

illeg.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*1 ejemplar
N. 33*



Estudio de la Capacidad Mutagenica de Medicamentos Antiparasitarios en Saccharomyces Cerevisiae

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO
PRESENTA:
OFELIA CATALINA GALINDO GOMEZ

6361

86p

CIUDAD UNIVERSITARIA JUNIO 1979

46



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
1. Mecanismos moleculares de las mutaciones	15
2. Sistema de activación metabólica <u>in vitro</u>	33
3. Sistema experimental para estudios de mutagénesis en <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	36
4. Características de los compuestos en estudio	
4.1 Pamoato de Pirvinio	39
4.2 Mebendazol	40
4.3 Citrato de Piperacina	40
MATERIALES	
1. Cepa de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	43
2. Medios de cultivo y soluciones	
2.1 Medio completo	43
2.2 Medio sintético	44
2.3 Soluciones	47
3. Compuestos Antihelmínticos	48
METODO	
1. Preparación del homogenado hepático	49

1.1	Inducción de las enzimas del hígado de rata	49
1.2	Obtención de la fracción S-9	49
2.	Determinación de las condiciones óptimas para la valoración del efecto mutagénico de las drogas	51

RESULTADOS

1.	Determinación del efecto citotóxico y <u>mu</u> tagénico del Pamoato de Pirvinio	57
2.	Determinación del efecto citotóxico y <u>mu</u> tagénico del Mebendazol	65
3.	Determinación del efecto citotóxico y <u>mu</u> tagénico del Citrato de Piperacina	69

	DISCUSION	73
--	-----------	----

	BIBLIOGRAFIA	79
--	--------------	----

T A B L A S Y F I G U R A S

<u>T a b l a s</u>	<u>Página</u>
I. Causas de las mutaciones	8
II. Efectos fenotípicos de alteraciones letales o mutagénicas de células individuales en un organismo multicelular	10
III. Drogas antiparasitarias. Aspectos - estudiados en relación a Mutagénesis	12
IV. Compuestos antiparasitarios	14
V. Mecanismos de protección celular que evitan alteraciones en el material - genético (ADN)	31
VI. Reacciones metabólicas llevadas a - cabo por el sistema enzimático P ₄₅₀ presente en microsomas hepáticos de mamíferos	34
VII. Concentraciones finales estudiadas de cada compuesto	56
VIII. Reversión de los marcadores his 1-7, arg 4-17 y hom 3-10 en los contro- les	60
IX. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el expe- rimento con Pamoato de Pirvinio	62
X. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el expe- rimento con Pamoato de Pirvinio y - mezcla S-9	63
XI. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el expe- rimento con Mebendazol	67

	<u>Página</u>
XII. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el experimento con Mebendazol y mezcla S-9	68
XIII. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el experimento con Citrato de Piperacina	71
XIV. Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes obtenidos en el experimento con Citrato de Piperacina y mezcla S-9	72

F i g u r a s

1. Tipos de alteraciones hereditarias	9
2. Supresión de una mutación por corrimiento fuera de formato	32
3. Estructura química de los compuestos	42
4. Curvas de sobrevida de los controles	59
5. Curvas de sobrevida con Pamoato de Pirvinio	61
6. Reversión de 3 marcadores en un experimento con Pamoato de Pirvinio, a un tiempo de exposición de 24 horas	64
7. Curvas de sobrevida con Mebendazol	66
8. Curvas de sobrevida con Citrato de Piperacina	70

Introducción

Actualmente en nuestro medio ambiente se encuentra difundido un número bastante elevado de compuestos químicos de toda índole, los cuales pueden ser incluidos en diferentes categorías: aditivos de alimentos, plaguicidas, cosméticos, drogas farmacéuticas, productos industriales diversos, contaminantes del agua y del aire.

A todas estas sustancias nos vemos expuestos en mayor o menor grado por diferentes razones (médicas, laborales, ambientales, etc.), y en ocasiones la exposición a las mismas resulta prolongada o crónica.

En todos los organismos vivos, la estabilidad del material genético y la fidelidad de su transmisión de una generación a la otra está asegurada por una serie de procesos biológicos complejos, entre los cuales podemos citar la duplicación, transcripción, traducción y segregación de la información hereditaria. Dicha información está contenida en la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), que se encuentra localizado fundamentalmente en los cromosomas del núcleo celular.

Se ha demostrado que una serie de agentes químicos y físicos son capaces de alterar la exactitud de los procesos ci-

tados, ya sea reaccionando directamente con el ADN, o bien con el aparato mitótico responsable de la transmisión equitativa del material genético. (Tabla 1).

Las alteraciones de la información hereditaria pueden corresponder a cualquiera de los siguientes tipos (Figura 1):

1. Mutaciones génicas puntuales. Cambios en un número no mayor de tres nucleótidos causados por la sustitución, adición o delección de bases en la molécula de ADN.

2. Rearreglos cromosómicos estructurales. Que afectan segmentos de más de tres nucleótidos como consecuencia de eliminación, duplicación, desplazamiento, inversión o translocación de pequeños o grandes segmentos de ADN.

3. Aneuploidía, cambios que afectan el número de cromosomas como: a) monosomías, consecuencia de la pérdida de uno o más cromosomas; b) trisomías, polisomías debidas a la adquisición de cromosomas supernumerarios; c) haploidía, cuando se reduce a la mitad el número cromosómico de una célula diploide; d) poliploidía, resultante del incremento de lotes cromosómicos por arriba del número diploide.

4. Recombinación errónea, entre zonas homólogas desplazadas o segmentos heterólogos de los cromosomas.

En la patología humana se conocen padecimientos producto de esas alteraciones, entre los que podemos citar: la fenilcetonuria, debida a una mutación puntual; el síndrome del maullido del gato, provocado por la pérdida de un segmento de cromosoma 5 y, el síndrome de Down o trisomía 21.

Desde hace aproximadamente diez años se vienen realizando numerosos estudios que han revelado la potente actividad mutagénica de grupos diversos de sustancias en diferentes organismos de experimentación (1,4,7,14,30,31,38,43,47,59,64,65) Esto ha generado una preocupación general por los posibles efectos adversos que acarrea para la salud del hombre el uso inmoderado de agentes químicos que pueden incrementar la frecuencia de enfermedades genéticas (5,13,20,21,25,27)

Durante la gestación, las consecuencias de la exposición a un agente mutagénico dependen del estado de desarrollo del organismo, el tipo de célula afectada y la alteración genética producida (26). (Tabla II). El efecto más drástico que se observa es la muerte de la célula, si ésta ocurre antes de la determinación (etapa de gástrula) o después de la diferenciación; el daño no es muy grave pues la (o las) célula (s) muerta es reemplazada por otra. Sin embargo, si la muerte celular se presenta durante el estado de gástrula o en etapas posteriores, las consecuencias pueden ser desastrosas para el

desarrollo de un órgano presentándose anomalías congénitas (39). La muerte de muchas células en un organismo adulto es capaz de reducir la vitalidad y puede contribuir a un envejecimiento temprano.

Por otro lado, las mutaciones en células germinales - pueden provocar alteraciones hereditarias que conducen a un desarrollo anormal del feto, abortos tempranos o bien a productos con alteraciones morfológicas, también pueden expresarse en una etapa posterior como alteraciones metabólicas, neurológicas, - del desarrollo sexual, etc.

En el organismo adulto, la mayoría de las mutaciones - somáticas conducen a la inactivación de funciones o a la muerte celular, o bien a tipos celulares anormales o neoplasmas (cáncer) (26). Se ha señalado una alta correlación entre la actividad mutagénica y carcinogénica de un gran número de compuestos (2,18,43,44,47,61,62)

De aquí surge la inmediata necesidad de identificar - de manera rápida y eficaz las sustancias potencialmente mutagénicas y/o carcinogénicas con el propósito de prevenir sus efectos en el hombre y su transmisión a generaciones futuras. Debido a una serie de factores que imposibilitan este tipo de estudios en el hombre de manera directa, se han desarrollado una se

rie de técnicas en diferentes organismos que permiten identificar distintos tipos de alteraciones genéticas. Entre éstas se encuentran las pruebas in vivo e in vitro que detectan mutaciones puntuales (1,10,47,54,75), aberraciones cromosómicas estructurales (22, 23) y no disyunción, o aberraciones cromosómicas numéricas (16, 41, 55, 70)

Ahora bien, se ha visto en repetidas ocasiones que los metabolitos de un compuesto químico inocuo o inerte per se, tienen una potente actividad mutagénica y/o tóxica por lo que varios sistemas de prueba in vitro han incorporado una preparación enzimática para reproducir las diferentes reacciones que se llevan a cabo in vivo en los procesos metabólicos de mamíferos (1, 6, 17, 29, 45, 48, 73). Asimismo, los estudios se pueden realizar introduciendo sistemas microbianos en un hospedero mamífero para que sean expuestos a las sustancias en condiciones naturales de metabolismo in vivo (24, 51), o bien, utilizando fluídos corporales (sangre y orina) de animales o de humanos para detectar la presencia de metabolitos activos haciendo pruebas con estos fluídos en microorganismos o en células de mamíferos en cultivo (14, 59).

Por lo general estas pruebas son de sencilla realización, altamente sensibles, reproducibles y proporcionan resultados confiables aunque limitados al tipo específico de daño que miden. Asimismo, debido a que el resultado obtenido en un

organismo no se puede extrapolar a otro diferente, para poder hacer una evaluación confiable sobre la potencialidad mutagénica de cualquier compuesto, es necesario hacer pruebas en varios organismos que midan diferentes eventos genéticos, los resultados así obtenidos ayudarían a formular medidas preventivas. Es importante señalar aquí que los resultados de los estudios epidemiológicos realizados en hombre, expuestos en condiciones laborales a cloruro de vinilo y halotanos, sugieren una correlación entre los datos experimentales y los efectos en poblaciones humanas manifestados como una incidencia elevada de abortos y de padecimientos congénitos en la descendencia (15, 38).

Conscientes de la importancia de investigar la capacidad mutagénica de compuestos químicos de amplia difusión o consumo, nos propusimos estudiar la actividad genética de medicamentos antiparasitarios ya que en México, como en muchos otros países del mundo, las enfermedades parasitarias constituyen un problema de salud pública difícil de erradicar. Un porcentaje bastante alto de la población y que está -constituida por individuos de ambos sexos y de todas las edades, se ve afectada por este tipo de padecimientos, y muchas veces, el tratamiento médico es prolongado o se repite con -frecuencia por la incidencia de la enfermedad. Hasta ahora,

son muy pocos los estudios que se han realizado para detectar la actividad mutagénica de los compuestos comúnmente utilizados en el tratamiento de parasitosis intestinales. (Tabla III). Para este estudio se eligieron tres compuestos antihelmínticos: el Pamoato de Pirvinio, el Mebendazol y el Citrato de Piperacina. (Ver uso en Tabla IV). La valoración de la actividad mutagénica de estos compuestos se realizó empleando como sistema biológico de prueba a la levadura Saccharomyces cerevisiae en la que se detectan mutaciones a nivel molecular (puntuales) a través de la reversión de marcadores genéticos.

TABLA I. CAUSAS DE LAS MUTACIONES

Físicas:

1. Rompimiento mecánico de la molécula de ADN
2. Rompimiento por diferentes tipos de radiaciones
3. No disyunción de los cromosomas
4. Altas temperaturas

Químicas:

1. Alteración o removimiento de bases en el ADN
2. Incorporación de bases alteradas
3. Intercalación de compuestos
4. Alteración de la estructura del ADN

Enzimáticas:

1. Producción de compuestos químicos que afecten el ADN
2. Errores del sistema de replicación del ADN
3. Alteración del sistema de replicación del ADN
4. Errores en la recombinación o reparación

FIGURA 1. TIPOS DE ALTERACIONES HEREDITARIAS

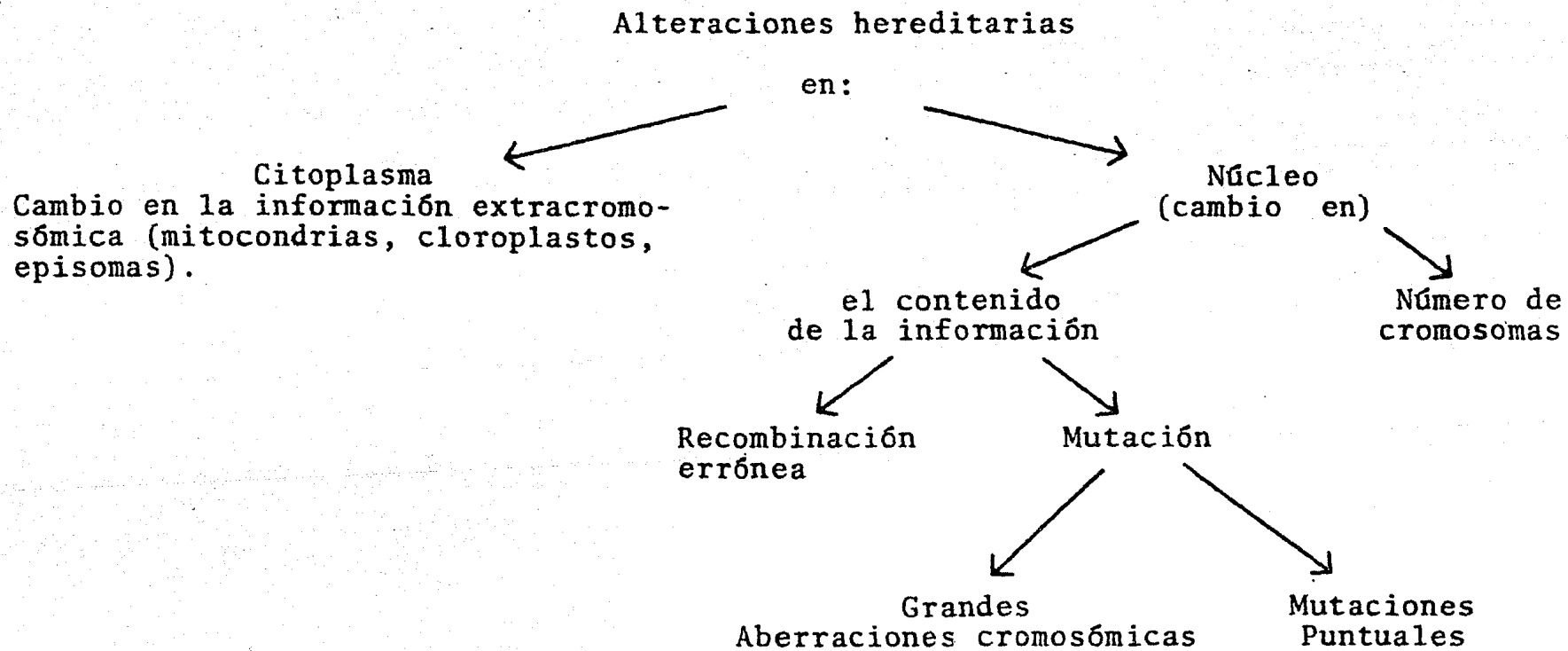


TABLA II. EFECTOS FENOTÍPICOS DE ALTERACIONES LETALES O MUTAGENICAS DE CELULAS INDIVIDUALES EN UN ORGANISMO MULTICELULAR (26):

<u>Tipo de Célula</u> (Estado de Desarrollo)	<u>Célula Muerta</u>	<u>Célula Mutada</u>	
		Dominante	Recesiva
		Ej. Pérdida de un represor por deleción, efecto de un cromosoma extra por translocación, etc.	Ej. Mutación puntual, deleción o aberración críptica (translocación).
<u>Células Somáticas</u>			
Desarrollo muy temprano (hasta blástula)	--	Desarrollo anormal (teratogénesis); muerte fetal.	
Desarrollo temprano - (a partir de gástrula y etapas subsecuentes)	Desarrollo anormal (teratogénesis)	Desarrollo anormal (teratogénesis); muerte fetal.	
Otras etapas de desarrollo (hasta adulto)	--	Neoplásicos (cáncer)	
<u>Células Germinales</u>			
	--	Letal (muerte fetal= aborto) u otros efectos fenotípicos como malformaciones, enfermedades metabólicas o neurológicas: mongolismo, síndrome de Turner, esterilidad. Se expresa en las siguientes generaciones.	Efecto letal o fenotípico. Se expresa en las generaciones siguientes cuando está en forma homocigota o cuando la información dominante se localiza en una región inactivada del cromosoma.

Gametos

--

Letal o malformaciones.
Se expresa en las generaciones sobrevivientes como enfermedades metabólicas, neurológicas y otras.

Efecto letal o fenotípico. Se expresa en las generaciones siguientes cuando está en forma homocigota o cuando la información dominante se localiza en una región inactivada del cromosoma.

TABLA III. DROGAS ANTIPARASITARIAS

Aspectos Estudiados en Relación a Mutagénesis

MEDICAMENTOS	A D N			Mutaciones génicas			Anomalías mitóticas (Células de mamífero)	Lesiones cromosómicas		No disyunción	Micro- núcleos	Instituciones detalles	Translu- ciones hereda- bles
	S í n t e s i s	R e p a r a c i ó n	L e s i o n e s	B a c t e r i a s	H o n g o s	D i o s o p h i l a		K a t ó n	H u m a n o				
I Antiazolamidos y antigárdiasicos: Cloroquina	1 5	6 12	13 15	15, 16			17		18,19			20	
Imetina													
Diyodohidroarqui- noleina													
Metronidazol			21 23	24 35	36	37			38	39	40		
II Antihelmánticos: belenio				16									
Clorosalicilamida													
Hexilresorcinol													
Mebendazol				41 43			41 43		44			44	44
Piperacina			45, 46	47 49									
Frantel				16 49									
Parvanio				16 49									
Tetrazol													

NOTA. Los números indican las referencias bibliográficas contenidas en el ANEXO.

Referencias

1. Proc. Nat. Acad. Sci. 54: 521, 1965
2. Proc. Nat. Acad. Sci. 55: 1511, 1966
3. Clin. Res. 20: 572, 1972
4. Mol. Pharmacol, 9: 304, 1973
5. Biochem. Pharmacol. 20: 1157, 1971
6. Stud. Biophys. 50: 107, 1975
7. Cancer Res. 35: 1773, 1975
8. Mol. Gen. Genet. 132: 13, 1974
9. Mutat. Res. 25: 391, 1974
10. Exp. Cell Res. 74: 67, 1972
11. Clin. Res. 17: 80, 1969
12. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 202, 1971
13. EMS Newsl. 5: 38, 1971
14. Antimicrob. Agents Chemother. 3: 530, 1973
15. Mutat. Res. 41: 61, 1976
16. Mutat. Res. 54: 230, 1978
17. Strahlentherapie 139: 587, 1970
18. Mutat. Res. 20: 115, 1973
19. Bull. Exp. Biol. Med. (USSR) 82: 1095, 1976
20. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23: 283, 1972
21. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 19, 1978
22. Mol. Pharmacol. 13: 872, 1977
23. J. Antimicrob. Chemother. 3: 43, 1977
24. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72: 5135, 1975
25. Science 188: 1118, 1975
26. Mutat. Res. 26: 483, 1974
27. Cancer Res. 37: 629, 1977
28. Mutat. Res. 38: 203, 1976
29. J. Nat. Cancer Inst. 56: 283, 1976
30. Mutat. Res. 57: 97, 1978
31. Antimicrob. Agents. Chemother. 10: 476, 1976
32. J. Med. Chem. 20: 1588, 1977
33. Cancer (Philadelphia) 38: 1253, 1976
34. Ann. N.Y. Acad. Sci. 269: 16, 1975
35. Mutat. Res. 29: 240, 1975
36. J. Tox. Env. H., 4: 815-824, 1978
37. Mutat. Res. 53: 213, 1978
38. Lancet 2: 802, 1976
39. Kapp, R. (Espermatozoides YY) Reportado en el "Workshop on methodology for assesing reproductive hazards in the work place" realizado en Washington en Abril, 1978.
40. Mutat. Res. 53: 125, 1978
41. Mutat. Res. 21: 50, 1973
42. Therapie 31: 505, 1976
43. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. 282: 517, 1976
44. Mutat. Res. 26: 427, 1974
45. Cancer Res. 33: 3209, 1973
46. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 14: 5, 1973
47. Ann. N.Y. Acad. Sci. 76: 475, 1958
48. Cancer Res. 32: 1598, 1972
49. Mutat. Res. 48: 307, 1977

TABLA IV.
COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS

<u>Compuesto</u>	<u>Parasitosis</u>
Diyodohidroxiquinoleina	Amibiasis intestinal
Emetina	Amibiasis invasora
Cloroquina	Amibiasis hepática
Metronidazol	Amibiasis Invasora. Giardiasis
Clorosalicilamida	Taeniasis . Hymenolepiasis
Tetramizol	Ascariasis
Piperacina	Ascariasis. Enterobiasis
Mebendazol	Ascariasis. Enterobiasis
	Uncinariasis
Pirvinio	Enterobiasis. Estrongiloidosis
Hexilresorcinol	Tricocefalosis
Befenio	Parasitosis intestinal por <u>A. duodenale</u> , <u>N. americanus</u>

+ Datos tomados del Diario Oficial del 2 de diciembre de 1977

GENERALIDADES

1. Mecanismos moleculares de las mutaciones

Para poder comprender mejor los mecanismos a través de los cuales se originan las mutaciones conviene hacer una breve revisión de la estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) que es donde se encuentra contenida la información genética, y de la manera como ésta se duplica.

El ADN consta generalmente de dos cadenas de polinucleótidos enrolladas sobre sí mismas en una hélice regular. Cada cadena contiene un grán número de nucleótidos. Existen cuatro nucleótidos principales, cada uno de ellos constituido por una base púrica (adenina o guanina) o pirimídica (timina o citosina), un azúcar (desoxirribosa) y un grupo fosfato. Su secuencia a lo largo de una cadena determinada es muy irregular. Las dos cadenas se mantienen juntas mediante enlaces de hidrógeno entre pares de bases. La adenina está unida siempre con la timina y la guanina lo está siempre con la citosina. La existencia de pares de bases significa que las secuencias de nucleótidos a lo largo de dos cadenas no son idénticas pero sí complementarias. La duplicación del ADN se realiza con las dos hebras separa

das, permitiendo a cada una de ellas actuar como molde para la síntesis de cadenas complementarias. La exactitud del proceso de duplicación mantiene la secuencia precisa de bases que determina la información contenida en el ADN. La posibilidad de que ocurra un cambio (mutación) durante la duplicación, bajo condiciones óptimas, es tan baja como de 10^{-8} a 10^{-9} .

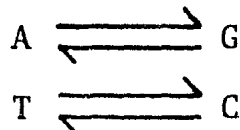
Las moléculas de ADN no son los moldes directos para la síntesis de polipéptidos. Cada triplete de bases (codón) determina la posición de un aminoácido dado en una molécula polipeptídica. Para ésto, primero la información del ADN se tiene que transferir a las moléculas de ácido ribonucleico mensajeras (ARN m), éstas actúan como los moldes primarios que ordenan la secuencia de aminoácidos en las proteínas. El ADN se transcribe a su vez en forma de ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) y de transferencia (ARNt) que toman parte durante la síntesis de proteínas.

Una mutación se define como todo aquel cambio micro o macromolecular que ocurre en el material genético y altera la secuencia de bases en la cadena nucleotídica. Pueden ocurrir de manera espontánea o inducidas por diferentes agentes físicos y químicos. (Tabla I).

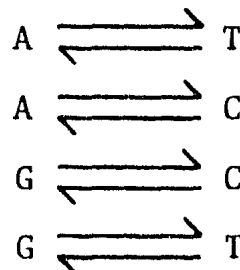
Se han reconocido los siguientes tipos de mutaciones:

Cambio de un par de bases. Durante la replicación del ADN se pueden presentar errores de apareamiento de las bases, por ejemplo, que la adenina se aparee con la citosina en lugar de hacerlo con la timina, o que la guanina se aparee con la timina y no con la citosina. La adenina y la guanina son bases púricas, la citosina y la timina son pirimidicas. Cuando una purina es sustituida por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina este cambio se denomina transición. El cambio de una purina por una pirimidina o viceversa se denomina transversión.

Transición:



Transversión:



El intercambio de una base por otra puede inducir dos tipos de mutaciones:

- a) Mutaciones de sentido equivocado, donde el cambio de una base en un codón resulta en la sustitución de un

aminoácido por otro. La trascendencia de este cambio va a depender de la posición de dicho aminoácido en la cadena polipeptídica y puede conducir a la formación de un polipéptido con función disminuida (deficiente) o completamente inactivo.

- b) Mutaciones sin sentido, si el cambio de una base produce un codón de terminación (ocreo UAA, ámbar UAG u ópalo UGA). Durante la síntesis de proteínas ninguno de estos codones es leído por los ARNt y en ese sitio se para la síntesis resultando en una terminación prematura de la cadena polipeptídica. El efecto de una mutación de este tipo depende del sitio donde se localiza el cambio y se pueden producir proteínas con una actividad disminuida o se puede bloquear totalmente su síntesis.

Adición o delección de un par de bases

A este tipo de cambio se le conoce como corrimiento fuera de formato porque la lectura correcta de los codones se ve desplazada a partir del sitio en que hubo la inserción o la delección de una base, resultando en tripletes que codifican para diferentes aminoácidos. Por lo general, las consecuencias -

son mucho más drásticas que las de una mutación por sustitución de bases.

Grandes deleciones o rearrreglos. El material genético puede sufrir la pérdida de pequeños y grandes segmentos constituidos por varios pares, cientos o miles de nucleótidos. El proceso mutacional básico parece ser un rompimiento seguido por un rearrreglo de los fragmentos, éstos se pueden invertir, intercambiarse o translocarse en los cromosomas.

Distribución desigual de los cromosomas en las células hijas. También se conoce como no disyunción y frecuentemente es provocada por agentes que alteran la formación y función del sistema de microtúbulos que forman las fibras del huso, responsable de la distribución equitativa de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.

El mantenimiento de la información genética correcta en una célula es sumamente importante y se han desarrollado varios mecanismos para proteger este material de lesiones o para repararlas si llegaran a ocurrir (Tabla V). El conocimiento de la existencia de esos mecanismos así como su especificidad es de mucho valor para poder comprender los efectos producidos mutágenos ambientales. Algunos agentes mutagénicos que son extremadamente activos en el ADN aislado pueden no tener efecto en células,

ya sea porque no penetran a través de la membrana celular o nuclear (por ejemplo, compuestos cargados negativamente); son inactivados metabólicamente dentro de la célula, o porque su efecto es reparado enzimáticamente. Por el contrario, otros compuestos que afectan muy poco o nada al ADN aislado pueden alterar el material hereditario si son activados por enzimas dentro de la célula (ej., el uretano), o si el daño que producen en el ADN no es reparado.

En organismos procariontes y eucariontes se han identificado sistemas de reparación que corrigen ciertos tipos de lesiones del ADN; por ejemplo, los dímeros de pirimidinas (37,67) inducidos por luz ultravioleta, la metilación del ADN, o los rompimientos cromosómicos inducidos por rayos X. Las reacciones de reparación incluyen la excisión de los nucleótidos alterados, una síntesis de reparación en la cual se copia la cadena complementaria, y finalmente la unión de los extremos abiertos mediante la acción de una enzima ligasa, (42). Diversos organismos difieren en los tipos de enzimas de reparación de que disponen. En humanos, se conoce igualmente la existencia de dichos sistemas y su alteración es causa de anomalías en la salud como en la enfermedad hereditaria Xeroderma pig-

mentosa que se debe a una deficiencia en el sistema que repara los dímeros de timina inducidos por luz UV, las personas que padecen esta enfermedad son muy sensibles a este tipo de radiación que es capaz de provocar cáncer en la piel (12).

Algunos de los procesos de reparación se llevan a cabo con mucha exactitud en cambio otros no son muy precisos y pueden dar origen a mutaciones. Se ha visto en microorganismos que mutantes de algunos de los sistemas de reparación presentan una mayor sensibilidad a la actividad de varios compuestos químicos. Los programas de identificación de mutágenos químicos generalmente incluyen pruebas que utilizan mutantes deficientes en dichos sistemas, ya que el espectro de alteraciones genéticas detectadas en éstos se amplifica, (18).

Los mutágenos pueden actuar sobre el material genético de dos maneras: en cualquier momento del ciclo celular (agentes alquilantes, arilantes, etc.) o durante el curso de un proceso dinámico, como la replicación del ADN (análogos de bases y agentes intercalantes).

Los mutágenos químicos se pueden clasificar de la siguiente manera de acuerdo al tipo de reacción que llevan a cabo con el ADN:

1. Alquilantes. Existen varios sitios en la molécula de ADN que pueden reaccionar con agentes alquilantes. Al parecer las posiciones N-7 y O-6 de la guanina son los sitios más frecuentemente alquilados, de ahí que el par de bases GC es donde ocurren el mayor número de mutaciones. La alquilación de la guanina puede modificar la base de manera que se aparee erróneamente, o también conducir a su eliminación del ADN (depurinización), induciéndose mutaciones por sustitución de bases (del tipo de transición) de un par G:C hacia uno A:T. Los agentes alquilantes con más de un grupo alquil activo (polifuncionales) pueden provocar entrecruzamiento de las cadenas de ADN e inhibir la replicación. Estos agentes además de producir mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas son asimismo tóxicos, teratogénicos y producen cáncer.

2. Arilantes. Son principalmente antibióticos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Estos compuestos reaccionan con el ADN a través de una unión covalente con los grupos funcionales reactivos. Debido a que muchos de estos compuestos son policíclicos se ha visto que también pueden intercalarse en el ADN, dando por resultado mutaciones por corrimiento fuera de formato. La informa

ción disponible sugiere que la base con que más frecuentemente reaccionan es la guanina.

3. Intercalantes. Estos compuestos forman complejos con el ADN después de que se intercalan dentro de la hélice de dicha molécula. Esta acción generalmente provoca una distorsión de la estructura normal del ADN debida a una extensión y desenrollamiento de la molécula, las distorsiones producidas pueden inducir errores durante la replicación provocando la inserción o delección de un par de bases (corrimiento fuera de formato). Los agentes intercalantes que tienen cadenas laterales activas, por ejemplo grupos alquilantes, son capaces de producir simultáneamente alquilaciones e intercalarse con el ADN. El principal grupo de este tipo de compuestos lo constituyen las acridinas.

4. Análogos de bases. Los compuestos de este tipo compiten con bases normales durante la replicación del ADN. La presencia de estas pseudobases provoca errores en el apareamiento de las bases que pueden originar mutaciones por transición de un par G:C hacia uno A:T o viceversa. Ejemplos de estas sustancias son el 5-bromouracilo y la 2-aminopurina.

5. Desaminantes. Todos estos agentes parecen tener una característica en común: atacan preferencialmente a la citosina, enseguida a la guanina y con menor frecuencia a la adenina. La timina no reacciona con estos compuestos debido a que no tiene un grupo amino. Las mutaciones inducidas por la desaminación de las bases son del tipo de transición, por lo general, de un par G:C a uno A:T. El ácido nitroso y la hidroxilamina pertenecen a este grupo, producen mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas.

6. Venenos mitóticos. Estos compuestos interfieren con la formación del huso mitótico y el funcionamiento de otras estructuras mitóticas (centriolos, centrómeros) y consecuentemente alteran la segregación cromosómica. Su actividad se debe a que forman complejos con los componentes proteínicos de los microtúbulos que constituyen las fibras del huso o de las estructuras citadas, produciendo cambios en ploidía. La colchicina constituye el mejor ejemplo de este tipo de agentes.

7. Inhibidores enzimáticos. Son aquellos compuestos que inhiben la actividad de enzimas involucradas en la biosíntesis de las bases púricas y pirimídicas normales, o también la actividad de las enzimas de reparación. Aunque -

estos mecanismos no son en sí los responsables directos de las mutaciones, crean una situación que favorece que éstas se originen. Por ejemplo, la inhibición de las enzimas de reparación aumenta la sensibilidad de la célula a la actividad de otros agentes químicos, las mutaciones producidas no reparadas pueden ser letales a la célula o bien se fijan en el ADN.

Las mutaciones en un gene que codifica para una enzima particular, pueden provocar la pérdida de su actividad. Si esta enzima cataliza uno de los pasos de una vía biosintética, por ejemplo la biosíntesis de un aminoácido, la mutación se va a expresar como un requerimiento del mismo. Una mutación en otros genes asociados con la misma vía, también impondrá dicho requerimiento a la célula. En levaduras y en otros organismos se han podido determinar muchas de las relaciones gene-enzima asociadas con la síntesis de aminoácidos y bases, así también ha sido posible aislar una serie de mutantes que tienen bloqueos en algún paso de una vía biosintética específica. Estos mutantes bioquímicos se denominan auxótrofos, no pueden crecer en un medio que sólo tiene los elementos nutritivos que requiere un organismo de tipo silvestre, por lo que se necesita adicionar al medio el aminoácido o

la base específica que no pueden sintetizar.

Se conocen asimismo, muchos ejemplos en los cuales una mutación nociva puede revertirse mediante un segundo cambio genético que restablece la actividad de la proteína afectada por la mutación inicial. Se han señalado dos mecanismos de reversión:

1. Reversión verdadera. Que restaura la secuencia de nucleótidos alterada en el gene estructural.
2. Mutaciones supresoras. Ocurren en un sitio diferente del cromosoma, actúan permitiendo la producción de copias normales o parcialmente normales de la proteína que la mutación original afectó. Las mutaciones supresoras pertenecen a dos categorías: las debidas a cambios de nucleótidos dentro del mismo gene como la mutación original pero en un sitio diferente (supresión intragénica) y las que ocurren en otro gene (supresión intergénica). Los genes que ocasionan supresiones en otros genes se denominan genes supresores.

El siguiente esquema muestra los posibles revertantes que resultaron de una segunda sustitución de bases en los experimentos de Yanofsky (36):

Aminoácido del tipo silvestre

Aminoácido del mutante

CGA
glicina

AGA
arginina



CGA
glicina

reversión
verdadera

Supresiones:

AGU
serina

revertante
completo

ACA
treonina

revertante
parcial

AUA
isoleucina

revertante
parcial

Una mutación sin sentido también puede suprimir se a través de una segunda sustitución de bases, el siguiente esquema proviene del trabajo de Koch (40) en el bacteriófago T₄:

<u>Tipo de mutación</u>	<u>Codón</u>	<u>Aminoácido</u>	<u>Fenotipo</u>
	CAG	glutamina	silvestre
Mutación primaria transición C → U	UAG	codón de terminación de cadena	mutante
Reversión verdadera transición U → C	CAG	glutamina	silvestre
Supresión transición A → G	CGG	triptofano	mutante

La supresión intragénica de una mutación por co
rrimiento fuera de formato puede ocurrir cuando una segund
da mutación inserta o suprime un nuevo nucleótido cerca -
del cambio original y restaura así la disposición origin
nal de codones mas allá del segundo cambio. Aunque todav
vía hay codones desordenados entre los dos sitios, hay -
buenas probabilidades (debidas a la degeneración del códi
go genético) para que todos los tripletes desordenados
codifiquen algún aminoácido, en este caso se pueden produc
cir proteínas completas a menudo funcionales, (Fig. 2).

Las supresiones también pueden originarse en ge
nes que controlan la formación de ARNt. Existe una molécu
cula específica de ARNt para cada aminoácido, cada una de
ellas lleva un juego de tres bases (anticodón) que se aco
pla a un codón complementario en el ARNm durante la sínte
sis de polipéptidos. Un cambio en el anticodón de un -
ARNt resultante de una mutación provocará que durante la
lectura del ARNm el ARNt mutante inserte el aminoácido -
que transporta en un sitio equivocado, pero si este amin
noácido es adecuado a ese sitio de la cadena polipeptídi
ca se restaura su función dando un fenotipo revertante.

La siguiente tabla que resultó de los trabajos de Carbón y Curry (9) muestra un caso de supresión mediada por ARNt:

<u>Codón en ARNm</u>	<u>Anticodón</u>	<u>Aminoácido insertado</u>	<u>Enzima</u>
GGA	CCU normal de gli-ARNt	glicina	normal
AGA	UCU normal de arg-ARNt	arginina	mutante
AGA	UCU mutante de gli-ARNt	glicina	normal

Existen tres codones de terminación de cadena, UAA, UGA y UAG, que durante la lectura del ARNm no son reconocidos por ningún ARNt y en ese sitio se detiene la síntesis del polipéptido. La supresión de una mutación sin sentido se puede efectuar a través de una mutación en el anticodón de un ARNt de manera que ahora éste sea capaz de reconocer un codón de terminación y en ese sitio inserte el aminoácido que acarrea, permitiendo que se produzca una proteína normal. En E. coli se ha demostrado un caso de supresión que opera a través de este mecanismo (33). Los

supresores sin sentido son más o menos específicos para cada uno de los tres codones de terminación y suprimen todas las mutaciones producidas por uno de esos codones dondequiera que se presenten. Su actividad entonces no se limita a un solo gene, por ejemplo, un supresor ocre eficiente puede restaurar la función de muchos genes auxótrofos que lleven una mutación de ese tipo. Debido a la acción pleiotrópica que ejercen, con frecuencia a los supresores de mutaciones sin sentido se les denomina supersupresores.

TABLA V. MECANISMOS DE PROTECCION CELULAR QUE EVITAN
ALTERACIONES EN EL MATERIAL GENETICO (ADN).

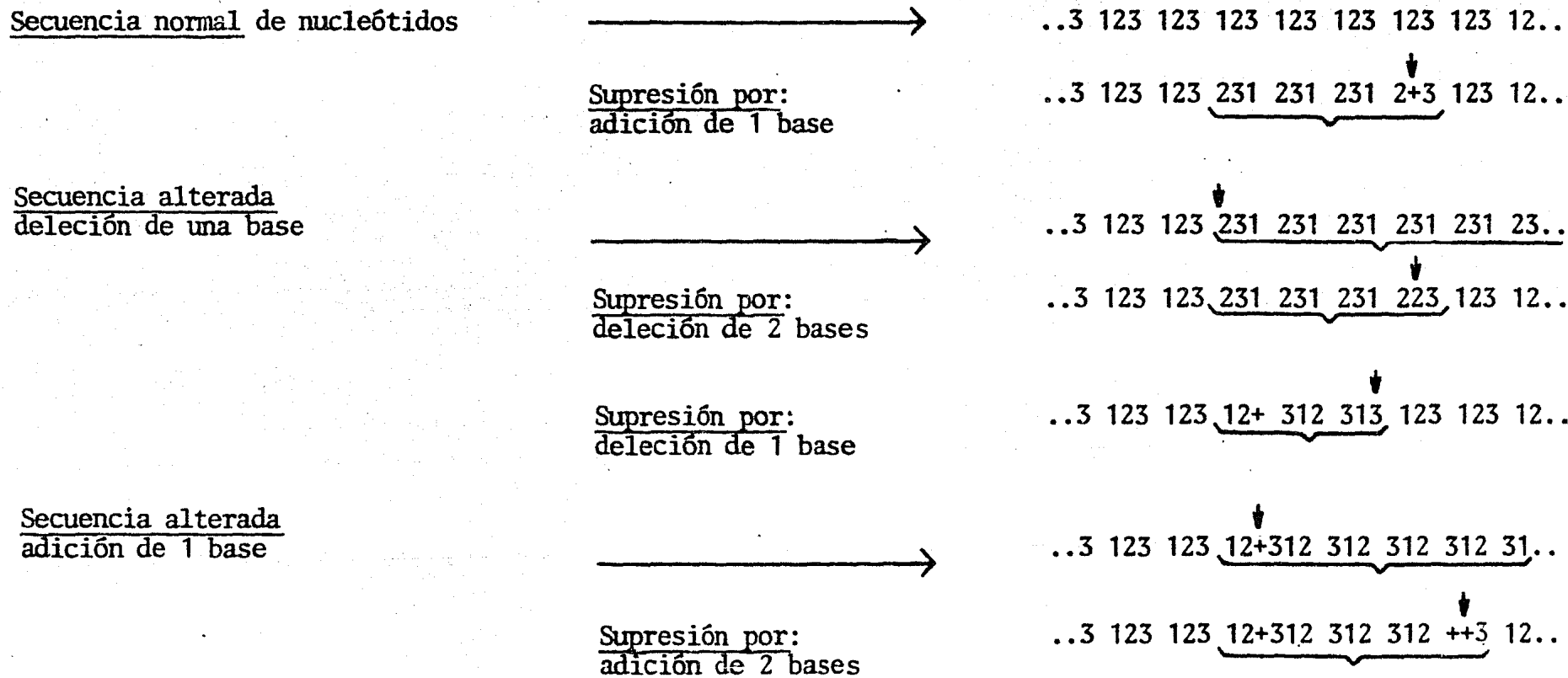
Estructurales

1. Permeabilidad de las membranas celular y nuclear.
2. Asociación del ADN con proteínas básicas para formar cromosomas.
3. Precisión de la segregación cromosómica mediante el concurso del aparato mitótico.

Enzimáticos

1. Inactividad metabólica de compuestos químicos nocivos.
2. Especificidad de las enzimas involucradas en la replicación.
3. Sistemas de reparación.
4. Mantenimiento del pH, concentración iónica, etc.

FIGURA 2. SUPRESION DE UNA MUTACION POR CORRIMIENTO FUERA DE FORMATO



* Las flechas cortas muestran el sitio de la adición o delección. Las llaves señalan la región de codones alterada.

2. Sistema de activación metabólica in vitro

Se ha visto en repetidas ocasiones que el metabolismo de un compuesto químico inerte per se puede generar metabolitos sumamente activos: tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, (6,14,17,28,29,45,46,47,48,57,59,69,73).

El principal sitio del metabolismo en mamíferos es el hígado. Las enzimas responsables de las diferentes reacciones metabólicas se localizan en el retículo endoplásmico. Al homogenizar y centrifugar el hígado se obtiene una fracción que se denomina "microsomal". Esta fracción contiene un sistema transportador de electrones que oxida diversas moléculas exógenas en presencia de O_2 y NADPH. El citocromo P_{450} es una flavoproteína que actúa como oxidasa terminal, se denomina así porque en forma reducida reacciona con monóxido de carbono formando un complejo que presenta un pico de absorción a 450 nm (32,69). El sistema microsomal cataliza diferentes reacciones oxidativas. (Tabla VI).

Dado que algunos microorganismos carecen de los sistemas bioquímicos de activación presentes en mamíferos, varios sistemas que utilizan este tipo de organismos para estudios de mutágenos químicos incorporan la fracción microsomal mas algunos cofactores (NADPH, Mg^{2+} , Glucosa-6-Fosfato) para detectar in vitro la presencia de metabolitos activos, (1,29,46,51,59).

TABLA VI.

REACCIONES METABOLICAS LLEVADAS A CABO POR EL SISTEMA ENZIMATICO P₄₅₀ PRESENTE EN MICROSOMAS HEPATICOS DE MAMIFEROS

TIPO DE REACCION	SUSTRATO	PRODUCTO
Hidroxilación aromática	Anilina	p-Aminofenol
Hidroxilación alifática	Hexobarbital	Hidroxihexobarbital
Formación de óxido de areno	Bromobenceno	Epóxido de bromobenceno
<u>N</u> -Dealquilación	Aminopirina	4- Aminoentipirina
<u>N</u> -Hidroxilación	2- Acetilaminofluoreno	N-Hidroxi-2-acetilaminofluoreno
<u>O</u> -Dealquilación	p-Acetanisidina	p-Hidroxiacetanilida
<u>S</u> -Dealquilación	6-Metiltiopurina	6-Tiopurina
<u>N</u> -oxidación	Dimetilanilina	Dimetilanilina <u>N</u> -óxido
<u>S</u> -oxidación	Cloropromacina	Sulfóxido de cloropromacina
<u>S</u> -oxidación	Sulfuro de diaminodifenil	Sulfóxido de diaminodifenil
<u>N</u> -aminación	Amfetamina	Fenilacetona
Desulfuración	<u>O</u> -etil- <u>O</u> (4 nitrofenil) fenil fosfonotionato	<u>O</u> -etil- <u>O</u> - (p-nitrofenil) fenil fosfato
Declorinación	Tetracloruro de carbono	Cloroformo

Declorinación

Halotano

--

Dealquilación de
metaloalcaloides

Tetraetilo de
plomo

Trietilo de plomo

Tomado de: Gillett, J. R., (1972), en: In vitro Metabolic -
Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, -
F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., Philpot, R. M.,
(eds.), North Holland Publishing Company, New -
York: 38

3. Sistema experimental para estudios de mutagénesis en *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucarionte, unicelular y uninucleado, puede existir en forma estable en fase haploide o diploide, su tiempo de generación es corto y sus requerimientos nutricionales sencillos. Dadas las ventajas que presenta se han elaborado diferentes técnicas para la utilización de este organismo en la detección de manera rápida de diferentes eventos genéticos. Por lo general estas técnicas se incluyen dentro de los programas de identificación de mutágenos químicos. La actividad mutagénica de una sustancia química particular se puede valorar a través de la inducción de mutaciones puntuales (53, 56, 59, 74, 75), recombinación mitótica (74, 75, 76), conversión génica (74, 75, 76) y no disyunción (55).

3.1. Características de la cepa XVI85-14C construida especialmente para detectar mutágenos químicos

La cepa XV185-14C es haploide y su genotipo es el siguiente:

ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1, trp 5-48, his 1-7, hom 3-10

Los marcadores ade 2-1, arg4-17, lys 1-1 y trp 5-48 son mutaciones supresibles de la variedad ocre (mutación por sustitución de bases sin sentido que produjo un codón ocre - UAA). Revierten por un segundo cambio en el mismo locus o en un locus supresor. Existen ocho genes supresores diferentes que suprimen las mutaciones de los alelos ade 2-1, arg 4-17, y lys 1-1 y estos son: SUP2, SUP3, SUP4, SUP5, SUP6, SUP7, SUP8 y SUP11, todos ellos son genes que transcriben ARNt de tirosina. El marcador trp 5-48 es supresible por un número mayor de supresores, aproximadamente 50 que codifican diferentes ARN de transferencia. A continuación se muestran las enzimas afectadas por estas mutaciones así como su efecto fenotípico.

Marcador	Enzima	Fenotipo
ade 2-1	Fosforribosil aminoimidazol carboxilasa	Requerimiento de adenina, colonias rojas
arg 4-17	Arginosuccinato liasa	Requerimiento de arginina
lys 1-1	Sacaropina dehidrogenasa	Requerimiento de lisina
trp 5-48	Triptofano sintetasa	Requerimiento de triptofano

El marcador his 1-7 es una mutación de sentido equivocado. La enzima afectada es la ATP fosforribosil transferasa y su deficiencia produce un requerimiento de histidina. Este marcador revierte a una frecuencia tres o cuatro veces mayor que el marcador lys 1-1. No se han encontrado supresores externos para este marcador, por lo tanto, su reversión se efectúa a través de mutaciones intragénicas. El marcador hom 3-10 es una mutación por corrimiento fuera de formato, la enzima afectada es la Aspartoquinasa, su deficiencia produce un requerimiento de treonina y metionina o de homoserina. Tampoco se han encontrado supresores externos para este alelo.

Para poder medir la reversión de cada uno de los diferentes marcadores, las células tratadas con un compuesto químico particular se siembran en un medio que contenga todos los requerimientos esenciales para su crecimiento, excepto histidina.

4. Características de los compuestos en estudio

4.1 Pamoato de Pirvinio

Este compuesto pertenece a una serie de colorantes de cianina. Su estructura química se presenta en la Fig. 3. Se utiliza en el tratamiento de Enterobiasis y Estrongiloidiosis. Su actividad antihelmíntica está asociada con una inhibición de la respiración en los helmintos aerobios y una interferencia con la absorción de la glucosa exógena en helmintos intestinales. Administrado oralmente no es absorbido del tracto gastrointestinal en un grado considerable (34). Hasta ahora sólo se han realizado dos estudios para medir su actividad genética, el de Mac Phee y Podger (48) en Salmonella typhimurium, en donde se obtuvieron resultados positivos cuando las células fueron tratadas con la droga en presencia de la mezcla S-9, produjo mutaciones por corrimiento fuera de formato y sustitución de bases; el estudio de Tutikawa, et. al. (68) en Bacillus subtilis y Salmonella typhimurium, el Pamoato de Pirvinio no mostró actividad mutagénica, sin embargo cuando incubaron la droga con nitrito de sodio en un medio ácido a 37°C y probaron la mezcla de reacción en S. typhimurium, se obtuvieron resultados positivos.

4.2 Mebendazol

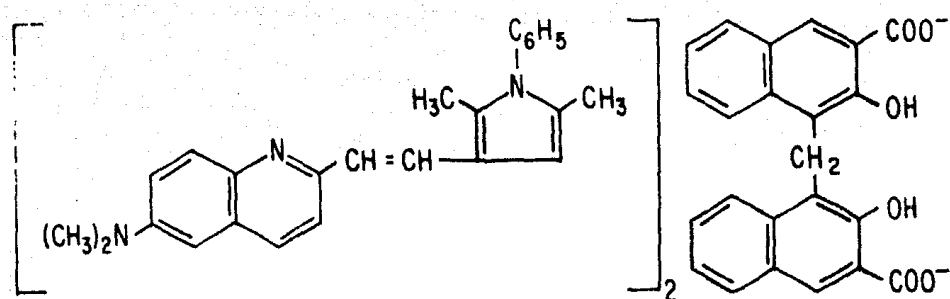
Esta droga pertenece al grupo de los benzimidazoles. Estructura química (ver. Fig. 3). El Mebendazol es un eficaz antihelmíntico contra la Ascariasis, Enterobiasis, Trichuriasis y Uncinariasis. Su actividad nematocida deriva de su habilidad para inhibir la absorción de glucosa en forma irreversible. Cuando se administra oralmente sólo una pequeña proporción es absorbida del tracto gastrointestinal. La excreción del compuesto es generalmente rápida (aproximadamente un 90% es excretado entre las 48 y 72 horas después de su administración). El compuesto es descarboxilado y su metabolito 2-amino se encuentra en la orina y las heces (34). Se han realizado algunos estudios para evaluar su actividad mutagénica en mamíferos (ratón) - que incluyen las pruebas de dominantes letales, la del espermatozoides, translocaciones en F_1 así como la detección de metabolitos activos en el suero de los animales tratados utilizando la prueba con Salmonella typhimurium, obteniéndose resultados negativos en todas ellas (64).

4.3 Citrato de Piperacina

Esta droga es altamente efectiva en el tratamiento de Ascariasis y Enterobiasis. Su estructura química se presen

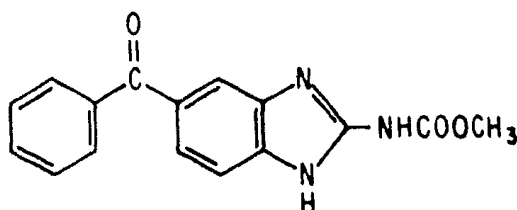
ta en la Fig. 3. En Ascaris altera la permeabilidad de la membrana del músculo produciendo parálisis. La piperacina se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral. Una cantidad es degradada en el cuerpo, el resto es excretada en la orina (34). Los estudios de tipo genético incluyen el de Mac Phee y Podger (48) en Salmonella typhimurium y el de Szybalsky (65) en Escherichia coli, con resultados negativos en ambos. Por otro lado se ha detectado actividad mutagénica de las formas nitrosadas 1-Nitroso-4 metil-piperacina, 1,4-Dinitroso piperacina y 1-Nitrosopiperacina, cuando éstas son metabolizadas en mamíferos; el efecto se detectó a través del ensayo vía el hospedero con Salmonella typhimurium (78).

FIGURA 3. ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS COMPUESTOS



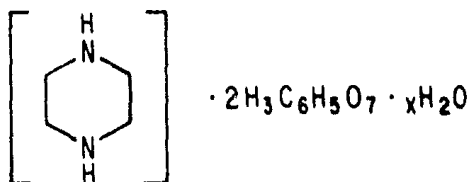
Pamoato de pirvinio

Bis { 6-(dimetil - amino) - 2 - [2 - (2,5 - dimetil - 1 - fenil - 1 - fenil pirrol - 3 - yl) xinil] - 1 - metilquinolinio } 4,4' - metilenebis(3 - hidroxil - 2 - naftoato)



Mebendazol

(Metil - 5 - benzoil - 2 - benzimidazole - 2 - carbamato)



Citrato de piperacina
(Dicitrato de tripiperacina)

MATERIAL

1. Cepa

Se utilizó la cepa haploide XV185-14C de Saccharomyces cerevisiae donada generosamente por el Dr. R. C. Von Borstel, del Departamento de Genética, Universidad de - - Alberta, Edmonton, Canada. Esta cepa fue construida por la Doctora S.Q. Quah, del mismo laboratorio.

2. Medios de cultivo y soluciones.

2.1. Medio completo YEPD

Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Dextrosa	2%
Bacto Agar (para medio sólido)	2%

Todos los ingredientes se esterilizan en autoclave juntos, menos la dextrosa, durante 20 minutos a una temperatura de 120° C, presión de 1.5 Kg./cm². La dextrosa se disuelve aparte en 100 ml. de agua destilada, se esteriliza también en autoclave y se añade al medio posteriormente.

2.2 Medio sintético selectivo

Se puede preparar de dos maneras, utilizando el medio sintético descrito por Wickerham (19), o utilizando la base nitrogenada de levadura sin aminoácidos preparada por los laboratorios Difco (Difco No. Cat. 0919-15).

Medio líquido de Wickerham

<u>Fuente de nitrógeno</u>	<u>Cantidad por 1000 ml</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
<u>Compuestos que suplen a los</u>	
<u>elementos traza</u>	
H_3BO_3	500 μg
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	40 μg
KI	100 μg
$\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200 μg
$\text{Na}_2\text{Mo O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	200 μg
$\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	400 μg
<u>Sales</u>	
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	1 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Na Cl	0.1 g
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O} (+)$	0.1 g

Vitaminas

Biotina	2 μ g
Pantotenato de Calcio	2 μ g
Acido Fólico	400 μ g
Inositol	2 μ g
Niacina	2000 μ g
Acido p-aminobenzoico	200 μ g
HCl-Piridoxina	400 μ g
Rivoflavina	200 μ g
HCL-Tiamina	400 μ g

(+) El cloruro de calcio se disuelve por separado en 1 ml de agua destilada y después se añade al medio, para evitar que se precipite.

Todos los ingredientes se disuelven en un volumen final de 1000 ml de agua destilada. Cada 100 ml de este medio líquido equivalen a 6.7 g de la base anhidra.

Para medir la reversión de marcadores auxótrofos, se adiciona a este medio dextrosa, aminoácidos y bases en las siguientes cantidades:

Medio líquido de Wickerham	100 ml
o base anhidra Difco	6.7 g
Dextrosa	2 %
Agar	2%

Se disuelven los ingredientes en un volumen final de 1000 ml de agua destilada. La dextrosa se disuelve por separado en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos y se añade al medio.

Las soluciones de aminoácidos y de las bases se pueden preparar en forma concentrada al 1% en agua destilada. Se esterilizan por filtración (a través de una unidad Swinex, con filtro Millipore 0.45 um) y se conservan en refrigeración. Se agregan al medio en las siguientes concentraciones, con excepción del que requiere el marcador específico al que se va a medir la frecuencia de reversión.

	<u>Cantidad por 1000 ml</u> <u>de medio sintético</u>
Sulfato de adenina	20 mg
L-Arginina	20 mg
L-Histidina HCl	20 mg
L-Leucina	30 mg
L-Lisina-HCl	20 mg

L-Metionina	20 mg
L-Triptofano	20 mg
L-Treonina	350 mg
Uracilo	20 mg

2.3 Soluciones

I. Solución amortiguadora de fosfatos

(A) KH_2PO_4	9.1 g/1000 ml agua destilada
(B) Na_2HPO_4	10.0 g/1000 ml agua destilada

Se mezclan las soluciones (A) y (B), 600 ml (A) con 900 ml (B). Se ajusta el pH a 7.0 ó a 7.4

Las soluciones ajustadas se esterilizan en autoclave durante 20 minutos. Se almacenan en refrigeración.

II. Solución de Cloruro de Magnesio 0.5 M y Cloruro de Potasio 2.0 M.

$\text{Mg Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.08 g
K Cl	7.45 g

Disolver en 50 ml de agua destilada.

METODO

1. Preparación del homogenado hepático

1.1 Inducción de enzimas de hígado de rata

Para obtener la fracción microsomal S-9 se utilizan ratas macho de 200 g (cepa Sprague Dawley), a las cuales se les inyecta una dosis de Aroclor 1254, de acuerdo al método de Czygan (17) con el propósito de inducir las enzimas microsomales hepáticas. El Aroclor 1245 se prepara diluyéndolo en aceite de maíz, a una concentración de 200 mg/ml, y se administra por vía intraperitoneal a una dosis de 500 mg/kg de peso 5 días antes de sacrificarlas. Las ratas se alimentan normalmente hasta 12 horas antes del sacrificio, cuando se les suspende la comida y la bebida.

1.2 Obtención de la fracción S-9

Una vez que se han sacrificado las ratas, el homogenado hepático se prepara siguiendo el procedimiento de Garner (28).

Todos los pasos se deben llevar a cabo estérilmente, a una temperatura de 4°C, para evitar que se alteren las enzimas.

Las soluciones y el material estéril se mantienen en hielo. Inmediatamente después de extraerse, los hígados se

colocan cada uno en un vaso de precipitado tarado estéril - que contiene un volumen de 15 ml de KCl 0.15 M y se pesan.

Se transfieren a otro vaso con tres volúmenes de KCl 0.15 M (3 ml/g de hígado). Con unas tijeras estériles se corta el hígado en trozos pequeños. El hígado así preparado se homogeniza (homogenizador con brazo de teflón).

El homogenado se centrifuga 10 minutos a 9000 xg. a 4 °C (centrífuga refrigerada Sorbal RC 5, rotor SS-34). El sobrenadante es lo que se denomina fracción S-9, se decanta en viales estériles y se congelan las muestras en hielo seco. Se conservan en un congelador a -70°C. Cada vez que se vaya a utilizar la fracción S-9, se descongela la cantidad necesaria a temperatura ambiente y se conserva en hielo hasta el momento de usarse, el sobrante se desecha.

Se determina la esterilidad de la fracción S-9. Si es necesario esterilizar la fracción, se hace a través de unidades Swinex con prefiltro (Millipore).

2. Determinación de las condiciones óptimas para la valoración del efecto mutagénico de las drogas

La manifestación de la actividad genética de un compuesto químico particular, depende de una serie de factores químicos, físicos y biológicos que afectan la respuesta de las células; (74, 75). Entre estos factores podemos citar: la propia concentración del compuesto, el tiempo de exposición, la etapa del ciclo celular en que se encuentran las células, condiciones de pH y temperatura, así como el manejo de las células después de la exposición.

A continuación se describe el protocolo seguido durante el desarrollo de los experimentos. Para determinar el efecto citotóxico de los compuestos, en una fase preliminar se hicieron pruebas con varias concentraciones de cada uno a diferentes intervalos de tiempo (4, 24 y 48 horas).

Aquí se presentan los resultados de las concentraciones finales con un tiempo de exposición de 24 horas.

Se estudiaron tres concentraciones de cada compuesto (Tabla VII). Se fijaron de acuerdo a su solubilidad en el

solvente. Debido a que el Pamoato de Pirvinio y el Mebendazol son poco solubles en agua, se utilizó como solvente Dimetilsulfóxido (DMSO), dada su capacidad para disolver diversas sustancias químicas, se utiliza comúnmente en experimentos con Saccharomyces cerevisiae ya que a concentraciones no mayores del 10% no ejerce un efecto tóxico en las células y tampoco aumenta la frecuencia de reversión espontánea. (74, 75). La dosis que elegimos fué de 5%. El Citrato de Piperacina sí es soluble en agua, sin embargo, en su estudio se utilizó también DMSO para mantener las mismas condiciones de los experimentos con las otras dos drogas.

Para detectar el efecto mutagénico se midió la reversión de tres de los marcadores de la cepa que detectan mutaciones a través de mecanismos diferentes: dos para sustitución de bases, marcadores his 1-7 (mutación de sentido equivocado) y arg 4-17 (mutación sin sentido), y para corrimiento fuera de formato, el marcador hom 3-10.

La cepa se conserva en cajas con medio completo YPED a 4°C. Cada vez que se va a realizar un experimento se prepara un cultivo fresco con tres días de anticipación; una colonia del cultivo original se siembra en medio completo

sólido y se incubaba durante dos días a 29°C. De aquí se toma una muestra y se suspende en medio completo líquido. Las células se incuban a 29°C con agitación constante durante 24 horas. El día del experimento los pasos a seguir son los siguientes:

10. Determinar la densidad celular del cultivo.

Para ésto se utiliza una cámara cuenta glóbulos o hemocitómetro (Improved Neubauer, Lumicyte, Propper Manufacturing, Co., Inc.); se prepara una dilución 1:100 en agua destilada, se toma una alícuota y se coloca en la cámara del hemocitómetro, las células que se cuentan son aquéllas que caen dentro de la retícula central que está subdividida en 25 unidades (5 x 5) el número resultante se multiplica por 10^6 para obtener el número de células por ml de cultivo. Se lavan las células dos veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y se prepara una suspensión ajustada a 2.5×10^8 células/ml.

20. Preparación de la mezcla S-9

Fracción S-9	0.4 ml
Solución de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5 M y KCl 2.0 M	20 μ l
Glucosa -6- fosfato	2880 μ g
NADP	1480 μ g
Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4	0.6 ml

30. Elaboración de soluciones concentradas del compuesto a probar
40. Para cada concentración a probar se preparan dos tubos de tratamiento

Uno con células suspendidas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y otro con células suspendidas en mezcla S-9 (2.5×10^8 células/ml).

Al tiempo 0 se agrega en cada tubo un volumen específico de la solución concentrada del compuesto en estudio para obtener la dosis final deseada. Se mezcla el compuesto con las células, agitando rápidamente, y se toma la primer muestra; ésta se suspende en solución amortiguadora pH 7.0 ó 7.4 (la que proviene del tubo con mezcla S-9). Los tubos se incuban con agitación constante a 29 ó 37°C (los que tienen mezcla S-9) durante el tiempo de exposición fijado. Las células de cada muestra que se tome a los intervalos de tiempo elegidos se lavan dos veces con solución amortiguadora y se resuspenden con la misma. Para determinar el efecto mutagénico, se siembran alícuotas de 0.1 ml (2.5×10^7 células) en cajas con medio sintético apropiado para cada marcador (tres cajas por concentración) y se incuban a -

29°C durante cinco días. Se calcula el número de revertantes promedio de las tres cajas. Para determinar la citotoxicidad se toma una alícuota de la muestra de células ya lavadas y se diluye hasta tener entre 100 y 200 células en 0.1 ml, se siembran en cajas con medio completo (tres cajas por concentración), se incuban durante tres días a 29°C, se calcula el valor promedio de las tres cajas. La sobrevida se expresa en porcentajes, tomando como 100% los valores obtenidos de la muestra tomada al tiempo 0, y la frecuencia de mutación se reporta como el número de revertantes obtenidas sobre el número de células sembradas (corrigiendo con los datos de sobrevida correspondientes).

TABLA VII. CONCENTRACIONES FINALES ESTUDIADAS DE CADA COM-
PUESTO

PAMOATO DE PIRVINIO

125 $\mu\text{g/ml}$	Solución 1×10^{-4} M
250 $\mu\text{g/ml}$	Solución 2×10^{-4} M
500 $\mu\text{g/ml}$	Solución 4×10^{-4} M

MEBENDAZOL

1110 $\mu\text{g/ml}$	Solución 3.7×10^{-3} M
2220 $\mu\text{g/ml}$	Solución 7.5×10^{-3} M
4440 $\mu\text{g/ml}$	Solución 1.5×10^{-2} M

CITRATO DE PIPERACINA

6240 $\mu\text{g/ml}$	Solución 0.9×10^{-2} M
12480 $\mu\text{g/ml}$	Solución 1.85×10^{-2} M
24960 $\mu\text{g/ml}$	Solución 3.9×10^{-2} M

RESULTADOS

La gráfica de la Fig. 4 muestra las curvas de sobrevivencia de dos controles, con agua destilada y con Dimetil sulfóxido (al 5%). El tiempo de exposición fué de 24 horas. En ambas curvas se observa un crecimiento exponencial de las células, revelando que a esta concentración el DMSO no es tóxico. La Tabla VIII contiene los valores de reversión de los marcadores en los controles.

1. Determinación del efecto citotóxico y mutagénico del Pamoato de Pirvinio

El Pamoato de Pirvinio mostró ser sumamente tóxico para las células. Los porcentajes de sobrevivientes obtenidos al finalizar el tratamiento fueron de 11, 7 y 1% para la dosis de 125, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mientras que las células del control presentaron un incremento de un 10%. (Fig. 5, Gráfica A).

Por otro lado, cuando las células se trataron con la droga en combinación con la mezcla S-9, la toxicidad disminuyó en las dosis de 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$, y tanto en la de 125 $\mu\text{g/ml}$, como en el control, el crecimiento permaneció estacionario. (Fig. 5, Gráfica B).

En la Tabla IX aparecen los valores de reversión de cada uno de los marcadores. En ellas se ve claramente que el Pamoato de Pirvinio es mutagénico per se, ya que produjo incrementos muy altos sobre los valores de reversión en los controles. En las gráficas de la Fig. 6, se muestra que no hay una linealidad en la respuesta con las dosis de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$, el número de revertantes obtenido de cada uno de los marcadores con estas dos dosis fué aproximadamente el mismo. Los aumentos sobre los valores controles fueron de aproximadamente 100 veces el locus de his 1-7, 100 veces de arg 4-17 y entre 40 y 60 veces de hom 3-10. Con la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ estos incrementos se duplicaron y hasta cuadruplicaron, siendo de 300 veces de his1-7, 200 veces de arg 4-17 y 150 veces de hom 3-10.

La mezcla S-9 disminuyó la actividad mutagénica del Pirvinio como se ve en la Tabla X. Se aprecia que no hubo un aumento notable en el número de revertantes con ninguna de las concentraciones empleadas.

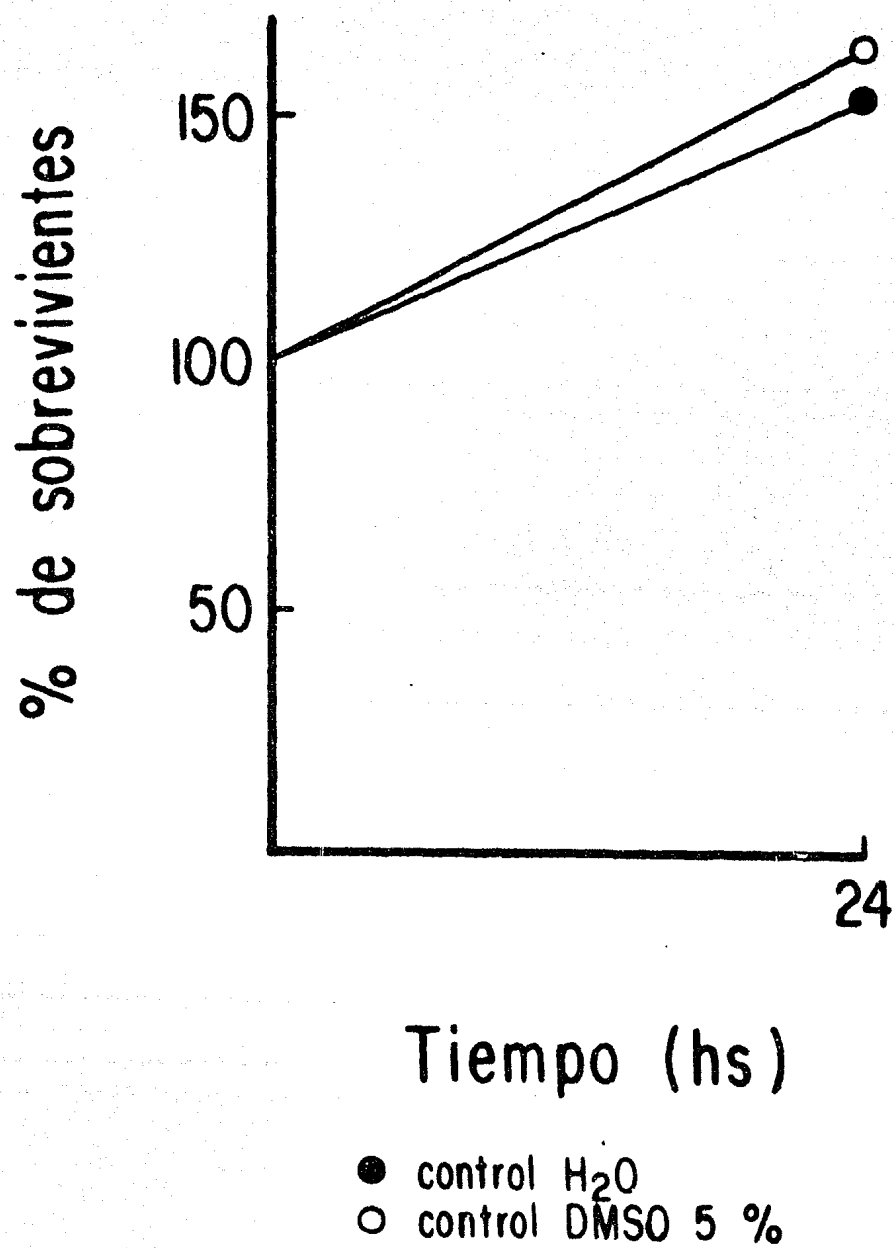


FIGURA 4. CURVAS DE SOBREVIDA DE LOS CONTROLES

TABLA VIII. REVERSION DE LOS MARCADORES his 1-7, arg 4-17 y
hom 3-10 EN LOS CONTROLES.

Control	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
H ₂ O	23.5	15.0	2.5	18.8	8.5	2.9
DMSO 5%	20.9	10.1	2.5	9.1	6.0	2.9
Mezcla S-9	13.7	10.2	3.2	16.0	5.0	1.8
Mezcla S-9 + DMSO 5%	19.7	8.6	2.4	18.5	7.2	2.1

Número de revertantes por 2.5×10^7 sobrevivientes.

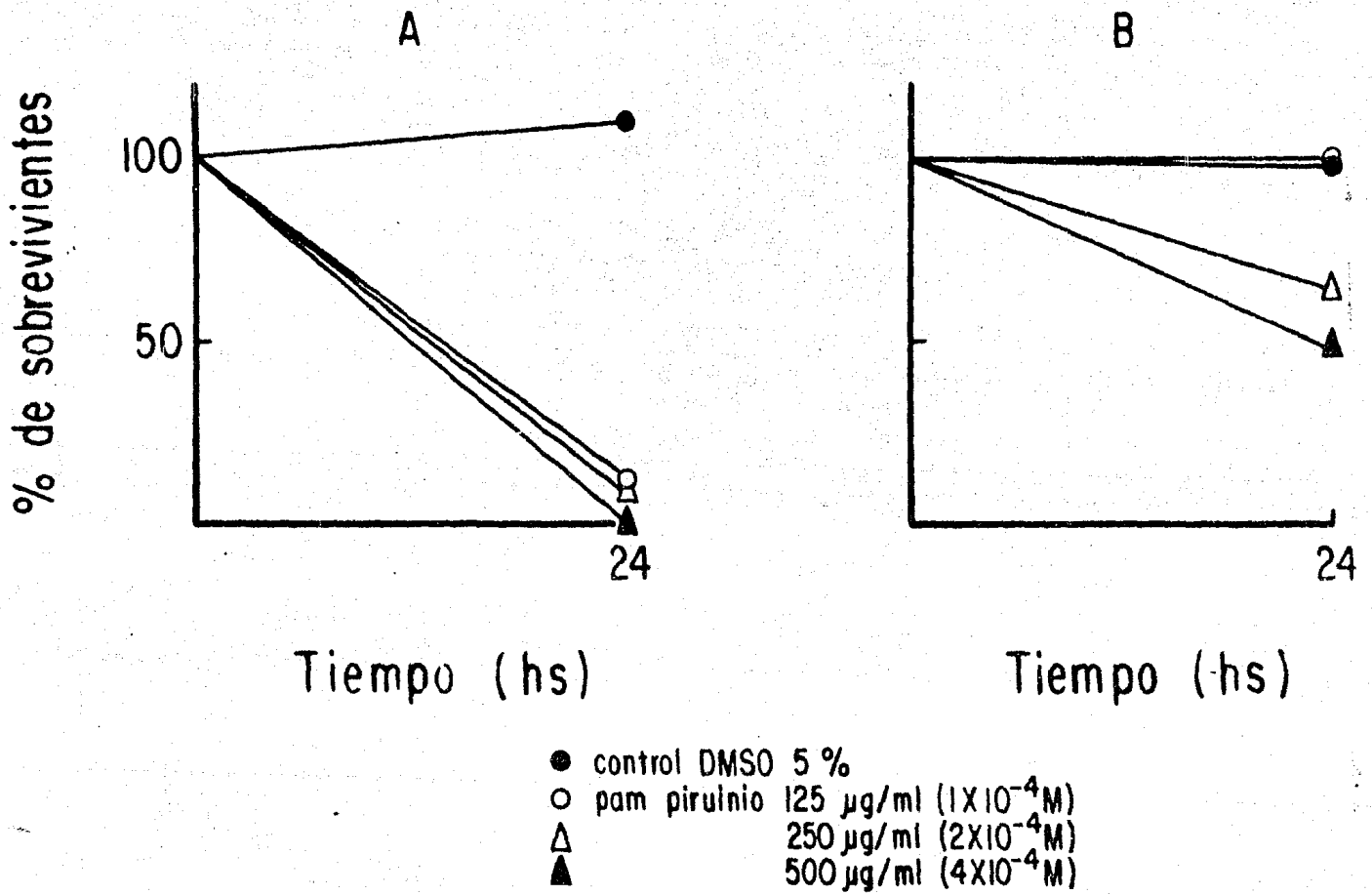


FIGURA 5. CURVAS DE SOBREVIDA:

A. Pamoato de Pirvinio

B. Pamoato de Pirvinio + mezcla S-9

TABLA IX. NUMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON PAMOATO DE PIRVINIO.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	17.0	6.0	2.6	22.2	2.7	2.4
125	31.3	9.9	3.0	2,023.6	263.6	123.6
250	48.6	11.7	3.3	2,351.6	237.1	80.0
500	53.3	14.7	3.0	6,660.0	430.0	330.0

TABLA X. NUMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON PAMOATO DE PIRVINIO Y MEZCLA S-9.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	13.6	4.0	2.3	20.4	4.4	2.0
125	31.6	10.0	1.0	19.2	6.3	2.0
250	22.0	9.6	1.3	39.0	7.2	1.5
500	21.4	8.3	2.6	34.0	18.3	2.7

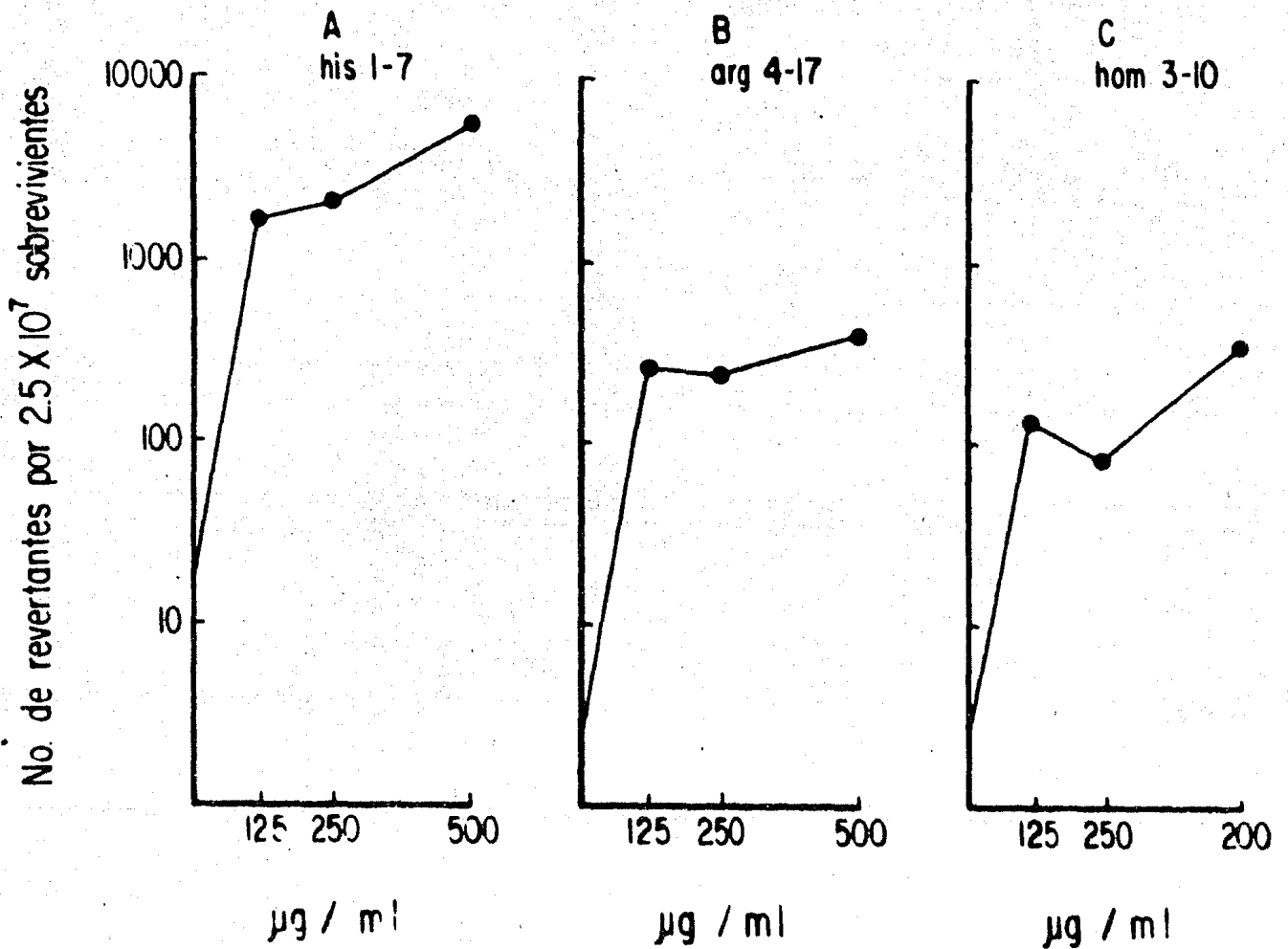


FIGURA 6. REVERSION DE 3 MARCADORES EN UN EXPERIMENTO CON PAMOATO DE PIRVINIO, A UN TIEMPO DE EXPOSICION DE 24 HORAS.

2. Determinación del efecto citotóxico y mutagénico del Mebendazol

La Fig. 7 presenta las curvas de sobrevivencia de los experimentos con Mebendazol. En la gráfica A se observa que las diferentes concentraciones inhibieron el crecimiento del cultivo, dicho efecto fué proporcional a la dosis.

Cuando los tratamientos se llevaron a cabo en combinación con mezcla S-9, las curvas de sobrevivencia dejan ver un efecto inhibitorio del crecimiento tanto en el control como con la concentración más baja, y un descenso en la sobrevivencia hasta de un 30% con la dosis más alta. (Fig. 7, Gráfica B).

El resultado del análisis del número de revertantes en cada uno de los grupos tratados, aparece en las Tablas XI y XII que indican que el Mebendazol en presencia o en ausencia de mezcla S-9, carece de actividad mutagénica.

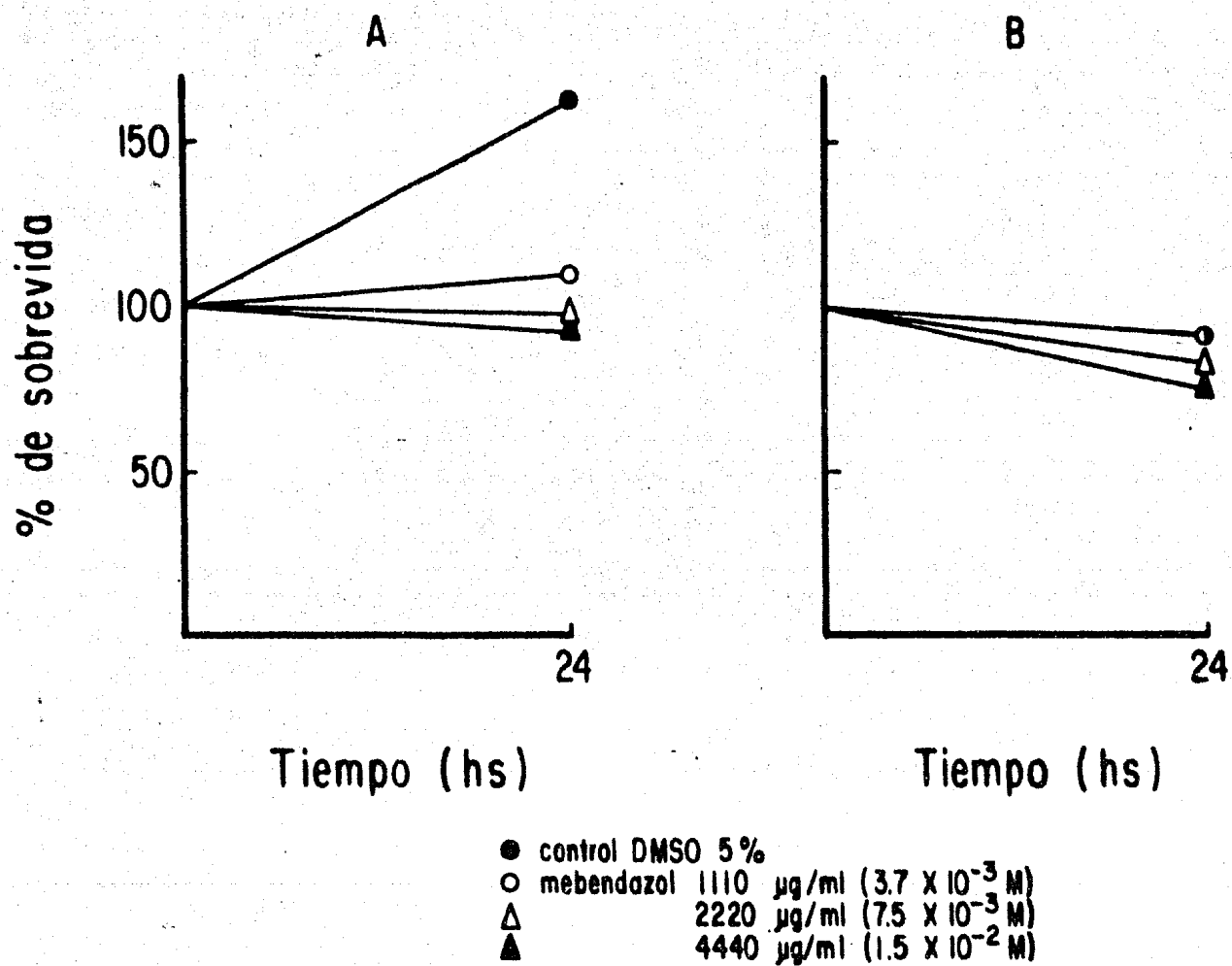


FIGURA 7. CURVAS DE SOBREVIDA.

A. Mebendazol

B. Mebendazol + Mezcla S-9

TABLA XI. NÚMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON MEBENDAZOL.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	25.6	4.6	2.3	13.0	4.0	2.0
1110	23.0	3.6	3.0	20.9	5.0	2.1
2220	14.0	2.0	1.6	28.1	4.1	3.1
4440	11.0	2.0	1.0	28.0	6.3	2.1

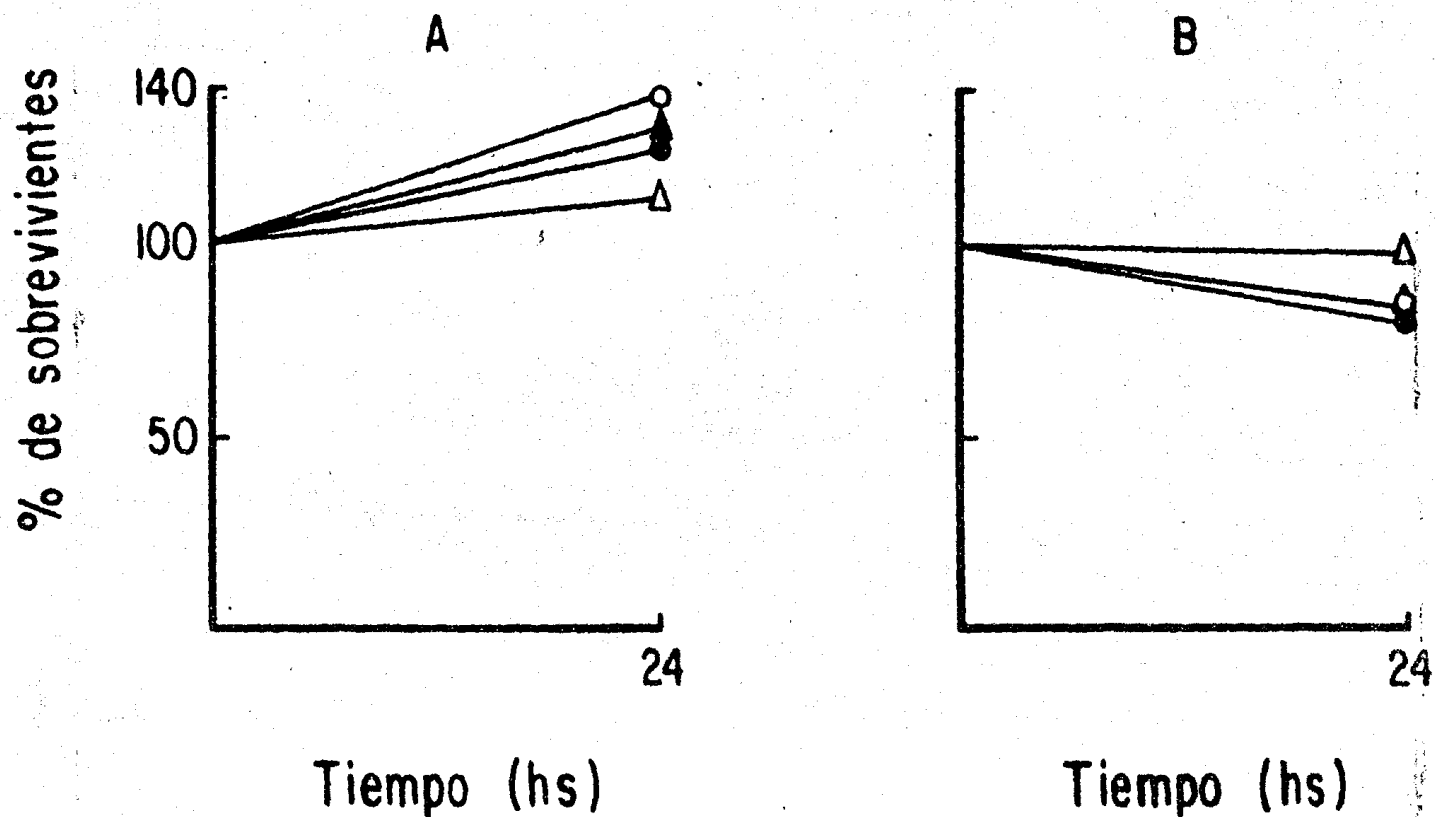
TABLA XII. NUMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON MEBENDAZOL Y MEZCLA S-9.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	27.0	1.6	4.0	21.8	7.5	4.6
1110	22.0	6.6	4.6	25.8	7.4	3.8
2220	25.0	4.6	4.3	15.5	3.4	2.4
4440	17.0	3.0	1.3	25.0	7.9	3.9

3. Determinación del efecto citotóxico y mutagénico del Citrato de Piperacina

En la gráfica A de la Fig. 8, se observa que únicamente la dosis más alta de Piperacina afectó el crecimiento del cultivo celular, inhibiéndolo, mientras que con las otras dos concentraciones al igual que en el control, se registró un incremento hasta de un 40% aproximadamente.

Cuando los tratamientos se llevaron a cabo con la incorporación de mezcla S-9 (Gráfica B, Fig. 8), se presentó una disminución de 20% en la sobrevivencia del tubo control y en los que llevaban las diferentes concentraciones de la droga el efecto fue más o menos el mismo, aunque menos severo con la dosis intermedia. Los valores de reversión muestran que la Piperacina no tuvo ninguna actividad mutagénica bajo las condiciones experimentales en que fue estudiada. (Tablas XIII y XIV).



- control DMSO 5 %
- cit. pip. 6240 µg/ml (0.9×10^{-2} M)
- △ 12480 µg/ml (1.8×10^{-2} M)
- ▲ 24960 µg/ml (3.9×10^{-2} M)

FIGURA 8. CURVAS DE SOBREVIDA:

A. Citrato de Piperacina

B. Citrato de Piperacina + Mezcla S-9

TABLA XIII. NUMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON CITRATO DE PIPERACINA

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	20.5	14.3	1.0	25.3	13.4	2.9
6240	5.0	5.0	1.3	13.9	5.3	1.9
12480	16.0	3.0	1.6	13.8	8.4	2.0
24960	15.5	10.3	1.3	13.8	5.3	1.4

TABLA XIV. NUMERO DE REVERTANTES POR 2.5×10^7 SOBREVIVIENTES OBTENIDOS EN EL EXPERIMENTO CON CITRATO DE PIPERACINA Y MEZCLA S-9.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	TIEMPO DE EXPOSICION (hs.)					
	0			24		
	Marcadores			Marcadores		
	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10	his 1-7	arg 4-17	hom 3-10
Control (DMSO 5%)	20.5	14.3	1.0	25.3	13.4	2.9
6240	17.6	12.3	1.6	21.4	11.0	3.0
12480	18.0	8.0	0.0	22.2	10.9	1.6
24960	18.0	8.0	2.0	24.1	16.6	3.6

DISCUSION

El sistema de prueba de Saccharomyces cerevisiae utilizado en este estudio, permitió detectar la actividad genética de uno de los tres compuestos probados, el Pamoato de Pirvinio. Este compuesto mostró un efecto marcadamente tóxico y mutagénico en las tres concentraciones empleadas. Aumentó la frecuencia de reversión de tres marcadores debidos a mutaciones tanto de sustitución de bases - como por corrimiento de formato y produjo incrementos sobre los valores de los controles de 100 a 300 veces del marcador his 1-7, de 100 a 200 veces de arg 4-17 y de 40 a 150 veces de hom 3-10. Con las dosis de 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y una sobrevida de 11 y 7% respectivamente, el número de revertantes obtenido de cada uno de los marcadores fué aproximadamente el mismo; dentro de este rango de concentraciones no se observó un efecto linear (Fig. 6), por lo que aparentemente el número de moléculas afectadas fué aproximadamente el mismo. Con la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ y una sobrevida de 1%, el número de revertantes de cada marcador fue de dos a cuatro veces mayor que el obtenido con las otras dos concentraciones, ésto puede ser resultado de que a la dosis más

alta el compuesto afectó un número mayor de macromoléculas. Cuando las células se incubaron con Pirvinio y mezcla S-9 la actividad tanto tóxica como mutagénica de la droga disminuyó considerablemente, lo que sugiere que las enzimas de homogenado hepático de rata presentes en la mezcla inactivaron la droga.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos con el Mebendazol y el Citrato de Piperacina, ninguno de estos dos compuestos mostró actividad mutagénica en las condiciones experimentales en que fueron estudiados. Existen varias posibilidades que podrían explicar los resultados negativos de las pruebas:

1. Que la sustancia no haya podido penetrar a la célula.
2. Que la actividad de sistemas enzimáticos en el citoplasma inactivaron la droga.
3. Que no tenga acceso al ADN (por la presencia de la membrana nuclear o de las proteínas asociadas con esta molécula en los cromosomas).
4. Que aún cuando haya reaccionado con el ADN, mecanismos de reparación eficientes impiden que se manifieste el efecto.

5. Que el compuesto sea inactivado por reacciones enzimáticas con la fracción S-9 o que no se produzcan metabolitos con actividad mutagénica.

Durante los experimentos las células estaban en continua división, hecho que favorece la actividad de aquellos agentes que requieren que la molécula de ADN se esté replicando para poder reaccionar con ella. Sin embargo, se observó que cuando las células se incubaban con mezcla S-9, se inhibía la división celular y en algunos casos se llegó a detectar un efecto tóxico que disminuyó la sobrevivida hasta un 20%. Este efecto durante la exposición a un compuesto particular, puede alterar los resultados obteniéndose falsos negativos, es decir, que no se manifiesta su actividad mutagénica.

Haciendo un análisis crítico de la reproducibilidad del sistema, se puede apreciar que de un experimento a otro se presentaron variaciones en las curvas de sobrevivida de los controles, tanto en presencia como en ausencia de la mezcla S-9 y se reflejó también una variabilidad en la frecuencia de reversión espontánea de los diferentes marcadores. Estas diferencias en los resultados pueden ser pro

ducto tanto de errores técnicos (conteo de las células, diluciones, eficiencia de sembrado) así como al estado fisiológico de las células (cultivos no sincronizados). Para afinar los resultados se requiere estandarizar lo más posible la manipulación de las células y establecer la variabilidad introducida por el experimentador. Además, para lograr mayor reproducibilidad en los resultados convendría utilizar cultivos sincronizados. Por lo que se refiere a la mezcla S-9, es recomendable hacer una curva contra concentración de la fracción S-9 utilizando controles positivos con el objeto de disminuir su efecto tóxico sobre las células sin alterar la actividad de las enzimas microsomales, también convendría verificar si las cantidades de los diferentes cofactores de la mezcla S-9 son las más adecuadas. Asimismo, es necesario medir la frecuencia de reversión de los diferentes marcadores de la cepa con una serie de mutágenos químicos conocidos, activos per se o que requieren ser metabolizados, para tener controles positivos a los cuales referir la actividad mutagénica de las sustancias en estudio. Una última recomendación es que no se estudie más de un compuesto por experimento (probando tres o cuatro concentraciones, los controles y tres marcado-

res de la cepa) debido a que cuando se trabaja con más sustancias simultáneamente, aumenta la probabilidad de cometer errores técnicos que cuantitativamente afectan los resultados (dado el gran número de muestras que hay que tomar, lavar, diluir y sembrar al mismo tiempo). Por otro lado, si se desea incrementar la sensibilidad de este organismo a la acción de mutágenos químicos deberán emplearse cepas que lleven mutaciones que aumenten la permeabilidad de la pared celular y también que disminuyan o anulen totalmente los sistemas de reparación.

Para finalizar, podemos considerar al sistema de reversión de Saccharomyces cerevisiae como un sistema adecuado para evaluar la potencialidad mutagénica de diferentes grupos de sustancias químicas en forma fácil, rápida, económica y confiable. Sin embargo, para poder concluir definitivamente sobre la actividad mutagénica de los tres compuestos incluidos en este estudio, Pamoato de Pirvinio, Mebendazol y Citrato de Piperacina, sobre esta levadura es necesario realizar más pruebas utilizando las diferentes técnicas que permiten detectar otro tipo de eventos como recombinación mitótica, conversión génica y no disyunción.

Para lograr una estimación más precisa del riesgo que representan para el humano, es indispensable ampliar su estudio a un número mayor de sistemas de prueba que utilicen diferentes organismos, incluyendo mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

1. AMES, B.C., MC CANN, J., AND YAMASAKI, E., (1975), -
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the
Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test,
Mutation Res., 31: 347-364
2. AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E., AND LEE, F.P.,
(1973), Carcinogens are mutagens: Bacterial Tester -
Strains as R factor Plasmids, Proc. Natl. Acad. Sci.
(U.S.A.). 72: 979-983.
3. ARCOS, J.C., ARGUS, M.F., (1974), en: Chemical Induction
of Cancer, Academic Press, New York and London, Vol. IIA
y IIB.
4. AUERBACH, C., (1976), Mutation Research, Chapman and -
Hall, London: 504 pp.
5. BATHELMESS, A., (1970), Mutagenic substances in the -
human environment, Chemical mutagenesis in mammals and
man, Ed. Vogel, F. and Rohnborn, G.: 69.
6. BARTSCH, H. MALAVEILLE, C., AND MONTESANO, R., (1975),
Human, rat and mouse liver mediated mutagenicity of -
vinyl chloride in S. Typhimurium strains, Int. J. Can-
cer, 15: 429-437.
7. BIGNAMI, M., et al, (1970), Non disjunction and cross-
ing over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus
nidulans, Mutat. Res. 26: 159-170.
8. BORGES, M., AND DE NOLLIN, S., (1975), Ultraestructural
changes in Ascaris suum intestine after mebendazole -
treatment in vivo, J. Paras., Vol. 61: 110-122.

9. CARBON, J. AND CURRY, J.B., (1968), Genetically and chemically derived missense suppressor transfer RNA's with altered enzymic aminoacylation rates, J. Mol. Biol., 38: 201-216
10. CATTANACH, B. M., (1971), Specific locus mutations in mice, en: Hollaender, A., (ed.), Chemical Mutagens, principles and Methods for their detection, Plenum press, New York, Vol. 2: 535-539.
11. CLEAVER, J.E., (1977), Methods for studying excision repair of DNA damaged by physical and chemical mutagens, en: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Kilbey, B. J., et. al., (eds.), Elsevier Scientific Publishing Co., New York, : 19-48.
12. CLEAVER, E.J., (1969), Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 63: 428.
13. COMITEE 17 COUNCIL OF THE MUTAGEN SOCIETY, (1975), Environmental Mutagenic Hazards, Science 187: 503-514.
14. CONNOR, T.H., STOECKEL, M., EVRAD, J., AND LEGATOR, M. S., (1977), The contribution of Metronidazol and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice, Cancer Res., 57: 629.
15. CORBETT, TH. H., (1976), Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics, Ann. New York Acad. Sci. (U.S.A.), 271: 58.
16. COUTINO, E.R., Analysis of anaphase in cell cultures: and adequate test system for the detection between compounds which selectively alter the chromosome structure of the mitotic apparatus, en: Workshop on systems to detect induction of aneuploidy by environmental mutagens, Savannah, G.A., E.U.A., Nov. 5-8 (1978).
17. CZYGAN, P., et. al., (1973), Microsomal metabolism of Dimethyl Nitrosamine and the Cytochrome P450. Dependency of its activation to a mutagen, Cancer Res., 33: 2983-2986.
18. DE SERRES, F.J., (1974), Mutagenic Specificity of Chemical Carcinogens in Microorganisms, en: Chemical Carcinogenesis Assays (R. Montesano, L. Tomatis, and W. Davis, eds.), IARC Scientific Publication No. 10, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

19. DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, Ninth Edition, Difco Laboratories, Detroit, Michigan: 251-252
20. EPSTEIN, S.S., SHEFNER, H., (1968), Chemical Mutagens in the Human Environment, Nature, 219: 385
21. EPSTEIN, S.S., ROHRBORN, G., (1971), Recommended Procedures for Testing Genetic Hazards from Chemicals Based on the Induction of Dominant Lethal Mutations in Mammalian, Nature, 230: 459
22. EPSTEIN, S.S., (1973), Use of the Dominant Lethal Test to detect genetic activity of environmental chemicals, Environ. Health Perspect., 6: 23
23. EVANS, H.J., (1976), Cytological Methods for detecting chemical mutagens, en: Hollaender, A. (ed.), Op. Cit., Vol 4: 1
24. FAHRIG, R., (1977), Recovery of yeast cells out of testes, liver, lung and peritoneum of rats, en: Handbook of Mutagenicity Tests Procedures, Kilbey, B.J., et. al. (eds), Elsevier Scientific Publishing Company, New York 135-147
25. FREESE, E., (1974), Genetic effects of mutagens and agents present in the human environment, en: Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis, Praksh, L., et. al. (eds). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois: 5-13
26. FREESE, E., (1971), Molecular Mechanisms of Mutations, en: Hollaender, A. (ed.), Op. cit, Vol I: 1-55.
27. FISHBEIN, I., (1972), Pesticidal, industrial, food additive and drug mutagens, en: Mutagenic effects of environmental contaminants, Sutton, H.E. and Harris, M.I. (eds.), Academic Press, New York: 129-170
28. GARNER, R.C., MILLER, E.C. AND MILLER, J.A., Liver Microsomal Metabolism of Aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530, Cancer Res., 32: 2058

29. GLETTEN, E., WEEKES, U., AND BRUSICK, D., (1975), In vitro metabolic activation of chemical mutagens, Development of an in vitro assay using liver microsomal enzymes for the activation of Dimethyl Nitrosamine to a mutagen, Mutation Res., 28: 113-122
30. GENEROSO, W.M., (1973), Evaluation of chromosome aberration effects of chemicals in mouse germ cells, en: Environ. Health Perspec., Exp. Issue No. 6
31. GENEROSO, W.M., RUSSELL, W.L., HUFF, S.W., STOUT, S.K., AND GOSSLEE, D.G., (1974), Effect of Dose on the induction of dominant lethal mutations and heritable translocations with Ethyl Methane Sulfonate in male mice, Genetics, 77: 741-752
32. GOLDSTEIN, A., ARONOW, L., KALMAN, S., (1978), Principles of Drug Action, 2nd Edition, Wiley Biomedical Health Publication, New York: 227-300
33. GOODMAN, H.M., ABELSON, J., LANDY, A., BRENNER, S. AND SMITH, J.D., (1968), Amber suppression: A nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA, Nature, 217: 1019-1024
34. GOODMAN, L.S. AND GILMAN, A. (eds.), (1970), The Pharmacological Basis of Therapeutics, Fifth Edition, Mc. Millan Publishing Co., Inc., New York: 1018-1030
35. GRIFFITH, A.J.F. AND DE LANGE, A.M., (1977), Fluorophenyl alanine increases meiotic non-disjunction in a Neurospora test system, Mutation Res., 46: 345
36. GUEST, J.R. AND YANOFSKY, C., (1965), Aminoacid replacements associated with reversion and recombination within coding unit, J.Mol.Biol., 12: 793-804
37. HARM, W., RUPERT, C.S. AND HARM, H., (1971), The study of photoenzymatic repair of UV lesions in DNA by flash photolysis, en: Photophysiology, (A.C.Giese, ed), Academic Press, New York, Vol VI: 279-324
38. INFANTE, P.F., WAGONER, J.K., AND WAXWEILER, R.J., (1976), Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic risks associated with vinyl chloride, Mutation Res., 41: 131

39. KALTER, H., (1968), Teratology of the Central Nervous System, University of Chicago Press, Chicago.
40. KOCH, R.E., (1971), The influence of neighboring base pairs upon base pair substitution mutation rates, Proc. Nat. Acad.Sci. (U.S.A.), 68: 773-776
41. LEONARD, A., (1973), Observations on Meiotic Chromosomes of the male mouse as a test of the potential mutagenicity of chemicals in mammals, en: Hollaender, A. (ed.), Op. Cit., Vol 3: 21-56
42. LIEBERMAN, M.N., (1976), Approaches to the analysis of fidelity of DNA repair in mammalian cells, en: International Review of Cytology, (G.H. Bourne, J.F. Danielli and K.W. Jeon eds), Academic Press, New York, Vol 45: 1-23
43. LIJINSKY, W., (1976), Carcinogenic and mutagenic N-nitroso compounds, en: Hollaender, A. (ed.), Op. cit., Vol. 4: 193
44. MALLING, H.V., (1966), Mutagenicity of two potent carcinogens, Dimethyl Nitrosamine and Diethyl Nitrosamine in Neurospora crassa, Mutation Res., 3: 537-540
45. MALLING, H.V., (1971), Dimethyl Nitrosamine: Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes, Mutation Res., 13: 425-429
46. MALLING, H.V., (1972), Mutation induction in Neurospora crassa incubated in mice and rats, Molec.Gen.Genet., 116: 211-222
47. MC CAAN, J., CHOI, E., YAMASAKI, E., AND AMES, B.N., (1975), Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals, Proc. Nat.Acad.Sci.(U.S.A.), 72: 5135-5139
48. MAC PHEE, D.G., AND PODGER, D.M., (1977), Mutagenicity tests on Antihelmintics: Microsomal activation of Viprynum emboate to a mutagen, Mutation Res., 48: 307-312

49. MILLER, J.A. AND MILLER, E.C., (1971), Chemical Carcinogenesis: Mechanisms and Approaches to its Control, Jour. Nat. Cancer Inst., Vol 47 (3): V-XIV
50. MOHN, G., ELLENBERGER, J. AND MC GREGOR, D., (1974), - Development of mutagenicity test using Escherichia coli K-12 as indicator organism, Mutation Res., 25: 187-196
51. MOHN, G., AND ELLENBERGER, J., (1973), Mammalian Blood-mediated Mutagenicity test using a multipurpose strain of Escherichia coli K-12, Mutation Res., 19: 257-260
52. MORTIMER, R.K. AND HAWTHORN, D.C., (1969), Yeast Genetics, en: The Yeast Genetics, Rose A.H. and Harrison, J.S. (eds), Academic Press, New York, Vol I: 385-460
53. MORTIMER, R.K. AND MANNEY, T.R., (1971), Mutation induction in yeast, en: Hollaender, A. (ed.), Op.cit., Vol I: 239-310
54. O NEILL, P., BRIMER, P.A., MACHANOFF, R., HIRSCH, G.P., - AND HSIE, A.W., (1977), A cuantitative assay of mutation induction at the hypoxantine guanine phosphoribosyl - transferasa locus in the chinese hamster ovary cells - (Cho/HGPRT System): Development and definition of the system, Mutation Res., 45: 91
55. PARRY, J.H. AND ZIMMERMANN, F.K., (1976), The detection of monosomic colonies produced by mitotic chromosome non-disjunction in the yeast Saccharomyces cerevisiae, Mutation Res., 36: 49
56. QUAH, S.Q. AND VON BORSTEL, R.C., Characteristics of a - Strain of Yeast (XV185-14C) Specially Constructed for Testing Environmental Mutagens.
57. RANNUG, U., JOHANSSON, A., RAMEL, C., WACHMEISTER, C.A., (1974), The mutagenicity of vinyl chloride after metabolic activation, Ambio: 194-197
58. ROMAN, H., (1956), A system selective for mutation - affecting the synthesis of Adenine in Yeast, Comp.Rend. Trav.Lab.Carlsberg, 26: 299-314
59. SIEBERT, D.A., (1973), A new method for testing genetically active metabolites. Urinary assay with Cyclophosphamide (Endoxan, Citoxan) and Saccharomyces cerevisiae, Mutation Res., 17: 307-314

60. SOBELS, F.H., (1974), The advantages of Drosophila for mutation studies, Mutation Res., 26: 277-284
61. SUGIMURA, T., et. al., (1976), Overlapping of Carcinogens and Mutagens, en: Fundamentals of Cancer Prevention, Magee University Park Press, Baltimore: 191-215.
62. SLATER, E.E., ANDERSON, M.D., AND ROSENKRANZ, H.S., (1971), Rapid Detection of Mutagens and Carcinogens, Cancer Res., 31: 970-973.
63. SCHMID, W., (1976), The Micronucleus Test for Citogenetic analysis, en: Hollaender, A. (ed.), Op. cit. Vol. 4: 31
64. SEILER, J.P., (1975), Toxicology and Genetic effects of Benzimidazole compounds, Mutation Res., 32: 151-168.
65. SZYBALSKY, W., Microbiological Systems. Observations on Chemical Mutagenesis in Microorganisms, Ann. N.Y. Acad. Sci. (U.S.A.), 76: 475-489.
66. STEWART, B.W., FARBER, E., (1973), Strand breakage in rat liver DNA and its repair following administration of cyclic nitrosamines, Cancer Res., 33: 3209-3215.
67. SUTHERLAND, B.M., CHAMBERLIN, M.J., AND SUTHERLAND, J.-C., (1973), Deoxyribonucleic acid photoreactivation enzyme from Escherichia coli, J. Biol. Chem., 248: 4200-4205
68. TUTIKAWA, K., SHINOI, N., AND YAGI, Y., (1978), Mutagenicity of the products generated by a reaction between Chloroquine and Nitrite, Mutation Res., 54: 230.
69. UEHLEKE, H., (1974), The formation and kinetics of reactive drug metabolites in mammals, Mutation Res., 25: 159-167.
70. VOGEL, E., (1975), Some aspects of the detection of potential mutagenic agents in Drosophila, Mutation Res., 29: 241.
71. WYROBECK, V.A.J. AND BRUCE, W.R., (1975), Chemical induction of sperm abnormalities in mice, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 72: 4425.

72. WATSON, J.D., (1974), *Biología Molecular del Gen*, Fondo Educativo Interamericano, S. A., México, 1974: 390-396
73. WOOD, A., (1976), Metabolic Activation of Benzopyrene - and Metabolites, en: *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., et. al. (eds.), North Holland Biomedical Press, Amsterdam: 13-54.
74. ZIMMERMANN, F.K., (1975), Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Res.*, 3: 71-86
75. ZIMMERMANN, F.K., (1976), Detection of genetically active chemicals using various yeast systems, en: Hollaender, A. (ed.), *Op. cit.*, Vol. 4: 209-239.
76. ZIMMERMANN, F.K., (1973), A yeast for visual screening for the two reciprocal products of mitotic crossing-over, *Mutation Res.*, 21: 263-269
77. ZIMMERMANN, F.K., (1971), Induction of mitotic gene conversion by mutagens, *Mutation Res.*, 11: 327-333.
78. ZEIGER, E., LEGATOR, M.S. AND LIJINSKY, W., (1972), Mutagenicity of N-Nitrosopiperazines in *Salmonella typhimurium* in the host-mediated assay, *Cancer Res.*, 32: 1598-1599.