria debida a la generación del complejo E-TSC en el sitio activo de la enzima (Jairaj et al., 1992; Levene et al., 1992). La enzima lisil oxidasa fué inhibida in vivo por TSC e in vitro sólo parcialmente; la inhibición de la enzima es revertida por piridoxal in vivo, pero no in vitro. Este efecto fué explicado por la presencia de un grupo sulfhidrilo cercano al sitio activo de la enzima lisil oxidasa, el cual puede formar un complejo con el grupo tiol de la TSC llevando a una inhibición irreversible (Levene et al., 1992).

Los estudios in vivo con embriones de Xenopus indicaron que la tiosemicarbazida tiene efectos teratogénicos en esta especie, ya que altera el desarrollo primario del esqueleto axial, lo que se manifiesta en malformaciones (Dawson, 1993). Por otra parte, se ha probado que el azufre oxidado o reducido en la biotransformación, también lleva a la inactivación del compuesto (Hajjar y Hodgson, 1980).

Por lo anterior se requiere de más evidencia experimental para determinar la posible genotoxicidad de tiosemicarbazida.

Objetivo

En este trabajo se pretende, determinar el potencial genotóxico de tres azidas, empleando la prueba de mutación y recombinación somática en Drosophila melanogaster, bajo los siguientes objetivos particulares:

a) Determinar la respuesta mutagénica y/o recombinogénica inducida por la isoniazida, la pirazinamida y la tiosemicarbazida, empleando la prueba SMART en células de las alas de Drosophila melanogaster.

b) Comparar el efecto genotóxico inducido por cada uno de los compuesto probados en las células somáticas de Drosophila.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los compuestos químicos probados en este trabajo: Isoniazida [CAS 54-85-3], Pirazinamida [CAS 98-96-4] y Tiosemicarbazida [CAS 79-19-6] se adquirieron de Aldrich Chemical Company, Inc.

Toxicidad. La dosis Letal 50 (LD_{50}) es una estimación estadística de la dosis de una sustancia que produce la muerte en el 50% de una población expuesta, en un tiempo específico y bajo condiciones establecidas en un tratamiento (Hayes, 1975). Debido a que la administración de los compuestos en la prueba SMART de Drosophila se hace en forma masiva, no es posible determinar por métodos convencionales la cantidad del compuesto que ha ingresado a cada mosca, por lo que el índice de toxicidad empleado se basa en

la obtención de la concentración letal 50 (LC₅₀) (concentración a la que mueren el 50 % de los organismos expuestos) (Maldonado, 1994). Para seleccionar las concentraciones de los compuestos empleados, se tomaron como referencia las concentraciones de azida de sodio probadas previamente (González, 1994). En este reporte, la LC₅₀ se fijó en 5 mM aproximadamente, aunque el rango de las concentraciones que finalmente se utilizaron fué muy inferior a ésta (0.50 a 1.0 mM), dada la gran toxicidad observada en los organismos tratados. Se seleccionaron las concentraciones 0.14, 0.26, 0.38, 0.5, 0.63, 0.75, 0.88, 1, 1.25, 1.5 y 2 mM, las cuales se utilizaron para los tratamientos con los 3 compuestos.

Los cultivos de moscas progenitoras se mantuvieron en frascos lecheros con medio de cultivo elaborado de acuerdo a Ramos et al (1993). Las líneas empleadas fueron: f1r²/TM3,Ser y mwh/mwh de donde se obtuvieron hembras vírgenes y machos, respectivamente. A los tres o cuatro días de realizada la crusa los progenitores se transfieren a medio de cultivo fresco para la recolecta de huevos durante un período de 8 h. Tres días después, las larvas de 72 ± 4 h son sometidas a tratamiento. De esta crusa se obtiene progenie de dos tipos: larvas libres de inversión + f1r²/mwh +, y larvas portadoras del cromosoma balanceador TM3,Ser/mwh + (portadoras de inversión), en proporción de 1 : 1, las cuales se tratan juntas debido a que no se pueden distinguir en esta etapa. En la figura 16 se resume el procedimiento general de la prueba.

Para el tratamiento, las larvas se transfirieron a tubos homeopáticos que contenían 1 g de medio instantáneo Carolina

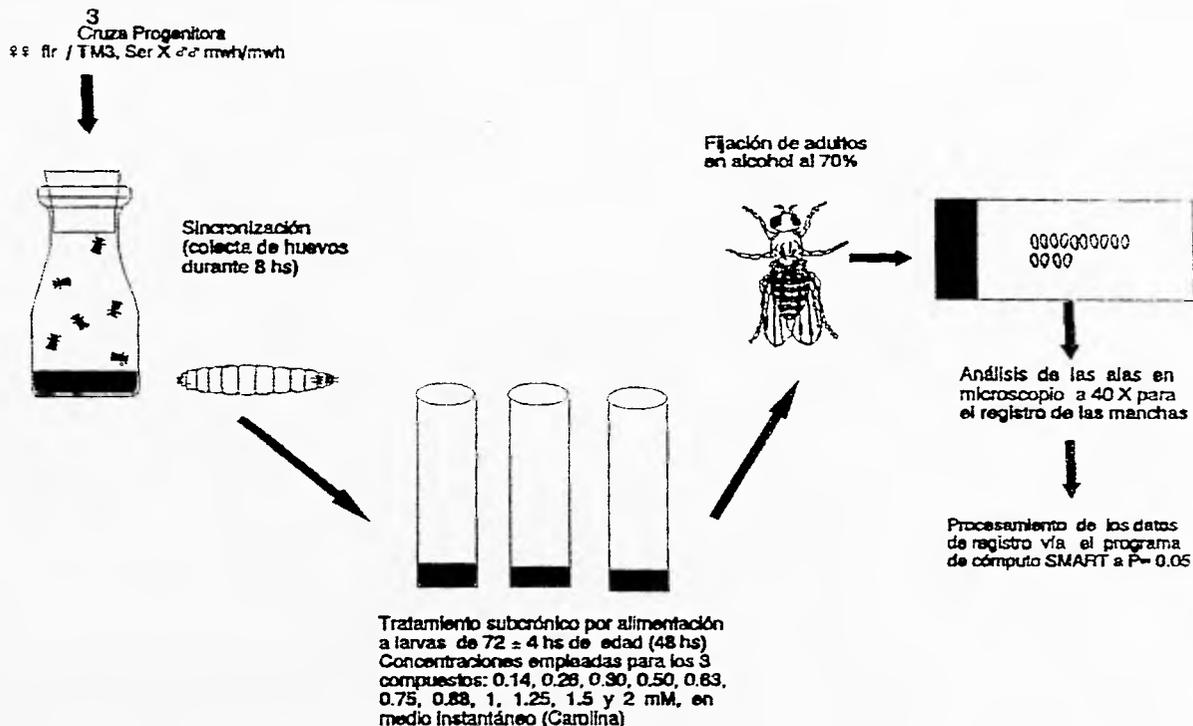
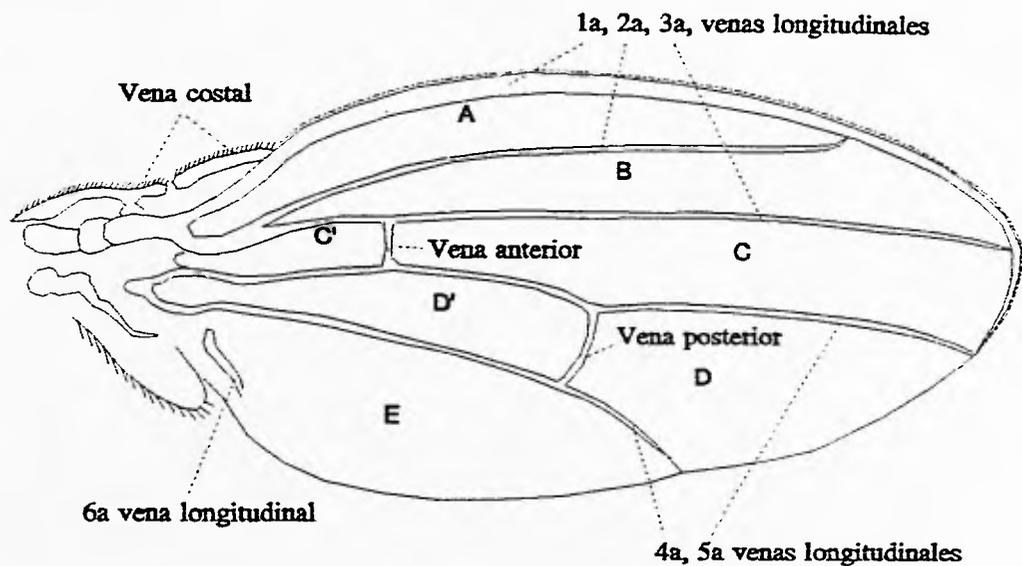


Fig. 16. Procedimiento para realizar la técnica de SMART en ala.

(Biological Supply Co., Burlington, N.C., U.S.A.) y 5 ml de la solución a probar recién preparada, asegurando de esta manera que la concentración del compuesto en todo el medio de cultivo estuviera repartida de manera uniforme. Las larvas se alimentaron por un período de 48 horas (tratamiento subcrónico), hasta que se inició la metamorfosis y posteriormente emergieron las moscas adultas (Graf et al., 1984). Se utilizó agua destilada como disolvente y testigo negativo y se realizaron 3 repeticiones por cada concentración probada.

Los organismos adultos se sacrificaron por sobredosis de éter y se fijaron en alcohol al 70 %. Para la preparación y análisis de las alas, se separaron las moscas libres de inversiones (silvestres) de las portadoras del cromosoma balanceador utilizando para distinguirlas el marcador Ser (Serrata) del cromosoma balanceador, el cual produce muescas en los bordes de las alas. Las alas se disectaron en solución Faure y se montaron por pares en laminillas. En cada laminilla se colocan las alas de 10 hembras y 10 machos para hacer un total de 40 alas (Graf et al., 1984).

Utilizando las venaciones naturales del ala, se distinguen 5 regiones: A, B, C, C', D, D' y E, las cuales se toman de referencia para la localización de las manchas durante su registro (Fig. 17). Cabe recordar que cada célula de las alas forma un pelo o tricoma sobre las alas de la mosca adulta. Las manchas obtenidas se clasificaron por tamaño y tipo en: simples chicas, de 1 a 2 células; simples grandes, formadas por más de dos células (f1r² o mwh); y gemelas, en las que células f1r³ y mwh se encuentran



**Fig. 17. Zonas del ala utilizadas para el registro de manchas
(Tomado de Maldonado, 1994)**

formando parte de la misma mancha. Se considera que dos manchas fueron formadas por dos eventos independientes cuando se separan entre sí por más de 2 hileras de células (pelos) silvestres (Graf et al., 1984).

Análisis estadístico

El tamaño de muestra requerido es de 120 alas por concentración, sin embargo en algunas concentraciones el número de organismos recobrados fué menor debido a la toxicidad de los compuestos probados. Los datos obtenidos se procesaron con el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado) y el procedimiento de decisión múltiple de Frei y Würgler (1988), basado en la prueba de X^2 para proporciones (con un nivel de significancia del 5 %). La decisión se basa en el contraste de dos hipótesis que permiten evaluar y diferenciar un efecto positivo, débil positivo, indeterminado o negativo (Tabla II).

La hipótesis nula (H_0), estipula que no existen diferencias entre la frecuencia de mutación en las series testigo y las tratadas. Si en las series tratadas se incrementa la frecuencia de mutación basal significativamente, 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 testigo. Si el tratamiento no produce el incremento propuesto en la series tratadas, la H_a se rechaza.

La constante "m" implica el número de veces que debe aumentarse la frecuencia de mutación de la serie testigo para

Tabla II. Resultados posibles en SMART. H_0 = hipótesis nula, H_a = hipótesis alternativa. (Según Frei y Würigler, 1988)

| $H_0 \backslash H_A$ | Se acepta H_A | Se rechaza H_A |
|----------------------|----------------------|------------------------|
| Se acepta H_0 | Indeterminado (I) | Negativo (-) |
| Se rechaza H_0 | Positivo (+) | Débil positivo (d+) |

considerar una diferencia significativa. Su valor se basa en la frecuencia basal de cada tipo de mancha: $m = 2$ para manchas sencillas chicas y totales, y $m = 5$ para manchas sencillas grandes y manchas gemelas, debido a que su frecuencia de aparición es mucho menor que las anteriores (Graf et al., 1984; Frei y Würigler, 1988).

RESULTADOS

Isoniazida. En la figura 18 y en la tabla III, se presentan los resultados obtenidos para este compuesto. Para manchas simples chicas se obtuvo un efecto débil positivo sobre la frecuencia a la concentración de 1 mM, a 0.38 y 1.50 mM el incremento resultó indeterminado y sólo fué positivo a 2.0 mM. No se produjeron incrementos en las frecuencias de manchas simples grandes y manchas gemelas. La frecuencia de manchas totales se incrementó de manera significativa a las concentraciones de 1.5 y 2.0 mM ($P < 0.05$). En las demás concentraciones no se observaron efectos mutagénicos ni recombinogénicos, no obstante, a concentraciones mayores a 1 mM isoniazida mostró toxicidad retrasando el desarrollo y reduciendo la cantidad de progenie recobrada.

La clase clonal promedio indica el número promedio de ciclos de división asociados con el tamaño de las manchas obtenidas. Así, se asume que una mancha de 1 ó 2 células se produjo en la última ronda de división, mientras que una mancha de 4 células requirió de 2 ciclos; una de 8 células, se formó en 3 ciclos, etcétera. La clase clonal promedio obtenida en todas las concentraciones fué igual o menor a la del lote testigo (1.93), sólo a 0.26 mM, la

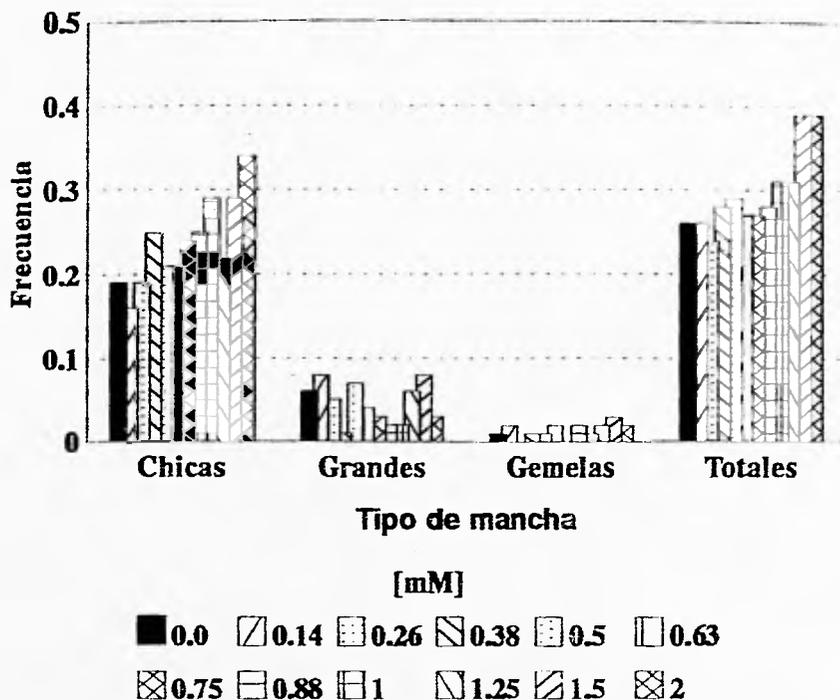


Fig. 18. Frecuencia de manchas inducida por isoniazida en *Drosophila melanogaster*. Exposición 72 X 48 h.

**TABLA III. Frecuencia y número de manchas obtenidas con isoniazida en larvas de *Drosophila melanogaster*.
Exposición: 72 x 48 hs.**

| [mM] | Núm de alas | Simple Chicas m= 2 | Simple Grandes m= 5 | Manchas Gemelas m= 5 | Totales m= 2 | Clones mwh | Clase Clonal Prom. | Frec. 10 ⁻⁵ Céls. | Frec. Corr. 10 ⁻⁵ |
|------|-------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Agua | 344 | 0.19 (66) | 0.06 (19) | 0.01 (3) | 0.26 (88) | 84 | 1.93 | 1.0 | |
| 0.14 | 120 | 0.16 (12)- | 0.08 (10)- | 0.02 (2) | 0.26 (31)- | 31 | 1.48 | 1.1 | 0.1 |
| 0.26 | 116 | 0.19 (22)- | 0.05 (6)- | 0.00 (0) | 0.24 (28)- | 28 | 2.04 | 1.0 | 0.0 |
| 0.38 | 79 | 0.25 (20)i | 0.01 (1)- | 0.01 (1) | 0.28 (22)- | 22 | 1.55 | 1.1 | 0.1 |
| 0.50 | 199 | 0.21 (42)- | 0.07 (13)- | 0.01 (2) | 0.29 (57)- | 50 | 1.50 | 1.0 | 0.0 |
| 0.63 | 224 | 0.21 (47)- | 0.04 (9)- | 0.02 (5) | 0.27 (61)- | 58 | 1.83 | 1.1 | 0.1 |
| 0.75 | 112 | 0.24 (27)- | 0.03 (3)- | 0.00 (0) | 0.27 (30)- | 28 | 1.68 | 1.0 | 0.0 |
| 0.88 | 120 | 0.25 (30)- | 0.02 (2)- | 0.02 (2) | 0.28 (34)- | 34 | 1.65 | 1.2 | 0.2 |
| 1.00 | 228 | 0.29 (65)d* | 0.02 (4)- | 0.01 (2) | 0.31 (71)- | 70 | 1.36 | 1.3 | 0.3 |
| 1.25 | 108 | 0.22 (24)- | 0.06 (7)- | 0.02 (2) | 0.31 (33)- | 32 | 1.75 | 1.2 | 0.2 |
| 1.50 | 119 | 0.29 (34)i | 0.08 (9)- | 0.03 (3) | 0.39 (46)+ | 44 | 1.91 | 1.5 | 0.5 |
| 2.00 | 120 | 0.34 (41)+ | 0.03 (4)- | 0.02 (2) | 0.39 (47)+ | 47 | 1.77 | 1.6 | 0.6 |

clase clonal fué ligeramente mayor, sin embargo, la diferencia entre los valores reportados no es significativa (Fig. 21).

La frecuencia de formación de clones por 10^5 células estima el número de clones esperados por cada 10000 células, tomando como referencia la clase clonal promedio del lote testigo. De esta manera, un compuesto no genotóxico no tendría influencia sobre la clase clonal promedio y los valores en las series tratadas serían similares a los del lote testigo y la razón entre las frecuencias de formación de clones por 10^5 entre las series testigo y tratadas sería igual a la unidad. La comparación cualitativa entre las frecuencias de la serie testigo y las tratadas con isoniazida mostró sólo un ligero incremento a 1.5 y 2 mM.

Pirazinamida. Este compuesto fué positivo para manchas totales en la concentración de 2 mM ($P < 0.05$) (Fig. 19 y tabla IV). Las concentraciones de 0.14 a 1.5 mM no mostraron efectos mutagénicos; al igual que con el compuesto anterior, también se observó toxicidad en las concentraciones mayores a 1 mM.

La clase clonal promedio del lote testigo de esta serie fué de 1.69, en las series tratadas se obtuvieron valores similares o mayores a éste. A 0.26, 0.75 y 1.25 mM, la clase clonal promedio fué mayor de dos ciclos. La frecuencia de inducción de clones por 10^5 células fué similar a la del lote testigo, sólo a 1.5 y 2.0 mM se observó un ligero incremento; aunque el incremento en la frecuencia de manchas totales fué significativo a 2.0 mM y a 1.5 mM fué estadísticamente indeterminado.

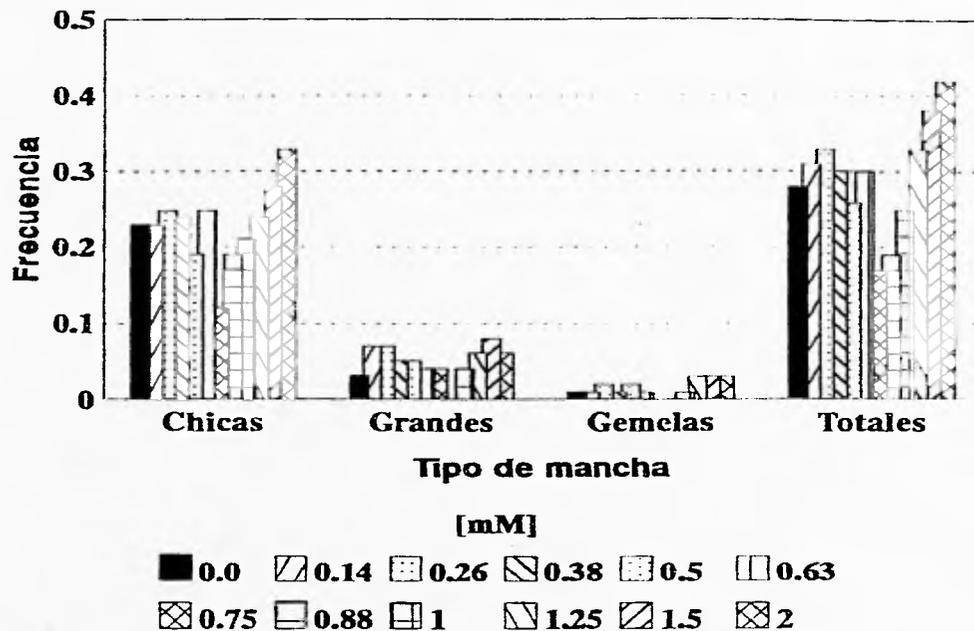


Fig.19. Frecuencia de manchas inducidas por pirazninamida en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 x 48.

**TABLA IV. Frecuencia y número de manchas obtenidas con pirazinamida en larvas de Drosophila melanogaster.
Exposición: 72 x 48 hs.**

| [mM] | Núm de alas | Simples Chicas m= 2 | Manchas | | | Totales m= 2 | Clones mwh | Clase Clonal Prom. | Frec. 10 ⁻⁵ Céls. | Frec. Corr. 10 ⁻⁵ |
|------|-------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------|-------------|-----------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | Simples Grandes m= 5 | Gemelas m= 5 | | | | | | |
| Agua | 333 | 0.23 (78) | 0.03 (11) | 0.01 (3) | 0.28 (92) | 90 | 1.69 | 1.1 | | |
| 0.14 | 117 | 0.23 (27)- | 0.07 (8)- | 0.01 (1) | 0.31 (36)- | 35 | 1.71 | 1.2 | 0.1 | |
| 0.26 | 120 | 0.25 (30)- | 0.07 (8)- | 0.02 (2) | 0.33 (40)- | 39 | 2.13 | 1.3 | 0.2 | |
| 0.38 | 111 | 0.24 (27)- | 0.05 (5)- | 0.01 (1) | 0.30 (33)- | 32 | 1.59 | 1.2 | 0.1 | |
| 0.50 | 149 | 0.19 (29)- | 0.05 (7)- | 0.02 (3) | 0.26 (39)- | 38 | 1.89 | 1.0 | -0.1 | |
| 0.63 | 189 | 0.25 (48)- | 0.04 (7)- | 0.01 (2) | 0.30 (57)- | 56 | 1.95 | 1.2 | 0.1 | |
| 0.75 | 90 | 0.12 (11)- | 0.04 (4)- | 0.00 (0) | 0.17 (15)- | 14 | 2.36 | 0.6 | -0.5 | |
| 0.88 | 74 | 0.19 (14)- | 0.00 (0)- | 0.00 (0) | 0.19 (14)- | 14 | 1.64 | 0.8 | -0.3 | |
| 1.00 | 173 | 0.21 (36)- | 0.04 (7)- | 0.01 (1) | 0.25 (44)- | 44 | 1.70 | 1.0 | -0.1 | |
| 1.25 | 119 | 0.24 (28)- | 0.06 (7)- | 0.03 (4) | 0.33 (39)- | 39 | 2.10 | 1.3 | 0.2 | |
| 1.50 | 116 | 0.28 (32)- | 0.08 (9)i | 0.03 (3) | 0.38 (44)i | 43 | 1.91 | 1.5 | 0.4 | |
| 2.00 | 120 | 0.33 (40)i | 0.06 (7)- | 0.03 (3) | 0.42 (50)+ | 49 | 1.82 | 1.7 | 0.6 | |

Tiosemicarbazida. Se obtuvieron incrementos significativos en la frecuencia de manchas grandes a 0.88 y 1.5 mM; y para manchas gemelas a 0.63 mM. La frecuencia de manchas totales no fué significativa en ninguna de las concentraciones probadas y sólo se detectaron incrementos indeterminados a 0.88 y 2.00 mM (Tabla V y Fig. 20). En comparación con los otros compuestos, la toxicidad tiosemicarbazida fué cualitativamente mayor.

La clase clonal promedio mostró fluctuaciones mayores a las encontradas con los otros compuestos probados, encontrandose valores ligeramente mayores a los del control a 0.38 y 0.88 mM y menores a 0.14, 0.75 y 1.0 mM (Fig. 21).

La frecuencia de inducción de clones por 10^{-5} células fué también similar a la del lote testigo.

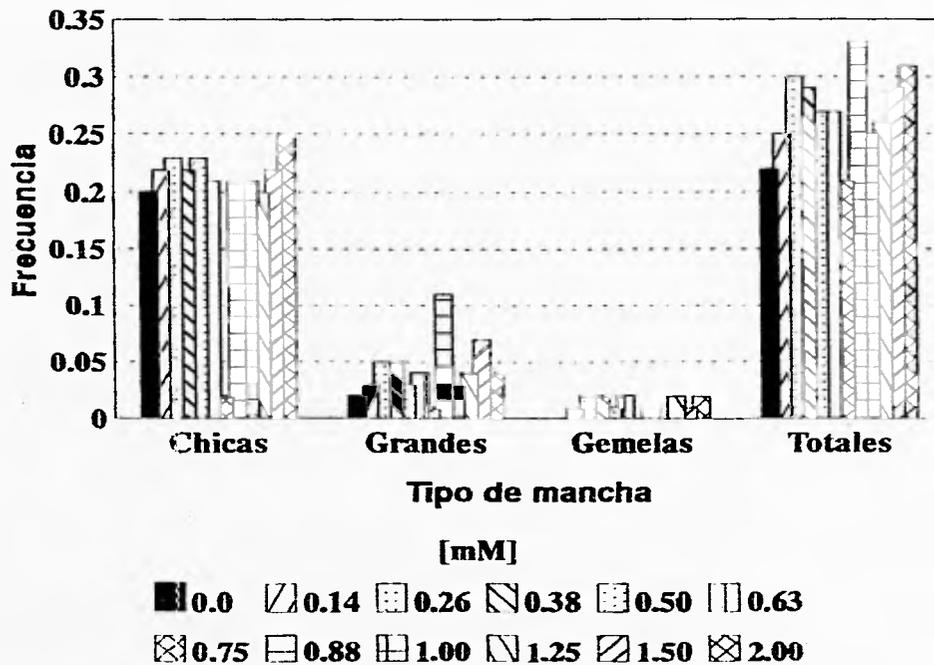


Fig. 20 Frecuencia de manchas inducidas por tiosemicarbazida en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 72 x 48 h.

TABLA V. Frecuencia y número de manchas obtenidas con tiosemicarbazida en larvas de Drosophila melanogaster.
Exposición: 72 x 48 hs.

| [mM] | Núm de alas | Simple Chicas m= 2 | Simple Grandes m= 5 | Manchas | | Totales m= 2 | Clones mwh | Clase Clonal Prom. | Frec. 10 ⁻⁵ Céls. | Frec. Corr. 10 ⁻⁵ |
|------|-------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|-----------------|---------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | | | Gemelas m= 5 | | | | | | |
| Agua | 314 | 0.20 (63) | 0.02 (7) | 0.00 (0) | 0.22 (70) | 68 | 1.9 | 0.9 | | |
| 0.14 | 119 | 0.22 (26)- | 0.03 (3)- | 0.01 (1) | 0.25 (30)- | 30 | 1.63 | 1.0 | 0.1 | |
| 0.26 | 120 | 0.23 (28)i | 0.05 (6)i | 0.02 (2) | 0.30 (36)- | 34 | 1.71 | 1.2 | 0.3 | |
| 0.38 | 120 | 0.22 (27)- | 0.05 (6)i | 0.02 (2) | 0.29 (35)- | 35 | 2.17 | 1.2 | 0.3 | |
| 0.50 | 176 | 0.23 (40)- | 0.03 (5)- | 0.01 (2) | 0.27 (47)- | 45 | 1.89 | 1.0 | 0.2 | |
| 0.63 | 170 | 0.21 (35)- | 0.04 (7)i | 0.02 (4)+ | 0.27 (46)- | 46 | 1.80 | 1.1 | 0.2 | |
| 0.75 | 82 | 0.20 (16)- | 0.01 (1)- | 0.00 (0) | 0.21 (17)- | 17 | 1.41 | 0.9 | 0.0 | |
| 0.88 | 72 | 0.21 (15)- | 0.11 (8)+ | 0.01 (1) | 0.33 (24)i | 23 | 2.04 | 1.3 | 0.4 | |
| 1.00 | 202 | 0.21 (43)- | 0.03 (6)- | 0.00 (1) | 0.25 (50)- | 49 | 1.49 | 1.0 | 0.1 | |
| 1.25 | 120 | 0.20 (24)- | 0.04 (5)i | 0.02 (2) | 0.26 (31)- | 31 | 1.74 | 1.1 | 0.2 | |
| 1.50 | 119 | 0.22 (26)- | 0.07 (8)+ | 0.01 (1) | 0.29 (35)- | 35 | 1.89 | 1.2 | 0.3 | |
| 2.00 | 106 | 0.25 (27)- | 0.04 (4)i | 0.02 (2) | 0.31 (33)i | 32 | 1.81 | | | |

DISCUSION

Un compuesto es considerado genotóxico si produce una respuesta positiva en cualquier ensayo que mida cualquier evento genético: mutación, síntesis no programada de ADN, rompimiento cromosómico y otros. Para calificar a un compuesto como no genotóxico se exigen criterios aún más estrictos: se requiere la inactividad del compuesto en pruebas de bioensayo que cubren cinco tipos de eventos terminales considerados críticos para la producción de daño al ADN: modificación en la secuencia de bases (sustitución, adición o pérdida de nucleótidos), alteración de la integridad (aductos, rompimientos, puentes cruzados), rearrreglos (recombinación), alteración de la segregación de cromosomas (venenos del huso) y daño a la integridad cromosómica (estructural) (Brusick, 1987).

El sistema de prueba SMART de Drosophila melanogaster ha probado ser una metodología experimental confiable en la caracterización de la genotoxicidad de un compuesto. La cada vez más abundante información obtenida con esta prueba indica que es sensible a compuestos pertenecientes a grupos químicos diversos: alquilantes, intercalantes, venenos del huso, recombinógenos, clastógenos, y aún hidrocarburos aromáticos policíclicos (Grae et al., 1984).

En el presente trabajo, los resultados obtenidos en la prueba SMART para isoniazida, pirazinamida y tiosemicarbazida pueden considerarse negativos, no obstante los incrementos significativos en la frecuencia de manchas recobrados en algunas concentraciones.

En el caso de la Isoniazida, la respuesta negativa obtenida es parcialmente inesperada ya que se ha probado que es un fuerte promutágeno para sistemas bacterianos (Wade et al., 1980; Ellard y Gammon, 1976; Herbold y Bulsemair, 1976), provoca intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de sangre periférica en humanos; inhibe la síntesis de ADN (Klein et al., 1973) y causa aberraciones cromosómicas en mamíferos (Röhrbom, 1972), entre otros efectos genotóxicos. La baja concordancia entre los resultados de genotoxicidad para este compuesto ha llevado a sugerir la participación de más de un mecanismo de acción (Propping et al., 1973). Existen evidencias experimentales de que la Isoniazida es transformada a hidrazina, un potente mutágeno y carcinógeno en ratas (Severi y Biancifiori, 1968; Schöneich, 1976), el cual también presenta variación en su vida media y actividad genotóxica dependiendo del organismo de origen (Braun et al., 1976; Whiting et al., 1979).

De manera similar, la respuesta obtenida en la SMART para la Pirazinamida no concuerda con los reportes acerca de su genotoxicidad. La Pirazinamida es un promutágeno probado en bacterias (Roman y Georgian, 1977; Braun et al., 1982; Wingard et al., 1991); disminuye el índice mitótico de células de médula ósea de ratones e induce la formación de aberraciones cromosómicas (Braun et al., 1982; Anitha et al., 1994); además, es un clastógeno en linfocitos en cultivo, de ratón y humano (Neuhäuser y Chauhan, 1987). Es posible que la baja actividad genotóxica mostrada se deba a la corta vida media de la Pirazinamida, que va de 2 a 3 horas y

a la rápida desintoxicación del compuesto (Braun et al., 1982; Anitha et al., 1994).

De los tres compuestos estudiados, la tiosemicarbazida es de la que se conoce menos. Se ha probado que altera el desarrollo en vertebrados (Dowson, 1993), pero no se han realizado estudios para valorar su mutagenicidad y su potencial cancerígeno.

La explicación para la mínima respuesta obtenida debería tomar en consideración dos aspectos que resultan opuestos: por un lado, implicaría que Drosophila no posee las enzimas implicadas para biotransformar estos compuestos a sus derivados conocidos, sin embargo, se ha probado ampliamente que tanto el adulto como la larva llevan al cabo reacciones de biotransformación muy similares a las catalizadas por las enzimas dependientes de citocromo P450 del hígado de mamíferos, así el grupo tiol de este compuesto podría haber sido oxidado llevando a la inactivación del compuesto, ya que existen evidencias de que Drosophila lleva al cabo reacciones por las que se inactiva este grupo (oxidación) (Hällstrom et al., 1985; Zijlstra y Vogel 1988). Por otra parte, asumiendo que el metabolito sí sea producido, implicaría la rápida desintoxicación del mismo, lo que no daría oportunidad a la inducción significativa de daño al ADN.

La clase clonal promedio indica el número de ciclos de división celular implicados en las manchas fenotípicas recobradas. Para los tres compuestos probados, éste fué similar al de los testigos correspondientes, aunque se observaron valores tanto menores como mayores. La figura 21 muestra que la clase clonal

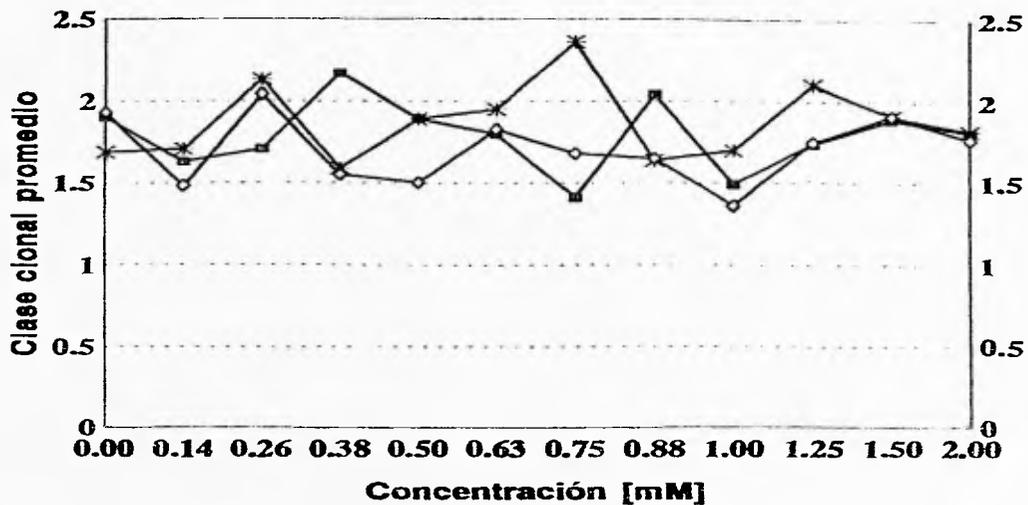
promedio en las diferentes concentraciones de los compuestos probados varía de manera similar.

Es pertinente considerar que, diferencias estructurales en las moléculas de una serie homóloga pueden generar variaciones importantes en su actividad mutagénica. En una misma clase química existen tanto sustancias genéticamente inactivas como inductoras de mutaciones puntuales, alteraciones cromosómicas y otro tipo de daños (Ashby y Tennant, 1988 y 1991). Este parece ser el caso entre los compuestos seleccionados y la azida de sodio, la cual ha mostrado ser un promutágeno que induce recombinación en Drosophila (González y Ramos, 1996; Ramos, 1996). No obstante lo anterior, existen algunas características compartidas por los cuatro compuestos: al parecer, todos requieren activación vía metabolismo; son compuestos tóxicos para Drosophila y, en exposiciones crónicas las concentraciones superiores a 2 mM resultan letales.

Como se indicó anteriormente, las concentraciones empleadas en este trabajo se tomaron como referencia de las probadas con azida de sodio (NaN₃) por González (1994), las cuales abarcan el rango de 0.5 a 1 mM. Al no obtenerse alguna respuesta, se decidió utilizar tres concentraciones menores (0.14, 0.26 y 0.38 mM) suponiendo que probablemente la gran toxicidad de los compuestos enmascaraba su genotoxicidad. Sin embargo en estas tampoco hubo resultados positivos, por lo que se probaron tres concentraciones mayores a 1 mM (1.25, 1.5 y 2 mM). En estas concentraciones, se observó alta toxicidad dependiente de la concentración del compuesto, caracterizada por retraso en el desarrollo de los organismos y

escasa progenie, particularmente con tiosemicarbazida estos efectos fueron muy marcados. Isoniazida y pirazinamida mostraron entre sí, toxicidad similar.

Para determinar si estos compuestos son no genotóxicos para Drosophila es necesario, sin embargo, abordar otras alternativas de administración del compuesto. Una podría ser probar concentraciones mayores a 2 mM pero en una exposición de menos duración, de manera que si la falta de efecto se debe a que el metabolito no alcanza la concentración suficiente para inducir daño, porque es biotransformado lentamente o bien, el metabolito es degradado rápidamente, la elección de concentraciones mayores de los compuestos podría producir concentraciones mayores de los metabolitos implicados, finalmente, exposiciones más cortas reducirían la pérdida de moscas por la toxicidad de los compuestos.



◇ Isoniazida * Pirazinamida ■ Tiosemicarbazida

Fig. 21 Clase clonal promedio inducida por isoniazida, pirazinamida y tiosemicarbazida. Exposición 72 X 48 h.

CONCLUSIONES

1. Los tres compuestos producen toxicidad dependiente de la concentración: Tiosemicarbazida > Pirazinamida > Isoniazida.
2. La débil actividad genotóxica de los compuestos probados se presentó en el siguiente orden: Isoniazida > Tiosemicarbazida > Pirazinamida.
3. Los resultados obtenidos no permiten concluir si la isoniazida, tiosemicarbazida y pirazinamida son genotóxicos para Drosophila.

B I B L I O G R A F I A

Albert L.A. (1988) Curso básico de toxicología ambiental. Limusa. México. 311 pp.

Ames B., W. Durston., E. Yamasaki y F. Lee (1973) Carcinogens are mutagens; A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 70(80): 2281-2285.

Anitha B., S. Sudha, P. M. Gopinath y G. Durairaj (1994) Genotoxicity evaluation of pyrazinamide in mice. Mutation Res., 321: 1-5.

Ashby J. y R. W. Tennant (1991) Definitive relationships among chemical structure for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. Mutation Res., 257: 229-306.

Bac Z. M. (1971) Fundamentals of biochemical pharmacology. Pergamon Press, New York. 420 pp.

Beyer E., R. Braun y J. Schöneich (1979) Genetic activity of isoniazid in the mammalian spot test. Mutation Res., 64: 152.

Beyer H., Walter W. (1987) Manual de Química Orgánica. Ed. Reverté,

S.A., México. 1080 pp.

Bhanumathi J. (1983) Cytogenetic and flow cytometric studies on the effects of some antib tuberculosis drugs. Ph.D. Thesis. University of Madras. Guindy Campus, Madras 600 025, India. En: Jansen, J.D., J. Clemmesen y K. Sundaram (1980) Isoniazid' - an attempt at retrospective prediction, Mutation Res., 76: 85-112.

Biancifiori C., y R. Ribacchi (1962) Pulmonary tumours in mice induced by oral isoniazid and its metabolites. Nature., 194: 488-489.

Biancifiori C., y L. Severi (1966) The relation of isoniazid (INH) and allied compound to carcinogenesis in some species of small laboratory animals: a Review, Br. J. Cancer., 20: 258-538.

Bönicke R. (1962) Comparative studies of the metabolism of isoniazid in uniovular and binovular twins. Bull. Un. Int. Tuberc., 32: 553-555.

Braun R., J. Schubert y J. Schöneich (1976) On the mutagenicity of isoniazid. Biol. Zbl., 95: 432-435.

Braun R. H., H-P. Jäkel y J. Schöneich (1984) Genetic effects of isoniazid and the relationship to in vivo and in vitro

biotransformation. *Mutation Res.*, 137: 61-69.

Braun R., L.B. Russell y J. Schöneich (1982) Workshop on the practical application of the mammalian spot test in routine mutagenicity testing of drugs and other chemicals. *Mutation Res.*, 97: 155-161.

Brusick D. (1987) *Principles of genetic toxicology*, 2a. ed., Plenum Press, Londres. pp. 69, 82, 86, 91, 105, 109-110, 129.

Cassaret L.J. y Doull (1975) *Toxicology of the poisons. The basic science*. Macmillan Publishing Co., Inc. New York, USA.

Cirnu-Georgian L. y V. Lenghel (1971) INH-induced chromosomal aberrations. *Lancet.*, 2: 93.

Davis Everett F., Barbara L. Toma y Lucy C. Lee (1951) *Handbook of Toxicology Vol. V: Fungicides*. W.B. Saunders Co., Philadelphia y London.

Dawson D.A. (1993) Comparative joint actions of semicarbazide and thiosemicarbazide on induction of malformations and osteolathyrism in mixtures with benzoic hydrazide. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis.*, 13: 23-33.

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 pp.

Ellard G.A., y P.T. Gammon (1976) Pharmacokinetics of isoniazid metabolism in man. J. Pharmacokinet. Biopharm., 4: 83-112.

Ennever F.K., N.J. Thomas y H.S. Rosenkranz (1987) The predictivity of animal bioassays and short-term genotoxicity tests for carcinogenicity and non-carcinogenicity to humans. Mutagenesis., 2: 73-78.

Filov V. A., A. A. Golubev, E. I. Liublina y N. A. Tolokontsev (1979) Quantitative Toxicology. John Wiley y Sons, New York. 462 pp.

Frel H. y F.E. Würigler (1988) Statistical methods to decide wheather mutagenicity test data from Drosophila melanogaster assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutation Res., 203: 297-308.

García-Bellido A. y J. Dapena (1974) Induction, deletion and characterization of cell diferentation mutants in Drosophila. Molec. Genet., 128:117-130.

García-Bellido A. J.R. Merriam (1971) Parameters of the wing imagal disc development of Drosophila melanogaster. Development Biology., 24: 61-87.

González C. E. (1994) Efecto del metabolismo en la respuesta genotóxica de azida de sodio en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 69 pp.

González C. E. y P. M. Ramos (1996) Sodium azide induced mitotic recombination in Drosophila melanogaster. Mutation Res., (en Prensa).

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

Gopal Rao, V.V.N., E.V.V. Gupta y I.M. Thomas (1990) Sister chromatid exchanges in the lymphocytes of tuberculosis patients receiving short-term chemotherapy. Tubercle., 71: 173-176.

Gopal Rao, V.V.N., E.V.V. Gupta y I.M. Thomas (1991) Chromosomal aberrations in tuberculosis patients before and after treatment with short-term chemotherapy. Mutation Res., 259: 13-19.

Gordon S. M., J. Drachman., L. A. Bland., M. H. Reid., M. Favero.,

- y W. R. Jarvies (1990) Epidemic hypotension in a dialysis center caused by sodium azide. *Kidney International.*, 37: 110-115.
- Graf U., F. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall y P.G. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster. *Environ. Mutagenesis*, 6: 153-188.
- Hajjar N. P. y E. Hodgson (1980) Flavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals. *Science.*, 209(5): 1134-1136.
- Hällstrom I., J. Magnusson y C. Ramel (1982) Relation between the somatic toxicity of dimethyl-nitrosamine and genetically determined variations in the level and induction of cytochrome P450 in Drosophila melanogaster. *Mutation Res.*, 92: 161-168.
- Hayes W. J. (1975) *Toxicology of Pesticides*. Williams & Wilkins Co. Baltimore. 580 pp.
- Hayes W. J. y E. R. Laws (1991) *Handbook of pesticide toxicology*. Vols. 1 y 3 Academic Press.
- Herbold B., y W. Buselmaier (1976) Induction of point mutations by different chemical mechanisms in the liver microsomal assay. *Mutation Res.*, 40: 73-84.

Hernández A. J. (1993) Relación estructura química-actividad genotóxica de 7 compuestos en células somáticas de los ojos de Drosophila melanogaster utilizando cepas con y sin actividad metabólica incrementada. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 78 pp.

Hüttner R., R. Braun y J. Schöneich (1979) Mutagenic activity of isoniazid in the mouse. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 31: 689-694.

Index Merck (1989) Encyclopedia of chemical and drugs. Published by Merck and Co. 1606 pp.

International Agency for Research on Cancer (1974) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Vol. 4. Lyon. 159-152 pp.

Jairaj K. Acharya y N. Appaji Rao (1992) A novel intermediate in the interaction of thiosemicarbazide with sheep liver serine hydroxymethyltransferase. J. B. Chemistry., 267(27): 19066-19071.

Jense J. W. (1964) Purification y properties of the isoniazid-transacetylase from human liver. An. Rev. Respir. Dis., 90: 306-307.

Jansen J.D., J. Clemmesen y K. Sundaram (1980) Isoniazid' - an attempt at retrospective prediction. Mutation Res., 76: 85-112.

Kamra O.P., and B. Gollapudi (1979) Mutagenic effects of sodium azide in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 66: 381-384.

Kimball R.F. (1977) The mutagenicity of hydrazine and some of derivatives. Mutation Res., 39: 111-126.

Klammerth O.L. (1976) Inhibition of transcription by isonicotinic acid hydrazide. Mutation Res., 35: 53-64.

Klein W. F. Kocsis, R. Eberl y H. Altman (1973) Untersuchungen über die unterschiedliche wirkung von farmaka auf die semiconservative DNA. Sythese bzw, auf die DNA-Reparaturvorgänge. Stud. Biophys., 41: 51-58. En: Jansen, J.D., J. Clemmesen y K. Sundaram (1980) Isoniazid' - an attempt at retrospective prediction. Mutation Res., 76: 85-112.

Kleinhofs A., W.M. Owais y R.A. Nilan (1978) Azide. Mutation Res., 55: 165-195.

Kleinhofs A., M. Kleinschmidt y D. Sciak, S. von Broembsen (1975) Azide mutagenesis. In vitro studies. Mutation Res., 29: 497-500.

Levene Cl., Sharman, D.F. y Callingham, B.A. (1992) Inhibition of chick embryo lysyl oxidase by various lathyrogens and the antagonistic effect of pyridoxal. Int. J. Exp. Pathol., Oct. 73(5): 613-624.

- Lindsley D.L. y G.G. Zimm (1992) The genome of Drosophila melanogaster. Part I: genes a-K. DIS 62, 121.
- Lindsley D.L. y E.H. Grell (1968) Genetic variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Institution, Publ. Washington D.C. 627 pp.
- Lippmann Ph. D. (1992) Environmental toxicants human exposures and their health effects. Van Nostrand Reinhold. New York. 699 pp.
- Litter M. (1986). Compendio de Farmacología. " El Ateneo" Pedro García. Argentina. 932 pp.
- Lozcalzo B. (1964) Hydrazide de l'acide isonicotinique et néoplasies. Arch. Int. Pharmacodyn., 152: 249-251.
- Machlin J. Lawrence, Vishua N. Singh y Suzanne K. Gaby (1991) Vitamin intake and health. Marcel Dekker, Inc. New York. 217 pp.
- Maldonado L.J. (1994) Comparación entre la estructura química y la actividad mutagénica de cinco compuestos orgánicos en células del ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 60 pp.
- Miller C.T. y D.R. Stoltz (1978) Mutagenicity induced by lyophilization or storage of urine from isoniazid-treated rats. Mutation Res., 56: 289-293.

Nasu S., Yamaguchi, K., Sakakibara, S., Imai, H. y I. Ueda (1981) *Biochim. Biophys. Acta.*, 677: 109-119.

Neuhäuser-Klaus A. y P. Chauhan (1987) Studies on somatic mutation induction in the mouse with isoniazid and hydrazine. *Mutation Res.*, 191: 111-116.

Noda A., T. Goromaru, K. Matsuyama K. Sogabe, K.Y. Hsu y S. Iguchi (1978) Quantitative determination of hydrazines derived from isoniazid in patients. *J. Pharmacol., Dyn.* 1: 132-141.

Obe G., B. Beek y K.L. Radenbach (1973) Action of anti-tuberculosis drugs on human leukocyte chromosomes in vitro. *Experientia.*, 23: 1433-1434.

Ordaz T. M. G. (1991) Valoración de la prueba de 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. 76 pp.

Organización Mundial de la salud (OMS) (1986) Criterios de salud ambiental 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud., México. 287 pp.

Orozco, S.P.G. (1993) Efecto protector de la vitamina E y de los b-

carotenos en contra de la mutagenicidad de la mitomicina-C (MMC) en la prueba somática de ala de Drosophila melanogaster. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 109 pp.

Owais W. M., A. Kleinhofs., R. C. Ronald. y R. A. Nilan (1981). Isolation of an azide mutagenic metabolite in Salmonella typhimurium. Mutation Res., 91: 155-161.

Patai S. (1971) The chemistry of the azido group. Intersci. Publ., New York. 360 pp.

Peacock A., y P.R. Peacock (1966) The results of prolonged administration of isoniazid to mice, rats and hamsters. Br. J. Cancer., 20: 307-325.

Propping P., G. Röhrborn y W. Buselmaier (1973) Comparative investigations on the mutagenic activity of isoniazid mammalian test systems. Mutation Res., 21: 19-53.

Ramos M. P., H.M. Abundis, J.C. Gaytán, M.G. Ordaz, P.G. Orozco, J. Maldonado H. Hernández, E. González, P. Reyes, E. M. Galicia y J. A. Muñoz (1993) Manual de laboratorio de genética para Drosophila melanogaster. Mc graw-Hill. México. 131 pp.

Ramos M. P. y E. González (1996) Sodium azide genotoxicity: Drosophila's gender differences?. Mutation Res., (en prensa)

Röhrborn G., H.G. Miltenburger y K.L. Radenbach (1978) A correlated study of the cytogenetic effect of isoniazid (INH) on cell systems of mammals and man conducted by thirteen laboratories. Hum. Genet., 42: 1-60.

Röhrborn G., P. Propping y W. Buselmaier (1972) Mutagenic activity of isoniazid an hydrazine in mammalian test systems. Mutation Res., 16: 189-194.

Roman I.C. y A. Caratzali (1971) Effects of anti-convulsant drugs on chromosomes. Brit. Med. J., 5781: 234.

Roman I.C. y and L. Georgian (1977) Cytogenetic effects of some antituberculosis drug in vitro. Mutation Res., 48: 215-224.

Rosenkranz H.S. y H.S. Carr (1971) Hydrazine antidepressants and isoniazid; potential carcinogens. Lancet., 1: 1354-1355.

Severi L. y Blancifiori (1968) Hepatic carcinogenesis in CBA/Cb/Se mice and Cb/Se rats by isonicotinic acid hydrazide and hydrazine sulfate. J. Natl. Cancer Inst., 41: 331-340.

Shöneich J. (1976) Safety evaluation based on microbial assay procedures. Mutation Res., 41: 89-94.

Tapia R. y Salazar, P. (1991) Glutamate decarboxylase activity in

the substantia nigra and the hippocampus of rats microinjected with inhibitors of the enzyme. *Neurochem. Res.*, Mar. 16(3): 263-267.

Thorton R. M. Rober y N. Boyd (1985) *Química Orgánica*. 8a. ed. SITESA. México. 1375 pp.

Timbrell J. A. (1989) *Introduction to toxicology*. Taylor y Francis Ltd. USA. 155 pp.

Tomlinson C.R. (1980) Effects of pH on the mutagenicity of sodium azide in Neurospora crassa and Salmonella typhimurium. *Mutation Res.*, 70: 179-191.

Toth B., y T. Toth (1970) Investigation on the tumor producing effect of isonicotinic acid hydrazide in ASW/Sn mice and MRC rats. *Tumori.*, 56: 315-324.

Toth B. y P. Shubik (1966) Carcinogenesis in swiss mice by isonicotinic acid hydrazide. *Cancer Res.*, 26: 1473-1475.

Vivien J.N., R. Thibier y A. Lepouple (1972) Recent studies on isoniazid. *Adv. Tuberc. Res.*, 18: 148:231.

Vogel F. (1978) Genetic aspects of induced mutation. *Hum Genet. Suppl.*, 1: 141-147.

Vogel E. (1987) Discussion Forum: Evaluation of potential mammalian genotoxins using Drosophila: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis.*, 2(3) 161-171.

Vogel E.W. (1991) Genotoxic chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. *Labotatorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese*, R.U. Leiden Sylvius Laboratoria. 66 pp.

Vogel E. W. (1992) Genotoxic chemicals. An introduction into the basic principles of genetic toxicology. *Laboratorium voor Stralengenetica en Chemische Mutagenese*. RU Leiden, Sylvius Laboratoria. (Curso).

Wade D.R., P.H.M. Lohman, I.E. Mattern y F. Berends (1980) The mutagenicity of isoniazide in Salmonella and its effects on DNA repair and synthesis in human fibroblasts. *Mutation Res.*, 89: 9.20.

Weber W. W. (1978) Genetic variability and extrapolation from animals to man: Some perspectives on susceptibilidad to chemical carcinogenesis from aromatic amines. *Environ. Hlth. Persp.*, 22: 141-144.

Whiting I. F., L. Wei y H. F. Stich (1979) Enhancement by transition metals of unscheduled DNA synthesis induced by isoniazid and related hydrazines in cultured normal and xeroderma pigmentosum human cells. *Mutation Res.*, 61: 505-515.

Wingard B., Theodore M., Joseph Lerner, M. D. Arnold y Schwartz (1991) Human Pharmacology Molecular-to-Clinical. Mosby-Year Book, Inc. U.S.A. 926 pp.

Wyrobek A.J., y W.R. Bruce (1978) Sperm abnormality assay. Chem. Mutagen., 5: 257.

Zeller P., H. Gutmann, B. Hegedüs, A. Kaiser, A. Langemann y M. Müller (1963) Methylhydrazine derivatives a new class of cytotoxic agents. Experientia., 19: 129.

Zijlstra J.A., E.W. Vogel (1988) Influence of inhibition of the metabolic activation on the mutagenicity of some nitrosamines, triazenes, hidrazines and seniciphylline in Drosophila melanogaster. Mutation Res., 202: 251-267.

Zion L. B., Jonathan C. Kuhn y Shimon Ulitzur (1986) Determination of the activity of 16 hydrazine derivatives in the bioluminescence test for genotoxic agents. Mutation Res., 173: 233-237.

Zuzuki D.T. A.J. Griffiths, J.H. Miller y R.C. Leuotin (1989) An introduction to genetic analysis. W.H. Freeman & Co., New York. 612 pp.