

## POTENCIALIDAD MUTAGENICA DEL HIDROSULFITO DE SODIO EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Néstor López A.(1)

### RESUMEN

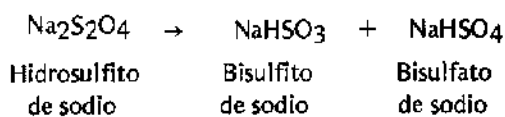
La panela es un producto alimenticio al que en su preparación se adicionan comúnmente blanqueadores. Entre ellos está el hidrosulfito de sodio, compuesto químico que reacciona con el DNA y de ahí su capacidad mutagénica.

Al tratar huevos de la mosca *D. melanogaster* con hidrosulfito de sodio se encontró una LD<sub>50</sub> de 5000 ppm, mientras que las pruebas de inducción de mutaciones letales recesivas, mostró una frecuencia de 3.18ojo para dosis de 4000 ppm. La capacidad mutagénica de este compuesto parece ser ocasionada por la inhibición de la reparación por excisión del DNA.

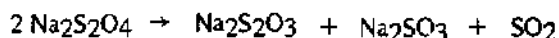
### INTRODUCCION

Existe entre nuestra población una alta exposición al hidrosulfito de sodio, ocasionada principalmente por la utilización de este compuesto en la elaboración de la panela, producto alimenticio del cual Colombia es el principal consumidor en el mundo, siguiéndole Méjico, Costa Rica, Nicaragua y el Japón (Chalarca, 1975). Con base en una supuesta toxicidad, el hidrosulfito de sodio fue retirado del mercado colombiano por la norma 1311 numeral 13.5 del ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas), la cual fue luego removida por falta de pruebas de laboratorio alegadas por los productores.

El hidrosulfito de sodio es un compuesto químico que al simple contacto con el agua se disocia en bisulfito de sodio y bisulfato de sodio:



Si el hidrosulfito de sodio se disuelve en una solución ácida se descompone así:



(Durrant y Durrant, 1970)

El bisulfito de sodio, uno de los compuestos de la disociación, tampoco requiere activación metabólica para su acción mutagénica y tiene la capacidad para reaccionar con muchos componentes celulares, impidiendo así que se pueda identificar correctamente su forma de acción (Pterling y Shih, 1975).

Las principales reacciones bioquímicas en las que participa este compuesto, son del tipo reversible e irreversible, mecanismos iónicos o de radical libre.

El bisulfito de sodio puede reaccionar reversiblemente con moléculas importantes en el metabolismo como aldehídos y cetonas en los carbohidratos, NAD, folatos, flavinas, vitamina K, y puede ocasionar la descomposición de la tímína (Pterling y Shih, 1975), e irreversiblemente en reacciones asociadas con radicales libres como la metionina (Inove y Hayatsu, 1971). Pero de las reacciones en las que puede participar el hidrosulfito de sodio las más importantes en nuestro caso son aquellas relacionadas con los ácidos nucleicos que, entre otras, incluyen la transaminación de las bases nitrogenadas, la desaminación de la citocina y la adición de bisulfito al uracilo y la tímína, todas ellas con capacidad mutagénica (Hayatsu, 1976).

Aunque la literatura científica reporta muy pocos estudios relacionados con la mutagenicidad del hidrosulfito de sodio, ocasionada probablemente por su poca utilización en otros países, queremos con este trabajo investigar en *Drosophila melanogaster* cuál es la LD<sub>50</sub> y si el compuesto logra producir mutaciones letales en el mismo animal.

Este trabajo se realizó en *Drosophila melanogaster* por ser el organismo más adecuado para detectar varios efectos de un mutágeno, permitiendo así una evaluación cuantitativa de los riesgos genéticos, la cual no se logra con otro organismo (Zimmerling, 1975). También por su bajo costo y por el tiempo reducido que se requiere para su mantenimiento en comparación con otros sistemas y por su capacidad para efectuar las mismas reacciones metabólicas que el hígado de

(1) Profesor, Depto. de Biología, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

de los mamíferos, sitio donde sufren la activación metabólica muchos mutágenos (Sobel y Vogel, 1976).

Aunque existen grandes diferencias fisiológicas entre la *Drosophila* y el humano, es lógico suponer que el efecto genético de un mutágeno debe ser similar en ambos organismos.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Determinación de la Dosis Letal LD<sub>50</sub> en estado embrionario.

#### A. Prueba 1

Se transfirieron 250 hembras vírgenes de 4 días de edad de la cepa Oregón a cajas de población donde había 250 machos de la misma cepa. Al día siguiente se les retiró el alimento normal y se les colocó alimento fresco en cajas de petri que contenían una de dos concentraciones del hidrosulfito de sodio (2000 ó 4000 ppm). En este último medio se les permitió la ovoposición por sólo cuatro horas, tiempo que requiere un compuesto químico, aplicado por vía oral, para llegar a los huevos en la hembra. Al cabo de este tiempo se retiraron las cajas de petri y se contaron los huevos con ayuda de un estereomicroscopio y se pasaron después a una botella con alimento que contenía el hidrosulfito de sodio a una concentración igual al tratamiento anterior. El número de adultos que emergió de cada frasco se contó diariamente a partir del día 9 hasta el día 20. El porcentaje de la letalidad corregida se encuentra por la siguiente relación (Abbot, 1925):

$$\frac{\text{o/o letalidad muestra} - \text{o/o letalidad control}}{100 - \text{letalidad control}} \times 100$$

Se hizo un control con el mismo procedimiento pero sin utilizar el hidrosulfito de sodio.

#### B. Prueba 2

Teniendo en cuenta que dosis superiores a 4000 ppm mata las hembras en esta segunda prueba, no se trataron las moscas madres sino que se inició el tratamiento en los huevos. Para esto, se tomaron 250 hembras vírgenes de 4 días de edad de la cepa Oregón y se cruzaron con 250 machos de la misma cepa en una caja de población con alimento normal. Al completarse este tiempo se transfirieron los huevos a cajas de petri con alimento al cual se le había agregado el hidrosulfito de sodio a dosis de 3000, 4000 ó 6000 ppm. Luego de un día se transfirió todo el alimento a botellas donde el organismo completó su ciclo de vida. Al día 20 de haber comenzado el cruce se contaron los adultos en cada botella. Con la misma metodología se efectuó un control.

### II. Producción de mutaciones letales recesivas en el cromosoma X.

Se utilizó el método ideado por Muller y completado por Abrahamson y Lewis (1971).

Se tomaron machos de la cepa Oregón de dos días de edad y se trataron oralmente por 24 horas con soluciones de 2000 y 4000 ppm de hidrosulfito de sodio mezclado con el alimento normal. Luego de transcurrido este tiempo se cruzaron masivamente con hembras vírgenes FM<sub>6</sub> de 3 a 5 días de edad por 24 horas, con el fin de muestrear sólo los espermatozoides maduros que poseía el macho en el momento del tratamiento. Cada hembra de la F<sub>1</sub> (que tendrá fenotipo normal) se cruzó individualmente con 2 machos FM<sub>6</sub>. En la F<sub>2</sub> se pudo reconocer la producción de mutaciones letales recesivas por la ausencia de machos con fenotipo normal. El procedimiento se ilustra en la figura 1.

La cepa FM<sub>6</sub> es utilizada por la propiedad que tiene de impedir el entrecruzamiento entre los cromosomas X de una hembra (por las múltiples inversiones que posee), garantizando así que el cromosoma X de los machos P<sub>1</sub> llegue intacto hasta los descendientes F<sub>2</sub> (fig. 1).

El nivel de significancia estadística se determinó con base en la prueba de Ji-cuadrado (Remington y Schork, 1970).

$$P_1: \frac{(1)}{\text{Oregón}} \sigma^{\circ} \times \text{♀} \frac{wFM_6y}{FM_6}$$

$$F_1: \frac{wFM_6y}{(1)} 1 \text{♀} \times 2 \sigma^{\circ} \frac{wFM_6y}{(1)}$$

$$F_2: \frac{wFM_6y}{wFM_6y} \text{♀}, \frac{wFM_6y}{(1)} \sigma^{\circ}, \frac{wFM_6y}{(1)} \text{♀}, \frac{(1)}{\text{muestra}} \sigma^{\circ}$$

Fig. 1 Procedimiento para la obtención de mutaciones letales recesivas: w: ojo blanco, y: cuerpo amarillo.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Aunque el diseño de este experimento no se enfocó a la etapa del ciclo de vida que podía ser afectado luego del tratamiento con el hidrosulfito de sodio, se observó que la diferencia entre el número de huevos puestos y los adultos que emergen se debía principalmente a la no eclosión de los huevos, más que a una mortalidad larval o pupal.

Con respecto al tiempo de duración del ciclo de vida, no se encontró una variación apreciable con respecto al control, bajo el efecto de ninguna de las dosis empleadas.

La sensibilidad que muestra el huevo de *Drosophila* al hidrosulfito de sodio, puede ser ocasionada por la capacidad que tenga este compuesto de inhibir un mecanismo iniciador del desarrollo o por la inactivación de algún compuesto celular necesario en las primeras etapas del desarrollo del huevo (Kaplan et al., 1974).

Los resultados de la toxicidad del hidrosulfito de sodio se muestran en la tabla 1. Se puede ver que a medida que se utiliza una dosis mayor aumenta la toxicidad de manera proporcional. La aparición de una letalidad de 23.98o/o para el control en la primera prueba se explica por el hecho de que no todos los huevos puestos por la mosca están fecundados y por lo tanto no eclosionan (Fowler, 1973).

Con el fin de analizar claramente la letalidad producida por el compuesto se propuso trabajar con la "letalidad corregida", correspondiendo así, para el control, una letalidad corregida de 0o/o. En esta primera prueba, la diferencia para la letalidad corregida entre 1000 y 2000 ppm (7.48o/o) guarda una relación que se mantiene entre 2000 y 4000 ppm (15.12o/o) (fig. 2).

Los resultados de la segunda prueba se muestran en la tabla 2. Aquí el porcentaje de la letalidad en el control fue de 29.24 o/o, valor que es mayor al obtenido en la prueba anterior.

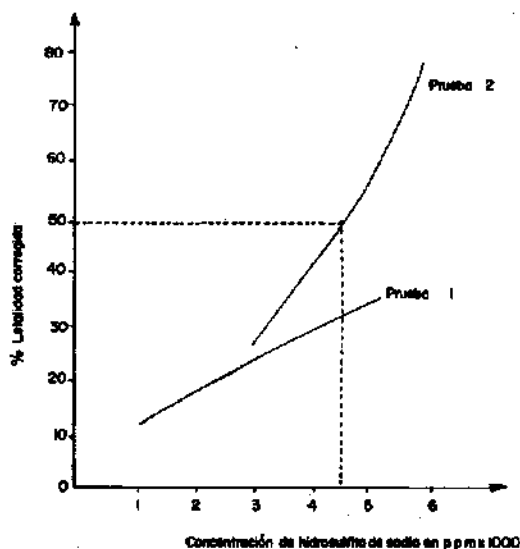


Fig. 2. Toxicidad de hidrosulfito de sodio y determinación de la LD50 en *Drosophila melanogaster*.

Nuevamente, para eliminar la letalidad ocasionada por agentes diferentes al hidrosulfito, se aplica la letalidad corregida. Para la segunda prueba se aplicaron las dosis de 3000, 4000 y 6000 ppm de hidrosulfito de sodio. En esta prueba el aumento de la dosis lleva a un incremento en la letalidad que no es proporcional ni lineal como en el caso anterior (fig. 2). Podemos, por esta segunda prueba, determinar que la LD50 se encuentra cerca a 5000 ppm.

Para la determinación de las mutaciones letales recesivas se analizaron 2.167 cromosomas con dosis de 2000 y 4000 ppm de hidrosulfito de sodio y un control. El valor obtenido en el control (0.1984 o/o) se acerca mucho al 0.2o/o encontrado por muchos investigadores, para las mutaciones letales recesivas espontáneas (tabla 3).

Para las dosis empleadas se notó que el hidrosulfito de sodio indujo mutaciones letales recesivas de una manera propor-

Tabla 1. Toxicidad de hidrosulfito de sodio en *Drosophila melanogaster*. Prueba 1

Concentración p p m	huevos puestos adultos que emergen	o/o Letalidad	o/o Letalidad corregida
Control	609/463	23.98	—
1000	227/146	35.66	11.70
2000	418/238	44.12	19.18
4000	646/376	58.20	34.30

Tabla 2. Toxicidad del hidrosulfito de sodio en *Drosophila melanogaster*. Prueba 2.

Concentración p p m	huevos puestos adultos que emergen	o/o Letalidad	o/o Letalidad corregida
Control	718/508	29.24	—
3000	560/296	47.14	25.29
4000	520/224	56.92	39.11
6000	220/36	83.63	76.86

Tabla 3. Frecuencia de mutaciones letales recesivas producidas en el cromosoma X de espermatozoides maduros de *D. melanogaster* tratados con hidrosulfito de sodio.

Tratamiento	Concentración p p m	Nº M.L.R.	Nº Normal	o/o M.L.R.	X <sup>2</sup>	N. S.
Control	0	1	525	0.190	—	—
Hidrosulfito	2000	15	817	1.836	7.253	P < 0.01
Hidrosulfito	4000	25	784	3.189	14.038	P < 0.0005

N.S.: nivel de significancia

M.L.R.: mutaciones letales recesivas

cional a la dosis empleada, siendo el valor máximo obtenido de 3.18 o/o para la dosis de 4000 ppm.

El mecanismo de la producción de las mutaciones letales recesivas por el hidrosulfito de sodio se desconoce, pero puede tener etapas comunes con las que sigue un compuesto similar, el bisulfito de sodio. Para esta sustancia se han propuesto dos tipos de reacciones:

1. La desaminación de la citocina para producir uracilo (fig. 3).
2. La transaminación de las proteínas con los ácidos nucleicos, preferentemente de banda simple (Shapiro et al., 1972).

Aún así, la forma más posible de acción del bisulfito parece ser la capacidad que tiene para inhibir un proceso de reparación por excisión del DNA que normalmente reduce la mutagenicidad, como se determinó en *E. coli* (Mallon y Rossman, 1981).

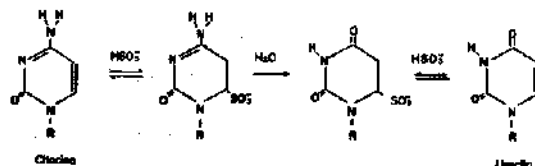


Fig. 3. Producción de uracilo por desaminación de la citocina (Shapiro, 1977).

## CONCLUSIONES

Para las pruebas de toxicidad antes mencionadas se puede determinar que para alcanzar una LD<sub>50</sub> en el estado embrionario de *Drosophila melanogaster* se debe aplicar una dosis muy alta de hidrosulfito de sodio, cerca a 5000 ppm, dosis que es difícil de alcanzar por consumo de alimentos en el hombre. Para tal efecto se requerirá la ingestión de aproximadamente 8.2 Kg de panela diaria (F.A.O., 1979, com.per.).

La producción de mutaciones letales recesivas en los espermatozoides maduros de *D. melanogaster* bajo las dosis empleadas muestra claramente la capacidad mutagénica de este compuesto y un posible efecto de dosis, lo cual indica el riesgo que puede representar su ingestión en dosis muy altas.

## LITERATURA CITADA

- Abbot, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Ent.*, vol 18, pp 265-267.
- Abrahamson, S. y F.B. Lewis. 1971. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*. Vol. 2. Plenum Press, New York.
- Chalarca, J. 1975. La Industria de la Panela y el Café. *Rev. Nal. Agric.* No. 813.
- Durrant, P. J. y B. Durrant. 1970. *Introduction to advanced Inorganic Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Fowler, G. L. 1973. Some aspects of the reproductive biology of *Drosophila*: sperm transfer, sperm storage and sperm utilization. *Adv. Genet.* vol 17. Acad. Press.
- F.A.O., 1979. Empleo del Hidrosulfito Sódigo para la producción de la panela (comunic. person.).
- Hayatsu, H. 1976. Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* vol 16 pp 75-124.
- Inoue, M. y H. Hayatsu. 1971. The interaction between bisulfite and amino acids. The formation of methionine sulfoxide from methionine sulfoxide from methionine in the presence of oxygen. *Chem. Pharm. Bull.* vol 19.
- Kaplan, D. M., D. L. Lutche y C. E. McJilton. 1974. Chronic exposure to SO<sub>2</sub>: possible effects at the cellular level. *Environment. Lett.* vol 7 pp 303-310.
- Mallon, R. G. y T. G. Rossman. 1981. Bisulfite (sulfur dioxide) is a comutagen in *E. coli* and in Chinese Hamster cells. *Mut. Res.* vol 88 pp. 125-133.
- Pterling, D.H. y N. T. Shih. 1975. Biochemistry of Bisulfite-sulfur dioxide. *Environomn. Res.* vol. 9.
- Remington, R.D. y M.A. Schork. 1970. *Statistics with application to the biological and health sciences*. Prentice-Hall. Inc. New Jersey. pp. 208-230.
- Shapiro, R. 1977. Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide). *Mut. Res.* vol 39 pp. 149-176.
- Shapiro, R. D. C. Lae y J. M. Weisgrass. 1972. A new chemical probe for singlestrand RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol 49 pp 358-363.
- Sobel, F. H. y E. Vogel. 1976. The capacity of *Drosophila* for detecting relevant genetic damage. *Mut. Res.* vol 41 pp 95-106.
- Zimmering, S. 1975. Utility of *Drosophila* for detection of potential environmental chemical mutagens. *Ann. N. Y. Ac. Sci.* vol 269 pp. 26-33.

MUTAGENIC POTENTIAL OF SODIUM HYDROSULFITE IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

## ABSTRACT

*Sodium hydrosulfite is a food additive used in Colombia primarily as a bleaching agent of unrefined sugar ("panela"). It can react with DNA, and is therefore thought to be potentially mutagenic.*

*Drosophila melanogaster eggs were treated with sodium hydrosulfite at different concentrations. A LD<sub>50</sub> was found at a concentration of 5000 ppm, and a frequency of 3.18 o/o X-linked recessive lethals at a dose of 4000 ppm. The mutagenicity of this compound is discussed in relation to excision repair mechanisms.*