



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

ESTUDIO DEL EFECTO MUTAGENICO DE AMEBICIDAS Y ANTIHELMINTICOS EN Salmonella typhimurium Escherichia Coli

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A:

Rosa María Rangel Zarate

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. ASPECTOS GENETICOS GENERALES	4
1. Mutación	4
a. Cromosómica	5
b. Puntual	5
c. Consecuencias	6
2. Reversión	9
a. Verdadera	9
b. Supresión	9
3. Sistemas de Reparación	11
a. <u>Pre-replicativa</u>	11
b. <u>Post-replicativa</u>	15
III. ANTECEDENTES SOBRE LA CAPACIDAD MUTAGENICA DE LOS MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS	17
IV. MATERIAL	19
1. Biológico	19
2. Químico	19
3. Soluciones	22
V. METODOS	23
1. Sistemas de Prueba Bacterianos	23
a. <u>Salmonella typhimurium</u>	23
b. <u>Escherichia coli</u>	29
c. Determinación de la actividad genotóxica de metabolitos	33
VI. RESULTADOS	38
1. <u>Salmonella typhimurium</u>	38
2. Determinación de la capacidad de los medicamentos de producir daño al ADN no reparado en <u>Escherichia coli</u>	55

	Pág.
VII. DISCUSION	57
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. BIBLIOGRAFIA	64

I. INTRODUCCION

En nuestro país hay un alto índice de enfermedades producidas por parásitos que infestan al humano, al que le ocasionan desequilibrios en todo su organismo. Este es un problema de salud pública que se presenta principalmente en países pobres en vías de desarrollo, en los que las condiciones ambientales y el nivel cultural de sus habitantes favorece la propagación de los parásitos y la constante reinfestación de los individuos.

Además de las medidas profilácticas recomendadas para evitar las infestaciones por amibas y helmintos es muy común el uso de fármacos para combatir estos padecimientos (Tabla 1), ya sea por prescripción médica o por automedicación.

Dentro de los efectos adversos que pueden ocasionar estos medicamentos se encuentra la producción de anomalías en el material genético susceptible de provocar la generación de cáncer, (7) o de alteraciones en los gametos que pudieran ser transmitidas a generaciones subsiguientes. No se sabe sin embargo en que medida los medicamentos antiamebianos y antihelmínticos contribuyen a la producción de las anomalías mencionadas, debido a la falta de estudios sistemáticos sobre los fármacos en cuestión.

Con base en la teoría que propone que el desarrollo del cáncer es precedido por procesos mutacionales (10,24) se han desarrollado una serie de pruebas sencillas que detectan compuestos capaces de pro-

TABLA 1. MEDICAMENTOS ANTIHELMINTICOS Y ANTIAMIBIANOS DE AMPLIO CONSUMO EN MEXICO. DATOS OBTENIDOS DE LA SUBDIRECCION GENERAL MEDICA DEL IMSS DE 1978 Y DEL CUADRO BASICO DE MEDICAMENTOS DEL SECTOR PUBLICO DE 1979.

Medicamentos Antihelminticos y Antiamibianos	
Nombre genérico	Indicaciones terapéuticas
Befenio	Parasitosis mixta por <u>Ankylostoma duodenale</u> , <u>Necator americanus</u> (uncinaria) y <u>Trichuris trichiura</u> (Tricocéfalos)
Niclosamida	Parasitosis intestinal por <u>Taenia solium</u> , <u>T. saginata</u> e <u>Hymenolepsis nana</u>
Hexilresorcinol	Parasitosis intestinal por Tricocefalosis masiva de colon
Piperacina	Parasitosis por <u>Ascaris lumbricoides</u> y <u>Enterobius vermicularis</u> (Oxiuros)
Pirantel	Tratamiento de Ascariasis, Anguilostomiasis y Enterobiasis
Pirvinio	Parasitosis por <u>Enterobius vermicularis</u> y <u>Strongyloides stercoralis</u>
Mebendazol	Parasitosis intestinal de amplio espectro por -- tricocefalosis, <u>Ascaris lumbricoides</u> , Uncinaria, Oxiuros y Taeniasis
Tiabendazol	Antihelmintico polivalente, para helmintiasis múltiple
Diyodohidroxiquinoleína	Amibiasis intestinal en portadores sanos
Yodoclorohidroxiquinoleína	Amibiasis intestinal en portadores sanos
Cloroquina	Amibiasis hepática
Emetina	Amibiasis invasora
Dehidroemetina	Amibiasis invasora
Metronidazol	Amibiasis invasora
Acido fenilarsónico	Amibiasis intestinal

ducir mutaciones (25,31). En estas pruebas se utilizan como sujetos de experimentación, microorganismos debido al bajo costo de su manejo y -- rapidez en la obtención de resultados, así como por la alta correlación encontrada entre la mutagenicidad de numerosos compuestos en bacterias y su carcinogenicidad en animales. (2,3,17).

Entre los sistemas bacterianos más conocidos se encuentran - aquellos que utilizan diversas cepas de Salmonella typhimurium para detectar mutaciones reversas y los que se sirven de Escherichia coli para evaluar la muerte celular provocada por el daño al material genético no reparado (1,29).

Los propósitos de este estudio consisten en:

- a) Evaluar la capacidad mutagénica de diversos medicamentos antiambianos y antihelmínticos en cepas de Salmonella typhimurium que poseen el sistema de reparación por excisión activo comparando estos resultados con aquellos previamente obtenidos en cepas deficientes en el sistema de reparación ya mencionado,
- b) Determinar la capacidad de dichos medicamentos de provocar muerte celular en cepas de Escherichia coli que no reparan el daño genético.
- c) Contribuir a identificar el sistema bacteriano de prueba más adecuado para determinar el efecto genotóxico de compuestos químicamente semejantes a los medicamentos incluidos en este estudio.

II. ASPECTOS GENETICOS GENERALES

Con el objeto de entender los principios en los que se basan los sistemas de prueba empleados para identificar mutágenos, se expondrán a continuación algunos aspectos de orden general sobre las características del material genético, de las mutaciones y de los sistemas enzimáticos que reparan lesiones en el ADN.

El ácido desoxirribonucleico (ADN), que se encuentra contenido en las células de todo organismo vivo, contiene la información genética específica para la estructura, función y desarrollo de cada ser y constituye el material a través del cual se transmiten de generación en generación, las características de cada especie (6).

El ADN consiste en una doble hélice formada por dos tiras de polinucleótidos complementarias entre si, en cada una de las cuales las bases púricas (G = Guanina y A = Adenina) y pirimídicas (C = Citosina y T = Timina) están dispuestas a lo largo de un esqueleto de grupos alternantes de desoxirribosa y fosfato, las dos tiras se mantienen unidas por puentes de hidrógeno entre las bases vecinas y debido a su estructura estereoquímica los puentes de hidrógeno sólo pueden formarse entre A - T y G - C (35).

1) Mutaciones

A los cambios espontáneos producidos por agentes físicos químicos o biológicos, que alteran la secuencia de nucleótidos original, que sirve de base a la información genética contenida en el ADN, se le denomi

na mutaciones (16).

Las mutaciones se clasifican en:

- a) Mutaciones Cromosómicas: Se caracterizan por un cambio en el cromosoma ya sea por delección o adición de un segmento cromosómico o por translocación o inversión provocando un reordenamiento de los genes contenidos en él.
- b) Mutaciones Puntuales: También conocidas como intragénicas, se caracterizan por que el cambio afecta solamente a un -- pequeño número de nucleótidos Tabla 2.

Las mutaciones puntuales se pueden agrupar en dos clases de acuerdo al cambio introducido en el ADN (26).

b.1. Por sustitución de bases se conocen dos tipos:

- Mutaciones por transición. En las que un par de bases es substituído por otro de la siguiente manera.

Una purina de una cadena es substituída por otra purina - diferente ó una pirimidina de una cadena es substituída - por una pirimidina diferente.

Este tipo de mutación puede ocurrir "espontáneamente" o - ser provocada por análogos de bases originales, que poseen un estrecho parecido estructural con las bases originales y que durante el proceso de replicación se insertan fácil - mente en el ADN.

- Mutaciones por Transversión: A diferencia del tipo de mutación anterior, aquí una purina de una cadena es substituida por una pirimidina o bien una pirimidina es substituida por una purina. Frecuentemente se presentan mutaciones espontáneas debidas a transversiones.

b.2. Por Corrimiento de la secuencia de bases o "frameshift" se han descrito dos tipos:

- Mutaciones por inserción. Un nucleótido extra se inserta en la cadena de ADN por lo que la lectura normal de los tripletes se altera. Un ejemplo de ella es el daño provocado por proflavinas, como la acridina, que se introduce entre las bases y en el momento de la replicación una base extra se adiciona en la cadena recién sintetizada en posición opuesta en la acridina.

- Mutaciones por delección: Un nucleótido se pierde de la cadena de ADN alterando, como en el caso anterior, la lectura normal de los tripletes.

c) Consecuencia de las mutaciones:

El daño que pueden ocasionar las mutaciones descritas dependerá del lugar donde se produzca la mutación (5) las mutaciones puntuales por substitución de bases, que generalmente se traducen en cambios de un aminoácido por otro en la cadena polipeptídica, se clasifican en:

Mutaciones de sentido equivocado

Mutaciones sin sentido

TABLA 2. NATURALEZA DEL EFECTO MUTACIONAL PRODUCIDO POR DIVERSOS GRUPOS DE AGENTES QUIMICOS (21).

Cambio químico	Cambio mutagénico	Mutagénico representativo
Alteración de bases resultado de la acción directa de un mutágeno, sobre la base produciendo cambios químicos	Transición	Hidroxilamina, ácido nítrico, etil metanosulfonato, N-metil-N-nitrosoguanidina
Substitución de bases por incorporación de bases análogas	Transición	5-bromouracilo
Remoción de bases y formación de un sitio apúrico como resultado de la activación química.	Transversión (?)	Etil metanosulfonato
Intercalación de material en el ADN, que altera las dimensiones y las propiedades de la hélice.	Corrimiento o Frameshift	Proflavinas Acridina
Entrecruzamiento de las cadenas de ADN	Corrimiento Delección	Acido nitroso N ₂ , mostaza

c.1. Consecuencia de las mutaciones de sentido equivocado

c.1.1. Formación de enzima deficiente: la actividad de la enzima se ve disminuída por el cambio en la secuencia de aminoácidos provocada por la mutación. Algunas -- variantes resultantes de tales cambios se describen -- a continuación.

- Formación de enzima de expresión condicionada: la enzima actuará solo en condiciones extrictamente establecidas, un ejemplo de ello son las mutantes sensibles a la temperatura y que al cambiar ésta, su eficiencia disminuye.

- Formación de enzima CRM: la enzima mutante no tiene actividad alguna y se le identifica inmunológicamente con la enzima original por una reacción cruzada por lo que se le denomina "Cross Reactive Material" (CRM).

- Complementación intracistrónica: cuando las enzimas están formadas por más de una cadena polipeptídica y estas contienen errores mutacionales en diferentes sitio, puede haber complementación entre las cadenas intactas lo que reconstituye una nueva configuración enzimática normal.

c.2. Consecuencia de las mutaciones sin sentido:

Cuando una mutación introduce cualquiera de los tres tripletes de terminación llamados sin sentido que no codifican para ningún aminoácido (UAA-Ocre, UAG-Ambar, UGA-Opalo) se obtiene una terminación prematura de la cadena polipeptídica.

Las mutaciones sin sentido tienen por lo anterior un efecto más drástico que las mutaciones de sentido equivocado y por tanto se traducen comúnmente en la desaparición de la función enzimática, excepto cuando la mutación sin sentido -- ocurre hacia el final del cistron.

Las mutaciones silenciosas son aquellas que al cambiar algún nucleotido por otro en un codón, se genera otro que codifica para el mismo aminoácido y por tanto la enzima no se -- afecta.

Por otra parte el daño que pueden ocasionar las mutaciones por corrimiento estructural es muy drástica ya que provocan lecturas erróneas del ADN generalmente letales (5).

2) Reversiones

Existe la posibilidad de que las mutaciones se restauren, fenómeno llamado reversión, que puede clasificarse de la siguiente manera:

(5).

- a) Reversión verdadera: llamada así puesto que se recupera la secuencia de bases originales en el ADN. Este proceso es -- poco frecuente y la única forma de probar que ha ocurrido -- es por secuenciación del lugar donde la base mutada ha sido reemplazada por la original.
- b) Reversión por supresión: a diferencia de la reversión verdadera, este tipo de reversión no recupera la secuencia de bases originales en el ADN y por sus características se di-

vide en:

b.1. Supresión intracistrónica

- Supresión intracistrónica en mutaciones de corrimiento es tructural: generalmente consisten en la restauración de la mutación frameshift original con otra frameshift dentro del mismo cistrón, así, una mutación por inserción es suprimida con una mutación por delección y viceversa.
- Supresión intracistrónica en mutaciones por substitución de bases: esta mutación es revertida por una segunda mutación por substitución de bases en el mismo codón, dando por resultado la inserción de un aminoácido más aceptable que el mutante inicial.

b.2. Supresión extracistrónica

- Supresión extracistrónica en mutaciones de sentido equivo cado: puede originarse en genes que controlan la síntesis de t-RNA o de la aminoacil-transferasa.
- Supresión extracistrónica de mutaciones sin sentido: actúan en genes que controlan la síntesis de t-RNA y condicionan que durante la traducción del RNA mensajero los -- triplete sin sentido sean reconocidos por un t-RNA mutan te el cual inserta un aminoácido correcto, restaurando -- así la función de la proteína alterada previamente por la mutación en el gene estructural.

- Supresión extracistrónica de mutaciones frameshift: se postula que un anticodón cuádruple en el t-RNA es capaz de leer el codón original y la base insertada durante la mutación, introduciendo en dicha posición un solo aminoácido. También se considera la posibilidad de que un anticodón no mutado tienda a cometer errores al traducir el mensaje, especialmente cuando éste consiste en una secuencia de bases idénticas.

3) Sistemas de Reparación

Como ya se mencionó el ADN es susceptible de ser dañado en algún momento de su proceso replicativo. Ahora bien, estas mutaciones ocasionadas en el ADN pueden ser reparadas por diferentes sistemas enzimáticos dependiendo principalmente de la distorsión ocasionada en el ADN.

Los mecanismos de reparación que mejor se conocen se dividen en: a) pre-replicativos y b) post-replicativos.

a) Los sistemas pre-replicativos más estudiados son:

a.1. Mecanismo de fotoreactivación de dímeros de timina:

Requiere la energía de la luz visible (300 - 660 nm) para catalizar la reacción enzimática de rompimiento del anillo dimérico ciclobutil-pirimidina "in situ" y restaurar las bases a su forma monomérica original. Este mecanismo puede reparar cualquier dímero inducido por acción de la luz ultravioleta en cuya reparación intervenga el mecanismo de excisión.

En el primer paso la enzima reconoce y enlaza específicamente a los dímeros y el complejo enzima-ADN absorbe la luz obteniendo la energía necesaria para la conversión del anillo dimérico ciclobutil a monómero de pirimidina, con una subsecuente separación del complejo enzima-ADN.

a.2. Mecanismo de reparación por excisión:

Participa en él un sistema multienzimático a través de cinco pasos (Fig. 1).

Paso 1: Reconocimiento del daño: en esta etapa intervienen diferentes enzimas según el tipo de mutación que haya que reparar reconociéndose y actuando sobre el daño detectado (14,17).

Paso 2: Insición: consiste en introducir un corte en el sitio en que se reconoce el daño, en el caso de que haya alguna base alquilada o un uracilo, actúa una enzima específica para cada uno de estos compuestos denominada N-glicosilasa que corta el enlace glicosílico entre la base reconocida y el azúcar. Para el caso que el ADN contenga una base equivocada o una estructura defectuosa actúa una correndonucleasa o endonucleasa específica clasificada según el número de bases envueltas en la lesión que reconoce, se acopla y corta la hélice afectada por la lesión que originó la distorsión. El corte realizado por la correndonucleasa desencadena el proceso de reparación por excisión (15) que es simultáneo en los siguientes pasos.

Paso 3: Excisión de la región dañada; comprende la remoción del -- fragmento dañado por medio de una exonucleasa.

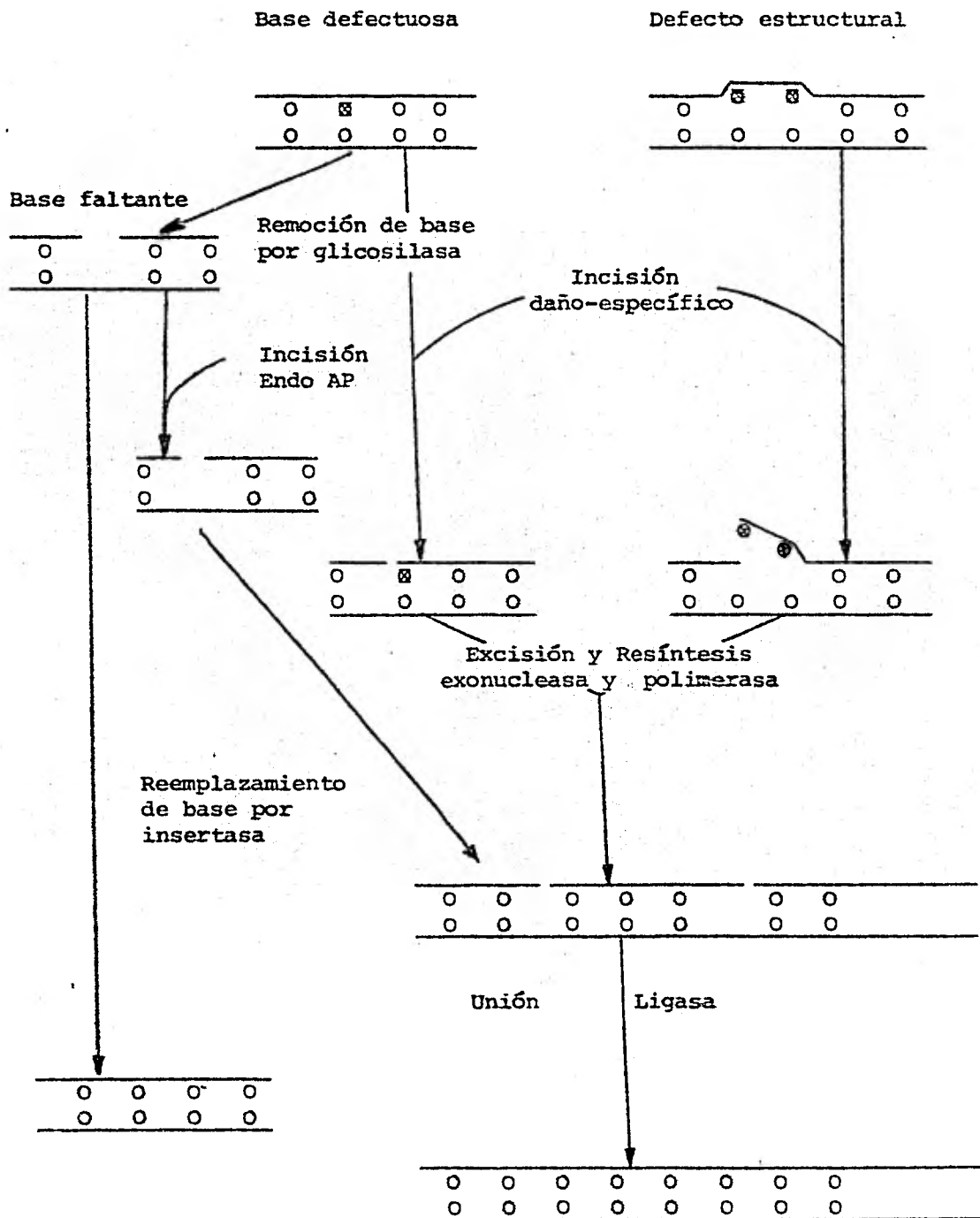
Paso 4: Reparación replicativa; consiste en la sustitución del segmento cortado en el extremo 5'P por un nuevo segmento. El paso 3 y 4 son coordinados de tal manera que no existe posibilidad de error en el nuevo segmento copiado cuando la enzima ADN-polimerasa 1 actúa, pues mientras se inicia la remoción en el extremo 5'P por una exonucleasa específica, al mismo tiempo se inicia la actividad de relleno por la ADN-polimerasa 1, y se va verificando que los nuevos nucleótidos que van colocando en la cadena sean los correctos. De no ser así son eliminados y nuevamente sustituidos, esta propiedad caracteriza a la polimerasa 1 pero no así a las otras polimerasas que son menos eficientes.

Paso 5: Terminación y Ligación: finalmente se restaura la continuidad lineal del ADN al intervenir la enzima ADN-ligasa, que une el -- extremo libre del fragmento nuevamente sintetizado con el resto de la cadena.

Una base púrica puede perderse por acción de una glicosilasa - que al dejar un hueco esta base perdida puede ser reemplazada por la acción de una insertasa que remueve cerca de 10 purinas por minuto.

Se ha mostrado también que un ADN lesionado puede replicarse y que aunque los fragmentos sintetizados a partir de él sean más cortos de lo normal, posteriormente alcanzan su tamaño normal gracias a la reparación - post-replicativa. La importancia de este mecanismo radica en que de el de

Figura 1: ESQUEMA DEL SISTEMA DE REPARACION POR EXCISION, ENDO AP SE -
REFIERE A UNA ENDONUCLEASA ESPECIFICA PARA SITIOS APURICOS O
APIRIMIDICOS



pendará la tolerancia de las lesiones que persistan en el ADN, así como, las consecuencias que deriven de los tratamientos que lesionan el ADN.

b) Los sistemas Post-replicativos incluyen:

b.1. Sistema de Recombinación:

Consiste en el intercambio de fragmentos homólogos en la cadena del ADN tanto para procariotes como para eucariotes, este sistema se divide en: (20).

- Recombinación general o legítima. Consiste en el intercambio de segmentos homólogos, teniendo lugar en cualquier parte a to do lo largo de la cadena de ADN este proceso estudiado en -- E. coli depende una proteína reconocida como rec A.
- Recombinación del sitio específico o ilegítima. El intercam-- bio ocurre únicamente entre segmentos heterogéneos que depende de la codificación del donador y de las proteínas específicas del huésped más no de la proteína rec A.

Cuando la secuencia es restringida en sitio endonucleosómico se legitima continuando con un mínimo de apareamientos homólogos.

En estos mecanismos actúan también enzimas que intervienen en el sistema de reparación por excisión, pues al remover el segmento dañado se utiliza exonucleasa, complementación de la cadena con polimerasas y la unión se realiza con una ligasa.

b.2. Sistema SOS

Es dependiente del producto del gen llamado rec A este sistema - resulta de una polimerización errónea, es activable sólo cuando se han provocado lesiones al ADN que ocasionan discontinuidades en el momento de la replicación y un desequilibrio celular. (18).

III. ANTECEDENTES SOBRE LA CAPACIDAD MUTAGENICA DE LOS MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

Se mencionarán solamente los trabajos previos en los que se utilizaron sistemas bacterianos para determinar su mutagenicidad.

La dehidroemetina y niclosamida han resultado ser compuestos mutagénicos que ocasionan corrimiento estructural cuando son probados en el ensayo estándar en cepas de Salmonella typhimurium con el sistema de reparación UvrB deficiente (11,13).

La cloroquina fue estudiada por Rosenkranz y col. en el sistema de E. coli A⁺/A⁻ en el que resultó preferencialmente inhibida la cepa deficiente en la enzima de reparación polimerasa, sin embargo, en cepas de S. typhimurium no se indujeron mutaciones. Tutikawa y col. trabajaron con cepas de Bacillus subtilis probando 25 antihelmínticos, entre estos la cloroquina que resultó ser negativa y mencionan la generación de una sustancia capaz de producir mutaciones en E. coli y S. typhimurium, al interaccionar la cloroquina y otros de los antiparasitarios con nitrito de sodio en medio ácido a 37°C. (27,34). Por otra parte Shüpbach indica que la cepa TA-1537 de S. typhimurium revierte con este compuesto utilizando en el método de fluctuación (33).

Los compuestos mebendazol, yodoclorohidroxiquinolefina, diyodo hidroxiquinolefina y hexilresorcinol, se han probado en el sistema de S. typhimurium y no se obtuvo respuesta mutagénica (11).

El hidroxinaftoato de befenio y el pamoato de pirantel dieron resultados negativos, probados tanto en el sistema de B. subtilis por Tutikawa y col., como en el sistema de S. typhimurium (11,34).

El pamoato de pirvinio fue mutagénico para las cepas de S. typhimurium TA-100 y TA-98, que son más sensibles en la prueba estándar tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica, por lo que se cree que éste fármaco puede provocar mutaciones tanto de sustitución de bases como por corrimiento estructural (11).

IV. MATERIAL

a. Material Biológico

Ratas machos cepa CDI de 200 - 250 g de peso

Cepas mutantes de Salmonella typhimurium

Cepas silvestre y mutante de Escherichia coli

b. Material Químico

b.1. Medios

Agar nutritivo

Colocar 25 g de agar nutritivo oxoid No. 2, y 15 g de bacto agar, di solver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 minutos, vertir en cajas petri estériles.

Agar de superficie nutritivo

En un matraz de tapón de rosca de 125 ml agregar 2.5 g de medio agar oxoid No. 2, y 0.75 g de bacto agar, disolver en 100 ml de agua desti lada y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Caldo nutritivo

2.5 g de medio oxoid No. 2 colocarlos en envases de 125 ml aforar a - 100 ml con agua destilada y esterilizar a 121°C por 20 minutos.

Agar E. de Vogel-Bonner

Solución No. 1. En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar 600 ml de agua destilada agregando además con agitación constante y en orden como se indican los siguientes reactivos: 10 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 100.0 g de ácido cítrico; 500 g de K_2HPO_4 anhidro; 175 g de $NaNH_4 \cdot 4H_2O$; aforar con agua destilada a volumen, agregar 1 ml de cloroformo como conservador y almacenar a temperatura ambiente.

Por otra parte en: Matraz No. 1, agregar 15 g de bacto agar y 800 ml de agua destilada en un matraz de 2000 ml.

Matraz No. 2, agregar 20 g de dextrosa en un matraz de 250 ml y 100 ml de agua destilada.

Matraz No. 3, agregar 20 ml de solución No. 1 y 100 ml de agua destilada en un matraz de 250 ml, esterilizar por separado a $121^\circ C$ 20 minutos y reunir el contenido de los 3 matraces, mezclar por agitación y vertir aproximadamente 25 ml por caja de Petri estéril.

Agar de superficie E. de Vogel-Bonner

En un matraz de tapón de rosca de 125 ml agregar 0.6 g de bacto agar, 0.5 g de NaCl y 100 ml de agua destilada, esterilizar a $121^\circ C$ por 20 minutos. Cuando se utilice, se funde y se agrega 10 ml de solución estéril de histidina 0.5 mM.

Agar HA+T

Matraz No. 1, colocar en un matraz de 1000 ml los siguientes compuestos: 3.0 g de KH_2PO_4 ; 7.0 g de K_2HPO_4 ; 1.0 g de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 0.5 g de citrato de sodio; 0.4 ml de MgSO_4 1.0 M y agregar 500 ml de agua destilada agitando.

Matraz No. 2, colocar en un matraz de 1000 ml 15.0 g de bacto agar, 5.0 g de dextrosa y agregar 500 ml de agua destilada agitando.

Esterilizar por separado y posteriormente reunir las coluciones de los matraces No. 1 y No. 2 complementando la mezcla con 10 ml/lt. de hidrolizado de caseína al 1%, 5 mg/lt de clorhidrato de tiamina y 5 mg/lt de tiamina, enfriar el agar a 45°C y distribuir en cada caja de Petri porciones de 25 ml exactos. Mantenganse en refrigeración en bolsas de polietileno bien cerradas hasta el momento de usarse.

Agar de superficie HA+T

Procédase como la preparación de agar HA+T calculando para hacer 100 ml de medio para colocarlos en matraces de tapón de rosca de 125 ml y colocar 7.5 g/lt de bacto agar al matraz No. 2.

Caldo HA+T

Procédase como en agar HA+T calculando para hacer 100 ml de medio para colocarlos en envases de 125 ml de tapón de rosca sin agregar bacto agar al matraz No. 2.

c. Soluciones

- Solución de cloruro de magnesio 0.4 M - cloruro de potasio 1.65 M.
- Solución de cristal violeta
- Solución de Ampicilina
- Solución de L-histidina 0.5 mM - Biotina 0.5 mM
- Solución de L-histidina 0.1 M - Biotina 0.5 mM
- Solución reguladora de fosfatos de 0.2 M pH = 7.4
- Solución salina
- Solución reguladora de fosfatos pH = 7
- Solución de Aroclor 1254 200 mg/ml
- Solución de KCl 0.15 M

V. METODOS

1. Sistemas de Prueba Bacterianos

Las concentraciones de los medicamentos que se emplearon en este estudio coinciden con las de experimentos previos realizados en el laboratorio (11,13) en los que se seleccionó la concentración máxima de los compuestos problema con base en su toxicidad o solubilidad (la desaparición del crecimiento bacteriano de fondo se consideró como indicadora de toxicidad. a) Salmonella typhimurium: el sistema de Salmonella typhimurium fue desarrollado por el Dr. Bruce N. Ames (4,31) empleando -- para la prueba diversas cepas mutantes auxótrofas para histidina (his-), aisladas a partir de cepas silvestres de S. typhimurium. El genotipo de las cepas utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 3, dos de estas cepas se originaron debido a una mutación por substitución de bases y cuatro más por un corrimiento estructural (frameshift).

El procedimiento que se sigue en este sistema de prueba consiste en exponer a las cepas mutantes al compuesto problema y establecer la capacidad que tiene éste para revertirlas al fenotipo silvestre.

Dado que las mutaciones por substitución de bases usualmente son revertidas por una segunda mutación del mismo tipo, al igual que sucede con las mutaciones por corrimiento estructural, a través de esta prueba es posible determinar el mecanismo de las mutaciones producidas por la substancia en estudio.

La sensibilidad del sistema se ha incrementado mediante mutaciones adicionales o por la introducción de un plásmido como se describe a continuación.

TABLA 3. ORIGEN DE LAS CEPAS MUTANTES DE Salmonella typhimurium (23)

Tipo de mutación	Cepas Uvr ⁺		Mutantes originales	Cepas UvrB	
	Con plásmido (pKM-101)	Sin plásmido Gal _E -rfa.		Sin plásmido Gal -rfa.	Con plásmido (pKM-101)
Substitución de bases	UTH-8414	TA-1975	HIS-G46	TA-1535	TA-100
Frameshift adición (+1)	UTH-8412	TA-1977	HIS-C3076	TA-1537	TA-2637
Frameshift delección (-2)	UTH-8413	TA-1978	HIS-D3052	TA-1538	TA-98

- Mutación gal-rfa: Es una mutación que origina defectos en la capa de polisacáridos que recubre la bacteria permitiendo así el paso de compuestos de elevado peso molecular a través de ella; esta mutación se logro en dos pasos (3).

Paso 1: Se aislaron mutantes en condiciones anaeróbicas resistentes a 2-deoxi-galactosa y a cloratos debido a una deleción en el operón de galactosa (gal) y biotina (bio).

Paso 2: Posteriormente se aislaron cepas mutantes resistentes al bacteriófago C-21, dichas mutantes poseen una elevada sensibilidad al cristal violeta y su morfología colonial es rugosa (rfa).

- Factor R: la introucción de un plásmido a las cepas auxotrofas a histidina les confiere, además de la resistencia a la ampicilina una sensibilidad mayor a los agentes mutagénicos (4).

A diferencia de las cepas tradicionales de S. typhimurium empleadas en las pruebas de mutagenesis, que contienen una deleción en el gen que codifica para una de las enzimas encargadas de la reparación del daño provocado por los rayos ultravioleta (UvrB), en las cepas ocupadas en este trabajo el sistema de reparación no se encuentra dañado (Uvr⁺).

a.1. Obtención y mantenimiento de las cepas mutantes de S. typhimurium

Estas cepas fueron obtenidas de cultivos donados por el Dr. Bruce N. Ames, los cuales vienen en viales conteniendo las bacterias en --

agar blando, de ahí se toma una asada para iniciar cultivos de mantenimiento, incubando en caldo nutritivo 16 hrs a 37°C y 200 rpm de agitación. -- Transcurrido este tiempo, se prueba cada una de las cepas con el fin de verificar:

a.1.1. La presencia de marcadores genéticos.

a.1.2. La reversión espontánea.

a.1.3. La sensibilidad a mutágenos específicos ya conocidos.

- Los cultivos de reserva primarios se obtienen de tomar 0.8 ml de suspensión bacteriana, más 0.07 ml de Dimetil sulfoxido (DMSO) y se conserva a -80°C.

- Los cultivos de reserva secundarios se obtienen de sembrar una -- asada del cultivo de 16 hrs de incubación, en cajas con medio mínimo sólido E. de Vogel-Bonner complementando con exceso de histidina-biotina, agregando además 0.1 ml de una solución de ampicilina (8 mg/ml) para aquellas cepas que posean plásmido pKM 101.

- Los cultivos que se usan en las pruebas de mutagénesis se obtienen de tomar una asada del cultivo de reserva secundario y sembrarlo en caldo nutritivo, incubando a 27°C por 16 hrs y 200 rpm de agitación.

a.2. Verificación de la presencia de marcadores genéticos

- Requerimiento de histidina

Se siembra, por medio de estrías, un cultivo de 16 hrs sobre cajas de Petri con medio agar E. de Vogel-Bonner. Se hace lo mismo

sobre agar E. de Vogel-Bonner complementado con exceso de histidina-biotina. Solo las cajas complementadas con histidina-biotina tendrán crecimiento después de incubar de 12 a 24 hrs 37°C.

- Sensibilidad al cristal violeta

Para verificar la presencia del marcador "rfa", se determina la sensibilidad de las cepas al cristal violeta al inocular 0.1 ml de cultivo en cajas de Petri con medio de agar E. de Vogel-Bonner (complementado con exceso de histidina-biotina), posteriormente se coloca un sensidisco estéril en el centro de la caja en donde se vierte con ayuda de una pipeta, 10 mcl de solución de cristal violeta (1 mg/1 ml). Si se encuentra presente la mutación se observará una zona de inhibición alrededor del disco, tras de incubar a 37°C de 12 - 24 hrs.

- Presencia de plásmido

Para comprobar la resistencia a la ampicilina, se traza una estría de solución de ampicilina sobre cajas de Petri que contengan agar E. de Vogel-Bonne (complementado con exceso de his-biot) y se deja secar. Perpendicularmente a las estrias de ampicilina se hace una estría con cada cepa, se deja secar y se incuba de 12 - 24 hrs a 37°C. Las cepas sin plásmido presentan una zona de inhibición alrededor de la estría de ampicilina.

- Sensibilidad a la luz ultravioleta

En cajas de Petri que contengan agar E. de Vogel-Bonner con exceso de histitidina-biotina se colocan estrias de las cepas a pro-

bar, la mitad de la caja se cubre con papel aluminio y se irradia (con lámpara germicida de luz ultravioleta de 15 W a 33 cm) por 6 segundos a las cepas sin plásmido y 8 segundos a las cepas con plásmido. Si las cepas contienen su sistema de reparación intacto crecerán en la zona irradiada y no irradiada después de la incubación de 12 - 24 hrs.

a.3. Reversión espontánea

Se toma 0.1 ml de cultivo incubado previamente 16 hrs, y se coloca en tubos de ensayo con tapón de rosca el cual contiene 2 ml de agar de superficie a 45°C, se agita suavemente y se vierte en cajas de Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner, se deja solidificar y se incuban las cajas invertidas a 37°C por 48 hrs, al cabo de las cuales se cuentan las revertantes espontáneas.

a.4. Ensayo de mutagenicidad con cepas de Salmonella typhimurium

En tubos con tapón de rosca (que contengan 2 ml de agar de superficie E. de Vogel-Bonner y 0.2 ml de solución de L-histidina 0.5 mM - Biotina 0.5 mM) se mantienen en baño maría a 45°C al iniciar el experimento. A continuación se les agrega secuencialmente lo siguiente: 0.1 ml de solución del compuesto en estudio al grupo problema y 0.1 ml de la solución que contiene el solvente al grupo control. A la mitad de los tubos (tanto controles como problema) se les agrega además 0.5 ml de mezcla S-9 para determinar la mutagenicidad de los metabolitos del compuesto. Finalmente se mezcla cuidadosamente sin

agitación brusca y se siembra rápidamente sobre cajas de Petri que contengan agar E. de Vogel-Bonner. Se deja solidificar el agar de superficie, se invierten las cajas para incubarlas por 48 hrs a -- 37°C. Se probarán tres concentraciones por lo menos, por duplicado. Tras la incubación se cuentan las colonias revertantes.

- Cuenta viable. Se realizan simultáneamente al ensayo mutagénico haciendo diluciones a partir de 0.5 ml de cultivo de trabajo que se vierten a tubos de tapón de rosca que contienen 4.5 ml de solución salina fisiológica. Se procede a realizar otras diluciones similares hasta alcanzar una dilución de 10^{-6} . Finalmente se toman alícuotas de 0.1 ml de esta dilución y se agregan a tubos -- conteniendo agar de superficie nutritivo, se mezclan y se vierten en cajas de Petri que contengan agar nutritivo. Una vez solidificadas se invierten e incuban 24 hrs. Se cuentan las colonias debiendo encontrar entre 1×10^9 a 2×10^9 en el cultivo de trabajo original.

b) Escherichia coli

El sistema de Escherichia coli ha sido desarrollado por el - Dr. Herbert S. Rosenkranz (30,8) y se basa en el empleo de dos cepas; - una de ellas es de tipo silvestre (pol A⁺) y la otra es una cepa mutante para el gen que codifica para la enzima ADN-polimerasa I (Pol A⁻), enzima que tiene un papel muy importante en los procesos de reparación.

La obtención de esta cepa se logró exponiendo cepas silvestres a un potente mutágeno, N-metil-N-nitro N-nitrosoguanidina que produ

jo una mutación sin sentido del tipo ambar. La sensibilidad de esta cepa a las radiaciones de luz ultravioleta y a los agentes radiomiméticos y químicos es sumamente elevada (9,15).

El fundamento de este sistema consiste en establecer la diferencia en el tamaño del halo de lisis, o en el número de sobrevivientes de la cepa silvestre Pol A⁺ y la cepa mutante Pol A⁻ después de haber sido expuestas al compuesto en estudio. Se espera que la cepa Pol A⁻ sea más vulnerable a la acción de agentes que lesionan el ADN, ya que no es capaz de reparar el daño y esto provoca una mayor muerte celular (12,19).

Con la finalidad de obtener datos más confiables de los compuestos en estudio, se decidió trabajar las dos pruebas bacterianas en paralelo. Se sabe en efecto que el sistema de Salmonella typhimurium es muy flexible bajo condiciones rutinarias, más no infalible (28,29) pues algunas clases de sustancias mutagénicas solamente han sido detectadas en el sistema de E. coli por lo que pueden complementarse mutuamente.

b.1. Obtención y mantenimiento de las cepas de Escherichia coli

Estas cepas fueron obtenidas de cultivos donados por el Dr. Herbert S. Rosenkranz, los cuales vienen en viales de donde se toma una asada para los cultivos de mantenimiento y se incuba en un caldo HA+T toda la noche a 37°C y 200 rpm de agitación.

Transcurrido este tiempo se prueba cada una de las cepas con el fin de verificar la sensibilidad a mutágenos específicos ya conocidos.

- El cultivo de reserva primario se obtiene de tomar una alícuota del inóculo incubado durante toda la noche añadiendo glicerol al 10% y posteriormente se mantiene a -20°C .
- El cultivo de reserva secundario se obtiene inoculando una asada de cultivo incubado toda la noche en agar HA+T inclinado, posteriormente se incuba éste durante 16 hrs en donde se obtiene un crecimiento abundante y se guarda en refrigeración. Este cultivo debe usarse en un tiempo máximo de mes y medio; a partir del cual se repite el procedimiento para obtener el nuevo cultivo de reserva secundario.
- El cultivo de trabajo para la prueba genotoxicidad se obtiene de tomar una asada del cultivo secundario y colocarla en matraces de 250 ml que contengan 15 ml de medio HA+T líquido fresco, incubando a 37°C toda la noche a 200 rpm.

b.2. Verificación de la sensibilidad a mutágenos específicos ya conocidos en ausencia de activación metabólica.

En tubos con tapón de rosca que contengan 2 ml de agar de superficie HA+T se agrega 0.1 ml de cultivo de trabajo, se mezcla suavemente y se platea en cajas de Petri que contengan agar HA+T, se deja solidificar y se procede a colocar un sensidisco en el centro de las cajas en el que se vierten; 10 mcl de etilmetano-sulfonato como primer control positivo en una caja, 10 mcl de metil-metanosulfonato como segundo control positivo en otra caja y en una tercera caja

10 mcl de cloranfenicol levógiro como control negativo (30 mcg/10 mcl). Se hace esto por duplicado para cada una de las cepas de Escherichia coli.

Posteriormente se invierten las cajas para incubar durante 16 hrs. a 37°C al cabo de las cuales se miden los diámetros de inhibición alrededor de los sensidiscos. Los valores obtenidos deben coincidir con los de la literatura; con el cloranfenicol deberá encontrarse, para las dos cepas, diámetros iguales alrededor del sensidisco de 30 mm, con el etil-metanosulfonato para la cepa Pol A⁺ 0.0 mm - de inhibición y para la cepa Pol A⁻, alrededor de 20 mm, con respecto al metilmetanosulfonato para la cepa Pol A⁺ el diámetro de inhibición es alrededor de 35 mm y para la Pol A⁻ es de 54 mm.

- b.3. Verificación de la sensibilidad a pre-mutágenos (compuestos que requieren ser activados metabólicamente para ejercer su acción genotóxica).

Para este propósito se utilizaron los compuestos ciclofosfamida y 2-aminoantraceno. Los pasos a seguir, son esencialmente los mismos descritos anteriormente con la diferencia de que se agrega 0.5 ml - de mezcla 39 en el tubo con medio HA+T de superficie además de 0.1 ml de cultivo de trabajo.

- b.4. Ensayo genotóxico con cepas de Escherichia coli Pol A⁺/A⁻

En tubos de tapón de rosca que contengan 2 ml de agar de superficie HA+T (se mantienen a una temperatura constante de 45°C) se agregan

0.1 ml del cultivo de trabajo y 0.5 ml de mezcla S9 en los que se quiera determinar la respuesta del compuesto en presencia de activación metabólica. Se mezcla suavemente y se siembra en cajas de Petri que contengan agar HA+T, se deja solidificar y se coloca un sensidisco en el centro de las cajas en el que se vierten: 10 mcl del solvente como control ó 10 mcl del compuesto en estudio a la concentración deseada; posteriormente se invierten las cajas para incubarlas por 16 hrs a 37°C. Para después medir los diámetros de inhibición alrededor de los sensidiscos (si no son claros los halos se dejan a temperatura ambiente 24 hrs más).

Cuentas viables

Se realizan simultáneamente al ensayo genotóxico en la misma forma que se describió para S. typhimurium con excepción de los medios específicos de crecimiento de esta cepa.

c. Determinación de la actividad genotóxica de metabolitos

Se sabe que numerosos compuestos sufren transformaciones metabólicas cuando están en contacto con las enzimas presentes en los organismos vivos y que estas transformaciones son las responsables de que determinado compuesto pueda adquirir su forma genéticamente activa (22). Así el uso de microorganismos que carecen de las enzimas activas presentes en mamíferos, hace indispensable diversas estrategias para tratar de solucionar este problema, tales como el empleo de:

- a) Activación metabólica: realizada por enzimas microsomales de -- hígado de roedores, presentes en el sobrenadante fracción S9) - que resulta después de la centrifugación a 9000 Xg de un homogeⁿnado hepático, el cual se agrega directamente al sistema de - prueba.
- b) Líquidos corporales de mamíferos intactos; tales como roedores o humanos expuestos al compuesto en estudio y cuya sangre y oriⁿna se agregan al sistema de prueba.
- c) Ensayo vía al hospedero: en el que se administra el compuesto problema al animal intacto, al cual se ha introducido previamen^tte el organismo detector (bacterias o levaduras) generalmente - en cavidad peritoneal, y posteriormente se recupera dicho orgaⁿnismo para la medición del daño genético ocasionado.

c.1 Preparación del homogenado hepático

Se eligen ratas de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 200 - 250g a las que se les administra por vía intraperitoneal 500 mg/Kg de -- peso de una solución de aroclor 1254 (200 mg/ml en aceite de maíz). Se mantienen cinco días más con alimento y agua "ad libitum", trans^ccurrido este tiempo, se sacrifican las ratas por dislocación cervi^ccal, se procede a la extracción del hígado por disección, se coloca en un vaso de precipitado (previamente tarado y estéril) que contieⁿne 15 ml de solución de KCl 0.15 M para cada hígado. El peso del - hígado se determina por diferencia.

Después se transfieren todos los hígados a un solo vaso de precipitado estéril, que contenga 3 ml de solución KCl 0.15 M por gramo de hígado, se cortan en trozos pequeños con una tijera estéril, se homogeniza con ayuda de un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón y se centrifuga por 10 minutos a 9000 xg.

El sobrenadante corresponde a la fracción S9 microsomal que se distribuye en viales con tapón de rosca de 5 ml de capacidad, a razón de 1 ml por vial, se congelan rápidamente sobre hielo seco y se mantiene a -80°C .

Todo el ensayo debe de realizarse asépticamente, con todo el material estéril y desde que se extrae el hígado deberá de mantenerse a baja temperatura con hielo, para evitar la inactivación de las enzimas microsomales contenidas en la fracción S9.

c.2. Evaluación de la cantidad óptima de homogenado.

Para medir la actividad de las enzimas microsomales hepáticas se utilizan compuestos que solo producen mutaciones al ser metabolizados. El Benzo [a] Pireno (10 mcg/caja) se emplea con la cepa TA-100 y el 2-aminoantraceno (5 mcg/caja) con la cepa TA-98.

Las mezclas de reacción se prepararon como sigue:

Tubo	Fracción S9 (ml)	MgCl ₂ -KCl (ml)	Amortiguador pH = 7.4 (ml)	Fracción S9 por ml de mezcla S9
I	0.00	0.08	4.00	0
II	0.08	0.08	3.92	20 ul
III	0.40	0.08	3.60	100 ul
IV	0.80	0.08	3.20	200 ul
V	1.20	0.08	2.80	300 ul
VI	4.00	0.20	6.00	400 ul

Complementar los tubos con NADP 4 mM/ml y G-6P 5 mM/ml

Cada uno de los controles y concentraciones se siembran por tripli cado, tomando como base la Tabla 4, vertiendo cada una de estas -- mezclas de reacción en tubos que contengan 2 ml de agar de superfi cie Vogel-Bonner e inmediatamente 0.1 ml de cultivo bacteriaron -- que contenga aproximadamente de 1×10^6 - 2×10^6 colonias por mi- lilitro, se mezcla suave y rápidamente después de lo cual se vier- te el contenido del tubo en cajas de Petri con agar E. de Vogel- Bonner. Incubar a 37°C durante una noche y contar las colonias.

TABLA 4. ENSAYO PARA LA EVALUACION DEL HOMOGENADO EN CEPAS DE S. typhimurium

Caja	Bacteria TA 1000 ó TA 98 (0.1 ml)	Mezcla S9 (0.5 ml)	Compuesto mutagénico (benzo [a] pireneno o 2-amino- antraceno) (0.1 ml)	DMSO (0.1 ml)
1	+	---	---	---
2	+	---	---	+
3	+	200 mcl de fracción S9	---	---
4	+	200 mcl " " "	---	+
5	+	sales	+	---
6	+	10 mcl de fracción S9	+	---
7	+	50 mcl de fracción S9	+	---
8	+	100 mcl " " "	+	---
9	+	150 mcl " " "	+	---
10	+	200 mcl " " "	+	---

+ Ver resultados página (40-41)

DMSO = Dimetil-Sulfóxido

VI. RESULTADOS

1. Salmonella typhimurium:

1a. Comprobación de marcadores genéticos:

En las cepas de S. typhimurium no presentó problemas ya que se obtuvieron los resultados esperados después de aplicar las pruebas descritas anteriormente (págs. 26-28).

1b. Frecuencia de reversión:

La estabilización del crecimiento de las cepas no fue problemático en cuanto a que se logró un crecimiento celular de $1-2 \times 10^9$ /ml. - El número de revertantes espontáneas de cada cepa se encuentra en la Tabla (5).

1c. Determinación de la cantidad óptima de mezcla S-9

Con respecto a la cantidad de mezcla (S-9) que se debe utilizar para los ensayos mutagénicos así como para verificar que se encuentra activa la fracción microsomal hepática se realizaron dos experimentos a -- cinco diferentes concentraciones se encontró (Fig. 2 y 3) que con respecto a la actividad de esta fracción en los dos ensayos se detecto actividad -- normal, así como para el ensayo con las dos cepas de E. coli y para las -- cepas de S. typhimurium la cantidad de homogenado hepático estuvo correcta.

1d. Determinación de la mutagenicidad de los medicamentos.

TABLA 5: NUMERO DE REVERTANTES ESPONTANEOS DE CADA CEPA UTILIZADA

Cepa	No. de revertantes espontáneos
<u>Uvr⁺ sin plásmido</u>	
TA-1975	2,2,3
TA-1977	13,11,13
TA-1978	19,12,15,21
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>	
UTH-8412	13,20,21,12,17,12,12,13
UTH-8413	10,16,16,14,14,17,14,15,13
UTH-8414	15,19,11,15,14,15,14,16,14
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>	
TA-100	131
TA- 98	25
<u>UvrB sin plásmido</u>	
TA-1538	29

Fig. 2. CURVA DOSIS-RESPUESTA CON HOMOGENADO HEPATICO CON 2-AMINO-ANTRACENO (2-AA) UTILIZANDO LA CEPA TA-98 Y CON BENZO [a] PIRENO UTILIZANDO LA CEPA TA-100

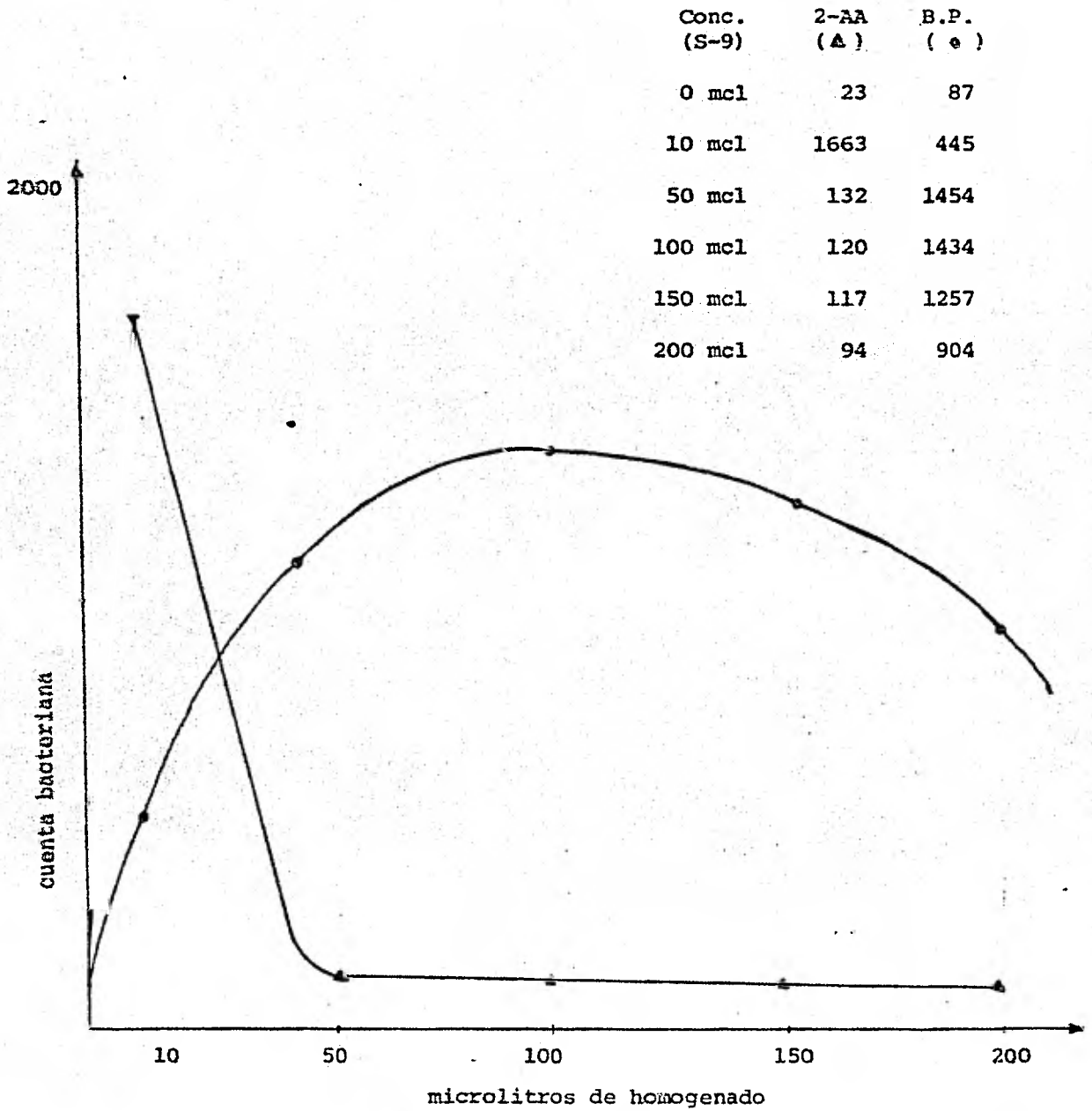
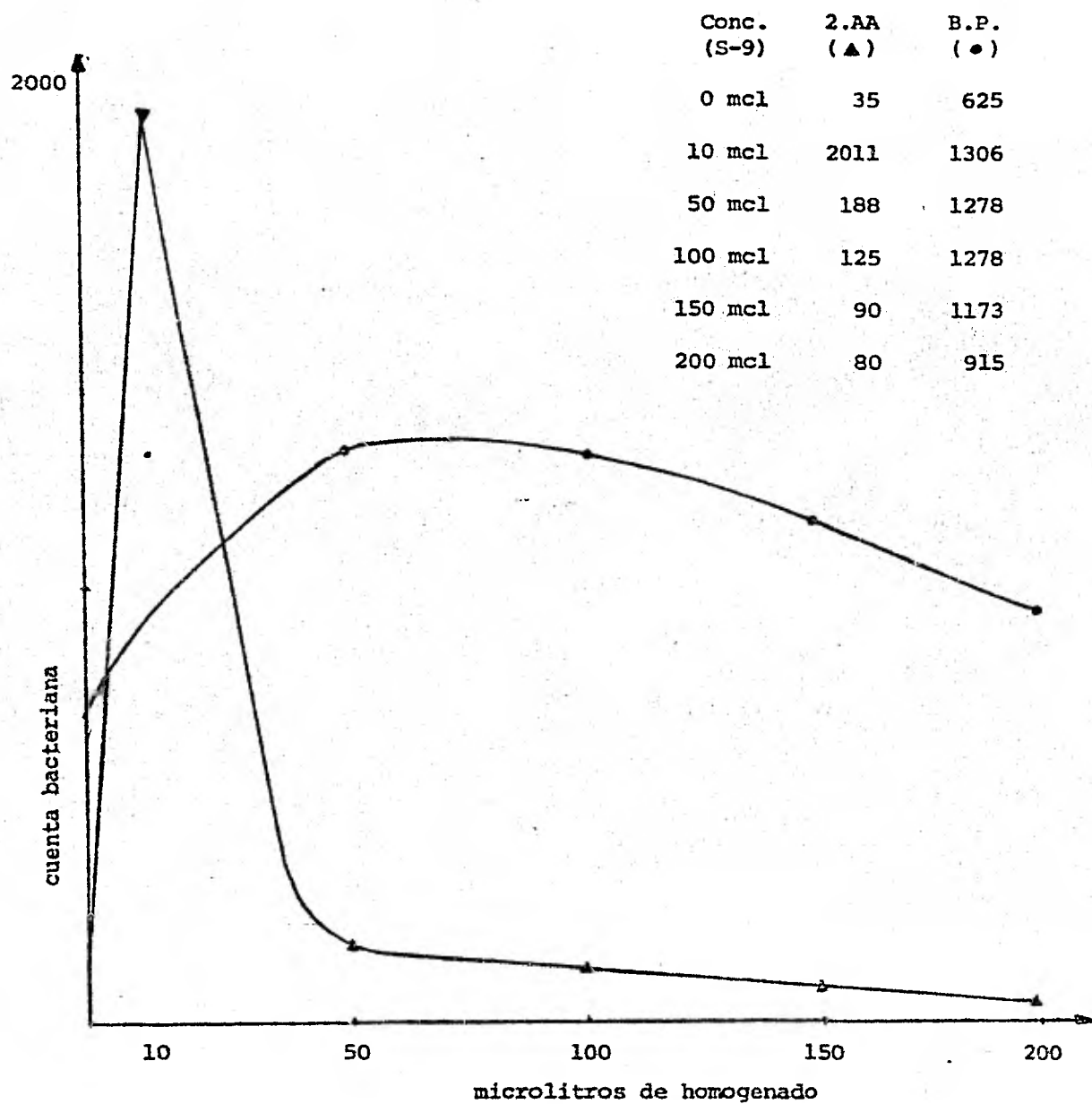


Fig. 3. CURVA DOSIS-RESPUESTA CON HOMOGENADO HEPATICO CON 2-AMINO-ANTRACENO (2-AA) UTILIZANDO LA CEPA TA-98 Y CON BENZO [a] PIRENO (B.P.) UTILIZANDO LA CEPA TA-100



Comparación de la reversión en cepas Uvr+ y UvrB en presencia de Pamoato de Pirvinio y ausencia de activación metabólica.

Como se muestra en la Tabla 6 el Pamoato de Pirvinio es capaz de inducir mutaciones en las cepas Uvr+ que poseen plásmido tales son UTH-8414 (mutante por sustitución de bases) y UTH 8414 (mutante por corrimiento) en ausencia de activación metabólica. Este resultado coincide con el encontrado previamente en el laboratorio en las cepas UvrB y corroborado en nuestro estudio en las cepas UvrB TA-100 y TA-98 a las que se expuso a una sola dosis del compuesto como control interno (2.5 mcg/caja).

En las cepas mutantes por sustitución de bases UTH-8414 y TA-100 el pirvinio incrementó la frecuencia de reversión espontánea hasta 9 y 2.8 veces respectivamente. En las cepas mutantes por corrimiento estructural, dicho incremento fue de 3 veces para la cepa UHT-8412 y de 4,2 veces para la cepa TA-98.

Comparación de la reversión en cepas Uvr+ y UvrB expuestas a niclosamida en presencia y ausencia de las enzimas microsomaes hepáticas.

Los resultados que aparecen en la Tabla 7 indican que la niclosamida no provoca reversión en las cepas Uvr+ TA-1978 (mutante por corrimiento) sin plásmido, pero induce un efecto tóxico, aunque este poco acentuado en presencia de las enzimas microsomaes hepáticas. Por el contrario y tal como se encontró previamente en el laboratorio este compuesto antihelmíntico sí es capaz de provocar reversión en las cepas UvrB TA-1538 (mutante por corrimiento) sin plásmido en presencia del sistema de activa-

TABLA 6. COMPARACION DE LA REVISION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺ Y UvrB) EXPUESTAS A PAMOATO DE PIRVINIO EN AUSENCIA DE ACTIVACION METABOLICA

Cepa	Pamoato de pirvinio mcg/caja						
	0	DMSO	1.0	1.5	2	2.5	
Uvr ⁺ sin plásmido	TA-1978	19	19	16	16	16	20
	TA-1977	13	13	12	12	14	14
	TA-1975	2	2	3	4	3	3
Uvr ⁺ con plásmido	UTH-8414	15	11	<u>78</u>	<u>109</u>	<u>123</u>	<u>135*</u>
	UTH-8413	10	11	12	11	12	14
	UTH-8412	13	12	<u>32</u>	<u>30</u>	<u>29</u>	<u>41</u>
UvrB con plásmido	TA-100	131	125	N.D.	N.D.	N.D.	<u>377*</u>
	TA- 98	25	25	N.D.	N.D.	N.D.	<u>106</u>

Los resultados que aparecen subrayados se consideran positivos.

N.D. = No se determinó

* = Toxicidad

TABLA 7. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺ Y UvrB) EXPUESTAS A NICLOSAMIDA, EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMA MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa		Niclosamida mcg/caja					50
		0	DMSO	5	10	25	
<u>Uvr⁺ sin plásmido</u>							
TA-1978	-S 9	12	11	7*	5*	0*	0*
	+S 9	21	15	22	25	11*	0*
<u>UvrB sin plásmido</u>							
TA-1538	-S 9	29	29	10*	4*	0*	0*
	+S 9	31	31	<u>364</u>	<u>834</u>	0*	0*

Los resultados que aparecen subrayados se consideran positivos.

* = Efecto tóxico

ción metabólica (S-9) a la vez que muestra toxicidad elevada en ausencia de dicho sistema enzimático.

Comparación de la reversión de la cepa S. typhimurium (Uvr+)
expuesta a difosfato de cloroquina en presencia o ausencia de enzimas mi-
crosoales hepáticas (S-9)

En la Tabla 8 se observa que la cloroquina no es capaz de inducir mutaciones en ninguna de las cepas Uvr+ empleadas, en las condiciones del estudio y a las dosis utilizadas. Tampoco se apreció un efecto tóxico notable, salvo para la cepa UTH-8412 a la dosis de 10,000 mcg y en ausencia del sistema enzimático microsomal.

Estos resultados discrepan con la datos positivos reportados en la literatura y encontrados en el laboratorio empleando las cepas UvrB - TA-1537 en el ensayo de fluctuación.

Reversión en cepas de S. typhimurium (Uvr+) expuestas a dehi-
droemetina en presencia o ausencia de enzimas microsomaes hepáticas (S-9).

En la Tabla 9 se muestra que la dehidroemetina no resultó mutagénica en este ensayo contrariamente a los resultados previos obtenidos en el laboratorio, en los que indujo reversiones en la cepa Uvr+ TA-98 en presencia del sistema de activación metabólica. Se aprecia sin embargo un ligero efecto tóxico en ausencia de las enzimas hepáticas, en las cepas TA-1977 y UTH-8413.

TABLA 8. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE *S. typhimurium* (Uvr⁺) EXPUESTAS A DIFOSFATO DE CLOROQUINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa		Difosfato de cloroquina mcg/caja					
		0	H ₂ O	10	100	1000	10,000
<u>Uvr⁺ sin plásmido</u>							
TA-1978	-S 9	15	15	15	15	15	9
	+S 9	28	26	28	18	19	18
TA-1977	-S 9	11	11	9	9	9	6
	+S 9	15	15	12	12	21	9
TA-1975	-S 9	2	2	3	3	2	2
	+S 9	2	2	1	1	1	1
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>							
UTH-8414	-S 9	19	21	21	20	22	20
	+S 9	20	20	21	22	24	21
UTH-8413	-S 9	16	14	15	13	15	15
	+S 9	20	20	18	18	21	19
UTH-8412	-S 9	20	19	28	21	19	0*
	+S 9	20	23	34	33	31	31

* = Efecto tóxico

TABLA 9. REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺)
EXPUESTAS A DEHIDROEMETINA EN PRESENCIA O
AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS
(S-9)

Cepa		0	Dehidroemetina mcg/caja				
			H ₂ O	3	30	300	3000
<u>Uvr⁺ sin plásmido</u>							
TA-1978	-S 9	21	21	23	24	17	19
	+S 9	48	40	52	42	40	38
TA-1977	-S 9	13	13	12	7*	7*	6*
	+S 9	13	12	11	13	13	12
TA-1975	-S 9	3	4	4	3	4	3
	+S 9	4	4	3	4	4	2
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>							
UTH-8414	-S 9	11	11	13	15	15	11
	+S 9	18	20	29	22	22	19
UTH-8413	-S 9	16	17	13	17	17	8*
	+S 9	24	25	25	28	21	22
UTH-8412	-S 9	21	20	20	20	23	23
	+S 9	24	22	23	23	23	25

* = Efecto tóxico

Reversión en cepas Uvr+ expuestas a: hidroxinaftoato de befenio, hexilresorcinol, mebendazol, pamoato de pirantel, yodoclorohidroxiquinoleína y diyodohidroxiquinoleína

Con base en los resultados obtenidos previamente en el laboratorio con las cepas UvrB y por nosotros en el estudio de pirvinio en cepas Uvr+ y UvrB, en los que las cepas con plásmido mostraron una mayor sensibilidad al efecto mutagénico de los compuestos, se optó en utilizar sólo cepas con plásmido para probar los fármacos restantes.

Los resultados que aparecen en las Tablas 10 a 15 indican que, en las condiciones empleadas en estas pruebas el hidroxinaftoato de befenio, el hexilresorcinol, el mebendazol, el pamoato de pirantel, la yodoclorohidroxiquinoleína y la diyodohidroxiquinoleína, no producen reversión en las cepas Uvr+ utilizadas, tampoco se observó un efecto tóxico salvo para la dosis mayor de befenio (cepa UHT-8412 S-9), de yodoclorohidroxiquinoleína y la diyodohidroxiquinoleína en las tres cepas principalmente sin S-9.

TABLA 10. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺) EXPUESTAS A HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S9)

Cepa		Hidroxi-naftoato de befenio mcg/caja					
		0	DMSO	2	20	200	2,000
<u>Uvr⁺</u> <u>con</u> <u>plásmido</u>	UTH-8414 -S 9	15	15	16	14	15	17
	+S 9	15	16	14	17	16	14
UTH-8413	-S 9	14	15	14	15	15	16
	+S 9	22	23	22	20	22	20
UTH-8412	-S 9	12	11	12	13	13	8*
	+S 9	12	14	13	15	14	12

* = Efecto tóxico

TABLA 11. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺) EXPUESTAS A HEXILRESORCINOL EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa		Hexilresorcinol mcg/caja					30
		0	DMSO	5	10	25	
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>							
UTH-8414	-S 9	14	14	14	13	12	13
	+S 9	14	14	14	14	13	20
UTH-8413	-S 9	14	15	15	14	14	14
	+S 9	27	27	26	26	27	27
UTH-8412	-S 9	17	17	17	16	17	17
	+S 9	20	19	19	20	21	23

TABLA 12. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺) EXPUESTAS A MEBENDAZOL EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa		Mebendazol mcg/caja					
		0	DMSO	0.15	1.5	15	150
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>							
UTH-8414	-S 9	15	13	13	14	15	16
	+S 9	15	17	17	16	16	16
UTH-8413	-S 9	17	18	19	19	18	19
	+S 9	18	21	22	21	21	21
UTH-8412	-S 9	18	19	18	19	18	19
	+S 9	22	20	20	20	21	22

TABLA 13. COMPARACION DE LA REVERSION EN CEPAS DE S.typhimurium (Uvr⁺) EXPUESTAS A PAMOATO DE PIRANTEL EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S 9)

Cepa		Pamoato de pirantel mcg/caja						
		0	DMSO	0.75	7.5	75	750	7,500
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>								
UTH-8414	-S 9	14	13	14	13	14	13	11
	+S 9	13	14	14	16	14	14	14
UTH-8413	-S 9	14	14	17	15	15	16	13
	+S 9	16	15	17	16	16	17	14
UTH-8412	-S 9	12	12	13	13	13	12	13
	+S 9	15	14	17	17	15	13	12

TABLA 14. REVERSION EN CEPAS DE *S. typhimurium* (Uvr⁺) EXPUESTAS A YODOCLOROHIDROXIQUINOLEINA EN PRESENCIA O - AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa		Yodoclorohidroxiquinoleína mcg/caja					
		0	DMSO	0.03	0.3	3	30
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>							
UTH-8414	-S 9	16	14	14	13	13	0*
	+S 9	15	14	13	15	14	14
UTH-8413	-S 9	15	17	17	15	13	0*
	+S 9	25	29	29	28	24	20
UTH-8412	-S 9	12	13	13	12	12	0*
	+S 9	19	23	24	28	23	0*

* = Efecto genotóxico

TABLA 15. REVERSION EN CEPAS DE S. typhimurium (Uvr⁺) EXPUESTAS A DIYODOHIDROXIQUINOLEINA EN PRESENCIA O AUSENCIA DE ENZIMAS MICROSOMALES HEPATICAS (S-9)

Cepa	Diyodohidroxiquinoleína mcg/caja							
	0	DMSO	0.3	1.5	3	9	30	
<u>Uvr⁺ con plásmido</u>								
UTH-8414	-S 9	14	13	14	14	13	12	0*
	+S 9	13	14	15	16	15	16	10
UTH-8413	-S 9	13	15	13	13	14	11	0*
	+S 9	17	15	13	14	14	14	5*
UTH-8412	-S 9	13	13	13	11	11	12	0*
	+S 9	14	15	15	15	16	14	6*

* = Efecto genotóxico

2. Determinación de la capacidad de los medicamentos de producir daño en ADN no reparado en Escherichia coli

2a. Comprobación de marcadores genéticos:

- Halos de lisis producidos por mutágenos conocidos: En la Tabla 16 se muestran el valor de los diámetros de halos de lisis producidos por los mutágenos conocidos empleados como controles positivos: metilmetanosulfonato (MMS) etilmetano sulfonato (EMS), ciclofosfamida (CF) 2 aminoantraceno (2AA) y cloranfenicol (CL) tal como se señaló anteriormente al describir la prueba (pág. 32). El MMS produjo en la cepa Pol A⁺ un halo de -- alrededor de 24 mm y en la Pol A⁻ de 53 mm en ausencia de activación metabólica -S9 mientras que en presencia de ésta, (+S9) los halos fueron de 33 mm y 48 mm para las cepas Pol A⁺/Pol A⁻ respectivamente. El EMS no inhibió la cepa Pol A⁺ mientras que en la Pol A⁻ produjo halos de 18 mm de inhibición. Tanto la ciclofosfamida como el 2-aminoantraceno utilizados como controles positivos con activación, no mostraron actividad inhibitoria para ninguna de las dos cepas de E. coli probadas. Con respecto al control negativo - utilizado, se observa que el cloranfenicol produjo halo de inhibición de - 30 y 20 mm en las cepas Pol A⁺ y Pol A⁻ respectivamente, cuando se agregó S-9 al sistema, la inhibición se redujo a 22 mm para la cepa Pol A⁺ y 21 - para la Pol A⁻.

2b. Determinación del efecto genotóxico de amebicidas y antihelmínticos

No se observó ningún efecto en las cepas Pol A⁺/Pol A⁻ expuestas a los medicamentos en presencia o ausencia del sistema de enzimas microsomas hepáticas en las concentraciones respectivas Tabla 16.

TABLA 16. DIAMETROS DEL HALO DE LISIS EN LA PRUEBA ESTANDAR EN E. coli Pol A⁺/A⁻ SIN ACTIVACION Y CON ACTIVACION METABOLICA MEDIADA POR LA FRACCION S-9

Agente químico	Cantidad por disco	Diámetro (mm)			
		Pol A ⁺ -S-9	Pol A ⁻ -S-9	Pol A ⁺ +S-9	Pol A ⁻ +S-9
DMSO	10 mcl	0	0	0	0
Agua	10 mcl	0	0	0	0
Metil-metanosulfo nato	10 mcl	24	53	33	48
Etil-metano-sulfo nato	10 mcl	0	18	N.D.	N.D.
Ciclofosfamida	250 mcg/10 mcl	N.D.	N.D.	0	0
2-Amino-Antraceno	100 mcg/10 mcl	N.D.	N.D.	0	0
Cloranfenicol	30 mcg/10 mcl	30	29	22	21
Pamoato de Pir- vinio	5 mcg/10 mcl	15	15	0	0
Niclosamida	0.5 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Pamoato de Piran- tel	75 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Mebendazol	1.5 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Hexilresorcinol	0.3 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Hidroxinaftoato de Befenio	30 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Dehidroemetina	30 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Cloroquina	1200 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Diyodohidrox- i-quinolefina	0.3 mcg/10 mcl	0	0	0	0
Yodoclorohidro xi-quinolefina	0.3 mcg/10 mcl	0	0	0	0

N.D. = No se determinó

VII. DISCUSION

Los resultados obtenidos se valoraron conforme a parámetros de dispersión de mediana, por considerar estos datos como dentro de métodos no paramétricos.

Mutagenicidad en *S. typhimurium*

Para considerar a un compuesto como positivo se tomaron en cuenta los siguientes criterios: reproducibilidad de datos, respuesta dependiente de la concentración, e incremento del número de revertantes que dupliquen la frecuencia de mutación espontánea.

En lo que respecta al pamoato de pirvinio nuestro estudio corroboró la mutagenicidad de este fármaco reportado previamente en las cepas TA-98 y TA-10C (11), las reversiones en las cepas mutantes por sustitución de bases se incrementan cuando se encuentra presente el mecanismo de reparación Uvr. Sin embargo las ocasionadas en las cepas mutantes por corrimiento estructural parecen ser atenuadas por la intervención del mecanismo de reparación. Estos hechos hacen suponer que en los dos eventos mutacionales producidos por pirvinio (sustitución de bases y corrimiento) repercuten en forma diferente en presencia del sistema de reparación Uvr ya que mientras que la sustitución de bases se ve potenciada, el corrimiento de bases, parece ser corregido eficientemente.

Ahora bien cuando hablamos de sustitución o corrimiento de bases provocadas en estas cepas por el pirvinio y de la modificación de su

frecuencia en presencia del sistema de reparación (Uvr) es solamente por inferencia ya que no estamos verificando directamente dichos mecanismos de reversión. Para este razonamiento partimos de que las cepas con las que trabajamos fueron generadas a través de tales mecanismos y que se considera que su reversión ocurre (preferentemente mediante los mismos procesos (11)). Aunque cabe señalar que se ha reportado que la cepa TA-100 es susceptible de revertir ocasionalmente por corrimiento y no por substitución de bases (7). Por lo tanto, solo podría decirse que al no ser diferentes los incrementos en la reversión producidos por el pirvinio en las cepas Uvr+ UTH-8412 y UvrB TA-100, el daño mutacional del tipo frameshift no se ve modificado por la presencia del sistema de reparación Uvr, de la misma manera dicho mecanismo de reparación no parecería ser eficiente para restaurar el daño mutacional provocado por el pirvinio en la cepa UHT-8414.

La niclosamida no produjo a su vez, mutaciones en S. typhimurium Uvr⁺ a pesar de que sí las indujo en las cepas UvrB lo que sugiere que el daño que ocasiona puede ser reparado por el mecanismo de reparación por excisión, (característico del sistema Uvr). Lo mismo podemos decir para la dehidroemetina, que produce mutaciones en S. typhimurium UvrB y no en las cepas Uvr⁺.

La cloroquina es un compuesto que discrepa de los datos obtenidos en laboratorio (11) y reportados en la literatura (33) en donde por el método de fluctuación éste compuesto resulta positivo utilizando cepas UvrB, y no así en el método estándar utilizado en este estudio por lo que para valorar el efecto del mecanismo de reparación Uvr en la mutagenicidad de cloroquina, el método a utilizar sería el de fluctuación y

no el método estándar de plateo que utilizamos en este trabajo.

El resto de los compuestos que dieron resultados negativos en las cepas de S. typhimurium con reparación, fueron igualmente negativos en las cepas sin reparación. En virtud de los resultados mencionados podemos considerar que en el estudio de compuesto del tipo de los antiparasitarios incluídos en esta evaluación el sistema de elección es el sistema de S. typhimurium (UvrB) mientras que el uso de las cepas Uvr⁺ solo contribuye a conocer si el daño mutacional es reparable por el sistema de reparación por excisión.

-Daño al ADN no reparado en E. coli

En este sistema se consideró que un compuesto da una respuesta positiva cuando la relación entre los diámetros de inhibición obtenidos Pol A⁻/Pol A es mayor a uno mientras que es negativo si la relación es igual a 1., existe una consideración en este sistema, cuando no se observa inhibición en el crecimiento bacteriano, no se puede determinar si el compuesto en prueba sea negativo o positivo ya que las causas de no observar inhibición pueden ser: que el compuesto no haya difundido, que difunda pero que no penetre en las células, que difunda y penetre pero que carezca de actividad genotóxica.

Los diámetros de inhibición obtenidos Tabla 16 difieren de los reportados en la literatura: para el Etil metano sulfonato se reporta para la Pol A⁻ = 19 mm y para la Pol A⁺ = 0 mm para el metil metano sulfonato se reporta para la Pol A⁻ = 58 mm y para la Pol A⁺ = 43 mm utilizando estos compuestos como controles positivos en ausencia de actividad metabó-

lica, en cambio en presencia de activación metabólica se recomienda la ciclofosfamida reportando para la Pol A⁻ = 28 mm y para la Pol A⁺ = 21 mm el control negativo recomendado con y sin activación metabólica es el cloranfenicol, en donde para la cepa de E. coli Pol A⁻ = 29 y para la Pol A⁺ = 29.

Con respecto a la diferencia de resultados se pensó que la -- razón es el manejo al compuesto en cuanto a la persona más sin embargo con respecto a lo reportado en la ciclofosfamida nuestro resultado fue nulo -- por la probabilidad de inactivación del compuesto con la mezcla S-9 y el -- tiempo de utilización, con respecto a los demás resultados de "control positivo" nos están dando diferente pero si nos está determinando una diferencia de inhibición entre las dos cepas que es en lo que se fundamenta este sistema.

La cloroquina aparece en la literatura reportado como positivo y aunque este sistema no es completamente determinante la concentración del compuesto para observar la inhibición si influye pues en la literatura habla de una concentración de 250 mcg mientras que nosotros utilizamos uno lo que puede determinar que la difusión no haya sido posible o bien la calidad del compuesto sea diferente al utilizado en la literatura.

El resto de los compuestos por este sistema no se pueden determinar ni sin activación ni en presencia de activación metabólica posiblemente porque estos compuestos por su peso molecular no difundan a través del agar y así pudo suceder con el 2-amino antraceno que es un compuesto de peso molecular elevado y aunque es conocido por su poder genotóxico no tuvo resultado alguno.

Con lo que se determina que el sistema de S. typhimurium sin reparación es el más adecuado para este tipo de compuestos antiparasitarios.

VIII. CONCLUSIONES

Evaluación de la capacidad mutagénica de medicamentos amebicidas y antihelmínticos en cepas de Salmonella typhimurium. Uvr⁺. Nuestro estudio confirmó la capacidad del pamoato de pirvinio de inducir mutaciones en bacterias de S. typhimurium. Plantea además la posibilidad de que el sistema de reparación Uvr afecte de manera diferente la inducción de mutaciones por substitución de bases o por corrimiento -- (Probablemente potenciando las primeras y disminuyendo las segundas).

Los resultados obtenidos con Niclosamida en la cepa TA-1538 UvrB, en presencia del sistema de activación metabólica coinciden con los encontrados previamente en el laboratorio. Los datos negativos obtenidos en la prueba con la cepa TA-1978 Uvr⁺ indican a su vez que el sistema de reparación Uvr es capaz de reparar las mutaciones inducidas por la niclosamida en las condiciones del estudio.

Para la dehidroemetina en trabajos previos resultó mutagénica ocasionando daño del tipo frameshift cuando se encuentra en presencia de activación metabólica, con cepas que contienen su sistema de reparación no hay tal efecto por lo que se infiere que un sistema como el de S. typhimurium de reparación evita este tipo de daño.

Los resultados obtenidos para la cloraquina utilizando el método de planteo divergen de aquellos generados con el método de fluctuación, por lo que se sugiere utilizar éste último para el papel que juega el mecanismo de reparación Uvr en la mutagenicidad de este medicamento.

La evaluación del resto de los compuestos es negativo tanto para con reparación como sin esta, por lo que este sistema es aceptado para estos medicamentos antiparasitarios.

2. Determinación de la capacidad de dichos medicamentos de provocar muerte celular en cepas de E. coli.

Este método no dió ninguna respuesta definitiva acerca de la mutagenicidad de los compuestos antiparasitarios probados, debido a los factores limitantes del mismo, por lo que se sugiere la utilización del método modificado en suspensión.

3. Identificación del sistema de prueba más adecuado para determinar efecto genotóxico de compuestos químicamente semejantes a los medicamentos incluidos en este estudio.

La sensibilidad del sistema de S. typhimurium con reparación Uvr^+ y sin reparación $UvrB$ difieren como se observó en los resultados por lo que la prueba estandar del Dr. Ames es la de elección para iniciar un sondeo con los compuestos problema.

Para la profundización del estudio se puede continuar tanto con la prueba con cepas de S. typhimurium con su sistema de reparación intacto como con el sistema de E. coli Pol A⁻/Pol A y ampliar a los métodos de fluctuación y suspensión que así se hace un estudio más completo.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Ames, B.N.
The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria in:
Chemical Mutagens principles and Methods of their Detection. A.
Hollaender Ed. Plenum Press, New York, Vol. 6, 109-147, 1971.
2. Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D.
Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver
homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 70; 8; 2281-2285, 1973.
3. Ames, B.N., Lee, F.D. and Durston, W.E.
An improved bacteria test system for the detection and classification
of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 3;
782-786, 1973.
4. Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/
mammalian-microsome mutagenicity test. Mut. Res. 31; 347-364, 1975.
5. Auerbach Charlotte, Reversa Mutations. Suppressors., Mutation
Tesearch, Chapman and Hall. 4, 54-72; 1976.
6. Charfaff, E.
Experientia 6; 201-213; 1950.
7. Cortinas de Nava Cristina, Alvarez R.
Posibles fuentes de Riesgo en el Consumo de Amebicidas y Antihelmi-
ticos. I I.B.M-U.N.A.M., 1980 .
8. D'Alisa, R.M., Carden III G.A., Carr, H.S., and Rosenkranz, H.S.
Reversion of DNA polymerase-deficient Escherichia coli, Mol. Gen.
Genetics; 110, 23-26, 1971.
9. De Lucia P. Cairns J.
Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA poly-
merase, Nature 224; 1164-1166, 1969.
10. Enviromental Mutagenis Hazard
Science 187, 504-514, (1975).
11. Espinosa, J.J.
Mutagenicidad de hidroxinaftoato de Befenio, Difosfato de cloroquina
dehidroemetina y Pamoato de Pirvinio en Salmonella typhimurium.
Tesis QFB-UNAM (1981).

12. Fluck E.R., Poirer, L.A., Rvelius H.W.
Evaluation of DNA polimerase-deficient mutant of E. coli for the rapid detection of carcinogens. Chem. Biol. Interact. 15, 219-231; (1976).
13. García, R.L., Zapata, A.M., E. Martínez
Estudio para la detección del poder mutagénico de mebendazole Diyodo-hidroxiquinoleína, Vioformo, Pirantel, y Niclosamida en cepas mutantes de S. typhimurium. Tesis QFB-UNAM (1981).
14. Goldstein-Aronow & Kalman
Principles of Drugs Actions the Basis of Pharmacology - Auram Goldstein, Lewis Aronow & Sumner M. Kalman; Harper Internal. Ed., Chap. 10, Chemical Mutagenesis. Ed. Kalman-Wiley; Chap. 10; 623-663, (1974).
15. Gross J., Gross M.
Genetic analysis of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polimerase; Nature 224; 1166-1168 (1969).
16. Hanawalt P.C., Cooper P.K., Ganesam A.K., Smith Ch.A.
DNA repair in bacteria and mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 48, 783-836 (1979).
17. Hexitt R.R.
Mutation Hazard First Ann. Course SEP; 14-29, 1976.
18. Howard Paul
"Inducible Repair of DNA"; Scientific American, Vol. 245, 5, 56-65, 1981.
19. Hyman J., Leifer S., S. Rosenkranz, H.S.
A quantitative procedure for diffusible and non-diffusibile Chemicals, Mutation Research, 74; 107-111, 1980.
20. Konberg A., DNA
DNA Replication
By W.H. Freeman and Co. 703, (1980).
21. Legator M.J., Flamm W.G.
Enviromental Mutagenesis and Repair. Ann. Rev. Bioche. 684-708; 1973.
22. Malling, H.V., Chu, E.H.Y.
Development of mutational model systems for study of carcinogenesis, Chem. Carc. Part B Marcell Dekker, Unc. N.Y.; 545-563, (1974)

23. Matney, T.S.
Article Unpublishe (Huston, Texas)
24. Miller, E.C. and Millar, J.A.
The Mutagenicity of Chemical Carcinogens: Correlations problems and interpretations, Chemical Mutagens Vol. 1., Plenum Press, New York 83, (1971).
25. Neel, J.V., Bloom, A.D.
The Detection of Enviromental Mutagens., Med. Clin. 53, 6, 1243-1256 (1969).
26. Purchase, I.F.H., Langstaff, E.; Ashby J., Sylies J.A.
Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recomendations for their use. Nature 264; 624-626, (1976).
27. Rosenkranz H.S., Carr H.S., Morgan C.
Unusual growth properties of a bacterial strain lacking, DNA polymerase. Biophys. Res. Commun. 44; 546-649, (1971).
28. Rosenkranz H.S., Gutter B., Speck W.T.
Mutagenicity and DNA-Modifying activity; A comparison of two microsomal Assay; Mutat. Res. 41; 61-70; (1976).
29. Rosenkranz H.S., Leifer Z.
Determining the DNA-Modifying activity of Chemical Using DNA-Polymerase - Deficient Escherichia coli. A. Hollander, Ed. Chem. Mutagens; N.Y. Plenum Press, 6 109-147 (1977).
30. Rosenkranz H.S.
Aspects of microbiology in cancer research. Ann. Rev. Microbiol. 27; 383-401 (1973).
31. De Serres, F.J.
Genetics tests for evaluating enviromental mutagens. Ambio Special Report No. 3; 23-27; (1973).
32. Slater E.E., Anderson M.D., Rosenkranz H.S.
Rapid detection of mutagens and carcinogens; Cancer Res. 31; 970-973; (1971).
33. SchÜpbach, M.E.
Mutagenicity evaluation of the two antimalarial agents cloroquine and mefloquine, using a bacterial fluctuation test. Mut. Res. 68; 41-49, 1979.

34. Tutikawa, K. Shimoi, N. and Yagi Y.
Mutagenicity of the products generated by a reaction between
cloroquine and nitrite. *Mutat. Res.* 54; 230; (1980).

35. Watson J. D. and Crick F.H.C.

Nature, 171, 737; 1953.