

102
zej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACION ENTRE LA ESTRUCTURA QUIMICA
Y LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE CINCO
COMPUESTOS ORGANICOS EN CELULAS
DEL ALA 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 :
JULIAN MALDONADO LUIS

DIRECTORA: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



MEXICO, D. F.,



1984

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CIUDAD UNIVERSITARIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realizó el pasante _____

Julían Maldonado Luis

con número de cuent: 8509273-4 con el título: _____

"Comparación entre la estructura cuínica y la actividad mutagénica de cinco
compuestos orgánicos en células del ala de Drosophila melanogaster".

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -
Biólogo .

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

Dra.	Patricia	Ramos Morales	EIRMA
Director de Tesis	Rosario	Rodríguez Arnaiz	
Dr.	Germán	Chamorro Cevallos	
M. en C.	Patricia Guadalupe	Orozco Soto	
Suplente Biol.	Miquel Anxel	Meneses Pérez	
Suplente			

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA

"THEODOSIUS DOBZHANSKY"

DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

CON EL APOYO DE LA

DIRECCIÓN GENERAL DE APOYO AL PERSONAL ACADÉMICO

(D G A P A)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

AGRADECIMIENTOS



A la directora de tesis:

Dra. Patricia Ramos Morales.

· Por su gran apoyo, paciencia y estímulo en la elaboración de este trabajo.

A los sinodales:

Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz

Dr. Germán Chamorro Cevallos

M. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto

Biol. Miguel Angel Meneses Pérez

Por sus valiosos comentarios y consejos en la revisión y corrección de esta tesis.

A todos los compañeros de trabajo del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias:

Héctor, Juan Carlos, Edna, Armando, Adrianna,
Irma, Yolanda y Ma. de Jesús.

DEDICATORIAS



A mis padres:

Prócoro Maldonado García
Catalina Luis de Maldonado

A mis hermanos:

Enrique, Juana y Rafael.

A mi sobrina:

Paulina Alejandra.

Me han dado siempre todo su afecto,
apoyo, comprensión y mucho más; les
debo lo que soy y todo lo que he
logrado hasta ahora.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Metabolismo	5
<i>Drosophila melanogaster</i>	11
Prueba de mutación y recombinación somáticas	14
Hipótesis	29
MATERIAL Y MÉTODO	29
Compuestos químicos	29
Determinación de la Concentración Letal 50	29
Líneas de <i>Drosophila</i>	30
Tratamiento	31
Fijación y elaboración de preparaciones	32
Análisis estadístico	34
III. RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

RESUMEN

El desarrollo de nuevos productos químicos para diversos usos como medicamentos, cosméticos, colorantes y aditivos de alimentos, plaguicidas, y compuestos de uso industrial, conduce a la realización de estudios para caracterizar fuentes potenciales de daño genético en los seres vivos.

La capacidad de un producto químico para interactuar y alterar el ADN de las células está influida por múltiples factores: características fisicoquímicas del compuesto, edad, sexo, y constitución genética del organismo, entre otros.

Resulta de interés, analizar la relación entre la estructura química de compuestos relacionados, así como de formas isoméricas de éstos y la posibilidad de que los compuestos puedan interactuar directamente con el ADN para producir alteraciones, o bien, sólo después que han sido biotransformados; la relación entre la estructura del compuesto y sus efectos sobre el material genético permite agrupar a los compuestos con cualidades específicas: en alquilantes, intercalantes, y otros.

En este trabajo se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática que emplea células de las alas de *Drosophila melanogaster* para comparar la actividad genotóxica de cinco compuestos con estructura química similar; dos acaricidas: 2,2'-Thiobis[4,6-diclorofenol] (Bitionol) y 4-Clorofenil fenil sulfona (Sulfenona); así como tres compuestos empleados en síntesis orgánica: 4-Clorofenil sulfóxido, Cloruro de 4,4'-bifenil disulfonilo y 4-Clorofenil sulfona.

Se utilizó la cruz $99 \text{ flr}^3/\text{TM3, Ser} \times \sigma \text{ mwh/mwh}$ de la cual se obtuvieron larvas que fueron expuestas a los compuestos en un tratamiento crónico (0 x 120 hs), las concentraciones fueron 150, 300, 450 y 600 ppm. En todos los casos se corrió un lote testigo. De cada tratamiento se realizó una repetición.

En las alas de las moscas adultas, se registraron las células afectadas por número, tamaño y tipo, y se analizaron con el programa de cómputo SMART a $P = 0.05$.

La respuesta genotóxica de los cinco compuestos fue concordante con la relación estructural existente entre ellos. Dos de los compuestos mostraron una débil actividad mutagénica: bitionol produjo manchas grandes a 150 ppm y gemelas a 300 ppm; y el cloruro de bifenil disulfonilo que indujo manchas grandes y totales a 600 ppm. Los otros compuestos probados (sulfenona, clorofenil sulfóxido y clorofenil sulfona) no mostraron actividad genotóxica, pero sí gran toxicidad.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre se ha preocupado por conocer los efectos de los diversos compuestos o sustancias presentes en el ambiente, y que de alguna forma interaccionan en su vida cotidiana o laboral. Se han realizado diferentes estudios para: 1) caracterizar fuentes potenciales de daño en los seres vivos, tanto de origen natural (actividad ígnea, depósitos minerales, aguas subterráneas, toxinas de animales y plantas, etc.), o bien como producto de la actividad humana (productos sintéticos con diversos usos como medicamentos, cosméticos, colorantes y saborizantes de alimentos, plaguicidas y otros); y 2) conocer las propiedades de tales compuestos y los posibles efectos que pueden tener en la salud humana (Brusick, 1987; Timbrell, 1989).

Las sustancias tóxicas se pueden agrupar en varias clases en relación a la forma en la que el hombre está expuesto a ellas: fármacos, aditivos de alimentos, plaguicidas, sustancias químicas industriales, contaminantes ambientales, toxinas naturales y venenos domésticos (Tabla I). Las consecuencias de esta exposición han sido estudiadas principalmente en las células germinales de diversos organismos, sin embargo, con el tiempo se ha acumulado información del impacto del ambiente en las células somáticas, lo que hace evidente la importancia de la detección y el estudio de estos eventos ya que muchos de ellos se relacionan con procesos cancerosos (Ames et al, 1973; Moutschen, 1985).

Los enfoques en la investigación de la actividad genotóxica de los agentes químicos que representan un riesgo mutagénico y/o carcinogénico para los seres humanos se han modificado en los últimos quince años (Ames et al, 1973; Clayson, 1980 y Graf et al, 1984). Este tipo de estudios cobran cada día más importancia pues las evidencias experimentales indican una fuerte asociación entre la actividad recombinogénica y la carcinogénesis; además, el inicio

TABLA I. Clasificación de mutágenos ambientales (Modificado de Moutschen, 1985).

Sustancias mutagénicas sintetizadas por el hombre y usadas directamente en condiciones específicas.				
A. Farmacéuticos		B. Plaguicidas		C. Aditivos
a. agentes antitumorales c. narcóticos e. excipientes	b. antibióticos d. anticonceptivos f. anestésicos	a. insecticidas c. herbicidas e. nematocidas	b. raticidas d. fungicidas	a. alimentos b. otros (cosméticos)
Sustancias mutagénicas usadas en la industria o que se encuentran en el ambiente como productos industriales.				
A. Agentes alquilantes	B. Solventes orgánicos compuestos organo-metálicos	C. Contaminantes del agua	D. Contaminantes del aire	E. Metales pesados
Sustancias mutagénicas naturales				
A. Alcaloides		B. Productos del metabolismo microbiano		

de un proceso canceroso frecuentemente está en relación con cambios en la información genética de las células (Ames et al, 1973; Vogel et al, 1980; Radman y Kinsella, 1980; Cairns 1981).

El empleo de los diversos bioensayos se enfoca hacia dos direcciones principales: la determinación del riesgo potencial que implica la exposición a los agentes en cuestión, tanto en relación con las células germinales como con las somáticas, y la predicción de la asociación entre genotoxicidad y carcinogenicidad, además del estudio de los posibles mecanismos de acción (De Serres, 1979; Vogel y Natarajan, 1979a y b; Todd et al, 1983; Würzler et al, 1983a; Brusick, 1988).

La toxicología es la ciencia que estudia las interacciones entre las sustancias químicas y los sistemas biológicos. Uno de los objetivos principales de la genética toxicológica es el de detectar y comprender las propiedades de un pequeño grupo de compuestos químicos altamente específicos para los ácidos nucleicos y en particular para el ADN, que pueden producir cambios en el material

genético. Los agentes genotóxicos son aquellos que producen cambios hereditarios letales o transmisibles en las células somáticas o en las células germinales (Vogel, 1992).

La genética toxicológica tiene como principales funciones: 1) implementar pruebas y métodos para evaluar el riesgo y definir el impacto de los agentes genotóxicos que se encuentran en el ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del acervo genético humano (efectos en células germinales), 2) elucidar las relaciones entre genotoxicidad y la iniciación de neoplasias (inducción de tumores o cáncer) (Vogel, 1992). Muchos carcinógenos químicos exhiben su actividad iniciadora a través de interacciones con el ADN nuclear lo que produce un daño genético permanente, tales como las mutaciones y las aberraciones cromosómicas. El rango de compuestos químicos potencialmente peligrosos va desde metales y compuestos químicos inorgánicos hasta moléculas orgánicas muy complejas (Timbrell, 1989).

En algunos casos los efectos tóxicos están determinados por la naturaleza de la sustancia y son debidos a la interacción entre el compuesto y un sitio específico del receptor molecular. Este receptor puede ser una enzima susceptible de ser inhibida, o alguna otra macromolécula, pero en muchos casos su identidad es desconocida (Timbrell, 1989).

Los compuestos genotóxicos pueden clasificarse por el o los mecanismos de interacción con los ácidos nucleicos, y los tipos de aductos ADN-mutágeno que resultan de tal interacción (Fig. 1). Este tipo de agrupación presenta algunas dificultades, por ejemplo: en el caso de clases químicas que requieren activación metabólica (los promutágenos) existe con frecuencia más de un metabolito activo, y además, la naturaleza exacta de los aductos en el ADN no siempre se conoce. Ejemplos de este tipo de clasificación son los siguientes:

- Agentes alquilantes monofuncionales (n-nitroso-dimetilamina, DMN)
- Agentes alquilantes bi- y trifuncionales (trietilenmelamina, TEM)

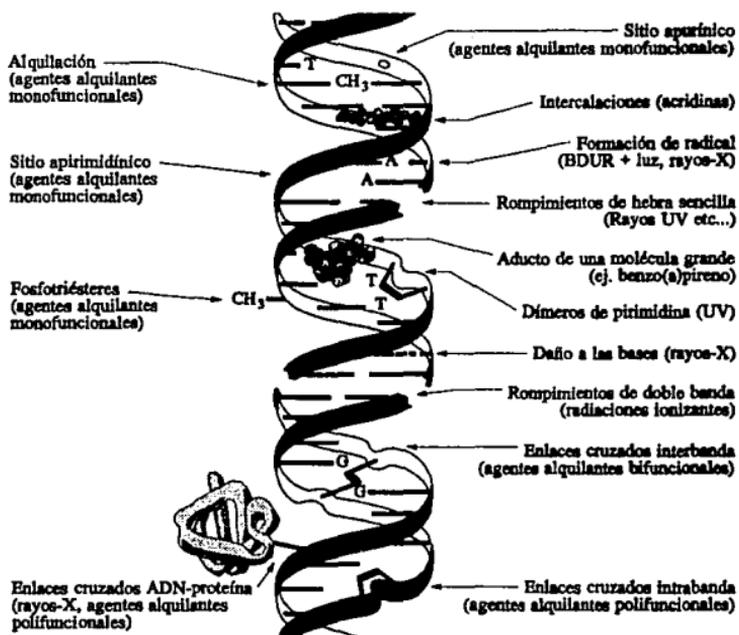


Fig. 1. Principales lesiones en el ADN (Modificado de Vogel, 1992).

- Agentes alquilantes cíclicos (mostazas nitrogenadas)
- Agentes intercalantes (proflavina)
- Agentes simples no alquilantes (formaldehído) (Vogel, 1992).

Metabolismo

La disposición de un compuesto tóxico en un sistema biológico puede dividirse en cuatro fases interrelacionadas: absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y excreción (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989) (Fig. 2).

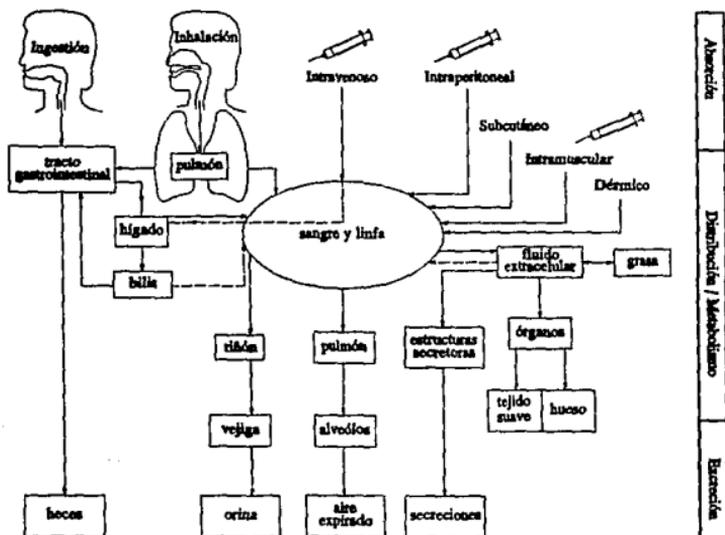


Fig. 2. Rutas de absorción, distribución y excreción de los compuestos tóxicos en el cuerpo humano (Modificado de Cassarett y Doull, 1975).

Los agentes tóxicos son absorbidos principalmente por la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal. En estudios toxicológicos se usan con frecuencia rutas especializadas como la intraperitoneal y la subcutánea (Zijlstra, 1987). Una vez que el compuesto químico ha entrado a la corriente sanguínea está disponible para llegar a un sitio en el que puede producir el daño.

La exposición a compuestos tóxicos por la vía respiratoria es toxicológicamente más importante que por la vía cutánea. El aire puede contener muchas sustancias extrañas. Estas pueden ser gases, vapores de solventes, aerosoles o materia particulada (Timbrell, 1989).

La piel está expuesta constantemente a compuestos extraños en forma de gases, líquidos y sólidos, principalmente en el caso de los dos primeros, la adsorción y la absorción son mecanismos de ingreso importantes.

Numerosas sustancias extrañas se encuentran mezcladas con la dieta mientras que otras son ingeridas en forma directa y algunos venenos se toman accidental o intencionalmente (Cassarett y Doull, 1975).

La absorción es el proceso por el que el compuesto tóxico pasa las membranas del cuerpo y entra a la corriente sanguínea. La tasa y el sitio de absorción pueden ser factores importantes en la toxicidad eventual de un compuesto. Hay varios sitios para el primer contacto entre un compuesto tóxico y un sistema biológico, pero la absorción involucra necesariamente el paso a través de las membranas celulares en cualquier sitio involucrado (Timbrell, 1989).

Una característica importante de las membranas biológicas es que son selectivamente permeables. Sólo algunas sustancias son capaces de pasar a través de ellas dependiendo de sus características fisicoquímicas:

- (a) tamaño
- (b) solubilidad en lípidos
- (c) afinidad a moléculas endógenas
- (d) polaridad/carga

Los mecanismos por los que un tóxico puede pasar a través de una membrana celular pueden ser divididos en dos tipos generales: (1) difusión o transferencia pasiva del químico, en el que la célula no juega un papel activo en la transferencia; y (2) transporte especializado, en el que la célula tiene parte activa en la transferencia del tóxico. De esta manera, las sustancias exógenas pueden pasar a través de las membranas biológicas por:

- (1) filtración a través de poros
- (2) difusión pasiva mediante los fosfolípidos de la membrana
- (3) transporte activo
- (4) difusión facilitada
- (5) fagocitosis/pinocitosis

Muchos tóxicos cruzan las membranas corporales por difusión simple, la tasa de difusión está ampliamente determinada por el coeficiente de partición lípido/agua del compuesto (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989).

Una vez en la corriente sanguínea el compuesto puede entonces disolverse en la sangre y distribuirse en el cuerpo de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas. Durante esta fase hay interacción del compuesto extraño con las proteínas en el plasma y con varias macromoléculas en otros tejidos. Algunos compuestos tóxicos se acumulan en varios sitios como resultado de la unión, transporte activo o alta solubilidad en los lípidos. El sitio de acumulación de un tóxico puede ser también el de mayor acción tóxica, aunque frecuentemente no lo es (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989).

El hígado y el riñón tienen una gran capacidad para unir compuestos químicos, estos órganos probablemente concentran más tóxicos que cualquier otro. Esto puede estar relacionado con el hecho de que son órganos muy importantes en la eliminación de tóxicos del cuerpo; el riñón y el hígado tienen gran capacidad para excretar diversos compuestos y el hígado además para metabolizarlos.

El compuesto tóxico es eliminado de la sangre por biotransformación, excreción y acumulación en diversos sitios. La importancia relativa de estos procesos depende de las propiedades físicas y químicas del compuesto tóxico (Zijlstra, 1987). La eliminación de las sustancias tóxicas es determinante de su efecto

biológico; si ésta es rápida se reduce la probabilidad de que ocurra toxicidad y también la duración de sus efectos. En el caso de un efecto tóxico, la eliminación del compuesto ayuda a reducir el daño (Timbrell, 1989).

Los agentes genotóxicos pueden ser clasificados en los llamados directos (que actúan por sí mismos) ya que son reactivos con las macromoléculas celulares (ADN, proteínas), y aquellos que requieren activación metabólica para ser reactivos (agentes genotóxicos precursores o promutágenos). Los agentes genotóxicos precursores no exhiben propiedades genotóxicas *per se*, pero se convierten en nuevas especies mediante el metabolismo de los organismos. Los promutágenos son inactivos en los sistemas biológicos que carecen de las enzimas necesarias para convertirlos a formas activas (Vogel, 1992).

Los productos del metabolismo son por lo general, más hidrosolubles que el compuesto original, el incremento en la excreción de un compuesto reduce su vida media biológica y por consiguiente, su toxicidad potencial (Casarett y Doull, 1975; Filov et al, 1979).

Durante la biotransformación, los mutágenos y carcinógenos (promutágenos y procarcinógenos) químicamente inertes pueden también ser transformados en metabolitos reactivos que son capaces de reaccionar con el ADN y entonces producir daño genético (Zijlstra, 1987) (Fig. 3).

Se distinguen dos tipos de reacciones, las llamadas de fase I (oxidación, hidrólisis o reducción) y las de fase II (reacciones de conjugación) (Timbrell, 1989; Vogel, 1992).

Las reacciones de fase I generalmente proporcionan a la molécula original un grupo funcional polar que es necesario para que subsecuentemente pueda conjugarse mediante las reacciones de la

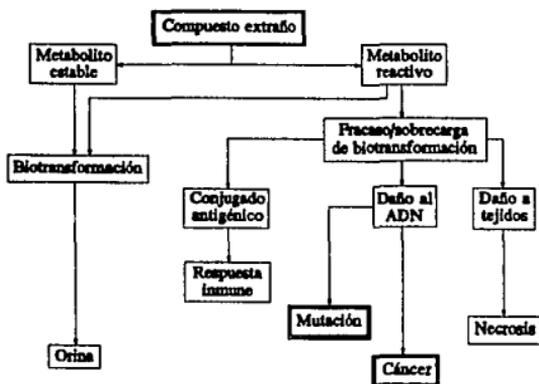


Fig. 3. Ilustración de las direcciones en que el metabolismo de un compuesto puede tener una variedad de consecuencias para el organismo (Modificado de Timbrell, 1989).

fase II. Los productos de la biotransformación de la fase II pueden ser metabolizados más adelante por otro tipo de reacciones (Timbrell, 1989; Hayes y Laws, 1991).

Con mucha frecuencia las enzimas implicadas en la biotransformación se encuentran de manera más abundante en el hígado de los animales. Sin embargo es importante recordar que (1) éstas también se pueden encontrar en muchos otros tejidos; (2) las enzimas pueden estar localizadas en un tipo particular de células en un órgano, y (3) las enzimas no siempre son específicas para los compuestos extraños y pueden tener un papel esencial en el metabolismo normal endógeno (Casarett y Doull, 1975; Zijlstra, 1987; Timbrell, 1989).

La biotransformación de compuestos extraños usualmente ocurre en la fracción microsómica (retículo endoplásmico liso) de células de hígado, aunque algunas biotransformaciones son no microsomales (ej. reducciones redox involucrando alcoholes, aldehídos y cetonas)

y además suelen estar involucrados otros tejidos (ej. pulmones, riñones, piel) (Zijlstra, 1987; Reeves, 1981).

La hidroxilación de compuestos lipofílicos se realiza por el sistema enzimático dependiente del citocromo P-450. Estas enzimas hemoprotéicas están localizadas predominantemente en el retículo endoplásmico liso de células en el hígado y con menor extensión en otros tejidos (Zijlstra, 1987).

Las enzimas dependientes de P-450 están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en mamíferos, aves, peces, reptiles, insectos, plantas, levaduras y algunas bacterias. Una característica que todas las P-450s tienen en común es un pico alrededor de 450nm en el espectro diferencial de monóxido de carbono reducido de los microsomas y el requerimiento de NADPH para la reducción de la enzima activa (Zijlstra, 1987).

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* reúne diversas características que le hacen un sistema de prueba eficiente para detectar el impacto de agentes químicos y físicos en el ADN; se ha demostrado la presencia de rutas de desintoxicación similares a las de los mamíferos y las células germinales tienen metabolismo oxidativo en ciertos estados de su maduración (Baars et al, 1980; Clark, 1982; Hällström et al, 1982; Zijlstra y Vogel, 1988). *Drosophila* es eficiente en la detección de metabolitos de vida corta, debido a que, como modelo *in vivo* no requiere la adición de un sistema metabólico exógeno y tiene un amplio espectro de actividades metabólicas capaces de activar promutágenos y procarcinógenos. En *Drosophila* alrededor del 85% de los carcinógenos probados son mutagénicos en células germinales. Su ciclo de vida es corto para permitir el análisis de progenie numerosa, pero lo suficientemente largo para distinguir entre los efectos de exposiciones crónicas, agudas y fraccionadas, además de

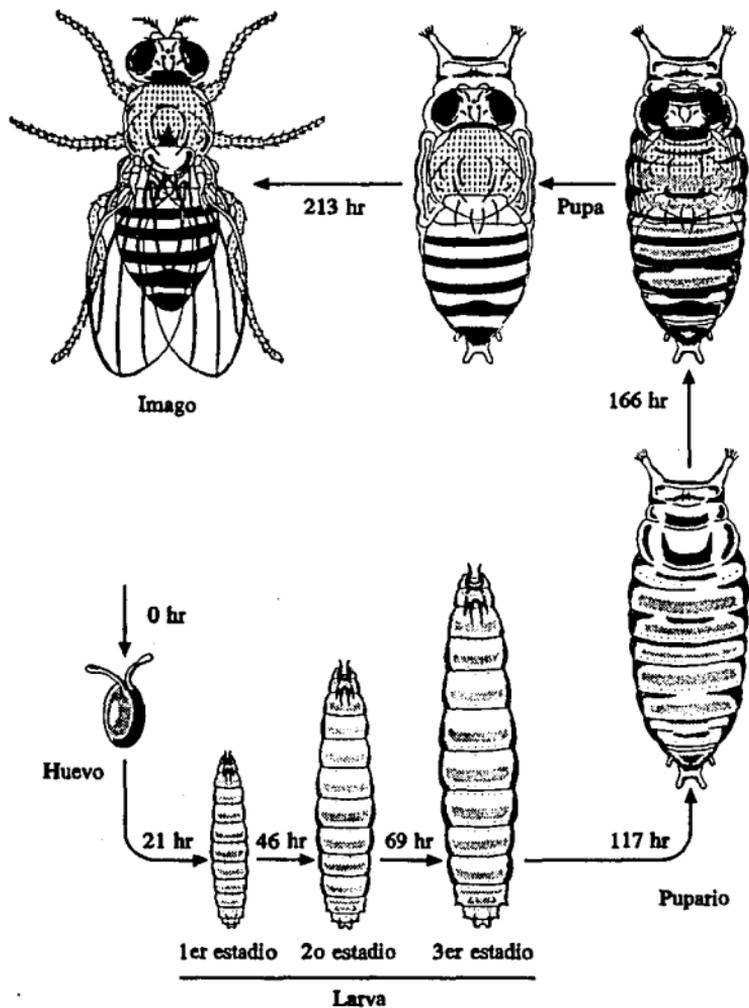


Fig. 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25±1°C.

contar con una gran cantidad de marcadores fenotípicos que facilitan el análisis genético (Lindsley y Grell, 1968; Lindsley y Zimm, 1979). Los agentes en estudio pueden administrarse por diferentes vías tales como alimentación de larvas y adultos, inyección, inhalación y ducha vaginal.

En la figura 4 se muestra el ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* y la duración de los diferentes estadios. El desarrollo de *Drosophila* incluye un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de tres estadios larvarios que culminan con una metamorfosis completa de la que finalmente surge el adulto. La duración del ciclo de vida completo es de 9.5 a 10 días en condiciones controladas de temperatura (25°C) y humedad relativa (60%) (Demerec y Kaufmann, 1962; Ramos et al, 1993).

Las larvas de *Drosophila* presentan dos linajes celulares diferentes; las células larvarias y las imagales. Las células larvarias forman el cuerpo de la larva, se caracterizan porque han perdido la capacidad de división y sólo aumentan en volumen. Las células imagales no están involucradas en la formación del cuerpo de la larva y se distinguen porque tienen tamaño pequeño, constitución cromosómica diploide, retienen la capacidad de división celular, y están determinadas genéticamente pero se diferencian hasta que la larva entra en la metamorfosis; estas células se localizan en estructuras características denominadas discos imagales, los cuales son primordios celulares que incrementan su tamaño al multiplicarse el número de células mediante divisiones mitóticas (Ramos et al, 1993). Los discos de células indiferenciadas dan origen a las estructuras del adulto durante la metamorfosis: ojos, antenas, alas, patas, etc. (Fig. 5) (García-Bellido y Merriam 1971a y b; Ramos, et al, 1993). La larva de *Drosophila melanogaster* posee actividades metabólicas que le permiten transformar una gran variedad de xenobióticos.

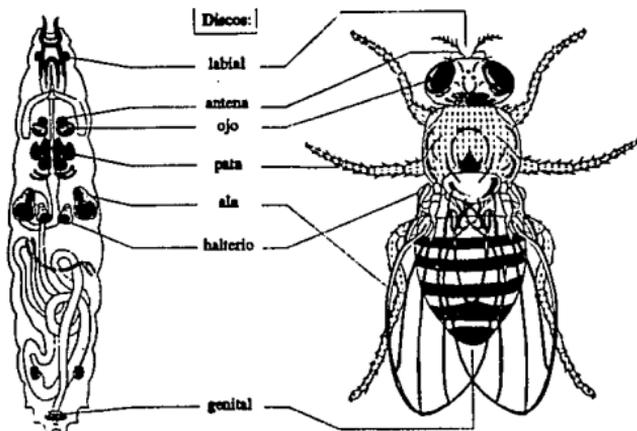


Fig. 5. Discos imagales en la larva de *Drosophila* y estructuras que forman en el adulto.

Algunas de las actividades del citocromo P-450 que catalizan reacciones en *Drosophila* fueron determinadas *in vitro*. Se encontró que *Drosophila* posee enzimas que metabolizan compuestos aromáticos y alifáticos tales como benzo(a)pireno, p-nitroanisol y aminopireno; la diferencia en el espectro de los microsomas indica que el citocromo P-450 está presente. Las actividades de la enzima pueden ser inducidas con efectividad con fenobarbital, aroclor (BPCs) o hidroxitolueno butilado. Las líneas de *Drosophila* con una resistencia incrementada a insecticidas tales como el DDT tienen una capacidad metabólica de P-450 incrementada para algunos, pero no todos los sustratos (Zijlstra, 1987; Timbrell 1989).

Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)

El empleo de las células de *Drosophila* permite detectar la actividad mutagénica y recombinogénica de compuestos químicos a nivel somático (Delgado, 1990; Ordaz, 1991).

Dada la correlación entre actividad mutagénica y carcinogénica, se ha propuesto que la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) además de detectar agentes mutagénicos, puede emplearse para identificar compuestos con potencial carcinogénico, los cuales inducen recombinación mitótica en una proporción importante (Graf et al, 1984). En esta prueba se tratan los discos imagales de las larvas de *Drosophila*. Cuando se produce alguna alteración en las células, ésta se transmite a las células hijas mediante el proceso de mitosis. En cada disco imagal expuesto experimentalmente a una sustancia química se tratan miles de células blanco. El tamaño de una mancha es reflejo del número de divisiones celulares que ocurren después de la inducción del cambio genético en el linaje celular (García-Bellido y Merriam, 1971a; Graf et al, 1984).

El disco imagal del ala (disco mesotorácico dorsal) se observa en el primer estadio larvario como un pequeño paquete de 15 a 30 células epidérmicas embrionarias. Durante el curso del crecimiento larvario estas células del disco se dividen alrededor de 15 a 16 veces (en promedio) para dar un total de casi 50000 células (30800 en la superficie del ala). Poco después de la formación del pupario la división de las células del disco se detiene. El disco toma una forma y tamaño característico siendo como un balón aplanado y altamente plegado (García-Bellido y Merriam, 1971a; Crick y Lawrence, 1975).

Durante la metamorfosis ocurren una serie de complicados movimientos celulares y esto da como resultado que el disco se evierte para formar la estructura del adulto. El ala en sí, se forma primero como una bolsa que posteriormente se colapsa y entonces pasa a ser una doble capa de células epiteliales (Crick y Lawrence, 1975).

En el protocolo de la prueba de mutación y recombinación somática que utiliza las alas se usan marcadores fenotípicos para

los tricomas de las células epiteliales, los que permiten reconocer alteraciones producidas por mutación, pérdida cromosómica o recombinación, ya que se genera la formación de un clon celular, el cual se manifestará en las alas de las moscas adultas como una mancha de tricomas afectados en un contexto de tricomas normales (Fig. 6). El tamaño de la mancha es un indicador del tiempo en que ocurrió la alteración, lo que permite distinguir compuestos directos de indirectos ya que los segundos requieren ser biotransformados por parte del organismo y entonces producen el daño genético en etapas tardías del desarrollo, produciendo clones celulares pequeños (Baars et al 1980, Wright 1980, Würgler et al 1983b, Graf et al 1984, Vogel 1987, Zijlstra y Vogel, 1988)

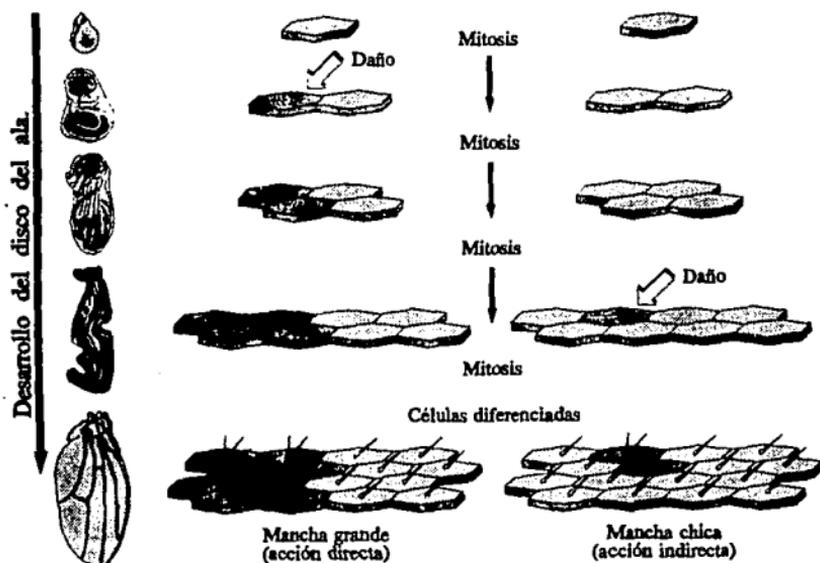


Fig. 6. Formación de clones durante el desarrollo del ala.

El marcador *flare*, *flr³* (3-39.0) es una mutación recesiva que es letal para el organismo en condición homocigótica; sin embargo, cuando se expresa en las células somáticas es viable y produce tricomas en forma de flama o solamente manchas quitinosas sobre la superficie de las alas. Para facilitar el mantenimiento de este marcador se utiliza el cromosoma balanceador TM3 el cual porta numerosas inversiones que impiden recobrar productos del entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos, tiene además el gen dominante *Ser* (*Serrata*) que es letal en condición homocigótica. De esta manera, en cada generación se eliminan las moscas *flr³/flr³* y *Ser/Ser*, por lo que sólo son viables las que portan ambos genes en condición heterocigótica (Delgado, 1990).

La mutación *multiple wing hairs*, *mwh* (3-0.0) es recesiva y en condición homocigótica produce la aparición de tres o más tricomas por célula en vez de uno, como en las moscas silvestres (Graf et al, 1984).

En este caso ambos marcadores: *flr³* y *mwh* se localizan en el brazo izquierdo del cromosoma 3 de *Drosophila*, y para esta prueba resulta de gran importancia considerar la posición del centrómero (3-47.7) ya que en los eventos de recombinación entre cromosomas homólogos puede actuar como un tercer marcador. Las mutaciones inducidas son detectadas como manchas en mosaico en el ala de los adultos que sobreviven y que muestran uno u otro de los fenotipos: *mwh* o *flr³*. Un evento de recombinación entre *mwh* y *flr³* puede dar como resultado una mancha sencilla *mwh*. Por otra parte la recombinación entre *flr³* y el centrómero da lugar a manchas dobles (Graf et al, 1984; Fig. 7).

La frecuencia y tamaño de las diferentes manchas permite la determinación cuantitativa de los efectos mutagénicos y/o recombinogénicos. La recombinación inducida lleva a manchas gemelas *mwh* y *flr³* y también en parte a manchas sencillas *mwh*. La pérdida de un alelo dominante puede ocurrir por una variedad de mecanismos:

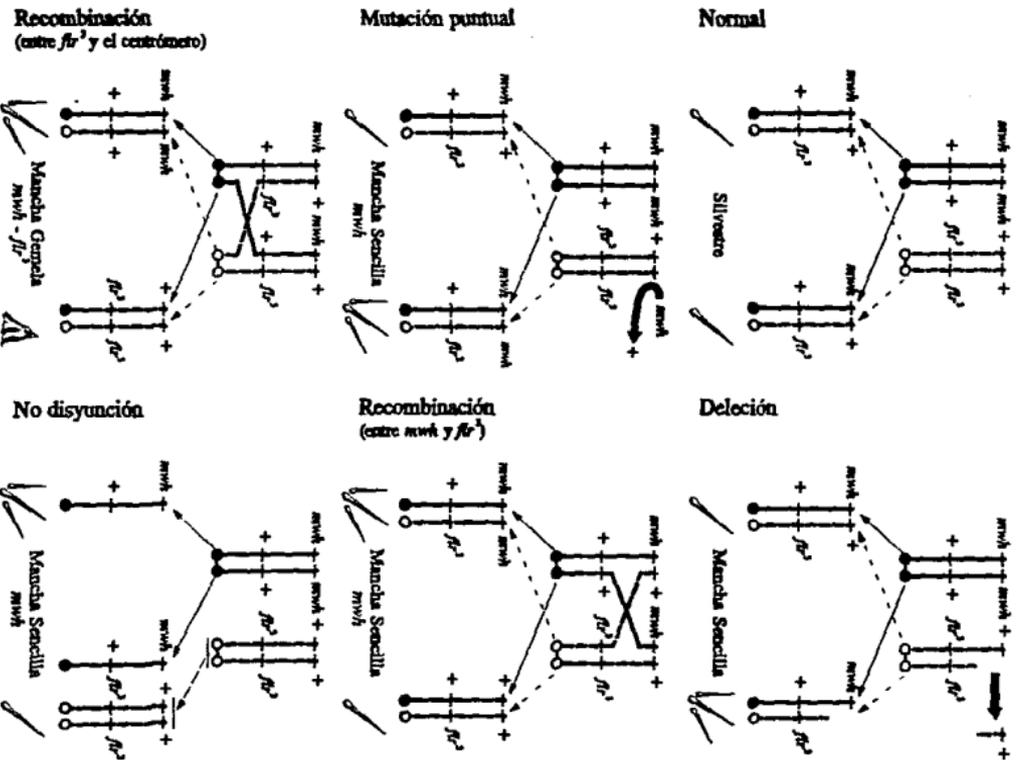


Fig. 7. Eventos genéticos que detecta SMART. (Modificado de Graf et al., 1984).

FALTA PAGINA

No.

19

intercambio mitótico homólogo, mutación, intercambio mitótico no homólogo y delección (Graf et al, 1984).

La reactividad absoluta de un compuesto tiene una importancia limitada y no siempre puede determinar si, es un poderoso mutágeno *in vivo* o no. La capacidad de un producto químico para interactuar y alterar el ADN de las células está influida por múltiples factores como son las propiedades fisicoquímicas del compuesto, la intensidad, forma y duración de la exposición (laboral o accidental), la constitución genética de los organismos, especies, sexo, edad, hábitos, salud, preñez, asociación con enfermedades y factores ambientales, entre otros (Ames et al, 1973; Clayson, 1980; Graf et al, 1984).

Resulta importante, analizar la relación entre la estructura química de compuestos relacionados, así como de formas isoméricas de éstos y la posibilidad de que puedan interactuar directamente con el ADN para producir alteraciones, o bien, sólo después de que su estructura ha sido biotransformada; la relación entre la estructura del compuesto y sus efectos sobre el material genético permite asociar agentes genotóxicos con actividades específicas (alquilación, intercalación y otras).

Para el estudio de las relaciones estructura química-actividad genotóxica existen dos principales tipos de enfoque: 1) los extra-termodinámicos, en los que las propiedades fisico-químicas están asociadas a ciertos efectos biológicos. 2) los métodos de conectividad, en los que se intenta ligar elementos estructurales específicos con los efectos (Zijlstra, 1987).

Las interacciones entre una molécula y un órgano blanco, especialmente en sistemas *in vivo*, son complejas y están determinadas por muchos factores, que a su vez modifican la mutagenicidad y/o carcinogenicidad para los organismos (Tabla II).

TABLA II. Factores que modifican la mutagenicidad y la carcinogenicidad de sustancias extrañas (Tomado de Zijlstra, 1987).

- Ruta de administración, forma de aplicación, tasa de absorción, distribución y eliminación
- Biotransformación: activación o desactivación metabólica
- El tipo de interacción con el ADN (radicales libres, electrófilos, intercalación)
- La tasa de reacción con el ADN y otras biomoléculas
- El tipo y distribución de los aductos del ADN
- La implicación de daño secundario al ADN (enlaces cruzados, sitios apurínicos)
- Reparación del ADN (propenso al error, libre de error o sin reparación)
- Tasa de división celular
- Expresión del daño genético
- El evento genético terminal
- Tiempo entre el tratamiento y la expresión del daño genético.

Estos factores dependen de una variedad de parámetros químicos que se aplican tanto a los compuestos primarios como a los metabolitos formados:

- lipofilicidad
- factores estéricos
- factores electrónicos
- interacciones con enzimas
- reactividad absoluta y relativa
- actividad óptica
- mono o multifuncionalidad (Zijlstra, 1987).

La estructura química de las moléculas de una sustancia y las propiedades biológicas de la misma están relacionadas estrechamente. El conocimiento de los grupos reactivos y/o de su posición en la molécula deben en principio permitir que las propiedades mutagénicas de una sustancia sean predecibles (Filov et al, 1979).

En este trabajo se emplearon compuestos del tipo de los bifenilos policlorados, los cuales, han sido un grupo complicado cuando se han estudiado sus efectos genotóxicos con diferentes bioensayos (OPS, 1979; Moriya et al, 1983; Ashby y Tennant 1991).

Los bifenilos clorados se caracterizan por tener una estructura química variada. Tienen estabilidad química, baja solubilidad en agua, solubilidad moderada en solventes orgánicos y baja presión de vapor. La estabilidad y la solubilidad dan lugar a que sean altamente persistentes, produciendo contaminación del ambiente a largo plazo y acumulación gradual en animales (OPS, 1979; De la Jara, 1985; Dent, 1991).

Se absorben por aparato digestivo y respiratorio, pero el riesgo mayor es la absorción por piel. Tienen actividad como inhibidores de anticolinesterasa en mamíferos e insectos dependiendo del balance entre las reacciones de activación y desintoxicación (Hajjar y Hodgson, 1980; De la Jara, 1985). Actúan sobre el sistema nervioso central, aunque no se ha aclarado el mecanismo exacto de esta acción, ni en el hombre ni en los animales. Tienen una toxicidad baja, aunque las dosis altas provocan náuseas y diarrea o en los mamíferos suelen producir hepatomegalia, nódulos hepáticos neoplásicos no metastatizantes en ratas y ratones, algunos de éstos derivan en carcinomas hepatocelulares; el mono rhesus es más sensible que la rata y muestra efectos similares a los observados en humanos con un orden similar de exposición (OPS, 1979; De la Jara, 1985).

Entre otros efectos se incluyen porfiria, inmunosupresión e interferencia con el metabolismo de los esteroides, es probable que algunos de estos efectos sean atribuidos al aumento de actividad enzimática microsómica, vinculado con la hepatomegalia (OPS, 1979).

Los compuestos y/o ciertos productos de degradación de los bifenilos clorados son liposolubles en general, se puede inferir

que se absorben fácilmente a través de las membranas y que se acumulan en el tejido graso, el material almacenado en la grasa parece ser bastante inactivo y se elimina de manera lenta. Si los organoclorados se encuentran en la grasa del cuerpo en niveles altos, cuando ésta se metaboliza se puede liberar suficiente compuesto químico en la sangre lo que produce envenenamiento y eventualmente la muerte. Los insecticidas (o sus derivados), pueden detectarse en el contenido gástrico, en la leche, orina, sangre y grasa. La excreción se realiza fundamentalmente por las heces (OPS, 1979, De la Jara, 1985; Vega, 1985; Dent, 1991).

Los plaguicidas clorados presentan una baja correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad. El ensayo de *Salmonella* no es sensible para los compuestos químicos que contienen un halógeno no reactivo y que son considerados carcinógenos. Los falsos positivos de mutagenicidad son raros entre esta clase de químicos (Moriya et al, 1983; Ashby y Tennant, 1991).

En roedores, la presencia de un halógeno inerte (cloro, bromo) en una molécula proporciona una alerta difusa para carcinogénesis no genotóxica, pero esta alerta es fundamentalmente distinta de la alerta genotóxica específica proporcionada por la presencia dentro de la molécula de un halógeno reactivo (reemplazable/electrofilico) (Ashby y Tennant, 1991).

Cuando se presenta un halógeno no reactivo, las consecuencias carcinogénicas dependen de los efectos que tiene el sustituyente: una lipofilicidad o un receptor adecuados, o una desintoxicación reducida (con el consecuente incremento de acumulación en lípidos) debido al bloqueo de hidroxilación enzimática. Esto sugiere bases conceptualmente distintas de estructura-actividad que pueden subrayar la carcinogénesis no genotóxica (Ashby y Tennant, 1991). Estos agentes actúan por mecanismos que no involucran unión directa al ADN (epigenéticos). En membranas celulares inhiben el intercambio molecular intracelular tanto en sistemas de células de

hígado como en células no hepáticas, y también inciden en la promoción de carcinogénesis de hígado; asimismo, pueden producir citotoxicidad (inhibición de los procesos de reparación), modificación hormonal, inmunosupresión o fotosensibilidad (Innes et al, 1969; Moriya et al, 1983; Williams et al, 1989).

La actividad insecticida de los organoclorados (como el DDT y sus análogos) se modifica por la forma y el tamaño de la molécula y se ha propuesto que para tener actividad, requieren de un grupo sustituyente para inhibir la libre rotación de los dos anillos de fenilo planos, pero además, funcionan estrictamente como tóxicos físicos. Poseen el tamaño y forma molecular óptimos para penetrar los intersticios de las moléculas lipoprotéicas de la membrana. Cuando la molécula penetrante posee regiones con fuerza de atracción muy grandes (ej. átomos de cloro) la interacción con la membrana puede afectar su permeabilidad (Cremlyn, 1990).

Varios derivados del bifenilo con un puente de enlace, son acaricidas, aunque están casi exentos de toxicidad para insectos. Muchos de los más importantes acaricidas del grupo de los compuestos del bifenilo con un puente de enlace como el DDT contienen dos átomos de cloro en posición 4,4' (4,4' diclorados) (Cremlyn, 1990).

Los acaricidas sintéticos se dividen en insecticidas-acaricidas y acaricidas específicos.

Los insecticidas-acaricidas son compuestos activos en pruebas de laboratorio contra insectos, ácaros y garrapatas. Incluyen algunos organofosfatos (ej. paration y diazinon), carbamatos, (ej. aldicarb y metomyl), organoclorados (ej. endosulfán y toxafeno), piretroides (ej. fluvalinato y bifentrin) y formamidinas (ej. clorodimeform y amitraz) (Hayes y Laws, 1991).

Los acaricidas específicos no son letales para los insectos pero sí lo son para ácaros y/o garrapatas. Incluyen algunos bifenil alifáticos (ej. clorobencilato y bromopropilato), organotinas (ej. cyhexatin y azocyclotin), compuestos con puente sulfuro (ej. clorofenson y tetradifon), derivados de dinitrofenol (ej. dinabuton y dinapacryl) y compuestos no relacionados estructuralmente (ej. dienocloro y azoxy benceno) (Hayes y Laws 1991).

Poco se sabe acerca del modo de acción bioquímico de estos acaricidas. La amplia variedad de los posibles grupos que sirven de puente entre los dos anillos fenilo, hace difícil formular las relaciones precisas entre estructura y actividad. En pruebas de laboratorio son generalmente negativos y siempre inespecíficos (De la Jara, 1985; Cremlyn, 1990).

Es importante evaluar la actividad de los compuestos extraños y establecer la relación que existe con su estructura química. Para este trabajo se eligieron los compuestos en base a su similitud estructural, para comparar sus efectos.

La exposición a estos compuestos depende de sus usos: como plaguicidas, en medicina humana y veterinaria o en síntesis orgánica.

Bitionol. 2,2'-Thiobis[4,6-diclorofenol]: (Fig. 8a) formulado como surfactante antimicrobiano contra bacterias, mildius y levaduras. Se ha utilizado como fungicida agrícola. Se emplea además como antiséptico tópico y antihelmíntico en parasitosis humana y medicina veterinaria, su uso en cosméticos se ha eliminado (Budavari, 1989; Bacq et al, 1991). Es ligeramente tóxico (Tabla III). No hay reacción en la piel cuando se aplica con un ungüento. En los seres humanos el bitionol causa algún grado de fotosensibilidad, lo que provoca que las células sean más susceptibles a la acción de la luz, especialmente la luz ultravioleta (Hayes, 1975; Hayes y Laws, 1991).

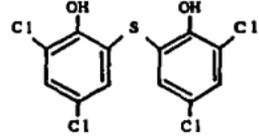
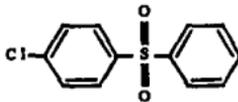
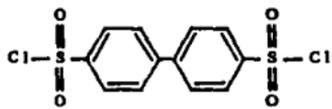
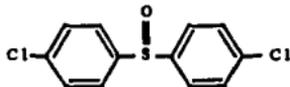
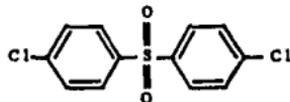
<p>a)</p> <p>Bitionol 2,2'-Thiobis[4,6-diclorofenol]</p>	
<p>b)</p> <p>Sulfenona p-Clorofenil fenil sulfona</p>	
<p>c)</p> <p>Cloruro de 4,4' bifenil disulfonilo</p>	
<p>d)</p> <p>4-Clorofenil sulfóxido</p>	
<p>e)</p> <p>4-Clorofenil sulfona</p>	

Fig. 8. Estructura de los compuestos utilizados.

Sulfenona. 4-Clorofenil fenil sulfona: (Fig. 8b) es moderadamente tóxico (Hayes, 1975). Es un acaricida que muestra toxicidad residual efectiva y acción ovicida para *Tetranychus bimaculatus* y otros ácaros fitófagos. En mamíferos de laboratorio la toxicidad oral es moderadamente baja. No produce irritación de la piel. En pruebas de alimentación crónica no hay almacenamiento

TABLA III. Clasificación de toxicidad en la evaluación del peligro de envenenamiento accidental a través de la ingestión (Tomado de Hayes, 1975).

Grado de toxicidad	Dosis (mg/kg) *	Dosis hombre 70kg
6 supertóxico	< 5	< 7 gotas
5 extremadamente tóxico	5 - 50	7 gotas - 1 cucharada
4 muy tóxico	50 - 500	1 cucharada - 1 onza
3 moderadamente tóxico	500 - 5000	1 onza - 1 libra
2 ligeramente tóxico	5000 - 15000	1 libra - 1 cuarto
1 prácticamente no tóxico	> 15000	> 1 cuarto

* Probable letalidad para los seres humanos.

significativo en tejidos de mamíferos. Es estable a temperatura ambiente con ácidos, álcalis, oxidantes y reductores, a temperatura ambiente (Hayes, 1975; Budavari, 1989). No se recomienda su uso en peras (variedades Bartlett o D'Anjou) uvas, plantas de jardín sensibles, cucurbitáceas, variedades de manzanas sensibles al enrojecimiento, tampoco es fitotóxico para cítricos. La vida media de sulfenona en la cáscara de cítricos se ha establecido en 9 a 12 días (Negherbon, 1959).

Los acaricidas organosulfurados como bitionol y sulfenona tienen azufre en su átomo central y una estructura semejante a la del DDT, con dos anillos fenilos. El azufre en combinación con los anillos de fenilo es particularmente tóxico para los ácaros, en los insectos la toxicidad es baja (Ware, 1978).

Cloruro de 4,4'-bifenil disulfonilo: (Fig. 8c) sus propiedades toxicológicas han sido poco investigadas. En exposiciones agudas es perjudicial si es ingerido, inhalado o bien absorbido a través de la piel. Causa quemaduras y es altamente destructivo para el tejido de las membranas mucosas y el tracto respiratorio superior, ojos y piel (Lenga, 1988).

4-Clorofenil sulfóxido: (Fig. 8d) no se tienen referencias de sus propiedades toxicológicas. Los sulfóxidos pueden ser oxidados a sulfonas, formas que han sido utilizadas en la elaboración de diversos acaricidas.

4-Clorofenil sulfona: (Fig. 8e) puede ser perjudicial en exposición aguda por inhalación, ingestión o absorción por la piel; además puede causar irritación (Lenga 1988).

El cloruro de bifenil disulfonilo es el único que no presenta puente de azufre entre los bencenos, los dos átomos de este elemento se encuentran en los extremos de los anillos. Los compuestos poseen de uno a cuatro átomos de cloro unido a los extremos. Estructuralmente los que muestran mayor relación son sulfenona, clorofenil sulfóxido y clorofenil sulfona, la diferencia es la falta de un átomo de cloro o de oxígeno. El bitionol no tiene su azufre en forma oxidada pero sí muestra dos grupos hidroxilo.

Se ha mostrado que algunos compuestos halogenados monocíclicos y policíclicos reconocidos como carcinógenos o bien cuyas estructuras sugieren una posible carcinogenicidad, resultan negativos en pruebas de mutación, estos compuestos forman un grupo heterogéneo del cual se ha discutido su posible alerta estructural (Ashby y Tennant, 1991).

En la presente tesis se comparó la actividad genotóxica de cinco compuestos relacionados químicamente mediante la prueba de mutación y recombinación somáticas en *Drosophila melanogaster*. Se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Determinar la actividad mutagénica y/o recombinogénica de cinco compuestos orgánicos empleando la prueba de SMART en ala de *Drosophila melanogaster*.

- 2) Comparar la respuesta genotóxica de los cinco compuestos con su estructura química y analizar la relación.

Hipótesis

Si la actividad genotóxica de un compuesto químico está determinada por su estructura química, entonces la inducción de mutación y recombinación somática por los cinco compuestos seleccionados será similar.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Compuestos químicos

Los compuestos usados en los tratamientos experimentales fueron: Bitionol 2,2'-Thiobis[4,6-diclorofenol] (Sigma), Sulfenona 4-Clorofenil fenil sulfona, 4-Clorofenil sulfóxido, Cloruro de 4,4'-bifenil disulfonilo y 4-Clorofenil sulfona (Aldrich).

Determinación de la Concentración Letal 50 (LC50)

En las pruebas de toxicidad con *Drosophila* es difícil establecer la dosis exacta que reciben los organismos (larvas o adultos) en las diferentes vías de administración que se pueden aplicar (oral, inyección, por contacto o ducha vaginal), en estos tratamientos sólo se conoce la concentración del compuesto en la solución. Por esta razón, el índice de toxicidad empleado en este trabajo es la **Concentración Letal 50 (LC50)**. Para obtener este índice se registra el número de moscas que mueren en cada tratamiento en un lapso de tiempo determinado y se obtiene el porcentaje a partir del total de moscas expuestas a la sustancia de prueba:

$$LC = \frac{\text{No. de moscas muertas}}{\text{Total de moscas}} \times 100$$

Para determinar la LC50 de los compuestos empleados en este trabajo se emplearon dos métodos de administración: inyección y oral. De cada compuesto se probaron cinco concentraciones y el testigo fue sacarosa al 5%, para cada concentración se realizó al menos una repetición.

1) LC50 por inyección: 50 machos de la línea silvestre Canton-S (CS) de 24 hs de edad se inyectaron con una microjeringa y se colocaron en frascos con medio de cultivo fresco. El volumen de solución inyectado a cada mosca se ha estimado en aproximadamente 4 μ l. A las 48 hs se realizó el registro de moscas muertas en cada frasco y se obtuvieron los índices de letalidad.

2) LC50 oral: grupos de 10 machos de la línea Canton-S de 24 hs de edad se colocaron en tubos homeopáticos que contenían 2 círculos de papel filtro humedecidos con 0.3 ml de la solución de prueba. Las moscas se cambiaron a tubos con solución nueva dos veces al día (mañana y tarde), durante dos días; para cada vial (dos por concentración), se registró el número de moscas muertas en cada cambio. A las 48 hs se realizó el registro final. Este procedimiento se continuó hasta observar la repetibilidad de la respuesta.

Líneas de *Drosophila*

Los cultivos se mantuvieron a 25°C, 60% de humedad y medio de cultivo elaborado a base de: agua (82.56%), carragenina (0.99%), azúcar (4.62%), harina de maíz (6.94%), levadura (4.36%), ácido propiónico (0.26%) y nipagín (0.26%) (Ramos et al, 1993).

En este trabajo se utilizaron dos líneas de *Drosophila melanogaster*: *flr³/TM3,Ser* y *mwh/mwh* de las cuales se extrajeron hembras vírgenes y machos, respectivamente.

Como resultado de esta cruce se obtienen dos tipos de progenie: las larvas transheterocigas (+ *flr³/mwh* +) constituyen la mitad de la progenie, la otra mitad consiste de larvas portadoras del cromosoma balanceador (*TM3,Ser/mwh* +), debido a que los dos tipos de larvas no son distinguibles se tratan juntas. Los adultos

de la F₁ se distinguen por la forma de las alas (Fig. 9).

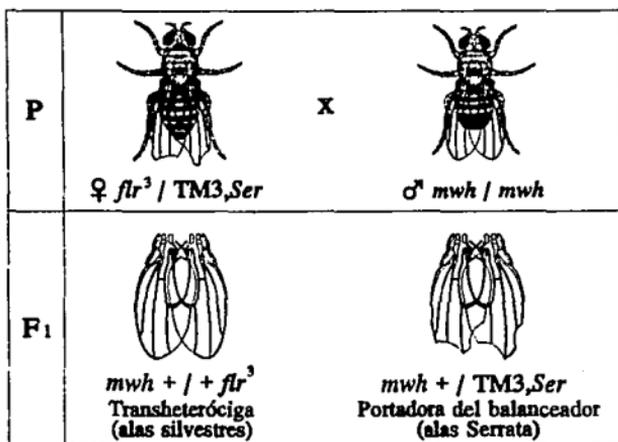


Fig. 9. Cruza progenitora para SMART y fenotipos de las moscas que se obtienen en la F₁.

Tratamiento

Los compuestos se disolvieron en una mezcla de etanol-Tween 80 3:1, la mezcla se calentó ligeramente durante 4 min. y después se agregó al medio de cultivo estándar que se encontraba a 60°C y se sirvió en frascos lecheros de 250 ml de capacidad (Hernández, 1993). Para cada compuesto las concentraciones empleadas fueron de 150, 300, 450 y 600 ppm. En todos los casos se corrió un lote testigo y se realizó una repetición de cada tratamiento.

Después de realizada la cruce progenitora, las moscas se colocaron en frascos con medio fresco que contenía diferentes concentraciones de cada compuesto. Los progenitores fueron retirados de los frascos 8 hs después, en el medio quedaron los huevos que continuaron su desarrollo hasta la emergencia de moscas

adultas (tratamiento crónico: 0 x 120 hs) (Fig. 10).

Fijación y elaboración de preparaciones

De las moscas adultas recuperadas se separaron las transheterocigas (con alas de fenotipo silvestre) de las portadoras del cromosoma balanceador (Serrata), las moscas se fijaron en etanol al 70%. Las alas se disectaron del cuerpo de las moscas y se colocaron en portaobjetos con solución Fauré (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 gr de hidrato de cloral y 50 ml de agua) para su análisis posterior al microscopio compuesto a 40x (Graf et al, 1984; Gaytán, 1993).

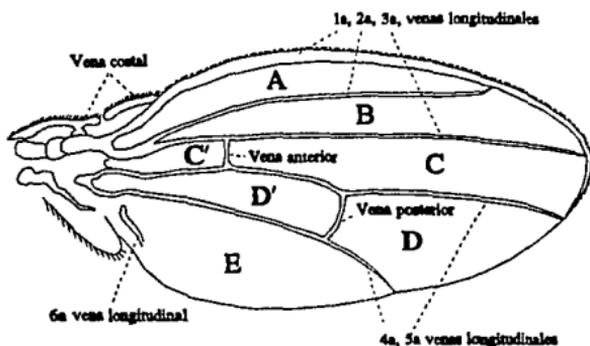


Fig. 11. Zonas de registro de manchas en el ala.

Durante el análisis de las alas se registró la localización de las manchas de acuerdo al sector del ala (Fig. 11). Las manchas *mw*^h o *flr*³ se clasifican en tres categorías: chicas sencillas (de 1 ó 2 células), grandes sencillas (más de 2 células) y gemelas (manchas que muestran la presencia de los dos marcadores (Graf et al, 1984). En ocasiones ocurre que un clon afectado es dividido por hileras de

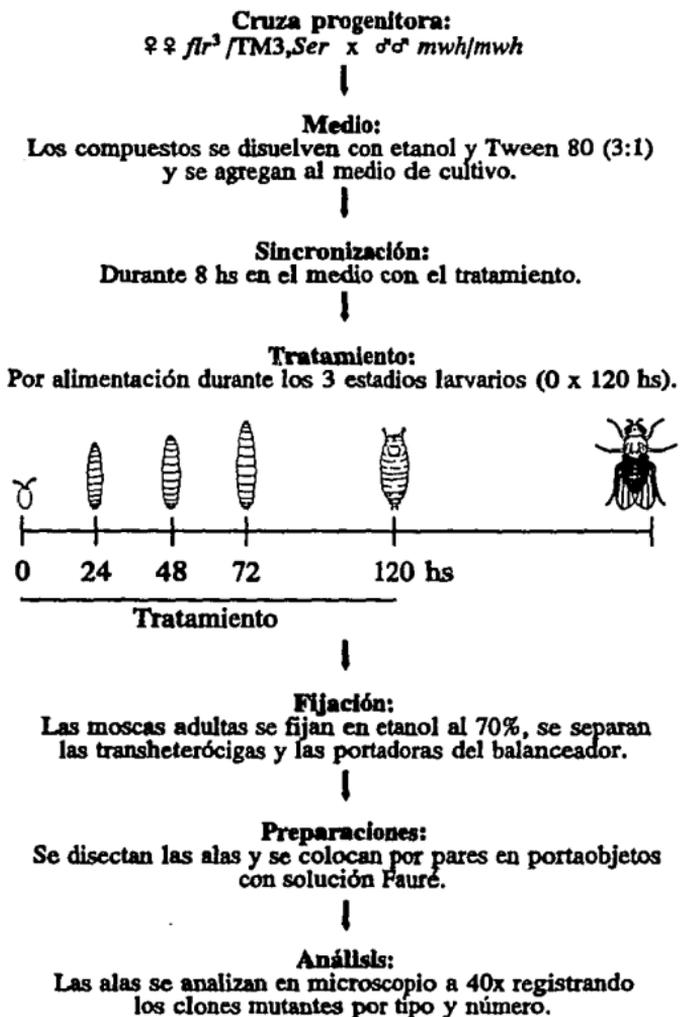


Fig. 10. Cronograma de SMART en ala.

tricomas normales, el criterio para decidir si se trata de dos manchas independientes, es que estén separadas por tres o más hileras de tricomas silvestres.

Análisis estadístico

El tamaño de muestra para el análisis fue de 80 alas por concentración. El análisis estadístico se realizó mediante el programa de cómputo SMART (Würgler, no publicado) con un valor de $P < 0.05$. Se determina si la fracción de alas que muestra al menos una mancha de un tipo particular (sencilla chica, sencilla grande o gemela) se incrementa en las series tratadas cuando se compara con las series testigo (Frei y Würgler, 1988). Se comparan las frecuencias obtenidas en las series tratadas con respecto a la testigo con base en las siguientes hipótesis: H_0 , según la cual la frecuencia de mutación (f_e) (inducida + espontánea) de las moscas tratadas no es más grande que la frecuencia de mutación del grupo testigo (f_c). H_a , que plantea que la frecuencia experimental es igual a m veces la frecuencia testigo (f_c), donde m es el factor de multiplicación para las frecuencias experimentales de los diferentes tipos de manchas. Para manchas sencillas chicas y totales $m = 2$ y para sencillas grandes y gemelas $m = 5$, ya que éstas son mucho menos frecuentes que las primeras.

Este análisis permite decidir si el resultado obtenido para cada compuesto es positivo, débil positivo, negativo o indeterminado al confrontar las hipótesis nula y alternativa (Frei y Würgler, 1988) (Tabla IV).

III. RESULTADOS

En la figura 12 se muestra la mortalidad producida por bitional inyectado en machos CS, en las pruebas para determinar la toxicidad de este compuesto. El valor de LC_{50} se encontró aproximadamente en 1650 ppm, aunque se puede observar que existe

TABLA IV. Resultados posibles en SMART. H_0 = hipótesis nula, H_A = hipótesis alternativa (Según Frei y Würgler, 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+)

una variación mayor en la mortalidad registrada en las concentraciones superiores a 1750 ppm, debida probablemente a la toxicidad. En las pruebas por vía oral para machos CS no se obtuvo respuesta inclusive en concentraciones de hasta 2500 ppm.

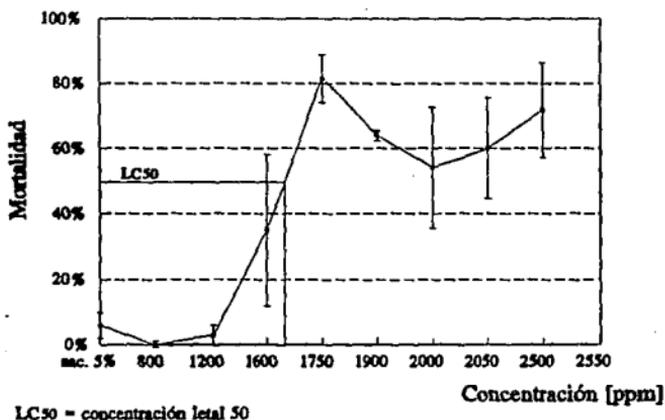


Fig. 12. Mortalidad ($x \pm \sigma$) por bitionol en machos silvestres de *Drosophila melanogaster* (inyección de adultos).

Sólo se realizaron pruebas de toxicidad para bitionol debido

a que los otros compuestos presentaron una solubilidad baja para los sistemas utilizados lo cual dificultó su administración a las moscas.

En SMART los lotes testigo (etanol + Tween 80) de cada tratamiento, no mostraron diferencias significativas entre sí en la frecuencias de manchas espontáneas, por lo que se sumaron.

Los resultados obtenidos para cada compuesto se muestran en las tablas V a IX y las figuras 13 a 18.

Bitionol: para manchas sencillas chicas resultó negativo en las cuatro concentraciones empleadas, aunque se puede observar que la respuesta estuvo en relación con la concentración (Tabla V y Fig. 13). En manchas grandes se tiene un efecto positivo para la concentración de 150 ppm. Las manchas gemelas mostraron un efecto positivo a 300 ppm además de que los efectos tienen una relación con la concentración hasta 300 ppm. Las frecuencias de manchas totales no fueron significativas en ninguna de las concentraciones probadas.

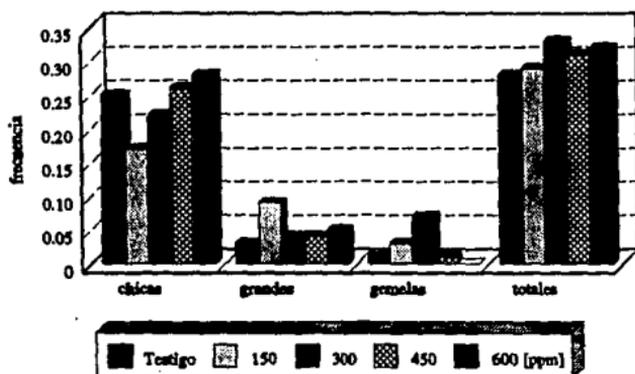
Sulfenona: este compuesto no mostró ningún efecto mutagénico ni recombinogénico, la frecuencia de manchas grandes en 150 y 600 ppm aumentan sólo ligeramente respecto del testigo (Tabla VI y Fig. 14). En manchas chicas y totales se observa una disminución en las frecuencias dependiente de la concentración.

Cloruro de bifenil disulfonilo: se encontraron efectos positivos en la concentración de 600 ppm para manchas grandes y totales (Tabla VII y Fig. 15). Sólo en manchas grandes se obtuvo una relación de efecto dependiente de la concentración sin ser significativo. Las manchas chicas muestran las frecuencias más altas en 300 y 600 ppm, que estadísticamente son indeterminadas con una disminución importante en 450 ppm.

TABLA V. Resultados obtenidos con bitionol. Exposición: 0 x 120 hs.

Conc. (ppm)	No. alas	Manchas pequeñas				Manchas grandes		Manchas totales		Clases sexuales	Ciclo de división celular promedio	Proc. de formación de clones x 10 ⁻³	
		chicas m = 2		grandes m = 5		m = 5		m = 2				observada	testigo
		no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.				
Testigo	400	98	0.25	10	0.03	5	0.01	113	0.28	112	1.67	1.1	
150	80	14	0.17	7	0.09 ⁺	2	0.03 [↓]	23	0.29	23	2.30	1.2	0.0
300	72	16	0.22	3	0.04	5	0.07 ⁺	24	0.33	24	2.17	1.4	0.2
450	80	21	0.26	3	0.04	1	0.01	25	0.31	25	1.68	1.3	0.1
600	80	22	0.28	4	0.05 [↓]	0	0.00	26	0.32	26	2.23	1.3	0.2

Testigo = etanol + Tween 80 (3:1). Análisis estadístico de acuerdo a Prei y Wrigler (1968): + = positivo, ↓ = indeterminado, m = factor de multiplicación. P < 0.05



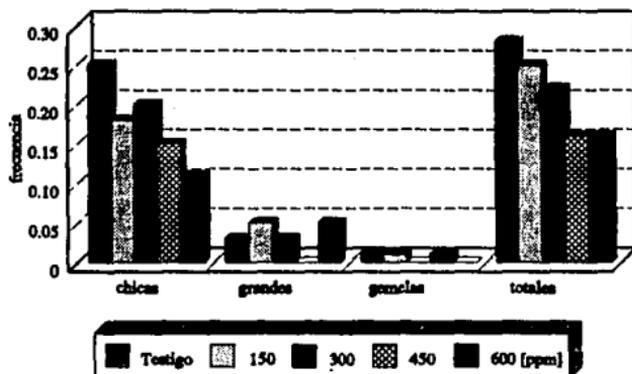
Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 13. Frecuencia de manchas inducidas por bitionol en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 0 x 120 hs.

TABLA VI. Resultados obtenidos con sulfenona. Exposición: 0 x 120 hs.

Conc. (ppm)	No. alas	Manchas pequeñas				Manchas grandes		Manchas totales		Clones arañ.	Ciclo de división celular promedio	Frec. de formación de clones $\times 10^{-2}$	
		chicas m = 2		grandes m = 3		m = 5		m = 2				observada	- testigo
		no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.				
Testigo	400	98	0.25	10	0.03	5	0.01	113	0.28	112	1.67	1.1	
150	76	14	0.18	4	0.05	1	0.01	19	0.25	18	2.11	1.0	-0.2
300	80	16	0.20	2	0.03	0	0.00	18	0.22	18	1.72	0.9	-0.2
450	80	12	0.15	0	0.00	1	0.01	13	0.16	13	1.38	0.7	-0.5
600	62	7	0.11	3	0.05	0	0.00	10	0.16	10	1.90	0.7	-0.5

Testigo = etanol + Tween 80 (3:1). Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würzler (1988):
 m = factor de multiplicación. $P < 0.05$



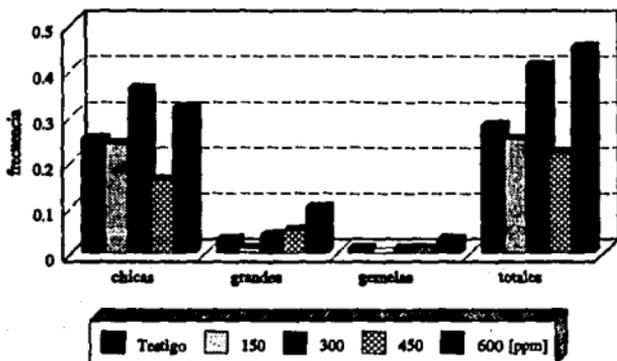
Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 14. Frecuencia de manchas inducidas por sulfenona en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 0 x 120 hs.

TABLA VII. Resultados obtenidos con cloruro de bifenil disulfonilo. Exposición: 0 x 120 hs.

Conc. (ppm)	No. abo	Manchas pequeñas				Manchas grandes				Cincoz avé	Cincoz de división celular promedio	Frec. de formación de clones x 10 ³	
		chicas m = 2		grandes m = 5		m = 5		m = 2				observada	- testigo
		no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.				
Testigo	400	96	0.25	10	0.03	5	0.01	113	0.28	112	1.67	1.1	
150	80	19	0.24	1	0.01	0	0.00	20	0.25	20	1.40	1.0	-0.1
300	78	28	0.36 ⁱ	3	0.04	1	0.01	32	0.41 ⁱ	31	1.74	1.6	0.5
450	80	13	0.16	4	0.05	1	0.01	18	0.22	18	2.28	0.9	-0.2
600	80	26	0.32 ⁱ	8	0.10 ⁺	2	0.03	36	0.45 ⁺	36	2.25	1.8	0.7

Testigo = etanol + Tween 80 (3:1). Análisis estadístico de acuerdo a Piel y Würzler (1968) : + = positivo, i = indeterminado, m = factor de multiplicación. P < 0.05



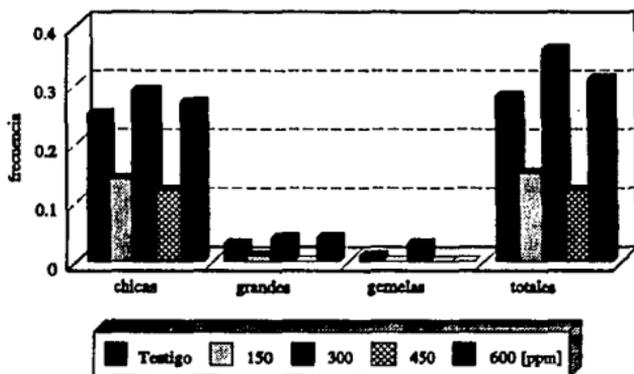
Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 15. Frecuencia de manchas inducidas por cloruro de bifenil disulfonilo en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 0 x 120 hs.

TABLA VIII. Resultados obtenidos con clorofenil sulfóxido. Exposición: 0 x 120 hs.

Conc. (ppm)	No. alas	Manchas sencillas				Manchas gemelas		Manchas totales		Clones avés	Ciclos de división celular promedio	Proc. de formación de clones $\times 10^{-5}$	
		chicas m = 2		grandes m = 5		m = 5		m = 2				observada	- testigo
		no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.	no.	fr.				
Testigo	400	98	0.25	10	0.03	5	0.01	113	0.28	112	1.67	1.1	
150	80	11	0.14	1	0.01	0	0.00	12	0.15	12	1.42	0.6	-0.5
300	72	21	0.29	3	0.04	2	0.03	26	0.36	25	1.88	1.4	0.3
450	34	4	0.12	0	0.00	0	0.00	4	0.12	4	1.25	0.5	-0.7
600	26	7	0.27	1	0.04	0	0.00	8	0.31	8	1.50	1.3	0.1

Testigo = etanol + Tween 80 (3:1). Análisis estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1968):
 m = factor de multiplicación. $P < 0.05$



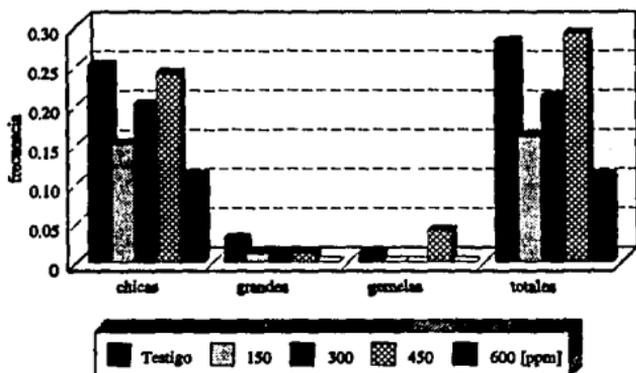
Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 16. Frecuencia de manchas inducidas por clorofenil sulfóxido en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 0 x 120 hs.

TABLA IX. Resultados obtenidos con clorofenil sulfona.
Exposición: 0 x 120 hs.

Conc. (ppm)	No. alas	Manchas pequeñas				Manchas grandes		Manchas totales		Ciclos avá	Ciclos de división celular promedio	Proc. de formación de clones x 10 ⁻³	
		m = 1 no.	m = 1 fr.	m = 5 no.	m = 5 fr.	m = 5 no.	m = 5 fr.	m = 2 no.	m = 2 fr.			observada	- testigo
Testigo	400	98	0.25	10	0.03	5	0.01	113	0.28	112	1.67	1.1	
150	80	12	0.15	1	0.01	0	0.00	13	0.16	13	1.38	0.7	-0.5
300	80	16	0.20	1	0.01	0	0.00	17	0.21	17	1.53	0.9	-0.3
450	80	19	0.24	1	0.01	3	0.04 ⁱ	23	0.29	23	1.61	1.2	0.0
600	28	3	0.11	0	0.00	0	0.00	3	0.11	3	1.33	0.4	-0.7

Testigo = etanol + Tween 80 (3:1). Análisis estadístico de acuerdo a Fiel y Würgler (1964):
i = indeterninado, se = factor de multiplicación. P < 0.05



Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 17. Frecuencia de manchas inducidas por clorofenil sulfona en *Drosophila melanogaster*. Exposición: 0 x 120 hs.

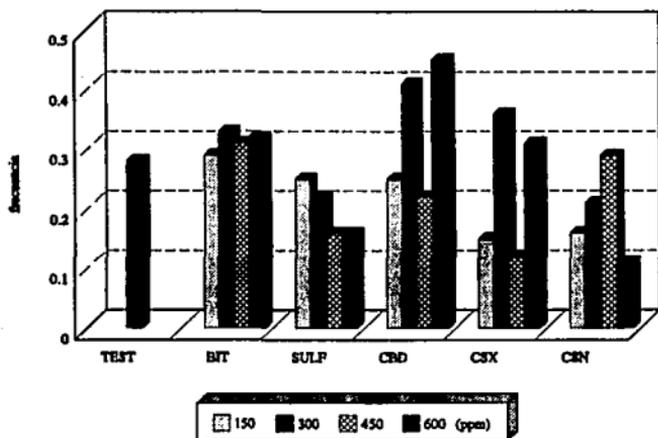
Clorofenil sulfóxido: este compuesto no tuvo efectos significativos para los diferentes tipos de manchas en ninguna de las concentraciones (Tabla VIII y Fig. 16), aunque en forma similar al cloruro de bifenil disulfonilo, las manchas chicas muestran frecuencias similares a las del testigo y mucho más bajas, y en este caso además ocurre algo similar con las manchas grandes. Sólo se obtuvieron manchas gemelas en 300 ppm. Los efectos tóxicos se manifestaron también en la menor cantidad de moscas adultas recobradas en las concentraciones de 450 y 600 ppm.

Clorofenil sulfona: en manchas chicas las frecuencias aumentan de 150 a 450 ppm pero sin alcanzar la frecuencia basal de mutación, y en 600 ppm la frecuencia disminuye considerablemente (efecto de toxicidad) como se observa en la tabla IX y la figura 17, además se recuperó un menor número de moscas en esta concentración. Las manchas grandes fueron constantes de 150 a 450 ppm, en 600 ppm no se registraron; sólo se presentaron manchas gemelas en 450 ppm.

La figura 18 muestra un resumen de las frecuencias en manchas totales para los cinco compuestos. Se observan efectos tóxicos evidentes en Sulfenona y clorofenil sulfona, así como las variaciones similares en las frecuencias de manchas obtenidas con cloruro de bifenil disulfonilo y clorofenil sulfóxido.

IV. DISCUSIÓN

Las características de la exposición y el espectro de los efectos provocados se presentan en una relación correlativa denominada relación dosis-respuesta. En la determinación de las medidas de seguridad para una sustancia es necesario tener un método cuantificable para la medición de la toxicidad y disponer de un método preciso para expresarla. La toxicidad de los compuestos no depende únicamente de sus propiedades, sino también de las dosis en que son administrados. Para una sustancia nueva, el punto de



Testigo = etanol + Tween 80 (3:1).

Fig. 18. Frecuencia de manchas totales inducidas por los cinco compuestos: TEST= testigo, BIT= bitionol, SULF= sulfenona, CBD= cloruro de bifenil disulfonilo, CSX= clorofenil sulfóxido, CSN= clorofenil sulfona.

inicio más común en la evaluación toxicológica es el uso de la letalidad como un índice. La respuesta tóxica más evidente es la muerte de los organismos; aunque otros indicadores son la presencia de lesiones patológicas o cambios químicos, bioquímicos y farmacológicos en éstos (Casarett y Doull, 1975; Timbrell, 1989).

Cuando la letalidad inducida por un compuesto se utiliza como el evento terminal en el estudio de la relación dosis-respuesta, es posible determinar la Dosis Letal 50 (LD50), que es una estimación estadística de la dosis de una sustancia que produce la muerte en el 50% de una población expuesta, dentro de un tiempo específico y bajo condiciones establecidas en un tratamiento (Hayes, 1975; Casarett y Doull, 1975). A su vez, la dosis se determina por la cantidad de una sustancia a una concentración conocida, en relación con el peso del organismo. Cuando no se conoce la dosis, la

letalidad se estima en base a la concentración (LC50).

El uso de moscas de tipo silvestre en las pruebas de toxicidad con *Drosophila* es útil para tener un índice de referencia que sirve de base para seleccionar las concentraciones preliminares de los compuestos bajo prueba. Las concentraciones finales pueden variar debido a que por lo general, las líneas mutantes presentan una mayor sensibilidad que las de tipo silvestre, las larvas pueden presentar una respuesta diferente respecto a los adultos dependiendo de la vía de administración y la intensidad de la exposición (Clark, 1982), además, la actividad tóxica de un compuesto no siempre refleja su capacidad para interferir con el material genético del organismo. Las concentraciones empleadas en esta tesis fueron inferiores a la LC50 estimada ya que se observó una mayor toxicidad cuando se administraron los compuestos a las larvas.

Existen sustancias con fórmulas muy diferentes que tienen efectos mutagénicos comparables, desde el punto de vista genético esto es una analogía. Por otra parte, existen series de compuestos homólogos, todos derivados del mismo núcleo, pero diferentes en detalles estructurales tales como radicales o grupos funcionales localizados en diferentes posiciones en la molécula. Como una función de estas diferencias estructurales, la molécula de una serie homóloga puede mostrar grandes diferencias en su actividad mutagénica. En una misma clase química existen tanto sustancias genéticamente inactivas como sustancias que inducen mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas y otro tipo de alteraciones (Moutschen, 1985).

Se asume que la descomposición metabólica de los bifenilos policlorados (BPCs) disminuye a medida que aumenta la cloración. Los estudios de BPCs con 1,2,4 o 5 átomos de cloro han demostrado que éstos se excretan más fácilmente en heces en forma de metabolitos hidroxilados en el caso de los mamíferos y aves, y que

permanecen por un tiempo más breve en tejido adiposo (OPS, 1979).

En el caso de *Drosophila melanogaster* se podría esperar que estos compuestos siguieran alguna ruta metabólica semejante, pero las diferencias en el número y posición de los sustituyentes en los compuestos serían determinantes de la rapidez de excreción.

Se ha observado que los BPCs producen un aumento del retículo endoplásmico liso de las células hepáticas, efecto acompañado de una inducción de la actividad enzimática microsómica del citocromo P-450. Esta inducción es más marcada con los bifenilos más clorados (OPS, 1979; Lippmann, 1992); además, pueden potenciar la acción de sustancias químicas que provocan activación microsómica, y/o disminuyen la acción de las que se desintoxican (OPS, 1979).

Los compuestos utilizados tienen 1, 2 y 4 átomos de cloro, en base a lo anterior, cabe la posibilidad de que se presente algún tipo de inducción o inhibición enzimática en las células de *Drosophila*.

Estos compuestos tienen azufre, el cual puede ser susceptible de ser oxidado o reducido en la biotransformación. La naturaleza y especificidad de sustrato de las enzimas involucradas en la oxidación de azufre han sido consideradas generalmente como pertenecientes al sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P-450. Sin embargo, otras enzimas como la monooxigenasa dependiente de flavin adenina dinucleótido (FAD) están presentes en los microsomas hepáticos (Hajjar y Hodgson, 1980).

La enzima flavin monooxigenasa microsomal (FMO) es una oxidasa azufrada y fósforo oxidasa. Su importancia en el metabolismo de plaguicidas fue establecida cuando se descubrió que la FMO oxida una variedad de plaguicidas que contienen tioeter. El azufre es convertido a sulfóxido y subsecuentemente a sulfona (Hajjar y Hodgson, 1980).

La monooxigenasa dependiente de FAD oxida rápidamente el átomo de azufre tioeter de muchos plaguicidas organofosforados y carbamatos al sulfóxido correspondiente. Se ha observado en peces y mamíferos que la sulfoxidación hepática se realiza eficientemente por la monooxigenasa y por citocromo P-450 (Hajjar y Hodgson, 1980; Cashman et al, 1990).

En diversas pruebas se han observado efectos de disminución en la actividad de enzimas microsómicas, y también la potenciación de algunos compuestos con metabolitos de sulfoxidación (Galtier et al, 1991; Murray et al, 1992). Algunos sulfóxidos y sulfonas son sustratos para la conjugación con glutathion S-transferasa microsómica y citosólica de hígado de conejo, mono, gallina y humano (Dulik et al, 1992).

En este trabajo se evaluaron dos sulfonas (sulfenona y clorofenil sulfona), un sulfóxido (clorofenil sulfóxido) y además el bitionol, que puede ser oxidado a sulfóxido de bitionol o bitionol sulfona, a su vez las sulfonas pueden ser reducidas. Con estas posibles direcciones en la biotransformación se puede esperar que ocurran algunos de los efectos mencionados anteriormente, además de la actividad genotóxica de los compuestos químicos.

Algunos bifenilos relacionados con los compuestos empleados en este trabajo no han mostrado incrementos significativos de tumores de ratón: bifenilo (1206 ppm), ovex (1019 ppm), tetradifon (260 ppm), clorofenson (2400 ppm), bitionolato de sodio (7 ppm), bitionol (111 ppm) (Innes et al, 1969).

El metabolismo del sulfóxido de bitionol se ha estudiado en ratas y vacas en lactancia, siendo oxidado a bitionol sulfona y reducido a bitionol. El sulfóxido de bitionol se unió a proteínas del plasma de bovinos y persistió por gran tiempo en los tejidos de animales tratados (Mourot y Mourot, 1987), esto difiere con la relación de número de átomos de cloro y la rápida eliminación.

El sulfóxido de bitionol resultó mutagénico en las líneas TA98 y TA100 de *Salmonella*, sin embargo la mutagenicidad fue abolida en presencia de la fracción S9 de hígado de rata. El Bitionol y la bitionol sulfona no exhibieron actividad mutagénica en *Salmonella* con o sin fracción S9. Se sugirió que el sulfóxido de bitionol es convertido a bitionol y bitionol sulfona por las fracciones S9 (Mourot y Mourot, 1987).

En nematodos el bitionol mostró una potente inhibición de la enzima L-serina sulfhidrasa activada. Por lo que posiblemente su acción antihelmíntica sea inhibiendo o activando enzimas (Walker y Barret, 1992). En protozoarios inhibe enzimas de fosforilación oxidativa y metabolismo de aminoácidos (Takeguchi et al, 1984; Thong y Coombs, 1987; Walker y Barret, 1992).

En este trabajo, los resultados obtenidos con bitionol en SMART mostraron una relación con lo datos mencionados anteriormente, ya que aunque se obtuvieron dos resultados positivos: manchas grandes (150 ppm) y gemelas (300 ppm), las frecuencias de mutación o recombinación en general fueron inferiores o similares al testigo.

Es posible que esta respuesta sea resultado de una posible biotransformación enzimática (oxidación) del bitionol a sulfóxido o sulfona. La baja frecuencia de manchas chicas con las diferentes concentraciones, así como las bajas frecuencias de manchas grandes para las concentraciones de 300 a 600 ppm, podrían ser el resultado de esta transformación.

La frecuencia de manchas gemelas fue positiva en la concentración de 300 ppm y sugiere que el bitionol o alguno de sus metabolitos pudo inducir actividad recombinogénica. Esta actividad no se presentó en las concentraciones más altas posiblemente por la toxicidad del compuesto.

En el caso de Sulfenona se ha determinado poca toxicidad para abejas e insectos benéficos, además se tienen los siguientes resultados en mamíferos:

- Ratonés recibiendo en la dieta 100 ppm por 12 meses no mostraron signos claros de intoxicación.
- Ratas recibiendo en la dieta 1000 ppm por 12 meses no mostraron signos de intoxicación.
- No hay evidencia de toxicidad crónica o irritación de la piel en ratas expuestas.
- Dietas con 10, 100, y 1000 ppm, a ratas, por más de 2 años produjeron retraso en peso ganado solo a 1000 ppm.
- Dosis de 10, 50, y 100 mg/k/día, en perro, produjeron toxicidad no específica solo a 100 mg/k/día.
- Pruebas repetidas en piel a 1 g/k, en solución de aceite dieron resultados negativos en conejo y cobayo.
- Se observó irritación pasajera en pruebas en ojo de conejo.
- No se incrementa la sensibilidad en cobayo.
- El almacenamiento en tejidos de rata y perro no fue significativo (Negherbon, 1959) (Tabla X).

TABLA X. Toxicidad de sulfenona para animales superiores (Tomado de Negherbon, 1959).

Animal	Ruta	LD50 g/kg	Comentario
ratón albino	oral	2.70	compuesto crudo
ratón albino	intraperitoneal	1.00	compuesto crudo
rata albina	oral	> 1.40	compuesto crudo
rata albina	intraperitoneal	ca 0.50	compuesto crudo
ratón albino ♂♂	oral	3.65	toxicidad en rata de igual orden
rata	oral	> 2.00	

En SMART, en el tratamiento con sulfenona se produjo una aparente relación inversa de sus efectos mutagénicos con las concentraciones utilizadas, esto se observa para manchas chicas y totales. Se debe tener cuidado en esta interpretación ya que la respuesta puede estar determinada principalmente por la toxicidad del compuesto y no por su actividad mutagénica. Se ha mencionado que la sulfenona presenta una toxicidad baja para mamíferos y resulta fitotóxico para algunos grupos de plantas, aunque se ha descrito como un acaricida específico puede presentar alguna actividad tóxica en algunos insectos.

Las manchas gemelas sólo se presentaron con 150 y 450 ppm en frecuencias idénticas a la del testigo, esto indica que sulfenona no indujo actividad recombinogénica.

Para los siguientes tres compuestos no se tienen referencias de estudios de toxicidad o mutagénesis, sin embargo, dada su relación estructural, se tomaron en cuenta las referencias generales para bifenilos clorados con puente de azufre.

A pesar de presentar diferencias en la disposición de los sustituyentes de azufre, el cloruro de bifenil disulfonilo y el clorofenil sulfóxido mostraron un comportamiento semejante aunque poco usual.

En ambas gráficas es evidente la fuerte disminución en la frecuencia de manchas chicas con 450 ppm, ésto no concuerda con una relación concentración-respuesta. Nuevamente se debe prestar atención en la interpretación y considerar los efectos de toxicidad. Es posible que las concentraciones empleadas resultaran altas para el bioensayo y/o que los efectos observados en estos compuestos (así como en sulfenona) sean artefactos debidos a la toxicidad. En la figura 19, se muestra una curva de toxicidad propuesta por Brusick (1987) en la que se muestra una región de toxicidad en la que se puede obtener una relación inversa con el

aumento de la concentración, lo cual implica problemas de interpretación. Esto puede estar reflejado en los resultados

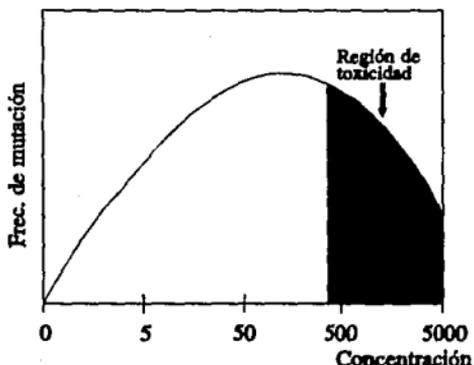


Fig. 19. Curva de dosis-respuesta que muestra un grupo de datos con una respuesta inversa a la concentración cuando la dosis es muy alta (Tomado de Brusick, 1988).

obtenidos con sulfenona. En el caso de cloruro de bifenil disulfonilo y clorofenil sulfóxido las variaciones en las frecuencias para las diferentes concentraciones pueden representar diversas actividades ante la toxicidad como: inducción (o inhibición) enzimática de los mecanismos de reparación o desintoxicación, muerte y/o selección celular.

Sólo el cloruro de bifenil disulfonilo produjo resultados positivos en 600 ppm para manchas grandes y totales. La oxidación del clorofenil sulfóxido da como resultado la formación del último compuesto empleado: clorofenil sulfona, el cual no manifestó actividades mutagénicas ni recombinogénicas. Las frecuencias estuvieron por debajo del testigo.

Las sulfonas han mostrado ser sustratos para enzimas microsómicas a las cuales podrían inducir o inhibir (Dulik et al, 1992). También es posible que este tipo de inhibición ocurra con

enzimas que participan en los mecanismos de reparación. Con *Drosophila* se observaron principalmente efectos tóxicos, reflejados por el bajo número de moscas recuperadas en la concentración de 600 ppm.

Bitionol y sulfenona son plaguicidas y su acción es predominantemente de toxicidad, por sus características estructurales se espera una acción similar con los otros tres compuestos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la toxicidad no implica o no determina la existencia de procesos mutagénicos (o recombinogénicos), los compuestos químicos pueden seguir diversas rutas en el organismo y no siempre afectar a la molécula de ADN. El daño al organismo puede expresarse por la interacción con otras biomoléculas que no actúan directamente en procesos de mutación o recombinación.

V. CONCLUSIONES

1. Dos compuestos mostraron una débil actividad: bitional produjo manchas grandes a 150 ppm y gemelas a 300 ppm; y el cloruro de bifenil disulfonilo que indujo manchas grandes y totales a 600 ppm.

2. Los otros compuestos probados (sulfenona, clorofenil sulfóxido y clorofenil sulfona) no mostraron actividad genotóxica.

3. La similitud estereoquímica de los compuestos fue concordante con la falta de acción genotóxica y con su toxicidad.

VI. REFERENCIAS

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

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

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

Bacq Y., J. M. Besnier, T. H. Duong, G. Pavie, E. H. Metman y P. Choutet (1991) Successful treatment of acute fascioliasis with bithionol. Hepatology, 14(16): 1066-1069

Budavari S. (Ed.) (1989) The Index Merck. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 11 ed. Merck & Co. Inc. Rahaway, N. J. U.S.A. 1606 pp.

Brusick D. (1987) Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press, Nueva York. 284 pp.

Brusick D. (1988) Evolution of testing strategies for genetic toxicity. Mutation Res., 205: 69-78

Cairns J. (1981) The origin of human cancers. Nature, 289: 353-357

Casarett L. J. y M. D. J. Doull (1975) Toxicology. The basic science of poisons. MacMillan Publishing Co. New York.

Cashman J. R., L. D. Olsen, R. S. Nishioka, E. S. Gray y H. A. Bern (1990) S-oxygenation of thiobencarb (bolero) in hepatic preparations from striped bass (*Morone saxatilis*) and mammalian systems. Chem. Res. Toxicol. 3(5): 433-440

Clark A. M. (1982) The use of larval stages of *Drosophila melanogaster* in screening for some naturally occurring mutagens. Mutation Res., 2: 89-97

Clayson D. (1980) Comparison between *in vitro* and *in vivo* tests for carcinogenicity. Mutation Res., 75: 205-213

Crick F. C. H. y P. A. Lawrence (1975) Compartments and polyclones in insect development. Science, 189: 340-347

Cremlyn R. (1990) Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Limusa, México. 356 pp.

De la Jara F. (1985) Manual de toxicología y tratamiento de las intoxicaciones con plaguicidas. Asociación Mexicana de la Industria de Pesticidas y Fertilizantes A. C. México, D. F. 191 pp.

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.

Demerec M. y B. P. Kaufmann (1962) Introducción a la genética y citología de *Drosophila melanogaster*. Comisión Nacional de Energía Nuclear, México 56 pp.

Dent D. (1991) Insect pest management. CAB International U.K. 604 pp.

De Serres F. J. (1979) Evaluation of test for mutagenicity as indicators of environmental mutagens and carcinogens. Am. N. Y.

Acad. Sci. 74-84

Dulik D. M., J. K. Huwe, J. E. Bakke, M. S. Connors y C. Fenselau (1992) Conjugation of polychlorinated agrochemical sulphoxides and sulphones by glutathione. *Xenobiotica*, 22(3): 325-334

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

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

Galtier P., M. Alvinerie, y. Plusquellec, A. E. Tufenkji y G. Houin (1991) Decrease in albendazole sulphonation during experimental fascioliasis in sheep. *Xenobiotica*, 21(7): 917-924

García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971a) Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.*, 24: 61-87

García-Bellido A. y J. R. Merriam (1971b) Clonal parameters of tergite development in *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biol.*, 26: 264-276

Gaytán J. C. (1993) Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina-C (MMC) por las vitaminas A y C en células somáticas del ala en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 71 pp.

Graf U., F. Würzler, A. Katz, H. Frei, H. Juon, C. Hall y P. Kale (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 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

Hällström 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.

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. 68 pp.

Innes J. R. M., B. M. Ulland, G. Marion, I. Valerio, I. Petrucelli, E. R. Fishbein, E. R. Hart, A. J. Pallotta, R. R. Bates, H. L. Falk, J. J. Gart, M. Klein, I. Mitchell, y J. Peters (1969) Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. *J. Natl. Cancer Inst.* 42:1101-1114.

Lenga R. E. (Ed.) (1988) *The Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data*. 2a ed. Sigma-Aldrich Corporation, U.S.A.

Lindsley D. L. y S. Grell (1968) *Genetic variations in Drosophila melanogaster*. Kansas University Press. 1740 pp.

Lindsley D. L. y G. G. Zimm (1979) *Computerized stock list 2*. D.I.S. Vol. 54. 165 pp.

Lippmann M. (Ed.) (1992) Environmental toxicants. Human exposures and their health effects. Van Nostrand Reinhold, New York 699 pp.

Moriya M., T. Ohta, K. Watanabe, T. Miyazawa, K. Kato y Y. Shirasu (1983) Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. Mutation Res., 116: 185-216

Mourot D. y A. Mourot (1987) Mutagenicity of bithionol sulfoxide and its metabolites in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Mutation Res., 188: 53-55.

Moutschen J. (1985) Introduction to Genetic Toxicology. John Wiley & Sons, Nueva York. 184 pp.

Murray M., A. M. Hudson y V. Yassa (1992) Hepatic microsomal metabolism of the anthelmintic benzimidazole fenbendazole: enhanced inhibition of cytochrome P-450 reactions by oxidized metabolites of the drug. Chem. Res. Toxicol. 5(1): 60-66

Negherbon W. O. (1959) Handbook of toxicology. Vol. 3 Insecticides. W. B. Saunders Company, U. S. A. 854 pp.

OPS (1979) Criterios de salud ambiental 2. Difenilos y trifenilos policlorados. Organización panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud. México, 86 pp.

OPS (1980) Criterios de salud ambiental 6, parte I. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. México, 287 pp

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. 96 pp.

Radman M. y A. Kinsella (1980) Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: Implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies. En R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis (Eds.): Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen Screening Tests. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 75-90

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

Reeves A. L. (1981) Toxicology: Principles and practice. Vol I. John Wiley & Sons, Nueva York. 224 pp.

Takeguchi T., S. Kobayashi y H. Kawasaky (1984) *Entamoeba histolytica*: inhibition in vitro by bithionol of respiratory activity and growth. Exp. Parasitol., 58, 1-7

Thong K.-W. y G. H. Coombs (1987) *Trichomonas* species: homocysteine desulphurase and serine sulphhydrase activities. Exp. Parasitol., 63, 143-151

Timbrell J. A. (1989) Introduction to toxicology. Taylor and Francis, New York. 155 pp.

Todd N. J. Clements, P. Zoeller y M. Phillips (1983) Absence of a mutagenic effect after feeding 4 anti-cancer drugs to *Drosophila melanogaster*. Mutation Res., 120: 121-125

Vega S. (1985) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Toxicología I. Cinética y efectos de los contaminantes tóxicos del ambiente. Centro panamericano de ecología humana y salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 133 pp.

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

Vogel E. y A. T. Natarajan (1979a) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in higher eukaryotic systems I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 62: 51-100

Vogel E. y A. T. Natarajan (1979b) The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkilating agents in higher eukaryotic systems II. Total and partial sex-chromosome loss in *Drosophila*. *Mutation Res.*, 62: 101-123

Vogel E., W. Blijleven, P. Klapwijk y J. Zijlstra (1980) Some current perspectives of the application of *Drosophila* in the evaluation of carcinogens. En: G. M. Williams, R. Kroes, H. Waaijers y K. Van de Poll (Eds.) *The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity*. Elsevier, Amsterdam, pp. 125-147

Walker J. y J. Barret (1992) Biochemical characterization of the enzyme responsible for "activated L-serine sulphydrase" activity in nematodes. *Exp. Parasitol.* 74(2): 205-215

Ware G. W. (1978) *The pesticide book*. Freeman and Company, San Francisco.

Williams G. M., H. Mori y C. A. McQueen (1989) Structure-activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300

ESTA TESIS NO SE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

chemicals. *Mutation Res.*, 221:263-286

Wright A. (1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutation Res.*, 75: 215-241

Würgler F., H. Juon y H. Frei (1983a) Promutagens detected by a rapid test with *Drosophila* somatic cells (Abstract). *Experientia*, 39: 686

Würgler F., U. Graf, H. Frei y H. Juon (1983b) Genotoxic activity of the anti-cancer drug methotrexate in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 122: 321-328

Zijlstra J. A. (1987) Pharmacological and mechanistic aspects of chemically induced mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Tesis Doctoral. Druk: Krips Repro Meppel. 192 pp.

Zijlstra J, A. y E. Vogel (1988) Metabolic inactivation of mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.*, 198: 73-83