

## EFECTO MUTAGENO DEL MESTRANOL Y NORGESTREL EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

*María Luisa Judith Bravo Aguiar(1)*  
*Jesús M. Cogollo Tordecilla(2)*

### RESUMEN

*En este trabajo se investigó el efecto mutágeno de dos principios activos de anovulatorios orales el mestranol y norgestrel, lo cual se realizó utilizando espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster*. Los resultados mostraron que la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo es significativamente mayor que el control ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ) en los cromosomas expuestos al norgestrel con dosis de 5 y 100 mg/ml. Contrariamente el incremento de la frecuencia de este tipo de mutaciones observado en los cromosomas X expuestos al mestranol no es significativo respecto al control. Sin embargo estos resultados no implican que el mestranol sea absuelto por su inocuidad como mutágeno a nivel puntual y que el norgestrel sea colocado en la lista negra.*

*Para llegar a inferencias más conclusivas es necesario realizar un gran volumen de investigaciones variando las condiciones experimentales.*

### INTRODUCCION

Los anticonceptivos orales constituyen un clásico ejemplo de sustancias químicas de reciente introducción en el medio ambiente humano y con explosiva difusión. Para el año 1965 se calculó en 31 millones el número de mujeres en edad reproductiva que usaban anticonceptivos orales y en 1974 alcanzó 119 millones(2).

La principal forma de acción de los anticonceptivos orales es inhibiendo la ovulación(20) por una alteración profunda y permanente de la secreción de gonadotropinas y esteroides

gonadales(4,5), lo cual expone a la mujer a un ambiente totalmente diferente al del ciclo sexual normal(19).

Mediante investigaciones en ratones y en otros mamíferos se ha demostrado que los esteroides sintéticos reproducen la función de los estrógenos y progestágenos ováricos(4,5,32) actuando como represores (por efecto de feedback negativo) del locus que controla la secreción del factor de liberación de las hormonas gonadotropinas (GnRH) en las neuronas hipotalámicas(14) por lo cual la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se suprime totalmente(32), como se ilustra en la figura 1(18).

(1) Profesora Departamento de Biología, Laboratorio de Genética Humana, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Estudiante de Biología.

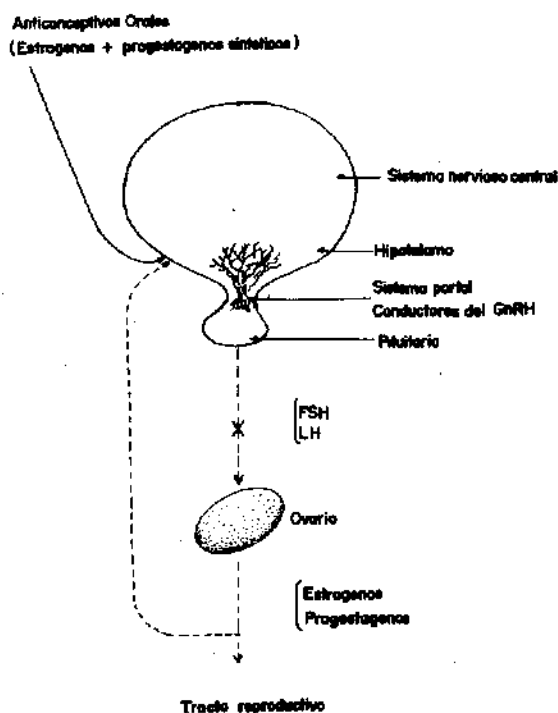


Fig. 1  
Esquema que ilustra el mecanismo de acción de los hormonas esteroidales sintéticas - sobre el eje hipotálamo-hipofisario-ovario (Tomado y adaptado de Harris, G.W. y Neffelin, E., 1970 (10)).

Los resultados de investigaciones preliminares sobre el posible efecto cancerígeno de los esteroides sintéticos mostraron un incremento significativo de la incidencia de hepatomas en ratones tratados con anovulatorios orales(22), lo que estimuló la investigación sobre el potencial mutágeno de los esteroides sintéticos.

La mayoría de las investigaciones se realizaron con la finalidad de detectar anomalías cromosómicas en cultivos de linfocitos y fibroblastos de mujeres bajo tratamiento de anticonceptivos orales(6,8,11,13,17) en abortos o en hijos nacidos a término de estas mismas mujeres(7,12,21,27,34). Los resultados son discrepantes. Sin embargo, es pertinente anotar que se ha reportado un incremento significativo de poliploidías, roturas cromosómicas y asociación satélite en neonatos de mujeres expuestas a anticonceptivos orales (11,12,27,36).

También se ha reportado un incremento significativo en el intercambio de cromátidas hermanas en cultivo de linfocitos

de mujeres que soportaban un prolongado tratamiento con hormonas esteroidales sintéticas(17,29), lo que obviamente significa algún tipo de efecto genético.

El objetivo de esta investigación es contribuir al conocimiento de la capacidad del mestranol(1) y el norgestral de inducir mutaciones puntuales en el cromosoma X de los espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster*.

## MATERIALES Y METODOS

Para esta investigación se utilizó la prueba de mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X en espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster*(1) descrito por Bravo y Zuleta(9). Los machos silvestres se obtuvieron de la cepa Oregón-R y las hembras vírgenes de la cepa FM6, la cual es ideal para detectar mutaciones letales recesivas ligadas al sexo(37).

Los principios activos se disolvieron en una solución de etanol al 40o/o y glucosa al 10o/o de tal suerte que la concentración final de mestranol fue de 0.50, 10.00 y 50.00 mg/ml y de 5.00 y 100 mg/ml de norgestrel. La exposición de los espermatozoides maduros a los esteroides sintéticos se hizo en forma oral durante 72 horas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente(10). El tratamiento con las diferentes dosis de mestranol y norgestrel se realizó simultáneamente con los controles. Todos los cultivos se mantuvieron a 24°C y se hicieron dos controles, el primero de los cuales recibió solamente glucosa al 10o/o. Para averiguar si el etanol tiene algún efecto sobre el material genético se hizo un segundo control, al que se le suministró etanol y glucosa al 40o/o y al 10o/o respectivamente.

La significación estadística fue determinada por la prueba de  $\chi^2$  utilizando la fórmula:

$$\chi^2 = \frac{(O_{11} \times O_{22}) - (O_{21} \times O_{12})^2}{(O_{1.} \times O_{2.} \times O_{.1} \times O_{.2})} \times N$$

Los símbolos de esta fórmula representan el número de cromosomas X viables y los con mutaciones letales recesivas observados, tanto en el control como en el tratamiento con la droga, tal como se muestra en la tabla I(33).

## RESULTADOS

Como se muestra en la tabla II y en la figura 2 las frecuencias de mutaciones letales recesivas observadas en el control con glucosa y etanol no es significativamente diferente que la del control con glucosa solamente. La frecuencia de este mismo tipo de mutaciones observadas en los cromosomas

(1) El mestranol fue donado por el laboratorio E.R. Squib & Sons de Cali y el norgestrel por el laboratorio Wyth Inc. de Bogotá, Colombia.

Tabla I. Tabla de contingencia de 2 x 2 con Frecuencias Observadas Oij

Cromosomas X observados	TRATAMIENTO		Totales de fila
	Druga	Control	
Mutados	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>	O.1
No Mutados	O <sub>21</sub>	O <sub>22</sub>	O.2
Totales de columna	O <sub>1.</sub>	O <sub>2.</sub>	

Tabla II. Frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster* expuestos al mestranol y norgestrel.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION (mg/ml)	LETALES No. CROMOSOMAS	X <sup>2</sup>	P
CONTROL (DEL CONTROL)		5/3233		
CONTROL		3/3457	0,458	N.S.
MESTRANOL	0,50	1/1257	0,004	N.S.
MESTRANOL	10,00	5/2098	1,537	N.S. (<0,30)
MESTRANOL	50,00	2/1715	0,105	N.S.
NORGESTREL	5,00	8/1757	7,515	<0,01
NORGESTREL	100,00	4/1091	4,226	<0,05

P: nivel de significación  
N.S.: no significativo.

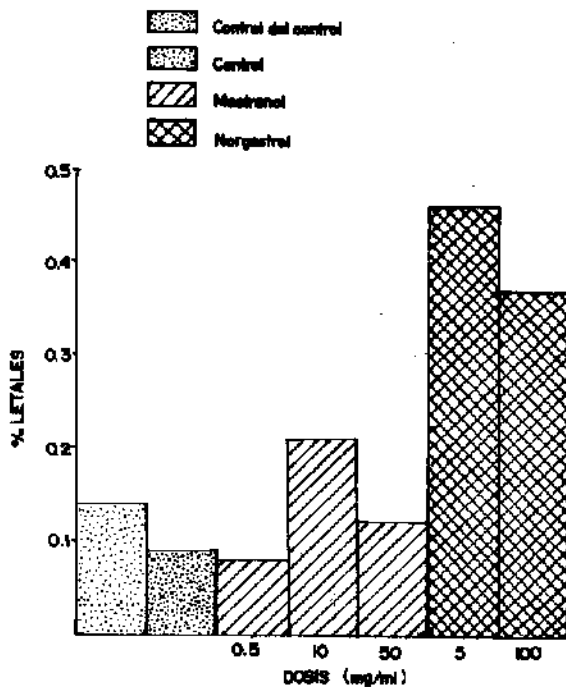


Fig. 2

Frecuencia de mutaciones puntuales letales recesivas ligadas al cromosoma X de *Drosophila melanogaster* expuestas al mestranol y norgestrel.

expuestos a los esteroides sintéticos, solamente es significativamente mayor en los cromosomas tratados con norgestrel, pero sin efecto de dosis.

## DISCUSION

Los resultados de esta prueba, presentados en la tabla II y en la figura 2 muestran un incremento estadísticamente significativo ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ) de la frecuencia de mutaciones puntuales letales recesivas en el cromosoma X de los espermatozoides expuestos al norgestrel con dosis 10 y 200 veces mayores que las fisiológicas contenidas en el Ovrál y otros tipos de anticonceptivos orales(31). Además, la actividad mutagénica del norgestrel muestra no tener efecto de dosis; inclusive, con la de 100 mg/ml la proporción de mutaciones es menor que la inducida con dosis de 5 mg/ml, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. Probablemente se debe al menor número de cromosomas analizados con la dosis mayor.

A pesar del apreciable volumen de investigaciones realizadas con el fin de estudiar el efecto genético de los anticonceptivos orales y sus principios activos(6,11,15,16,17,23,24,26), muy pocas han utilizado el norgestrel o anticonceptivos que contengan esta droga(20,25,30) por lo cual no existen suficientes elementos de comparación. En *Salmonella thyphimurium* con el método de Ames(20) el norgestrel no mostró actividad mutagénica, como tampoco en *Drosophila melanogaster*(30), pero en esta última el tratamiento se hizo a nivel de larvas, en las cuales las mutaciones puntuales en las células germinales podrían estar enmascaradas por el sistema de reparación(28). Sin embargo, en la literatura existe algún indicio de actividad mutágena y/o cancerígena de los progestágenos con estructura química semejante al norgestrel(20,35). El noretinodrel en ratas incrementó la incidencia de tumores en células de la pituitaria, hígado y glándulas mamarias(35). El linestrenol y el acetato de norestisterona incrementaron significativamente la incidencia de mutaciones letales dominantes en ratones(3).

Los resultados de investigaciones para averiguar la actividad mutágena y/o cancerígena del mestranol o de los anticonceptivos orales que contienen este elemento, son controvertibles(27,30,35,38). Con Lyndiol, en ratones, utilizando dosis 10 veces mayores que las fisiológicas se observó un incremento significativo de las mutaciones letales dominantes (3), pero con esta misma droga y también en ratones se falló en demostrar incremento significativo de mutaciones recesivas visibles y malformaciones mayores(38).

En nuestro estudio, el mestranol no muestra un incremento significativo de la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo (tabla I y figura 2). Sin embargo, se observa una débil actividad mutágena ( $P < 0,30$ ) con dosis de 10 mg/

ml, que es unas 100 veces mayor que las concentraciones que contienen los anticonceptivos compuestos con mestranol(31). Estos resultados están de acuerdo con otros estudios parecidos realizados en *Drosophila*(30). Como se observa en la tabla I y la figura 2 con dosis de 500 veces mayores que las fisiológicas, la incidencia de mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X es menor, lo cual podría indicar que no existe efecto de dosis, o que la dosis crítica, si la hay, está cercana a las fisiológicas, lo cual se podría investigar con posteriores estudios.

Los resultados de esta prueba, negativos para el mestranol y positivos para el norgestrel, no implican, en manera alguna,

que la primera droga sea absuelta por inocuidad como mutágeno a nivel puntual y que el norgestrel sea colocado en la lista negra. Es recomendable proseguir los estudios con dosis crecientes de norgestrel, iniciando con las fisiológicas hasta detectar en qué concentraciones incrementa su actividad mutagénica a niveles significativos.

En conclusión, utilizando espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster* el norgestrel muestra actividad mutagénica estadísticamente significativa con dosis 10 y 200 veces mayores que las fisiológicas, mientras que la actividad mutagénica del mestranol es muy débil.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAMSON, S., Lewis, E. B. (1971). The detection of mutations in *Drosophila melanogaster*. In chemical mutagens. 461-487, Hollander, A. ed O. Plenum Press, New York.
2. AITKEN, R. J. (1979). Contraceptive research and development. Br. med. Bull. 35: 199-204.
3. BADR, F. M., BADR, R. S. (1974). Studies on the mutagenic effect of contraceptive drugs, I. Induction of dominant lethal mutations in female mice. Mutation Res. 26: 529-534.
4. BINGEL, A. S., Benoit, P. S. (1973). Oral contraceptives therapeutics versus adverse reactions with an outlook for the future II. J. Pharmat. Sc. 62: 349-362.
5. ——— (1973). Oral contraceptives: Therapeutics versus adverse reactions with an outlook for the future I. J. Pharmat. Sc. 62: 179-200.
6. BISHUN, N., Mills, J. (1971). Mitotic indices and oral contraceptives. Br. Med. J. 3: 704.
7. ———, ———, Parke, D. V., Williams, D. C. (1975). A cytogenetic study in women who had used oral contraceptives and in their progeny. Mutation Res. 33: 299-310.
8. ——— (1976). Cytological effects of the oral contraceptive. Mutation Res. 39: 97-110.
9. BRAVO, M. L., Zuleta, M. (1976). Efecto de las radiaciones gamma en espermatozoides maduros de *Drosophila melanogaster*. Actualidades Biol. 5(16) 30-35.
10. ——— (1981). Efecto mutágeno del LSD-25 en *Drosophila melanogaster*. Actualidades Biol. 10: 78-82.
11. CARR, D. H. (1967). Chromosomes after oral contraceptives. Lancet 2: 830-831.
12. ——— (1970). Chromosome studies in selected spontaneous abortions. I. Conception after oral contraceptives. Can. Med. Assoc. J. 103: 343-348.
13. DE GUTIERREZ, A. C., Lisker, R. (1973). Longitudinal Study of the effects of oral contraceptives on human chromosomes. Ann. Genet. 16: 259-262.
14. FINK, G. (1979). Neuroendocrine control of gonadotrophin secretion Br. Med. Bull. 35: 155-160.
15. FITZGERALD, P. H., Pickering, A. F., Ferouson, N. (1973). Depressed lymphocyte response to PHA in long terms users of oral contraceptives. Lancet 1: 615.
16. GLATT, H. R., Metzger, M., Oesch, F. (1979). Diethylstilbestrol and 11 derivatives a mutagenicity study with *Salmonella typhimurium*. Mutation Res. 67: 113-121.
17. GOH, K. O. (1967). Chromosomal breaks in women taking birth control pills. USAEC-ORAU, Research Report. 106: 97-104.

18. HARRIS, G. W., Naftolin, F. (1970). The hypothalamus and control of ovulation. *Br. med. Bull.* 26: 3-9.
19. KLOPPER, A. (1970). Developments in steroidal hormonal contraception. *Br. med Bull.* 26: 361-365.
20. LANG, R., Redmann, U. (1979). Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames *Salmonella* / microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 67: 361-365.
21. LAURITSEN, J. G. (1975). The significance of oral contraceptives in causing anomalies in spontaneous abortions. *Acta Obst. Gynec. Scand.* 54: 261-264.
22. LEMON, H. M. (1977). Experimental basis for multiple primary carcinogenesis by sex hormones: a review. *Cancer* 40: 1825-1832.
23. LITTLEFIELD, L. G., Mailhes, J. B. (1975). Comparison of chromosome breakages in lymphocytes and fibroblast from control women and women taking oral contraceptives. *Fert. Steril.* 26: 828-832.
24. LITTLEFIELD, L. G., Lever, W. E., Miller, F. L., Goh, K. O. (1975). Chromosome-breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women taking oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121: 976-980.
25. MARIN, M.L., Zuleta, M. (1978). Efecto mutagénico del anticonceptivo Noral. Tesis de grado, Depto. de Biología.
26. MATTON VAN LEUVEN, M. Th., Thiery, M., De ble, S. (1974). Cytogenetic evaluation of patients in relation to the use of oral contraception. *Contra.* 10: 25-39.
27. McQUARRIE, H. G., Scott, C. D., Ellsworth, H. S., Harris, J. W., Stone, R. A. (1970). Cytogenetic studies on women using oral contraceptives and their progeny. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 108: 659-665.
28. MENDELSON, D. (1974). The effect of caffeine in repair systems in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 22: 745-756.
29. MURTHY, P. B. K., Prema, K. (1979). Sister-chromatid exchanges in oral contraceptives users. *Mutation Res.* 68: 149-152.
30. PARADI, E. (1981). Mutagenicity of some contraceptive drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 88: 175-178.
31. PIOTROW, P. T., Lee, C. M. (1974). Oral contraceptives-50 million users. Population Report, Serie A, No. 1 A5 - A7.
32. POTTS, M., Van der Vlugt, T., Piotrow, P. T., Gall, L. J., Huber, S. C. (1975). Oral contraceptives. Mode of action. Population Reports Series A (2): A33 - A35.
33. REMINGTON, R. D., Schork, M. A. (1970). Statistics with Applications to the biological and health sciences col. Prentice-Hall, Inc. New Jersey pp. 208-230.
34. RICE-WRAY, E., Marquez-Monter, H., Gorodovsky, J. (1970). Chromosomal studies in children born to mothers who previously used hormonal contraceptives. *Contraception* 1: 81-85.
35. SAUNDERS, F. J. (1967) Effects of norethynodrel combined with mestranol on the offspring when administered during pregnancy and lactation in rats. *Endocrinology* 80: 447-452.
36. SHAPIRO, L. R., Graves, Z. R., Kirshhorn, K. (1972). Oral contraceptives and in vivo cytogenetic studies. *Obstet. Gynecol.* 39: 190-192.
37. STRICKBERGER, M. W. (1962). Experiments in Genetic with *Drosophila* ed. J. Wiley and Sons, Inc. New York.
38. EALLACE, M. E., Badr, F. M., Badr, R. S. (1979). Studies in Mice on the Mutagenicity of two contraceptive Drugs *J. Med. Genet.* 16: 206-209.