

¿NOS ENCONTRAMOS FRENTE A UNA NUEVA CLASE DE MUTAGENOS?

Oscar R. Cuyubamba,^a William A. Pryor,^b Barbara S. Shane,^c
y Giuseppe L. Squadrito,^{a, b}

SUMMARY

1,3-Dinitronaphthalene, previously identified in particulate organic matter, easily forms covalent adducts with DNA nucleotides at room temperature. The mutagenic potency of a related dinitropolycyclic aromatic hydrocarbon (dinitroPAH) with meta disubstitution, namely 1,3-dinitrofluoranthene, is rather independent of the Salmonella Typhimurium tester strain (TA98, TA98NR and TA98/1, 8DNP6) when assayed according to the Ames Test. This unusual behavior suggests that it does not require metabolic activation via the "classical nitroreductase" and/or the acetylase. The fact that 1,3-dinitronaphthalene readily forms covalent adducts with DNA nucleotides further suggests that dinitroPAH with meta nitro-groups may not require the usual metabolic activation pathways.

RESUMEN

El 1,3-dinitronaftaleno, previamente identificado en polvo ambiental, forma aductos covalentes con nucleótidos del DNA a temperatura ambiente

-
- a) Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú, Apartado 1761, Lima, Perú.
 - b) Biodynamics Institute, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803, U.S.A.
 - c) Institute for Environmental Studies, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803, U.S.A.

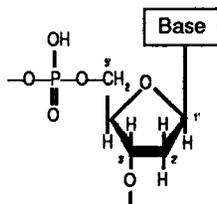
fácilmente. La potencia mutagénica de un hidrocarburo aromático policíclico dinitrado (HAPDN), el 1, 3-dinitrofluoranteno, es prácticamente independiente de la cepa de *Salmonella Typhimurium* (TA98, TA98NR y TA98/1, 8DNP6) empleada en el Test de Ames. Este comportamiento poco usual sugiere que este HAPDN no requeriría de la activación metabólica vía la “nitroreductasa clásica” y/o de la acetilasa. El hecho de que el 1, 3- dinitronaftaleno forma aductos covalentes con nucleótidos del DNA rápidamente está de acuerdo con que HAPDN meta dis sustituidos podrían prescindir de las rutas usuales de activación metabólica.

INTRODUCCION

El DNA contiene una secuencia de nucleótidos mediante la cual los aminoácidos son codificados. Secuencias de tres de estos nucleótidos (codones) especifican un aminoácido.

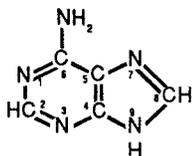
Cada nucleótido está constituido por una base nitrogenada unida a una molécula de ribosa y a un grupo fosfato (Fig 1).

2'-Desoxirribonucleósido-
5'-monofosatos

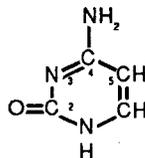


Estructura general

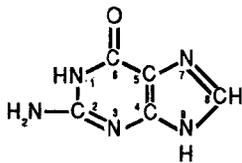
BASES MAS COMUNES DEL DNA



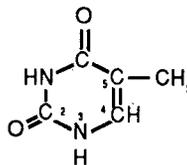
Adenina (A)



Citosina (C)



Guanina (G)



Timina (T)

Fig. 1. Constitución del DNA.

La variabilidad reside en la base nitrogenada ya que el azúcar y el grupo fosfato constituyen el esqueleto de la cadena polinucleótida del DNA (Fig 2).

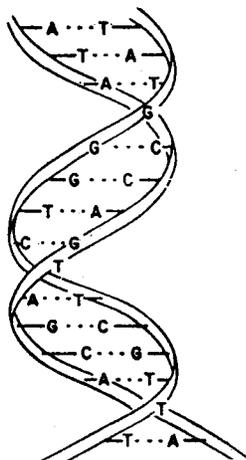


Fig. 2. La doble hélice del DNA.

Un conjunto de codones constituye un gen. Un gen que codifica una proteína determinada es susceptible de cambios químicos como resultado de acción física (como rayos x, rayos gamma) o de la acción de algunos agentes químicos, de modo que una de las tres bases del triplete codificador para un resto aminoácido resulta modificada. Como consecuencia se produce una alteración en la secuencia de nucleótidos del DNA de las células hijas, el cual podría codificar una cadena polipeptídica alterada que quedaría defectuosa en

su función biológica. La alteración en la secuencia de nucleótidos en el DNA constituye una mutación. El proceso de inducción de mutaciones es una mutagénesis y el agente que lo causa es denominado mutágeno.

A menudo hay una estrecha relación entre mutagénesis y cáncer en el sentido de que una o más proteínas defectuosas pueden ocasionar alteraciones estructurales en las células. Una célula defectuosa causa cáncer si su anomalía le permite su proliferación descontrolada.

LOS COMPUESTOS HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS NITRADOS COMO MUTÁGENOS

Existen muchos compuestos que son mutágenos (Tabla 1); un grupo de éstos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados (HAPN), son casi en su totalidad cancerígenos y mutagénicos [1-4]. Estos compuestos pueden reaccionar con las bases nitrogenadas del DNA y alterar su secuencia.

Los HAPN provienen mayormente de la combustión en motores diesel y motores a gasolina y de reacciones atmosféricas entre HAP y óxidos de nitrógeno [5].

TABLA 1. Relación entre carcinogenicidad y mutagenicidad (muestras de resultado positivo / muestras totales)

Categoría de compuestos	Carcinógenos detectados como mutágenos bacterianos	No carcinógenos sin actividad mutagénica en bacterias
Aminas aromáticas	23/25	10/12
Haluros de alquilo	17/20	1/3
Aromáticos policíclicos	26/27	7/9
Esteres, epóxidos, carbamatos	13/18	5/9
Nitroaromáticos y heterocíclicos	28/28	1/4
Nitrosaminas	20/21	2/2
Toxinas y antibióticos fúngicos	8/9	5/5
Mezcla condensada de humo de cigarrillos	1/1	—
Colorantes azo y compuestos diazo	11/11	2/3
Sustancias bioquímicas de uso común	—	46/46
Compuestos orgánicos diversos	1/6	13/13
Heterocíclicos diversos	1/4	7/7
Compuestos nitrogenados diversos	7/9	2/4
	156/179	101/117

Obtenida de McCarm. J. E. Choi. E. Yamasaki, and B. N. Ames. 1975. Proc. Nt. Acad. Sci. U.S. 72: 5135-5139.

EL TEST DE AMES [4, 6]

Los estudios de mutagenicidad y cáncer en animales demandan muchos problemas en la práctica debido al prolongado tiempo, el costo elevado, y la baja sensibilidad.

Existen cepas de bacteria *Salmonella Typhimurium* incapaces de biosintetizar histidina (cepas His⁻). Una pequeña proporción de estas bacterias revierte a la forma silvestre pudiendo sintetizar su propia histidina (His⁺), sobreviviendo así y multiplicándose para formar colonias discretas a una frecuencia determinada.

El test de Ames consiste, esencialmente, en la combinación del compuesto a estudiar y la cepa de la bacteria mezclados con agar en un plato petri. Luego de una incubación de 2 días a 37°C se cuentan las colonias que revierten. Normalmente el estudio de un mutágeno consiste en realizar tres pruebas con dosis diferentes y obtener un rango de concentraciones en el que se produce una curva lineal de dosis-respuesta, siendo la potencia mutagénica del compuesto directamente proporcional al número de colonias revertientes.

Existen diversas cepas, y cada una de ellas responde a distintos tipos de mutaciones, como eliminaciones, adiciones o sustituciones de pares de bases. Las cepas TA98 detectan mutágenos que causan corrimiento de armazón en el DNA, que es característico para los HAPN y HAPDN. Derivados deficientes de nitrorreductasas de las cepas TA98 (identificados como TA98NR) o de acetilasas (identificadas como TA98/1, 8DNP6) son empleadas en estudios de activación metabólica de los HAPN y HAPDN.

Tabla 2.- Potencias mutagénicas del 1, 3-dinitrofluoranteno en *Salmonella Typhimurium* TA98, TA98NR y TA98/1,8DNP6.

Cepa	Revertientes/mol
TA98	2601
TA98NR	2798
TA98/1, 8DNP6	2615

¿FRENTE A UNA NUEVA CLASE DE MUTAGENOS?

Por lo general los HAPN requieren de acción enzimáticas para ser activados y poder reaccionar con el DNA [7]. Los grupos nitro de los HAPN pueden ser reducidos por nitrorreductasas hasta hidroxilamina, la cual puede ser acetilada para dar un potente electrófilo potencial, el ión nitrenio, (o un portador de éste) altamente reactivo frente a las bases nitrogenadas del DNA. En algunos casos los HAPN pueden ser activados por hidroxilación de su esqueleto aromático vía monooxigenasas dependientes del citocromo P450, pero es bastante raro.

El 1, 3-dinitronaftaleno se encuentra presente en el polvo troposférico urbano [8]. El único HAPDN semejante cuya potencia mutagénica haya sido evaluada mediante el test de Ames es el 1, 3-dinitrofluoranteno (Fig 3), el cual ha demostrado tener un comportamiento frente al test de Ames muy diferente al del resto de los HAPN y HAPDN.

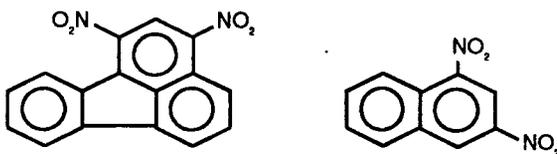


Fig.3. 1,3-Dinitrofluoranteno y 1,3-dinitronaftaleno.

Sorprendentemente, al no depender marcadamente de las nitrorreductasas o de la acetilasa para mostrar su potencia mutagénica (Tabla 2), el 1,3-dinitronaftaleno parece no necesitar de activación enzimática. Para investigar este raro comportamiento hemos estudiado la interacción de las bases del DNA con el 1,3-dinitronaftaleno en solución acuosa.

En la figura 4 se muestra los espectros UV-VIS de soluciones equimolares de 1,3-dinitronaftaleno y adenosina, así como el espectro de la mezcla de reacción y el espectro teórico (que representa la simple mezcla de las soluciones reactantes). El espectro de la reacción (D) es diferente al espectro teórico (C).

Es notorio que ocurre una rápida reacción, aparentemente de adición nucleofílica al anillo aromático del 1,3-dinitronaftaleno por parte de la base del DNA. ¿Será éste el mecanismo de mutagenicidad del 1, 3-dinitronaftaleno in vivo?.

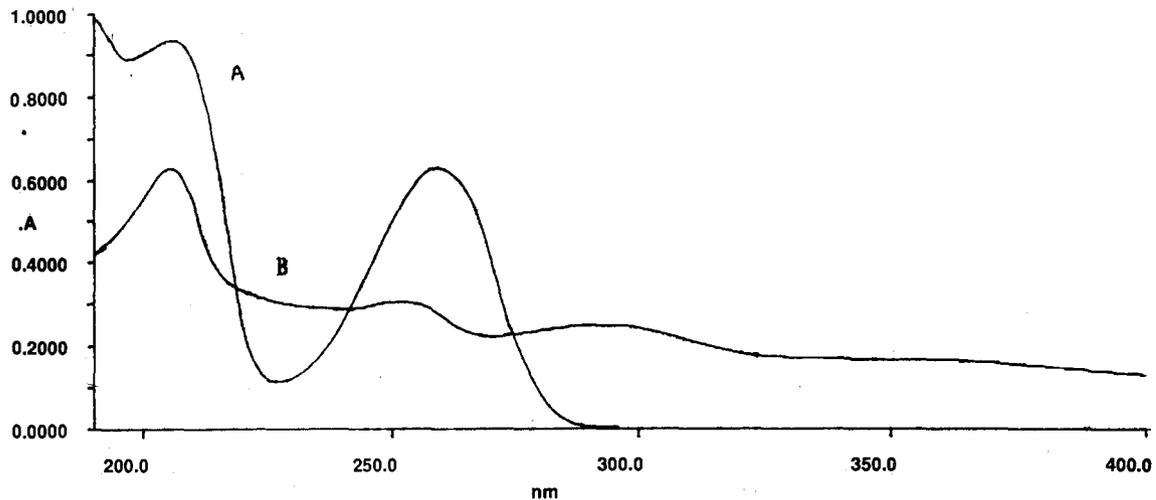


Fig. 4. a) **Curva A:** Espectro UV-VIS de solución de 1,3-dinitronaftaleno 5×10^{-4} M en mezcla de etanol-agua 1:2. **Curva B:** Espectro UV-VIS de la solución de adenosina 5×10^{-4} M en mezcla de etanol-agua 1:2.

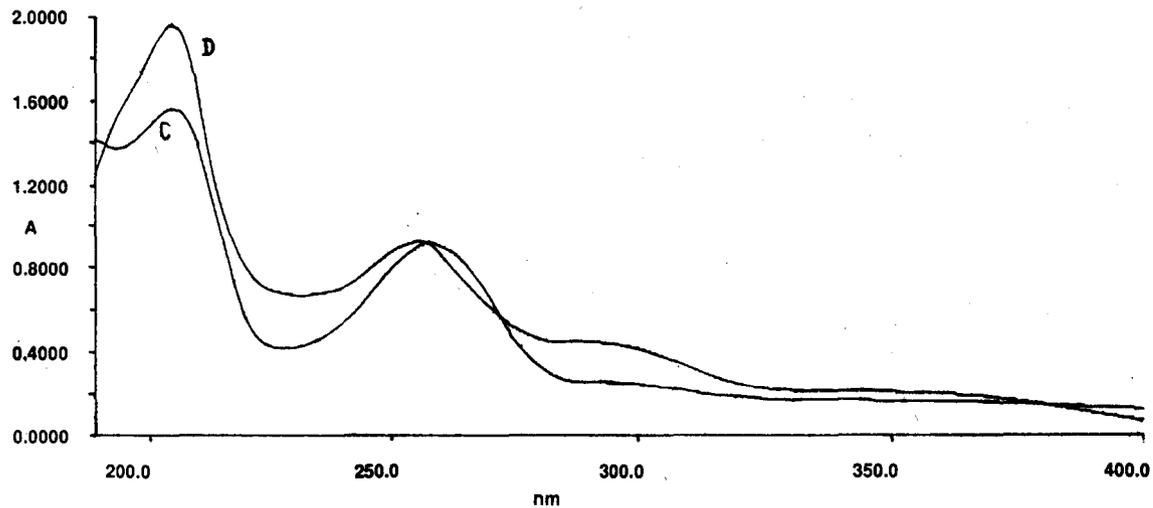


Fig. 4. b) **Curva C:** Espectro UV-VIS de la reacción entre volúmenes iguales de las soluciones de la Fig. 4 a) después de 24 horas a 37°C. **Curva D:** Espectro UV-VIS teórico, suma de las curvas A y B dividida entre 2.

BIBLIOGRAFIA

1. Vance, W. A., Levin, D. E. (1984) *Environmental Mutagenesis*, **6**, 787-811.
2. Ames, B. N. (1979) *Science*, **204**, 240-270.
3. Tokiwa, H., Nakagawa, R., Morita, K., Ohnishi, Y. (1981) *Mutation Research*, **85**, 195-205.
4. Nakamatzu, J.: Mecanismos Relacionados con la Mutagenicidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Nitrados presentes en el Medio Ambiente y la evaluación de sus Potencias Mutagénicas. Tesis de Licenciatura. PUC, (1989).
5. Squadrito, G. L., Pryor, W. A. (1989) *Revista de Química*, PUCP **III**, 21.
6. Maron, D., Ames, B. (1983) *Mutation Reserarch*, **113**, 173-215.
7. Chow, M.; Heflich, R., Fu, P. (1986) *Carcinogenesis*, **6**, 1235-1238.
8. Matsushita, H., Iida, Y. J. (1986) *High Resolut. Chromatogr. Commun.* **9**, 708-711.