



III Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental



UNIVERSIDAD DE NAVARRA

Pamplona 3 - 4 de Julio de 1991.

III Reunión científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental

Pamplona 3 - 4 de Julio de 1991

Miércoles, 3 de Julio

- 9:00 Entrega de documentación.
- 9:30 Sesión inaugural.
- 10:00 Ponencia:
Mutagens in food.
Dr. L. Henderson. Unilever Research Centre.
- 11:00 Café.
- 11:30 1ª Sesión de comunicaciones orales
- 13:00 Almuerzo.

- 15:00 2ª Sesión de comunicaciones orales
- 16:30 Café.
- 17:00 Reunión Anual de la S.E.M.A.

Jueves, 4 de Julio

- 9:00 Ponencia:
Mecanismo de acción genotóxica de agentes alquilantes.
Dra. C. Pueyo. Universidad de Córdoba.
- 10:00 3ª Sesión de comunicaciones orales
- 11:00 Café.
- 11:30 Mesa Redonda:
Control de la incidencia sobre la salud del efecto mutagénico de sustancias químicas.
- 13:00 Almuerzo.

- 15:00 4ª Sesión de comunicaciones orales

Programa

III Reunión Científica de la Sociedad Española de
Mutagénesis Ambiental

Pamplona 3 - 4 de Julio de 1991

**III Reunión Científica de la Sociedad Española
de Mutagénesis Ambiental**

Pamplona 3 - 4 de Julio de 1991

10:30 Presentación:
Mutaciones in food

Dr. L. Henderson, Univer. Research Centre

11:00 Café

11:30 1ª Sesión de comunicaciones orales

**Organizada por el Departamento de Genética de la
Universidad de Navarra.**

1. Mutaciones de mutagenicidad de extractos de alimentos en bacterias
sensitivas. Jarama J., Aguilera-Duran E. y Fariñas E.

2. Mutaciones inducidas por contaminación mutagénica de alimentos de Tailandia
por: Jarama J., López de Castro A., Mateos V., Murga A. y Otero A.

3. Estudio de la actividad genotóxica de extractos mutagénicos. Jarama J.,
López de Castro A., Mateos V., Murga A. y Otero A.

**Patrocinada por el Departamento de Salud
del Gobierno de Navarra.**

4. Estudio sobre el contenido genotóxico del agua mineral embotellada de origen
natural de Navarra. Jarama J., López de Castro A., Mateos V., Murga A. y Otero A.

12:00 Almuerzo

Programa

**III Reunión Científica de la Sociedad Española de
Mutagénesis Ambiental**

Pamplona 3 - 4 de Julio de 1991

Miércoles, 3 de Julio

- 9:00 Entrega de documentación.
- 9:30 Sesión inaugural.
- 10:00 Ponencia:
Mutagens in food.
Dr. L. Henderson. Unilever Research Centre.
- 11:00 Café.
- 11:30 1ª Sesión de comunicaciones orales:
1. Mecanismos implicados en la mutagénesis producida por Fluoroquinolonas. Clerch, B., Barbé, J. y Llagostera M.
 2. Mecanismos de mutagenicidad de análogos del Nifurtimox en *Salmonella typhimurium*. Jurado, J., Alejandro-Durán, E. y Pueyo, C.
 3. Relación estructura química-actividad mutagénica de derivados de Triazino indol. García, E., Lopez de Cerain, A., Martinez, V., Monge, A. y Gullón, A.
 4. Estudio de la actividad genotóxica de distintos herbicidas. Torres, C., Surrallés, J., Ribas, G., Carbonell, E., Nehring, R., Soriano, S., Xamena, N., Creus, A. y Marcos, R.
 5. Estudio sobre la actividad genotóxica del agua tritiada utilizando distintos sistemas de ensayo. Ribas, G., Torres, C., Carbonell, E., Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Creus, A. y Marcos, R.
- 13:00 Almuerzo.

15:00 2ª Sesión de comunicaciones orales:

6. Utilización de mutantes del locus *white* de *Drosophila melanogaster* en la detección de mutaciones somáticas. Resultados de los mutantes *white-buff* y *white-ivory*. Xamena,N., Egido,A., Soriano,S., Creus,A. y Marcos,R.
7. Mutagenicidad de la acroleína en *Drosophila melanogaster* en presencia de modificadores del metabolismo. Barros,A.R., Comendador,M.A. y Sierra,L.M.
8. Espectro de mutación inducido por dietilnitrosamina en células postmeióticas de *Drosophila melanogaster*. Sierra,L.M.
9. Detección de genotoxicidad mediante el test de mutación y recombinación somáticas en alas de *Drosophila melanogaster*. Osaba,L., Aguirre,A. y Alonso, A.
10. El ensayo SMART en *Drosophila*. Sensibilidad frente a diez agentes carcinógenos. Batiste-Alentorn,M., Xamena,N., Creus,A. y Marcos,R.

16:30 Café.

17:00 Reunión Anual de la S.E.M.A.

Jueves, 4 de Julio

9:00 Ponencia:

Mecanismo de acción genotóxica de agentes alquilantes.
Dra. C. Pueyo. Universidad de Córdoba.

10:00 3ª Sesión de comunicaciones orales:

11. Estudio de la persistencia de las lesiones provocadas por tres mutágenos químicos de distinta naturaleza (4NQO, EMS y MMC) en cromosomas de células CHO6. Daza,P., Escalza,P. y Cortés,F.
12. Estudio de la respuesta adaptativa mediante el test de micronúcleos en linfocitos humanos condicionados con peróxido de hidrógeno y expuestos posteriormente a rayos X. Domínguez,I., Cortés,F., Panneerselvam,N, Escalza,P y Mateos,J.C.
13. Actividad citogenética del Permetrin en cultivos *in vitro* de células de mamífero, linfocitos humanos y células CHO. Herrera,A., Caballo,C., Barrueco,C., de la Peña,E., Sanz,F., Santamaría,A y Rodríguez Murcia,C.
14. Genotoxicidad del agente antitumoral Melfalan. Estudios *in vivo* e *in vitro*. Carbonell,E., Umbert,G., Xamena,A., Creus,A. y Marcos,R.

- 11:00 Café.
- 11:30 Mesa Redonda:
Control de la incidencia sobre la salud del efecto mutagénico de sustancias químicas.
- 13:00 Almuerzo.
- 15:00 4ª Sesión de comunicaciones orales:
15. Biomonitorización de la exposición de Halotano en mujeres anestesiadas para cirugía ginecológica electiva. Bernal,M.L., Navarro,A., Lanuza,J. y Sinués,B.
 16. Determinación de micronúcleos en pacientes asmáticos en tratamiento con teofilina. Lanuza,J., Broto,A., Bernal,M.L., Sáenz, M.A., Suárez,M.A. y Sinués,B.
 17. Genotoxicidad de las aguas de la ría de Avilés. Ferreiro,J.A.,Sierra,L.M. y Comendador,M.A.
 18. Estudios de Tensioactivos presentes en extractos de aguas mediante el test de AMES y EM-FAB. Romero,J.,Ventura,F., Caixach,J y Rivera,J.
 19. Incidencia de alteraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas en agricultores expuestos a plaguicidas. Carbonell,E., Umbert,G., Vaibuenaa,A., Castejón,J., Xamena,N., Creus,A. y Marcos,R.

MUTAGENS IN FOOD.

Henderson, L.

Environmental Safety Laboratory, Unilever Research, Colworth House, Sharnbrook, Bedfordshire MK44 1LQ.

Epidemiology studies indicate dietary factors have a major role in the induction of cancers in humans. Sources of mutagens in food include polycyclic aromatic hydrocarbons, nitropyrenes and heterocyclic amines in cooked foods, pesticide residues; food additives; naturally occurring plant toxins including flavonols and alkaloids; contaminants e.g. aflatoxins and nitrate or salt cured meat and fish. Toxicological investigations have led to reduced exposure to dietary mutagens. Further possibilities of limiting the contribution of food components to causation of human cancers will be discussed. The presence of mutagenic food additives and pesticide residues is controlled by regulatory agencies in most developed countries. The contribution of naturally occurring mutagens to the initiation of mutations in humans is less amenable to intervention, but modification of dietary habits such as calorie restriction may have a role in reducing endogenous oxidative damage. Fibre and fat intake are important modifying factors in the activity of food mutagens. The use of different cooking processes may also reduce mutagen formation e.g. cooking meat by microwaving produces lower levels of heterocyclic amines than frying. In addition, the identification of dietary antimutagens opens up the possibility of "designing" foods with reduced mutagenic potential.

Exposición		Tipo de Mutación	
Dosis	Residuo	Alcaloides	Países de Origen
100	ATI	CPG	Principalmente mutaciones
200	Aca & ATI	CPG, CPT	Lesiones mutagénicas
100	TACI	IPA	Principalmente mutaciones
200	TACI	IPA, NPG	Lesiones azaradas
		CPY	T

MECANISMO DE ACCION GENOTOXICA DE AGENTES ALQUILANTES

Pueyo de la Cuesta, C.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba.

Las investigaciones sobre reparación del ADN y mutagénesis han puesto de relieve la existencia de complejos mecanismos de defensa que protegen la célula contra posibles daños genéticos¹. Dichas investigaciones están muy desarrolladas en procariontes por su simplicidad de manejo y disponibilidad de numerosos mutantes. El uso inteligente de la información científica obtenida con organismos procarióticos (principalmente *E. coli*) ha prestado una ayuda inestimable en el diseño experimental de las investigaciones con células de mamífero y en la interpretación de los datos resultantes, poniendo de relieve estrechas similitudes en los mecanismos moleculares implicados en el procesamiento de los daños infringidos al material genético^{2, 3}.

Los agentes alquilantes constituyen un grupo muy estudiado de genotoxinas por su importancia como contaminantes, sus aplicaciones médicas y la pertenencia a este grupo de un gran número de carcinógenos animales, algunos de elevada potencia^{4, 5}. Los compuestos alquilantes modifican covalentemente el genomio celular generando hasta 14 tipos distintos de lesiones primarias⁶. La cantidad y distribución de grupos alquilo introducidos en el ADN difiere según el tipo de agente alquilante. Así, alquilsulfatos y alquilalkanosulfonatos reaccionan mediante un mecanismo asociativo de tipo S_{n-2} con los nitrógenos altamente nucleofílicos. Por el contrario, los compuestos N-nitrosos reaccionan mediante un mecanismo de tipo S_{n-1} preferentemente con los oxígenos. Cuanto mayor es el tamaño del grupo alquilo mayor es el carácter S_{n-1} , de manera que los agentes etilantes, aunque menos activos que los metilantes, tienen mayor afinidad por los oxígenos. La tabla resume aspectos significativos de los genes implicados en la reparación de las lesiones identificadas como de mayor significado biológico en *E. coli*^{7, 8}.

Reparación		Tipo de lesión	
Gen	Producto	Alquilación	Papel Biológico
<i>ogt</i>	ATII	O ⁶ G	Principal lesión mutagénica
<i>ada</i>	Ada ó ATI	O ⁶ G, O ⁴ T	Lesiones mutagénicas
<i>tag</i>	TAGI	N ³ A	Principal lesión letal
<i>alkA</i>	TAGII	N ³ A, N ³ G O ² Py	Lesiones letales ?

Los aductos más relevantes inducidos por los agentes alquilantes en el ADN son O⁶meG (una base que aparee erróneamente con la timina generando transiciones GC:AT) y N³meA (una lesión letal que bloquea la replicación del ADN)⁹. La bacteria *E. coli* se defiende de la O⁶meG y de la N³meA mediante dos mecanismos, uno constitutivo y otro inducible, que la protegen supuestamente contra exposiciones crónicas y agudas a los agentes alquilantes. El mecanismo inducible se denomina respuesta adaptativa y está bajo control de la proteína Ada. Esta ATasa se metila al reparar la lesión inocua metilfosfotriéster, convirtiéndose en un activador transcripcional de su propio gen, así como de otros genes (por ejemplo *alkA*). Ada se autometila también al reparar la lesión mutagénica O⁶meG en un proceso suicida. Los genes *ogt* y *tag* son por el contrario de expresión constitutiva. Las células responden de forma compleja a los agentes alquilantes, por ello, a pesar de los numerosos estudios existentes, lo que conocemos representa una pequeña parte de lo que aún queda por esclarecer. A este respecto, merece la pena resaltar que sólo se conocen las funciones biológicas del 50% los genes bacterianos implicados en la respuesta a los agentes alquilantes. Del 50% restante sólo se sabe si están bajo el control de la proteína Ada (como los genes *alkB* o *aldB*) o no (como los genes *aidI* o *aidC*)^{7, 8, 9}.

Nuestro grupo de trabajo ha aislado un par de estirpes isogénicas de *E. coli* K-12 que difieren de forma espectacular en la respuesta a la acción genotóxica de agentes etilantes; la estirpe denominada UC1101 es extremadamente sensible en comparación con su parental UC376¹⁰. Recientemente hemos encontrado que las mismas (e incluso mayores) diferencias se manifiestan respecto de los compuestos metilantes, pero sólo en un fondo Ada deficiente. Experimentos de mutagénesis y de reparación *in vivo* de diferentes aductos han puesto de manifiesto que la estirpe hipermutable carece de la ATasa constitutiva, codificada por el gen *ogt*. Nuestros trabajos sugieren que el papel biológico de Ogt radica en su capacidad para reparar niveles muy bajos de alquilación, además de constituir uno de los principales mecanismos de defensa contra los agentes etilantes (al menos en ausencia del mecanismo fiel de reparación por escisión).

Referencias

- 1) Walker G.C. (1984) *Microbiol. Rev.* 48, 60-93.
- 2) Friedberg E.C., Hanawalt P.C. (1988) *Mechanisms and consequences of DNA damage processing*. Alan R. Liss INC, New York.
- 3) Moses R.E., Summers W.C. (1988) *DNA replication and mutagenesis*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- 4) Schmähel D., Kaldor J.M. (1986) *Carcinogenicity of alkylating cytostatic drugs*. IARC Scientific Publications n° 78, Lyon.

- 5) Swirsky L. et al. (1984) Environmental Health Perspectives 58, 9-319.
- 6) Singer B., Grunberger D. (1983) Molecular biology of mutagens and carcinogens. Plenum Press, New York & London.
- 7) Lindhal T., Sedgwick B. (1988) Ann. Rev. Biochem. 57, 133-157.
- 8) Volkert M.R. (1988) Environ. Mol. Mutage. 11, 241-255.
- 9) Horsfall M.J. et al. (1990) Environ. Mol. Mutagen. 15, 107-122.
- 10) Abril N. et al. (1991) Mutat. Res. 252, 199-200.

Financiación: CEE Programa STEP (contrato nºEV4V-0039-E(TT)) y Junta de Andalucía (grupo nº 3167).

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA MUTAGENESIS PRODUCIDA POR FLUOROQUINOLONAS.

Clerch, B., Barbé, J. y Llagostera, M.

Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona)

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran la mutagénesis producida por ciprofloxacina, ofloxacina y enoxacina en la cepa estándar de *Salmonella typhimurium* TA102 (Ysern *et al.* 1990). La cepa TA102 contiene la mutación *hisG428* en el plásmido multicopia pAQ1, es portadora del plásmido pKM101 (cuyos genes *mucAB* son responsables del mecanismo de reparación tendente al error) y tiene el mecanismo de reparación por escisión intacto (Uvr). En este trabajo se ha estudiado: 1) La reversión de la mutación *hisG428* integrada en el cromosoma en lugar de en el plásmido pAQ1; 2). el efecto del sistema de reparación tendente al error (presencia y ausencia del plásmido pKM101) y del sistema de reparación por escisión (mutantes *uvrB*) en la reversión de la mutación *hisG428* inducida por fluoroquinolonas.

Los resultados obtenidos con las fluoroquinolonas estudiadas muestran un incremento significativo de la reversión cuando la mutación *hisG428* está presente en el cromosoma (cepas TA103 y TA2638). Sin embargo, no se detecta un aumento de reversión en ausencia del plásmido pKM101 (cepas TA2661 y TA2657) y en mutantes *uvrB* (cepa TA2659), aún siendo portadoras del plásmido pKM101 (cepas TA104 y TA2678).

Todos estos datos nos permiten concluir que tanto el sistema de reparación tendente al error como el sistema de reparación por escisión son mecanismos implicados en la mutagénesis producida por fluoroquinolonas y que la mutación *hisG428* es una diana mutacional útil en la detección de la mutagénesis inducida por este tipo de compuestos.

MECANISMOS DE MUTAGENICIDAD DE ANALOGOS DEL NIFURTIMOX EN *Salmonella typhimurium*.

Jurado, J., Alejandre-Durán, E. y Pueyo, C.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba.

(Financiación Junta de Andalucía. Grupo 3167)

Los análogos del nifurtimox, sintetizados por Mester y colaboradores (Mester *et al.* Arch. Pharm., 320, 115 - 120, 1987) son nitrofuranos, compuestos heterocíclicos formados por un anillo imidazol con un grupo nitro en posición 5. Dicho grupo es un requerimiento básico de su mutagenicidad y carcinogenicidad. Estos compuestos han sido sintetizados como fármacos alternativos al nifurtimox, droga utilizada en el tratamiento de la tripanosomiasis americana. El hallazgo en algunos de ellos de una actividad antitripanosómica superior al propio nifurtimox, justifica el estudio de su genotoxicidad así como de los mecanismos mediante los cuales dichos compuestos llegan a ser mutagénicos.

Los nitrofuranos, en general, se activan a metabolitos mutagénicos mediante una nitroreducción. De esta forma, estirpes deficientes en alguna de las enzimas que intervienen en la reducción de nitrofuranos serán resistentes a la acción letal y mutagénica de estos compuestos. Los metabolitos mutagénicos forman aductos con el ADN y las mutaciones se originan como consecuencia de la inducción de los procesos de reparación propensos a error.

Con el objetivo de investigar los mecanismos de mutagenicidad de estos nuevos fármacos se construyeron dos series de estirpes: en primer lugar, la mutación *araD531* fué introducida mediante conjugación en las estirpes del ensayo Ames TA98, TA98NR (deficiente en nitroreductasa clásica) y TA98DNP (deficiente en acetiltransferasa) con el fin de estudiar el papel de estas actividades con el ensayo de mutaciones directas de resistencia a L-arabinosa dando lugar a las estirpes BA14, BA14NR y BA14DNP respectivamente. En segundo lugar, para corroborar los resultados obtenidos con las estirpes anteriores, se procedió a la transformación de la estirpe BA14 con plásmidos superproductores de actividad nitroreductasa o acetiltransferasa dando lugar a las estirpes BA146 y BA149 respectivamente. Según los resultados obtenidos en relación a la activación de estas drogas hemos distinguido 3 grupos: a) compuestos dependientes de actividad nitroreductasa (1k y nifurtimox), b) compuestos dependientes de actividad transacetilasa (1d y 1h) y c) compuestos independientes de ambas actividades (1g, 1b, 1e, 1i y ada).

RELACION ESTRUCTURA QUIMICA-ACTIVIDAD MUTAGENICA DE DERIVADOS DE TRIAZINO INDOL

García,E.², Lopez de Cerain,A.¹, Martinez,V.³, Monge,A.¹ y Gullón, A.²

¹ C.I.F.A., ² Departamento de Genética, ³ Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Universidad de Navarra.

Se ha estudiado la actividad mutagénica de 10 compuestos de la serie 3-(4'-bencilidenamino) 5H- 1,2,3-triazin [5,4-b] indol-4-ona que difieren en las propiedades fisicoquímicas del radical que ocupa la posición 4' del grupo bencilidenamino: -H, -OH, -COOH, -OCH₃, -COOCH₃, -NHCOCH₃, -Cl, -NO₂, -C₆H₅ y -OC₆H₅. Fueron ensayados en las estirpes TA97, TA98, TA100 y TA102 de *Salmonella typhimurium*, mediante el procedimiento de incubación sin activación metabólica y con fracción microsomal o S9 al 10%.

Los compuestos con los radicales fenilo y fenoxi fueron inactivos. El resto de los compuestos aumentaron significativamente el número de revertientes His⁺. En conjunto se encontraron tres patrones de respuesta, dependiendo de la potencia mutagénica y de la influencia de activación metabólica. Se confirma la importancia del anillo de 1,2,3 triazina como factor de riesgo mutagénico, si bien el tamaño del radical 4' y el carácter hidrofóbico del mismo parecen modular la actividad mutagénica.

Mediante análisis QSAR, aplicando el método de mínimos cuadrados (ALS), se han encontrado tres ecuaciones que relacionan actividad mutagénica con el carácter hidrofóbico del radical 4'.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DE DISTINTOS HERBICIDAS.¹

Torres,C., Surrallés,J., Ribas,G., Carbonell, E., Nehring,R., Soriano,S., Xamena,N., Creus,A. y Marcos,R.

Departament de Genètica i de Microbiologia. UAB. 08193-Bellaterra.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos en la experimentación llevada a cabo para determinar la potencialidad genotóxica de cuatro herbicidas: alacloro, atrazina, hidrazida maleica y paraquat utilizando cuatro ensayos diferentes: el de mutación somática en el sistema inestable *zeste white* (UZ), el de mutación y recombinación somática (WS) y el de pérdida cromosómica (CL) en *Drosophila melanogaster*, y el de intercambios entre cromátidas hermanas (SCE) en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica.

Los resultados obtenidos en el ensayo UZ son todos negativos. Los del ensayo WS indican que tanto la hidrazida maleica como el paraquat y la atrazina son capaces de inducir incrementos significativos en las alteraciones genéticas detectadas en este ensayo. La comparación de los resultados obtenidos en estos dos ensayos de mutación somática confirman la insensibilidad del ensayo UZ frente a plaguicidas, al tiempo que demuestra la elevada sensibilidad del ensayo WS en la detección de agentes mutagénicos.

Los resultados obtenidos en el ensayo CL con la hidrazida maleica indican que este herbicida presenta actividad clastogénica en *D. melanogaster*.

En el ensayo de detección de intercambios entre cromátidas hermanas, tanto la hidrazida maleica como el paraquat son capaces de incrementar las frecuencias con respecto al control.

En resumen, los resultados obtenidos con la hidrazida maleica indican que este herbicida es un agente con una fuerte potencialidad genotóxica.

¹ Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por la CICYT (SAL89-0868)

ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD GENOTOXICA DEL AGUA TRITIADA UTILIZANDO DISTINTOS SISTEMAS DE ENSAYO¹

Ribas,G., Torres,C., Carbonell,E., Batiste-Alentorn,M., Xamena,N., Creus,A. y Marcos,R.

Departament de Gènetica i de Microbiologia. UAB. 08193-Bellaterra.

Durante los últimos años se han ido acumulando evidencias experimentales que nos indican que la radiación beta del tritio puede inducir distintos tipos de lesiones biológicas, incluidas las mutagénicas. Así, distintos estudios muestran que, a dosis equivalentes, el tritio es incluso más mutagénico que la radiación gamma y que los rayos X.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos en la evaluación genotóxica del tritio, administrado en forma de agua tritiada y utilizando los siguientes sistemas de ensayo: a) ensayo de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila* (SLRL), b) ensayo de mutación y recombinación somática en *Drosophila* utilizando marcadores de las células del ala (WS), y c) ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas, utilizando linfocitos humanos (SCE).

Los resultados obtenidos en el ensayo SLRL muestran que el agua tritiada es un activo inductor de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo ya que, a la concentración máxima ensayada (250 $\mu\text{Ci/ml}$), induce frecuencias de mutación altamente significativas (1,49%).

En el ensayo de mutación y recombinación somática, el agua tritiada induce frecuencias significativas (0,61%) en el número total de clones mutantes, a la concentración de 50 $\mu\text{Ci/ml}$, sin que se aprecien incrementos en la frecuencia de clones dobles, que son los indicadores de la inducción de recombinación somática.

Con respecto a los resultados obtenidos en el ensayo de SCE, estos muestran un ligero incremento, si bien significativo, a la concentración de 50 $\mu\text{Ci/ml}$.

En resumen, podemos decir que nuestro trabajo pone en evidencia que el agua tritiada es claramente eficaz en la inducción de daño genético en los tres sistemas de ensayo utilizados.

¹ Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por la CICYT (PB87-0026)

UTILIZACION DE MUTANTES DEL LOCUS WHITE DE *Drosophila melanogaster* EN LA DETECCION DE MUTACIONES SOMATICAS. RESULTADOS DE LOS MUTANTES *WHITE-BUFF* Y *WHITE-IVORY*.

Xamena,N., Egido,A., Soriano,S., Creus,A. y Marcos,R.

Departament de Gènetica i de Microbiologia, UAB, 08193-Bellaterra.

Para la detección de mutaciones somáticas se precisan marcadores genéticos de fenotipo fácilmente reconocible. El locus *white* de *Drosophila melanogaster* es uno de los loci mejor estudiados en eucariotas. Muchas de las mutaciones de este locus se pueden reconocer por cambios de pigmentación de los ojos observables a simple vista. Por tanto, el locus *white* puede ser útil en el desarrollo de sistemas de detección de mutaciones somáticas y, de hecho, ya se ha utilizado, como en el caso del ensayo *white-white coral* y del *zeste-white*.

Estos últimos años hemos trabajado sobre la utilización de diferentes sistemas genéticos basados en el uso de marcadores del locus *white* en la detección de mutaciones somáticas, cuyos resultados se han presentado en las anteriores reuniones de la SEMA. En la presente comunicación se exponen los resultados obtenidos, por una parte, del análisis del estadio óptimo del desarrollo larvario en el momento del tratamiento, utilizando el sistema $(w^i)_4$ y, por otra parte, los del estudio del mutante *white-buff*, caracterizado por la presencia de una inserción de 8,7 kb identificada como un elemento B104.

Los resultados obtenidos con el sistema $(w^i)_4$ ponen de manifiesto que, en el caso del estudio de compuestos relativamente inestables, es en el segundo estadio (48 a 72 h después de la puesta) en el que se observan frecuencias de mutación más elevadas y, por consiguiente, parece ser el estadio óptimo para realizar el tratamiento.

Por otra parte, el estudio del sistema w^{bl} con los agentes alquilantes etilnitrosourea, metanosulfonato de etilo y metanosulfonato de metilo, pone de relieve su elevada sensibilidad frente a estos compuestos.

MUTAGENICIDAD DE LA ACROLEINA EN *Drosophila melanogaster* EN PRESENCIA DE MODIFICADORES DEL METABOLISMO.

Barros,A.R., Comendador,M.A. y Sierra,L.M.

Departamento de Biología Funcional. Area de Genética. Universidad de Oviedo.

En un trabajo reciente hemos mostrado que la acroleína es mutagénica en *D. melanogaster*, pero existen algunas sugerencias de que su mutagenicidad puede deberse tanto a la acción directa de este compuesto como a su transformación en algún metabolito genotóxico.

En este trabajo nos hemos planteado abordar esta cuestión comparando los resultados de test de letales recesivos ligados al sexo (SLRL) en condiciones normales con los obtenidos cuando las moscas son pretratadas con activadores o inhibidores del metabolismo.

Se realizó el test SLRL tratando las moscas con fenobarbital (activador del citocromo P450), dietil-maleato (agente consumidor de glutatión) o fenilimidazol más iproniazida (inhibidores de la actividad oxigenasa), para distintas concentraciones de acroleína.

Los resultados muestran que la acroleína en *D. melanogaster* es un mutágeno directo, pero además se han obtenido evidencias que confirman la hipótesis inicial de que una fracción de la actividad mutagénica de este compuesto se puede atribuir a alguno de sus metabolitos.

ESPECTRO DE MUTACION INDUCIDO POR DIETILNITROSAMINA EN CELULAS POSTMEIOTICAS DE *Drosophila melanogaster*.

Sierra, L.M.

Departamento de Biología Funcional. Area de Genética. Universidad de Oviedo.

Dietilnitrosamina (DEN) es un potente agente promutágeno y procarcinógeno que reacciona principalmente con los átomos de oxígeno de las bases nitrogenadas del ADN. En este trabajo se ha estudiado el espectro de mutaciones que este compuesto induce en estadios postmeióticos de la espermatogénesis de *D. melanogaster* utilizando como gen blanco el locus *vermilion*.

Las mutaciones aisladas, tanto de la F₁ (mutaciones directas) como de la F₂ (mosaicos gonadales), se clonaron aplicando la técnica de PCR y se secuenciaron por el método dideoxi.

Los resultados obtenidos muestran que DEN induce tanto mutaciones puntuales como deleciones e inserciones. Entre los cambios de bases las transversiones aparecen con una frecuencia mayor que las transiciones. No se observan diferencias entre mutaciones F₁ y F₂.

Estos datos difieren de los encontrados, en el mismo sistema, con etilnitrosourea (ENU) que, con unas propiedades similares a DEN, muestra una mayoría de transiciones, de acuerdo con lo que se espera de un agente alquilante de átomos de oxígeno.

DETECCION DE GENOTOXICIDAD MEDIANTE EL TEST DE MUTACION Y RECOMBINACION SOMATICAS EN ALAS DE *Drosophila melanogaster*.

Osaba,L., Aguirre,A. y Alonso,A*.

Departamento de Biología Animal y Genética. Facultad de Ciencias. UPV-EHU.

* Departamento de Genética. Universidad de Córdoba

Desde su descripción en 1984, el test SMART se ha revelado como un método eficaz en la detección de actividad genotóxica, tanto en sustancias puras como en mezclas complejas. Las ventajas que presenta este test se derivan fundamentalmente de la utilización de un organismo eucariota superior (*Drosophila melanogaster*), con actividad metabólica endógena, corto tiempo de generación y bien conocido genéticamente. Este test en células somáticas parece presentar además mayor sensibilidad y precisión que el ensayo más común realizado en estos momentos en *D. melanogaster*: SLRLT (Sex Linked Recessive Lethal Test ó Test de Letales Recesivos Ligados al Sexo).

Con el fin de confirmar los excelentes resultados obtenidos hasta ahora con el test SMART, se está intentando, por parte de varios laboratorios, analizar un amplio espectro de compuestos, tanto cancerígenos como no cancerígenos, y previamente clasificados como mutágenos o no en otros test de mutagénesis.

En esta comunicación presentamos los resultados previos obtenidos en el análisis de una serie de pesticidas, tanto insecticidas (aletrin, carbaril, malation) como herbicidas (sulfalato, trifluralin) y fungicidas (maneb, zineb).

EL ENSAYO SMART EN *Drosophila*. SENSIBILIDAD FRENTE A DIEZ AGENTES CARCINOGENICOS

Batiste-Alentorn, M.* , Xamena, N., Creus, A. y Marcos, R.

Departament de Gènetica i de Microbiologia. UAB. 08193-Bellaterra y *Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda.

Entre los diferentes ensayos de mutación utilizados en *Drosophila*, el ensayo SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) ofrece múltiples ventajas ya que requiere tan sólo una generación, los efectos se detectan fácilmente como sectores de tricomas múltiples y/o malformados, fácilmente visibles sobre un fondo de fenotipo normal, y se realizan preparaciones permanentes que pueden ser reevaluadas, lo que facilita la confirmación de los resultados obtenidos.

Para ampliar la información existente en vistas a la validación de este ensayo, se presentan los resultados obtenidos con diez agentes carcinogénicos (acetamida, acrilamida, benzo[α]pireno, ciclofosfamida, dietilestilbestrol, 4-nitroquinolina-N-óxido, *o*-toluidina, propileneimina, safrole y tiourea). Larvas de 48 h de edad, transheterocigóticas para los marcadores recesivos múltiple *wing hairs (mwh)* y *flare (flr)*, fueron expuestas a tres concentraciones de cada uno de los compuestos durante todo el desarrollo larvario (tratamientos crónicos).

La propileneimina, la 4-nitroquinolina-N óxido, la ciclofosfamida, la acetamida y la acrilamida, son detectados como agentes mutagénicos en este ensayo, mientras que el benzo [α]pireno, el dietilestilbestrol, el safrole, la tiourea y la *o*-toluidina no mostraron actividad genotóxica.

ESTUDIO DE LA PERSISTENCIA DE LAS LESIONES PROVOCADAS POR TRES MUTAGENOS QUIMICOS DE DISTINTA NATURALEZA (4NQO, EMS Y MMC) EN CROMOSOMAS DE CELULAS CHO6.

Daza, P., Escalza, P. y Cortés, F.

Dpto. Biología Celular. Facultad de Biología. Sevilla.

El desarrollo de técnicas basadas en la incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) en el material genético de células eucarióticas, ha permitido estudiar en las últimas décadas el proceso de formación de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICHs) con un gran nivel de resolución.

Los ICHs son la manifestación a nivel citológico de procesos de recombinación ocurridos entre duplex de ADN idénticos de cromosomas mitóticos durante la replicación. Dada la buena correlación existente entre la exposición de células a agentes que dañan el ADN y el incremento en la frecuencia de estos intercambios estas técnicas vienen siendo muy usadas como test citogenético para la detección de potenciales mutágenos y/o carcinógenos, así como para el estudio de las lesiones provocadas en el ADN por los mismos. Hemos tratado de estudiar y comparar la persistencia de las lesiones provocadas en el ADN de células de mamíferos *in vitro*, por tres agentes químicos de distinta naturaleza: 1) 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO), agente UV-mimético que tras reducirse se une a residuos de guanina; 2) Mitomicina-C (MMC), agente alquilante bifuncional que forma "crosslinks" mediante intercalación en el ADN; 3) Etilmetanosulfonato (EMS), agente alquilante monofuncional que forma monoadductos.

Las células CHO fueron expuestas durante una hora a distintas concentraciones de los agentes ya citados y se cultivaron durante tres rondas de replicación en presencia de BrdU según el protocolo de tinción diferencial en tres tonos. Esta técnica permite saber con exactitud en que ciclo celular ocurrió cada intercambio a partir del patrón de coloración que presente.

Se obtuvieron distintos resultados dependiendo de la naturaleza de los agentes utilizados. Las lesiones inducidas en el caso de la 4NQO, parecen ser reparadas eficazmente tras el período S siguiente a la exposición al agente químico, ya que se ve aumentada la frecuencia de ICHs de primera ronda mientras que las de segunda y tercera ronda no experimentaron prácticamente ningún cambio respecto a los valores control.

En el segundo de los casos, MMC, se vio que las lesiones persistían durante dos ciclos celulares, apareciendo incrementadas las frecuencias de las ICHs

de primera y segunda ronda pero permaneciendo invariable la frecuencia de la tercera ronda.

Por el contrario, tras la exposición de las células a EMS, mutágeno menos potente que los anteriores, la frecuencia de ICHs se mantuvo incrementada durante al menos los tres ciclos celulares posteriores al tratamiento. Esto sugiere que las lesiones causadas por el EMS son altamente persistentes y capaces de inducir intercambios eficientemente durante sucesivas generaciones celulares.

Desarrollo de la Tercera Ronda de Selección de Células Mutantes. Células Mutantes de la Tercera Ronda de Selección.

Los datos estadísticos procedentes de los experimentos sobre mutación y las 12 horas de selección por período de 120 minutos a una concentración de 10⁻⁶ M de EMS durante 24 horas, a las 24 horas del tratamiento se detectó mayor susceptibilidad a dosis de 150 y 300 mg de EMS M, e inmediatamente después se les sometieron a una concentración de 10⁻⁶ M de EMS. Las células fueron sometidas a 12 y 24 horas de selección. En cada caso se detectó el número de mutaciones en células seleccionadas por ser 5 y 10 células sometidas a selección con reducción en la frecuencia de mutaciones con respecto a aquellas que fueron sometidas al tratamiento con EMS.

En relación con los datos de selección de 12 y 24 horas de selección, caso al 10⁻⁶ M de EMS, se observó una reducción en la frecuencia de mutaciones. Cada vez que se sometieron las células a dosis de 150 y 300 mg de EMS a la selección, inmediatamente después de la selección se detectó una mayor frecuencia de mutaciones.

Dado que las frecuencias de mutación en las células seleccionadas inmediatamente a continuación de la selección, aumentaron al ser sometidas a una dosis de 10⁻⁶ M de EMS, la aplicación de EMS de 10⁻⁶ M en las células seleccionadas inmediatamente después de la selección, sugiere que la aplicación de EMS de 10⁻⁶ M en las células seleccionadas con respecto a las células seleccionadas con EMS, sugiere que el tratamiento con EMS de 10⁻⁶ M a las 12 horas.

Esto sugiere una gran relación con respecto a las células seleccionadas inmediatamente a continuación de la selección de 12 horas, sugiere que las células seleccionadas inmediatamente después de la selección, sugiere que las células seleccionadas con respecto a las células seleccionadas con EMS, sugiere que el tratamiento con EMS de 10⁻⁶ M a las 12 horas.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA MEDIANTE EL TEST DE MICRONUCLEOS EN LINFOCITOS HUMANOS CONDICIONADOS CON PEROXIDO DE HIDROGENO Y EXPUESTOS POSTERIORMENTE A RAYOS X.

Domínguez, I., Cortés, F., Panneerselvam, N., Escalza, P. y Mateos, J.C.¹

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Sevilla. ¹ Centro Regional de Oncología "Duque del Infantado". Sevilla.

Linfocitos humanos procedentes de dos donantes fueron tratados a las 24 horas de estimulación con peróxido de hidrógeno a tres concentraciones no tóxicas durante 30 minutos. A las 24 horas del pretratamiento las células fueron expuestas a dosis de 150 o 300 rad de rayos X, e inmediatamente después se les suministró citocalasina B a una concentración de 6 µg/ml. Las células fueron fijadas tras 12 ó 20 horas en citocalasina B. En cada caso se analizó el número de micronúcleos en células binucleadas para ver si las células pretratadas presentaban una reducción en la frecuencia de micronúcleos con respecto a aquellas que habían recibido sólo el tratamiento con rayos X.

Se utilizaron dos tiempos distintos de fijación (12 ó 20 horas en citocalasina) con el fin de ver si existía alguna diferencia en la posible respuesta adaptativa. Con el mismo objetivo se probaron las dosis distintas de rayos X, puesto que debido a la variabilidad interindividual pueden ser distintas las dosis más adecuadas a cada donante.

Dado que los micronúcleos son el resultado de fragmentos cromosómicos, cromatídicos o cromosomas aberrantes, constituyen un buen test indicador de roturas de doble cadena del ADN. La utilización del test de micronúcleos en binucleadas permite seleccionar la población de células de primera mitosis así como descartar el retraso en el ciclo celular como posible explicación de la reducción del daño en células pretratadas con respecto a las que sólo recibieron rayos X, por ser el tratamiento en citocalasina B de al menos 12 horas.

Esto constituye una gran ventaja con respecto al test de aberraciones cromosómicas en metafase, donde el empleo de colcemida durante 3 horas únicamente para detenerlas en metafase pudiera permitir (aunque existen evidencias de que no ocurre así) un mayor retraso en aquellas células que recibieron los dos tratamientos y ello resultar en una reducción del número de aberraciones cromosómicas en células pretratadas.

ACTIVIDAD CITOGENETICA DEL PERMETRIN EN CULTIVOS *IN VITRO* DE CELULAS DE MAMIFERO, LINFOCITOS HUMANOS Y CELULAS CHO.

Herrera,A., Caballo,C., Barrueco.C., de la Peña,E.*, Sanz,F.,
Santamaría,A. y Rodríguez Murcia,C.**

Centro Nacional de Sanidad Ambiental, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.*
Centro de Ciencias Medioambientales. ** Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, c/
Serrano 115, 28006 Madrid.

Se determinó el daño cromosómico originado por el permetrín en cultivos *in vitro* de linfocitos de sangre periférica humana y en células de ovario de *hamster* chino (CHO).

Para conocer el tipo de daño inducido por el permetrín se utilizaron, en los cultivos de linfocitos, tres ensayos citogenéticos que detectan alteraciones distintas: aberraciones cromosómicas estructurales, intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos.

El ensayo de aberraciones cromosómicas se realizó tanto en células de linfocitos como en células CHO a fin de comparar ambos cultivos y ver cual posee mayor sensibilidad. También en ambos cultivos, se valoró la influencia de la duración del tratamiento en la respuesta observada.

El permetrín fue ensayado en un rango de concentraciones de 5 - 500 µg/ml, tanto en ausencia como en presencia de un sistema de activación metabólica (S9mix).

Los resultados obtenidos indican que el permetrín fué positivo en el ensayo de micronúcleos en ausencia de activación metabólica. También, se observaron pequeños incrementos en la frecuencia de SCEs no relacionados con la dosis. En cuanto a las aberraciones cromosómicas se observó un pequeño incremento en ambos cultivos, en ausencia de S9mix y cuando el permetrín estaba presente en el medio hasta la recogida de los cultivos.

GENOTOXICIDAD DEL AGENTE ANTITUMORAL MELFALAN. ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.¹

Carbonell,E., Umbert,G., Xamena,N., Creus,A. y Marcos,R.

Departament de Gènetica i de Microbiologia. UAB. 08193-Bellaterra.

El melfalán es un agente antitumoral muy utilizado en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, fundamentalmente en los mielomas.

Es conocido que, en general, la mayoría de agentes antitumorales son a su vez agentes genotóxicos, habiéndose detectado esta actividad tanto a partir de ensayos de corta duración, como a partir de la información obtenida en pacientes tratados o en trabajadores que manipulaban dichos compuestos.

En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos en un estudio realizado sobre la actividad genotóxica del melfalán utilizando linfocitos humanos tratados tanto *in vitro* como *in vivo*.

El tratamiento de cultivos de linfocitos humanos con melfalán indujo incrementos significativos de aberraciones cromosómicas, lo que pone de manifiesto su potencialidad genotóxica.

Los estudios *in vivo* se han realizado evaluando las frecuencias de aberraciones cromosómicas en linfocitos de cinco pacientes sometidos a terapia con melfalán. Las muestras de sangre se tomaron: a) antes de iniciar el tratamiento, b) justo después del tratamiento y c) varias semanas después del tratamiento.

Los resultados indican que, a pesar de las diferencias encontradas entre pacientes, tanto en las frecuencias iniciales de aberraciones cromosómicas, como respecto a los efectos post -tratamiento y cinética de prevalencia de las lesiones inducidas, el valor promedio indica un claro incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas tras el tratamiento que disminuye, hasta aproximarse a los valores iniciales, cuando esta frecuencia se determina varias semanas después.

¹ Este trabajo ha sido subvencionado por la CEE EV4V2-00016

BIOMONITORIZACION DE LA EXPOSICION A HALOTANO EN MUJERES ANESTESIADAS PARA CIRUGIA GINECOLOGICA ELECTIVA.

Bernal, M.L., Navarro, A., Lanuza, J. y Sinués, B.

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Zaragoza

El halotano sigue siendo uno de los fármacos más usados en anestesia. Estudios epidemiológicos han mostrado una cierta asociación entre la exposición a halotano y distintas consecuencias de genotoxicidad, como incremento en anomalías congénitas e incidencia de cáncer. El objetivo del presente estudio es establecer la validez de la concentración de tioéteres urinarios (TU) como indicador biológico de la exposición y/o detoxicación de halotano, así como determinar la asociación existente entre su dosimetría interna (TU) y dos parámetros citogenéticos: micronúcleos (MN) y frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (SCE), en pacientes bajo anestesia con halotano. Fueron seleccionadas 25 mujeres sometidas a cirugía ginecológica electiva. En todas las pacientes se tomaron muestras de orina y sangre antes (muestra A) y 24 h. después (muestra B) de la anestesia para determinar la concentración de TU y para los análisis citogenéticos. Los resultados muestran que la concentración de TU era mayor en la muestra B ($Z = 3,98, p < 0,0001$). La media de los valores de SCE mostró un incremento en la muestra B sin significación estadística ($Z = 1,60, p > 0,05$). Dividiendo las pacientes de acuerdo con sus incrementos de TU entre después u antes de la anestesia, se obtuvieron dos subgrupos: subgrupo Ia, 12 pacientes con un alto incremento de TU en la muestra B; y subgrupo Ib, 11 pacientes con bajo incremento de TU en la muestra B. Se encontró un incremento estadísticamente significativo en los SCE después de la anestesia con respecto a la muestra A en el subgrupo Ib (subgrupo con baja eliminación de TU) ($t = 3,28, p < 0,01$). Estos resultados avalan la tesis sobre el importante papel que podrían jugar las variaciones interindividuales en la actividad de la glutatión-S-transferasa en la determinación de la susceptibilidad del halotano asociado al daño hepático.

DETERMINACION DE MICRONUCLEOS EN PACIENTES ASMATICOS EN TRATAMIENTO CON TEOFILINA

Lanuza,J., Broto,A., Bernal,M.L., Sáenz, M.A., Suárez,M.A. y Sinués,B.

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Zaragoza

La teofilina es uno de los fármacos broncodilatadores más usados para el tratamiento crónico del asma. Químicamente la teofilina es una xantina dimetilada, y las metilxantinas producen alteraciones citogenéticas como micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica. Además, se ha demostrado que la adición de teofilina a cultivos celulares induce alteraciones citogenéticas. En el presente trabajo se han investigado posibles efectos citogenéticos de la teofilina en pacientes asmáticos en tratamiento continuo con este fármaco. El recuento de micronúcleos en células con bloqueo citocinético, y el índice mitótico (MI) fueron evaluados en cultivos de linfocitos de sangre periférica de pacientes ($n = 30$) que eran tratados con teofilina sola, teofilina con fármacos β -2-adrenérgicos, o teofilina en combinación con corticoides inhalados.

Se obtuvieron dos muestras de cada individuo para realizar un estudio prospectivo; antes del tratamiento (muestra A) y después del comienzo del tratamiento (muestra B). Después del tratamiento, los resultados muestran un incremento en los MN ($z = 3.13; p < 0.01$) sin modificaciones en el MI ($t = 0.13; p < 0.09$). Ni los niveles plasmáticos de teofilina, ni la duración del tratamiento se correlacionaron con los parámetros citogenéticos ($r = 0.18$ y $r = 0.093$ respectivamente).

Nuestros resultados reflejan que la teofilina induce daño citogenético en linfocitos de pacientes asmáticos que reciben tratamiento continuado. El incremento en el recuento de micronúcleos parece ser independiente de los efectos sobre el proceso mitótico, más bien parece ser debido al efecto clastogénico. La metilación en la posición 3, combinada con otras posiciones de metilación, podría estar involucrada en los efectos sobre los cromosomas.

GENOTOXICIDAD DE LAS AGUAS DE LA RIA DE AVILES (ASTURIAS)

Ferreiro, J.A., Sierra, L.M. y Comendador, M.A.

Departamento de Biología Funcional. Area de Genética. Universidad de Oviedo.

Las aguas continentales de la zona central de la región asturiana han venido recibiendo durante los últimos 30 años un aporte considerable de contaminantes tanto de origen urbano como industrial.

El caso más llamativo, tanto por la variedad como por la cantidad de contaminantes es la ría de Avilés.

Se ha estudiado la genotoxicidad de vertidos de algunas industrias que desaguan en la ría, así como muestras de la propia ría utilizando dos tests con *D. melanogaster*: el test de pérdida de cromosomas sexuales y el test de mutación y recombinación somática en ojos w/w⁺.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de actividad genotóxica en las muestra de aguas tanto de la propia ría como las procedentes de algunos vertidos.

ESTUDIO DE TENSIOACTIVOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE AGUAS MEDIANTE EL TEST DE AMES Y EM-FAB.

Romero J.¹, Ventura F.², Caixach J.¹ y Rivera J.¹

¹Laboratorio Espectrometría de Masas. C.I.D. (C.S.I.C.) Barcelona ² Sociedad General de Aguas de Barcelona.

Uno de los principales grupos de contaminantes químicos en aguas naturales y de bebida son los tensioactivos industriales. Estos se dividen en tres grandes grupos: aniónicos (alquilbencenos sulfonados), catiónicos (aminas cuaternarias con cadenas alquílicas) y no iónicos (derivados del nonilfenol y alcoholes lineales, polietoxilados). Tradicionalmente el análisis de estos compuestos se lleva a cabo de forma inespecífica por métodos colorimétricos (Substancias Activas al Azul de Metileno); recientemente se han puesto a punto técnicas específicas de análisis que usan la Cromatografía Líquida (HPLC) y Espectrometría de Masas (EM). La EM en modo de ionización FAB (apta para el estudio de compuestos no volátiles, termolábiles y de alto peso molecular) ha resultado ser especialmente interesante en el estudio cualitativo de tensioactivos y sus metabolitos de biodegradación, tanto en formulaciones como en extractos orgánicos medioambientales.

Paralelamente al estudio analítico de estos compuestos existe una creciente preocupación por su potencial efecto toxicológico sobre el ser humano y el medio ambiente. En la bibliografía existen un buen número de trabajos que prueban su potencial tóxico, principalmente con tests de toxicidad en animales, así como establecen las directrices de biodegradabilidad y bioacumulación que los rigen.

En la presente comunicación se mostrarán los trabajos que estamos realizando en la identificación de tensioactivos en extractos orgánicos de agua mediante la EM-FAB y HPLC, resultados obtenidos con el test de Ames para estos extractos, evaluación de patrones de tensioactivos, y mostrar los trabajos en curso para establecer el papel de los tensioactivos aniónicos en la toxicidad detectada con el test de Ames en extractos orgánicos metanólicos.

En la actualidad se está profundizando en la caracterización estructural de los resultados, buscando de determinar el origen iónico de los tensioactivos, así como de su biodegradación, determinando además, sus relaciones con la toxicidad individual crónica.

* Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por el CICYT (SAL39-8500)

INCIDENCIA DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS E INTERCAMBIOS ENTRE CROMATIDAS HERMANAS EN AGRICULTORES EXPUESTOS A PLAGUICIDAS¹

Carbonell,E., Umbert,G., Valbuena,A.*, Castejón,J *., Xamena,N., Creus,A., y Marcos,R.

Departament de Gènetica i de Microbiologia. UAB, 08193-Bellaterra y *Centre de Seguretat i Higiene. Barcelona.

Aunque existe suficiente evidencia, en base a los resultados obtenidos en ensayos de corta duración, de que algunos de los plaguicidas normalmente utilizados en las labores agrícolas presentan actividad genotóxica, es necesario ampliar los trabajos sobre el riesgo genotóxico que la exposición frente a estos agentes puede suponer para aquellas personas expuestas ocupacional y crónicamente a los mismos, como es el caso de los trabajadores agrícolas.

En esta comunicación se presentan los resultados de un estudio realizado con 70 agricultores del Maresme (zona agrícola próxima a Barcelona) expuestos a diversos plaguicidas (benomilo, captan, fenvalerato, paraquat, etc.) en comparación con un control concurrente de 67 personas, de características similares en cuanto a edad, sexo, hábitos, etc., y no expuestas a plaguicidas.

En ambas poblaciones se han evaluado las frecuencias de aberraciones cromosómicas y de intercambios entre cromátidas hermanas, como indicadores de daño genotóxico. Ambos ensayos se han efectuado siguiendo los protocolos estándar contándose, por cada individuo analizado y en un estudio codificado, un total de 50 metafases en el ensayo de intercambios entre cromátidas hermanas y de 100 en el de aberraciones cromosómicas.

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, el análisis estadístico efectuado no muestra la existencia de diferencias significativas en cuanto a las frecuencias de intercambios entre cromátidas hermanas entre la población expuesta y la control.

En la actualidad se está profundizando en la elaboración estadística de los resultados, tratando de discriminar si existen factores (tabaquismo, edad, tiempo de exposición, compuestos utilizados, etc.) asociados a la respuesta individual obtenida.

¹ Este trabajo ha sido subvencionado parcialmente por la CICYT (SAL89-0868)

ENCUESTA PARA LA COORDINACION DE GRUPOS QUE DESARROLLAN PRUEBAS DE ENSAYO PARA LA EVALUACION DEL RIESGO DE LOS PRODUCTOS QUIMICOS EN ESPAÑA*

Elina Valcarce¹, Eduardo de la Peña², Benjamin S. Fernandez. Murias³, y Ana Fresno⁴

1. Seguridad Química, Subdirección General de Sanidad Ambiental, Ministerio de Sanidad y Consumo; 2. Centro de Ciencias Medioambientales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 3. Subdirector General de Control, Instituto de Salud Carlos III; 4. Subdirectora General de Sanidad Ambiental, Ministerio de Sanidad y Consumo.

Resumen

Se propone la realización de una Encuesta, dirigida a los distintos grupos de trabajo españoles, con la finalidad de conocer, las personas, grupos y centros, que están desarrollando pruebas de determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de los productos químicos y agentes físicos. La encuesta esta basada en el conocimiento y desarrollo de los métodos requeridos en el anexo V de la directiva 79/831/CEE, sobre sustancias químicas, y publicados en las directivas 84/449/CEE y 87/302/CEE; y en las líneas directrices de la OCDE. Así mismo, se pretende conocer aquellas líneas de trabajo que estan desarrollando nuevos protocolos de estudio, y que puedan ser incluidos en la evaluación del riesgo de las sustancias químicas.

Los datos se enviaran a la atención de la Dra. Elina Valcarce, Coordinadora Nacional de Métodos de Ensayo en la CEE. Subdirección General de Sanidad Ambiental.

Ministerio de Sanidad y Consumo

Paseo del Prado 18-20, 7^a. planta. 28014 Madrid

* Encuesta presentada en las II Jornadas Nacionales de Sanidad Ambiental. Ministerio de Sanidad y Consumo. Febrero,1991. Madrid

INTRODUCCION

La determinación de las características físicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de las sustancias químicas en general implica la realización de un, cada vez, mayor número de pruebas de ensayo de laboratorio, dados los requisitos legislativos, tanto a niveles nacionales como dentro de las organizaciones internacionales, con el fin de permitir el uso y comercialización de tales sustancias químicas (Real Decreto 2216 /1985) .

Todo ello ha impulsado enormemente los trabajos encaminados a normalizar u homologar tales pruebas de ensayo, que pueden utilizarse de una manera común evitando múltiples esfuerzos. En este sentido, tanto la Comunidad Económica Europea como la OCDE promocionan grupos de trabajo cuyas tareas persiguen:

- 1) La puesta al día de los métodos de ensayo ya existentes, perfeccionándolos, preferentemente por medio de la realización de ensayos de intercalibración, en los que intervienen expertos de los diferentes países miembros.
- 2) El desarrollo de nuevos métodos, teniendo en cuenta los avances científicos y la búsqueda de métodos alternativos que, en el caso concreto de los estudios toxicológicos, reflejan la tendencia de la sociedad actual a disminuir la utilización de animales de experimentación.

Nuestro objetivo al realizar la Encuesta, entre los distintos grupos de trabajo españoles, persigue el conocer las personas, grupos y centros, que están desarrollando pruebas de determinación físicoquímica, toxicológica y ecotoxicológica en las dos áreas señaladas, lo que hará posible una participación más activa, tanto dentro de las actividades que se están llevando a cabo en el seno de la CEE y OCDE, como en el desarrollo de nuevos métodos de ensayo que contribuyan a un uso menor de animales en las pruebas toxicológicas (Directiva 86/609/CEE y Real decreto 223/1988) .

Por todo ello, para la realización de esta encuesta se consideran los aspectos siguientes:

- 1) optimización y homologación de nuevos métodos, en el seno de la CEE y la OCDE (Frazier,1990);
- 2) Empleo de métodos alternativos que disminuyan el uso de animales de laboratorio en la experimentación y control toxicológico (de la Peña et al., 1990); y
- 3) la implantación de "Buenas Practicas de Laboratorio" o GLP (Repetto, 1988). Aspectos de máxima actualidad, y que se hacen imprescindibles si se quieren validar, en la CEE y OCDE, los resultados obtenidos en España. Con anterioridad se han realizado encuestas parciales, que hacen necesaria su ampliación (Murias y Valcarce 1987, de la Peña 1987, y Guardiola y Camí 1987 y 1988) .

La respuesta a la encuesta estará basada, en el conocimiento y desarrollo de los métodos, requeridos en el anexo V de la directiva 79/831/CEE, sobre sustancias químicas, y publicados en las directivas 84/449/CEE y 87/302/CEE y en las líneas directrices de la OCDE (1981) (Tablas 1 y 2). Se pretende así mismo conocer aquellas líneas de trabajo que están desarrollando nuevos protocolos de estudio, y que puedan ser incluidos en la evaluación del riesgo de las sustancias químicas.

El conocimiento de las personas y de los grupos de trabajo que están contribuyendo al desarrollo de los diferentes métodos de determinación tanto fisicoquímica, como toxicológica y ecotoxicológica, permitirá el que puedan ser requeridos y convocados a las reuniones de expertos, representando los intereses de España, en las citadas reuniones de la CEE y/o OCDE.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento a D^a. Antonia Martínez Lopez, Ayudante Diplomada de Investigación del CSIC, por su eficaz ayuda.

BIBLIOGRAFIA

1. Frazier, J.M. (1990) Scientific Criteria for Validation of in vitro Toxicity Test. OECD Environment Monographs N^o.36. pp. 62.
2. Guardiola E. y Camí J.(1987) Impacto de la Investigación Toxicológica en España durante los últimos años.1987. Ed. Plan Nacional de Investigación Científica y Técnica. Barcelona.pp.152.
3. Guardiola E. y Camí J. (1988) Censo de grupos que realizan Investigación en Toxicología. Actualización (1988). Secretaría General Plan Nacional de I+D. Barcelona. pp.157.
4. OECD (1981) OECD Guidelines for testing of Chemicals. OECD Publications Office, Paris.
5. Murias B. y Valcarce.E (1987) Encuesta sobre Grupos que desarrollan Ensayos Ecotoxicológicos. Publicación Interna del Servicio de Seguridad Química Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
6. de la Peña, E. (1989) Encuesta a los Miembros de la Asociación Española de Toxicología En: Monografía Técnica VII Jornadas Toxicológicas Españolas Tena G. y E. de la Peña (Compiladores). Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. pp.943-952.
7. de la Peña, E. Barrueco,C. Herrera,A y Garcia,P (1990) Ensayos de Genotoxicidad: Una Alternativa a la Experimentación animal. Rev. Esp. Animal ,1, 43 -45.
8. Repetto, G. (1988) Las Practicas Correctas de Laboratorio y Problemas de su Implantación Rev.Toxicol. 5, 117-125.

LEGISLACION

1. Real Decreto 2216/1985, de 28 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento sobre Declaración de Sustancias nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias peligrosas. BOE, 27 de noviembre de 1985.
2. Real Decreto 223/1388, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE, 67 18 de marzo de 1988.
3. Directiva 84/449/CEE. Directiva de la Comisión, de 25 de Abril de 1983 por la que se adopta, por sexta vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 19 de septiembre de 1984.
4. Directiva 86/609/CEE. Directiva del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 18 de diciembre de 1986.
5. Directiva 87/302/CEE. Directiva de la Comisión, 18 de noviembre de 1987, por la que se adopta al progreso técnico, por novena vez, la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 30 de Mayo de 1988.

Participantes:	pag.
Aguirre, A.	17
Alejandro-Durán, E.	10
Alonso, A.	17
Barbé, J.	9
Barros, A.R.	15
Barrueco, C.	22
Batiste-Alentorn, M.	13, 18
Bernal, M.L.	24, 25
Broto, A.	25
Caballo, C.	22
Caixach, J.	27
Carbonell, E.	12, 13, 23, 28
Castejón, J.	28
Clerch, B.	9
Comendador, M.A.	15, 26
Cortés, F.	19, 21
Creus, A.	12, 13, 14, 18, 23, 28
Daza, P.	19
de la Peña, E.	22, 29
Domínguez, I.	21
Egido, A.	14
Escalza, P.	19, 21
Fernández Murias, B.	29
Ferreiro, J.A.	26
Fresno, A.	29
García, E.	11
Gullón, A.	11
Henderson, L.	5
Herrera, A.	22
Jurado, J.	10
Lanuza, J.	24, 25
Llagostera, M.	9
Lopez de Cerain, A.	11
Marcos, R.	12, 13, 14, 18, 23, 28
Martinez, V.	11
Mateos, J.C.	21
Monge, A.	11
Navarro, A.	24
Nehring, R.	12
Osaba, L.	17
Panneerselvam, N.	21
Pueyo, C.	6, 10
Ribas, G.	12, 13

Rivera, J.	27
Rodríguez Murcia, C.	22
Romero, J.	27
Sáenz, M.A.	25
Santamaría, A.	22
Sanz, F.	22
Sierra, L.M.	15, 16, 26
Sinués, B.	24, 25
Soriano, S.	12, 14
Suárez, M.A.	25
Surrallés, J.	12
Torres, C.	12, 13
Umbert, G.	23, 28
Valbuena, A.	28
Valcarce, E.	29
Ventura F.	27
Xamena, N.	12, 13, 14, 18, 23, 28

