

# ESTUDIO DE LA GENOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS DEL POLIETILENGLICOL TEREFALATO (PET): DIMETILTEREFALATO (DMT) Y ACIDO TEREFALICO (TPA).

Daniel Lerda. Cátedra de Toxicología Ambiental. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba. Camino a Alta Gracia Km 7.5. 5000 Córdoba. Argentina. Tel./Fax: 54 51 940696.

**RESUMEN:** Lerda, D. Estudio de la genotoxicidad de los compuestos del polietilenglicol tereftalato (PET): Dimetiltereftalato (DMT) y Acido tereftálico (TPA). *Acta Toxicológica Argentina. (1998) 6 (1): 11-13.* Se estudió la acción genotóxica y mutagénica del dimetiltereftalato (DMT) y el ácido tereftálico (TPA), los principales componentes del polietilenglicol (PET). Fueron evaluados in vitro con el test de Ames, prueba de la síntesis de ADN no programada y micronúcleos. Los datos obtenidos no revelan potencial mutagénico para el DMT y TPA en las condiciones del protocolo experimental utilizado.

**PALABRAS CLAVES:** polietilenglicol tereftalato; dimetiltereftalato; ácido tereftálico; genotoxicidad; mutagenicidad.

**ABSTRACT:** Lerda, D. *Genotoxicity test on the compounds of polyethylene glycol terephthalate (PET): Dimethylterephthalate (DMT) and Terephthalic acid (TPA).* *Acta Toxicológica Argentina. (1998) 6 (1): 11-13.* Dimethylterephthalate (DMT) and terephthalic acid (TPA), the main compounds of polyethylene glycol terephthalate (PET) were evaluated for genotoxicity and mutagenicity in the Ames test, UDS by liquid scintillation counting, and micronuclei induced in binucleate human lymphocytes. Data failed to show that DMT and TPA at experimental protocol had any genotoxic and or mutagenic effects.

**KEYWORDS:** polyethylene glycol terephthalate; dimethylterephthalate; terephthalic acid; genotoxicity; mutagenicity.

## INTRODUCCION

En el curso del último decenio se ha desarrollado considerablemente el empleo de productos químicos en una vasta gama de la actividad humana. Este hecho es importante no sólo desde el punto de vista de un enorme volumen de producción química sino también a que la gran variedad de estos productos se han introducido en todos los aspectos de la vida cotidiana (productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, pesticidas, insecticidas, contaminantes industriales diversos en el agua y en el aire, etc.). Además, el desarrollo de la utilización pacífica de la energía nuclear, de la radiación ionizante con fines diagnósticos y terapéuticos y de la radiación ultravioleta aumentaron la exposición humana a radiaciones de distinta naturaleza física. Si bien la mutación espontánea y la selección natural constituyen los principales momentos intermedios a través de los cuales se realizan los procesos evolutivos, no es de dudar que la exposición de la población humana a un número creciente de agentes químicos de acción mutagénica deba ser mirada con preocupación. El empleo de la materia plástica en la producción de contenedores para uso alimentario ha sido en estos últimos años de relevante interés para la toxicología. El polietilenglicol tereftalato (PET), una resina patentada en Inglaterra en 1941 por la Imperial Chemical Industries (ICI), ha hecho su entrada en el mercado, sustituyendo rápidamente al PVC en la preparación de manufacturas destinadas al campo alimentario. En Argentina el PET es utilizado como contenedor de bebidas gaseosas. En Italia y en casi todos los países europeos el uso de tal contenedor es limitado a la bebida gaseosa, agua mineral, aceites y otros líquidos no alcohólicos. En el Reino Unido y en los E.U. han aprobado el uso de tales contenedores para farmacia y cosmética.

Defusco et al.<sup>(1)</sup> observaron actividad mutagénica en concentrado de agua mineral, mantenida por un mes en botella de PET expuesta a la luz en la cepa TA 98 con la prueba de Ames. Goncharova et al.<sup>(2)</sup> encontraron un efecto clastogénico débil en ratones tratados con DMT. Con respecto a la posible carcinogenicidad, el Programa Nacional de Toxicología de E.U.<sup>(3)</sup> presentó un informe en donde ratones de la cepa B6C3F1 y ratas F344 tratadas en la dieta con DMT, no mostraron efectos carcinogénicos.

En virtud de que las concentraciones ensayadas en este trabajo no fueron estudiadas previamente y como un aporte más a los datos ya existentes en la literatura mundial sobre ge-

notoxicidad, el principal objetivo de este estudio fue determinar la acción genotóxica y mutagénica de los componentes principales del PET: dimetil tereftalato (DMT) y ácido tereftálico (TPA).

## MATERIALES Y METODOS

Los componentes químicos investigados en este estudio, DMT y TPA fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Las muestras DMT y TPA se disolvieron en una solución acuosa con 3 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1 % de TWEEN 20 (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) para realizar las pruebas de Ames y de la Síntesis de ADN no programada. Para la prueba de Micronúcleos, las muestras DMT y TPA fueron disueltas en RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) con 1% de DMSO.

Las concentraciones de los compuestos químicos ensayadas en este trabajo (0.5, 5, 50 y 500 ug/ml), surgen de los estudios preliminares de toxicidad realizados en cada prueba.

### Prueba de Ames

La mutagenicidad bacteriana del DMT y TPA se investigó usando las cepas TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 98 y TA 100 de *Salmonella typhimurium* con o sin activación metabólica (+ S 9). Se utilizó la mezcla S-9 de hígados de ratas machos Sprague-Dawley tratadas con Aroclor 1254 de acuerdo al método de Ames et al.<sup>(4)</sup>. Fueron utilizadas tres placas por dosis por cepa y se utilizó el criterio de Ames et al.<sup>(4)</sup> para evaluar la mutagenicidad del DMT y TPA.

Una prueba preliminar de toxicidad fue realizada con la cepa TA 100 para establecer el correcto rango de concentración a emplear.

### Prueba de la síntesis de ADN no programada

Se empleó el método descrito por Bartsch et al.<sup>(5)</sup> en donde se utilizaron células humanas heteroploides HeLa. Como mutágeno de control en ausencia de activación metabólica se utilizó el etilmetansulfonato (EMS) (Fluka 73256) 100 mM y en presencia de activación metabólica se utilizó el 2-aminoantraceño (2AAC) (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) 100 mM. Las células se sembraron en placa para cultivos celulares de 24 pocillos de 16 mm de diámetro conteniendo cada uno un vidrio de 12 mm de diámetro. Después de una incubación de 24h a 37°C

en incubadora en atmósfera controlada (CO<sub>2</sub> al 5 %), las células se lavaron con PBS. Se procedió luego al tratamiento, exponiendo las células por 1 h a la sustancia en examen a las diversas dosis (1 ml/pocillo) en presencia de activación metabólica en la cantidad de 0.5 ml/pocillo (en la placa + S 9) y en ausencia de activación metabólica (en la placa - S 9). Al término del tratamiento las células se lavaron con PBS agregando 1 ml/pocillo de DMEM (Sigma Chemical, St. Louis MO, USA) en una mitad de los pocillos por cada tratamiento, mientras en la otra mitad se agregó DMEM más hidroxurea (HU) 75 mM. Después de 15 min. a 37°C en un pocillo se agregó metiltimidina 3 H (10 u Ci ml<sup>-1</sup>) por 4 h. La incorporación de tritio dentro de la fracción ácida-insoluble fue contada en una cámara de centelleo con tolueno-base en un "Spectrómetro tri-carb Packard". Los resultados se expresaron como el porcentaje de incorporación de TdR-3H en presencia y ausencia de hidroxurea.

Previo al examen, se realizó la prueba de citotoxicidad en presencia y ausencia de activación metabólica. La dosis máxima tolerada fue aquella cuya concentración permitía el 60 % de crecimiento celular respecto al control.

### PRUEBA DE MICRONUCLEOS

La prueba se realizó "in vitro" sobre linfocitos humanos de sangre entera periférica obtenida de 4 sujetos voluntarios sanos, de ambos sexos, de entre 20 y 30 años de edad, no fumadores, no expuestos a ningún tratamiento farmacológico o a agentes mutagénicos por lo menos desde un año antes y no expuestos a radiaciones ionizantes por lo menos desde seis meses antes, con anamnesis negativa de fragilidad cromosómica y de recientes infecciones virales.

La sangre entera (0.5 ml) obtenida de voluntarios sanos, heparinizada, se agregó a 4.5 ml de cultivo completo (RPMI 1640 con HEPES 4.10 ml, suero fetal calcico al 20 % 0.75 ml, fitohemaglutinina 0.05 ml, pen/sterp 152 U ml<sup>-1</sup>) en tubos estériles de 10 ml. Los cultivos se incubaron a 37 grados centígrados por 72 h. Como control negativo se utilizó el DMSO y como control positivo la bleomicina (50 ug ml<sup>-1</sup>, Sigma B 5507). Después de 22 h, a los cultivos se le agregaron las concentraciones a investigar de DMT y TPA. A las 44 h se le agregó 3 ug ml<sup>-1</sup> de citocalasina B (Sigma, Cat C 6762, 2 mg ml<sup>-1</sup> en DMSO) en cada cultivo como fue descrito por Obe et al.<sup>(6)</sup> para el método de células binucleadas. Las células fueron recolectadas centrifugando por 12 minutos a 1200 x g, luego fueron tratadas con KCl al 0.56 % y nuevamente se centrifugaron por 10 minutos a 1400 x g. Se fijaron con una mezcla de metanol:acético glacial (3:1), se realizaron tres lavados con el fijador y luego se colocaron las células en portaobjetos codificados y se dejaron secar a la temperatura ambiente hasta el día siguiente. Luego se procedió a la coloración con Giemsa al 4 %. Se contaron 1000 células binucleadas por portaobjetos y 2 portaobjetos por cultivo. Se realizaron para cada sustancia en examen dos cultivos repetidos en tiempos diversos. Previo al examen se realizó el ensayo de la dosis máxima, para ello se realizó el tratamiento "in vitro", tomando como dosis máxima aquella que había provocado una mortalidad celular del 30 %, utilizando el colorante vital de Nigrosina para detectar las células muertas.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparación entre grupos en las tres pruebas se utilizó el análisis de variancia monovalente para rango de Kruskal-Wallis<sup>(7)</sup>.

### RESULTADOS Y DISCUSION

El principal metabolito del DMT, el ácido paraftálico (pFT), de acuerdo a los datos de la literatura, no presentó actividad mutagénica con y sin activación metabólica en el test de Ames<sup>(8)</sup>.

Igualmente negativo resultó el dato del pFT con y sin activación metabólica en las síntesis de ADN no programada<sup>(10)</sup>.

En este estudio, los resultados obtenidos con el Test de Ames se observan en las Tablas 1 y 2, no encontrándose diferencias significativas con respecto a los controles en presencia o ausencia de activación metabólica.

Cepas Dosis ug/placa	TA 98		TA 100		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9
0.00 a	20	16	150	127	21	15	16	6	26	25
0.50	18	12	135	115	19	13	10	5	24	21
5.00	17	16	100	120	18	10	10	3	23	20
50.00	19	15	140	110	18	8	8	6	22	20
500.00	16	13	130	98	10	10	6	2	22	19
Control Positivo	1644	128	1114	1280	118	1300	180	199	591	222

a: solvente, control negativo. Los valores informados son medias.

**Tabla 1.** Respuesta mutagénica del DMT en el Test de Ames.

Cepas Dosis ug/placa	TA 98		TA 100		TA 1535		TA 1537		TA 1538	
	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9
0.00 a	21	17	120	105	20	16	20	8	29	37
0.50	18	13	105	80	10	13	20	6	23	30
5.00	19	15	101	99	11	10	18	5	21	32
50.00	15	14	100	96	9	12	17	8	20	29
500.00	10	13	98	94	5	10	14	7	21	28
Control Positivo	1392	1256	691	808	89	531	139	179	483	775

a: solvente, control negativo. Los valores informados son medias.

**Tabla 2.** Respuesta mutagénica del TPA en el Test de Ames.

La incorporación de TdR-3H en presencia de hidroxurea para suprimir la replicación del ADN fue utilizada para determinar la síntesis de reparación del ADN en un cultivo de células humanas heteroploides HeLa. El DMT y TPA a distintas concentraciones (0.5, 5, 50 y 500 ug ml<sup>-1</sup>) en presencia y ausencia de S-9 durante 1 h de incubación no indujeron lesiones del ADN (Tabla 3); mientras que 100 mM de EMS en ausencia de activación metabólica, incrementó tres veces la incorporación de TdR-3H sobre el valor del control (valor histórico del laboratorio).

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en el test de Micronúcleo en linfocitos humanos de sangre periférica, pudiendo observarse que para ambos compuestos no se detectan incrementos significativos en su frecuencia.

Es de destacar que en este estudio se ensaya un barrido de concentraciones (0.5, 5, 50 y 500 ug/ml-1) para ambos compuestos (DMT y TPA) que no han sido previamente descritos

Compuesto	Concentraciones (ug ml-1)	% de incorporación de TdR-3H	
		Presencia de hidroxiuurea	Ausencia de hidroxiuurea
DMT	0.5	0.7	0.7
	5.0	0.5	0.6
	50.0	0.6	0.7
	500.0	0.4	0.8
TPA	0.5	0.7	0.7
	5.0	0.8	0.9
	50.0	0.9	0.8
	500.0	0.5	0.7

**Tabla 3.** Efectos del DMT y TPA en la síntesis del ADN no programada.

Compuesto	Concentraciones (ug ml-1)	Micronúcleos / 1000 células binucleadas
DMT	0.5	3
	5.0	2
	50.0	2
	500.0	4
TPA	0.5	3
	5.0	3
	50.0	3
	500.0	3
Control Positivo	50	747
Control Negativo	50	2

**Tabla 4.** Frecuencias de micronúcleos en linfocitos humanos tratados con DMT y TPA.

en la literatura. Sin embargo, estos resultados son similares a los reportados por otros autores<sup>(8-12)</sup> en cuanto a la no detección de efecto mutagénico, bajo estas condiciones de ensayo.

La ausencia de actividad mutagénica del DMT y TPA uniformemente observada en las pruebas del presente estudio, no puede ser considerada como que el DMT y TPA no son carcinogénicos, dado a que hay algunas evidencias que fueron reportadas sobre promoción de tumores en hígado de ratas<sup>(13,14)</sup>; esto implica que las pruebas cortas de genotoxicidad son negativas y los estudios de carcinogenicidad dan resultados positivos. Estos estudios de carcinogenicidad fueron realizados en roedores provocando un aumento del número de peroxisomas en el hígado. El incremento del número de peroxisomas en hígado de roedores, implica aumento del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que puede desarrollar especies reactivas de oxígeno, que tienen la capacidad de dañar el ADN e iniciar la carcinogenesis. Reddy y Lalwani<sup>(15)</sup> propusieron que debido a este mecanismo indirecto de conversión neoplásica se pueden ubicar a estos

agentes en la categoría de carcinógenos epigénicos.

En este estudio se realizó el análisis de mutagenicidad con cinco cepas de Salmonella en el Test de Ames. Además, en el intento de tener otros datos genotoxicológicos, se realizó el screening con una batería de tests que comprende la reparación del ADN en cultivos de células humanas heteroploides HeLa y el estudio citogenético en linfocitos humanos, (test de micronúcleos). Sería interesante poder realizar en otra etapa una serie de tests "in vivo" sobre el líquido biológico de animales tratados crónicamente, y una valoración toxicológica clásica de tratamientos agudo y crónico. Todo esto a los fines de proveer datos concluyentes para una oportuna valoración del potencial tóxico de la manufactura del PET empleado en el campo alimentario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Defusco,R.; Logman,D.; Bruce,D. (1981) Leaching of mutagens in mineral water from PET bottles. The Science of the Environment. 15: 125-135.
- Goncharova,R.I.; Deminatti,L.; Brown, F. (1988) Mutagenic effect of DMT on mouse somatic cells in vivo. Mutat.Res. 204:703-709.
- National Toxicology Program (1979) Bioassay of dimethylterephthalate for possible carcinogenicity (Cas N° : 120-61-6). DHHS. Publication (NIH) 79-1376, Bethesda, MD.
- Ames,B.N.; McCann J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsoma-mutagenicity test. Mutat.Res. 31:347-364.
- Bartsch,G.; Kuroki,C.; Malaveille,N.; Loprieno,N.; Barale,R.; Abbondandolo,A.; Bonatti,S.; Rainaldi,G.; Vogel, E. and Davis, A. (1978) Absence of mutagenicity of praziquantel, a new, effective, anti-schistosomal drug, in bacteria, yeasts, insects and mammalian cells. Mutat. Res. 58:133-142.
- Obe,G.; Beek,B. and Vaidya, V.G. (1984) An improved micronuclear assay in lymphocytes. Mutat.Res. 139: 61-65.
- Kruskal,W.H. and Wallis,W.A. (1952) Use of ranks in one criterion variance analysis. J.Amer.Statist.Ass. 47:583-621.
- Kozumbo,W.; Lerner,G.; Weisman,J. (1982) Assessment of mutagenesis phthalate esters. Env.Health Persp. 45:109-130.
- Zeiger,L.R.; Errol,J.; Haworth,J.; Steve,R.; Mortelmans,A.; Kristien,A.; Speck,A. and William,N. (1985) Mutagenicity testing of di (2-ethylhexyl) phthalate and related chemicals in Salmonella. Env.Mutagen. 7:213-232.
- Werner,K.L. (1986) Investigation of the potential for binding of DEHP to rat liver DNA in vivo. Env.Health Persp 65:267-269.
- Goncharova,R.I.; Deminatti,L.; Brown,F. (1988) Mutagenic effect of DMT on mouse somatic cells in vivo. Mutat.Res. 204:703-709.
- Shelby,M.D.; Erexson,G.L.; Hook,G.J. and Tice,R.R. (1993) Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. Environ.Mol. Mutagen. 21:160-179.
- Conway,K.; Costa,M.; Miller,C.; Patierno,S.R. and Thornhill,P.G. (1989) Peroxisome proliferation, DEHP and tumorigenesis. Drug.Metab.Rev. 21:65-102.
- Ward,J.M.; Rice,J.M.; Creasia,D.; Lynch,P. and Riggs,C. (1983) Dissimilar patterns of promotion by di-(2-ethylhexyl) phthalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. Carcinogenesis 4:1021-1029.
- Reddy,J.K. and Lalwani,N.D. (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. CRC Crit.Rev.Toxicol. 12:1-58.