



4
2 Escor

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**Evaluación de la Genotoxicidad de
Antiamibianos y Antihelminticos
en Sistemas Bacterianos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

**Carlos Arumir Escorza
María-Teresa Meza Méndez**

Director de Tesis
Q.F.B. Javier Espinosa Aguirre .



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	
Clasificación de Agentes Genotóxicos.	19
1) Precursores de agentes genotóxicos.	
2) Agentes genotóxicos.	
Naturaleza de los Blancos Críticos de Mutágenos y Carcinógenos Químicos.	23
Papel del Metabolismo en la Mutagénesis y Carci nogénesis Química.	25
A.- Reacciones de Fase I.	
I.1) Reacciones de oxidación mediadas por el sistema microsómico hepático.	
I.2) Reacciones de oxidación no mediadas por el sistema microsómico hepático.	
II.- Reacciones de Reducción.	
III.- Reacciones de Hidrólisis.	
B.- Reacciones de Fase II.	
I.- Reacciones de Conjugación.	
Activación de los Precursores de Agentes Genotóxicos	32
1) Reacciones primarias de activación mediadas por monooxigenasas.	
2) Reacciones subsecuentes a la activa ción por monooxigenasas.	

- 3) Reacciones primarias de activación
no mediadas por monooxigenasas.

Estructura y Función del Material Genético 37

Causas, Tipos de Alteraciones del ADN y Me-
canismos de Protección. 41

A.- Causas Generales de Alteraciones Genéticas

- 1) Agentes químicos.
- 2) Agentes físicos.
- 3) Agentes Biológicos.

B.- Tipos de Alteraciones Genéticas.

- 1) Lesiones no genotóxicas.
- 2) Lesiones genotóxicas.

C.- Mecanismos de Protección del Material Genético.

- 1) Sistemas de reparación constitutivos.
- 2) Sistemas de reparación inducibles pro-
pensos a error.

Características Generales de las Cepas $polA^+$ y $polA_1^-$
de Escherichia coli. 91

Características Generales de las Cepas rec^+ y rec^-
de Bacillus subtilis. 93

MATERIAL Y METODOS 95

1) Material Biológico.

- a) Origen de las cepas de Escherichia coli.
- b) Preservación de las cepas.

- c) Origen de las cepas de Bacillus subtilis.
- d) Preservación de las cepas.
- e) Homogenado hepático.
- f) Preparación de la fracción S-9.
- g) Mezclas de activación metabólica.

2) Material Químico.

- a) Sustancias de Prueba.
- b) Reactivos.

Ensayos de Genotoxicidad.

106

A.- Escherichia coli.

B.- Bacillus subtilis.

Medicamentos Utilizados en la Quimioterapia de la
Helminthiasis y Amibiasis.

116

RESULTADOS

138

A.- Sistema de Escherichia coli $polA^+/polA_1^-$.

- 1) Verificación de la actividad de la enzima
Pol I en las cepas $polA^+/polA_1^-$.
- 2) Genotoxicidad de los fármacos de prueba.

B.- Sistema de Bacillus subtilis Rec^+/Rec^- .

- 1) Verificación de la actividad de reparación
por recombinación de las cepas H-17 y M-45.
- 2) Genotoxicidad de los fármacos de Prueba.

DISCUSION.

197

- 1) Resultados con Escherichia coli.
- 2) Resultados con Bacillus subtilis.

CONCLUSIONES

215

APENDICE.

218

Preparación de Medios y soluciones para:

- I) Salmonella typhimurium.
- II) Escherichia coli.
- III) Bacillus subtilis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS
DE LA INVESTIGACION

- 1.- Establecer las condiciones óptimas para el empleo de 2 sistemas de prueba bacterianos que miden daño genotóxico.
- 2.- Comparar la sensibilidad de dichos sistemas para detectar agentes genotóxicos.
- 3.- Determinar la genoletalidad de diversos medicamentos antiparasitarios, en los que se incluyen compuestos Antiambianos y Antihelmínticos.
- 4.- Evaluar la influencia del sistema de activación metabólica (Enzima S-9) en la genotoxicidad de compuestos Antiambianos y Antihelmínticos.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio, es el de analizar el papel de los sistemas rec y polA, en la reparación del daño producido al ADN por los medicamentos antiparasitarios que muestren actividad genotóxica.

INTRODUCCION.

Desde la prehistoria, el hombre ha estado expuesto sin saberlo, a un gran número de mutágenos y carcinógenos ambientales de origen natural, como algunos flavonoides y pirrolizidinas presentes en ciertos vegetales comestibles, o micotoxinas producidas por diversos hongos, tal es el caso de las aflatoxinas B₁, G₁ y B₂, que se encuentran principalmente como contaminantes de granos comestibles y que están consideradas entre las sustancias mutagénicas y carcinogénicas más potentes presentes en la naturaleza.

Con el advenimiento del fuego, el hombre se vió frente a una carga adicional de compuestos genotóxicos. Ciertos productos derivados de la cocción de carnes, entre ellos el benzo (a) pirano, y algunos pirolisados de las proteínas, han sido señalados como responsables de la acción mutagénica y carcinogénica presentes en los alimentos cocinados con carbón o a fuego directo.

Los mutágenos y carcinógenos producidos por el hombre, entraron en escena hacia mediados del siglo anterior, cuando se lleva a cabo la producción y difusión de diversos compuestos químicos sintetizados por la industria naciente de esa época. Desde entonces, el número de compuestos sintéticos ha ido en aumento, llegando en la actualidad a una cifra que rebasa los 50,000 (6). Así también, al desarrollo científico y tecnológico ha traído como resultado la contaminación de nuestro habitat, razón por la cual nos vemos constantemente expuestos a diversos factores que constituyen un riesgo para la salud e integridad física del hombre (11).

La existencia de este riesgo ha originado que durante las últimas dos décadas, las investigaciones se hallan encaminado a la evaluación

de los efectos adversos de estos factores contaminantes.

Hasta la fecha, dichos estudios han identificado diferentes substancias químicas con actividad mutagénica, entre los que se incluyen a plaguicidas, que como contaminantes residuales llegan al consumidor, aditivos de alimentos, fármacos, cosméticos, halotanos en el agua potable, produc--tos y residuos industriales contaminantes como el cloruro de vinilo, asbes--tos, hidrocarburos aromáticos, etc. Es decir, los mutágenos generados por el hombre se encuentran presentes en casi todas las actividades humanas. (32, 49, 50, 51, 67).

La identificación de compuestos con acción mutagénica y/o carcinogénica, se ha logrado experimentalmente a través de la exposición de organismos de laboratorio a las sustancias a prueba y aunque se ha observado que los sistemas de detección empleados, no son infalibles para identificar a la totalidad de los agentes químicos que para el hombre puedan implicar riesgo genotóxico, constituyen un recurso valioso para el monitoreo de mutágenos y carcinógenos.

Ahora bien, debido a la larga duración y principalmente al alto costo de los experimentos que utilizan animales de laboratorio, estos estudios así como los epidemiológicos en humanos, son poco factibles de ser ejecutados en forma rutinaria como sistemas de evaluación de riesgo. Por lo cual, los ensayos microbianos han encontrado una amplia aceptación y un empleo difundido como pruebas de tamia.

Es así, como dichas pruebas de monitoreo han permitido identificar una importante fuente potencial de daño genético para las poblaciones humanas, especialmente en aquellas con exposición de tipo crónico a agen--

tes genotóxicos.

En la actualidad se sabe, que los mutágenos y carcinógenos ambientales pueden tener tres efectos genotóxicos importantes en el humano; pueden causar mutaciones en las células germinales, provocando como resultado la acumulación de genes anormales en la población, causar alteraciones genéticas en la flora bacteriana normal o bien, producir mutaciones en las células somáticas y favorecer con ello la formación de células malignas.

Por ello, existe gran preocupación de que la frecuencia de tales padecimientos aumente, si no es de alguna manera reducida la exposición continua a dichos mutágenos ambientales, Esto ha suscitado la aparición de organizaciones como la ICEPENC (International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens), International Association of Environmental Mutagen Societies, ALMATA (Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental), etc., que se han preocupado por la evaluación de los riesgos causados por la exposición a diversos agentes en las poblaciones humanas (41).

Es importante señalar, en lo que se refiere al daño genético y al cáncer, que es difícil establecer con certeza una asociación entre la exposición a un factor dado y la elevación de la incidencia de padecimientos hereditarios o de tumores malignos en la población afectada. Tampoco hay que olvidar que hasta ahora no existe una terapia eficaz para el tratamiento del cáncer, así como para la mayoría de los padecimientos hereditarios. De ahí la importancia de contar con sistemas indicadores de riesgo que permitan establecer medidas preventivas. Además, no se puede omitir el

hecho de que en los países altamente industrializados, las afecciones genéticas constituyen una de las principales causas de mortalidad.

En cuanto a México, país con patrones mixtos de salud, se ha empezado a dar importancia al estudio del cáncer y de los padecimientos de tipo hereditario, al identificarse que el primero es una de las principales causas de muerte después de los 45 años de edad y los segundos, ocupan uno de los primeros lugares como origen de muerte en el primer año de vida. De ahí que haya surgido un gran interés en detectar las fuentes potenciales de riesgo de cáncer y trastornos congénitos, entre las que podemos citar al consumo de medicamentos. Se sabe en efecto, que entre los carcinógenos para el humano, identificados a través de estudios epidemiológicos, se encuentran medicamentos tales como: dietilestilbestrol, ciclofosfamida, etc., mientras que entre los que producen malformaciones congénitas, tenemos a la talidomida, medicamento que fue usado en Inglaterra a principios de la década de los sesentas por mujeres gestantes para evitar los vómitos al principio del embarazo, y que provocó la aparición de focomelia en los hijos de éstas (63), surgiendo entonces una gran inquietud por el riesgo de exposición a medicamentos durante la gestación.

IMPORTANCIA DE LA EVALUACION DEL RIESGO GENOTOXICO DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

Entre la población de la República Mexicana, las parasitosis se consideran como uno de los problemas de salud pública más importantes. Los grupos de edad más afectados son los niños y de estos, primordialmente los preescolares y escolares.

Aunque las parasitosis no son causa de mortalidad como tales --

en las estadísticas del país, y no existen datos de su morbilidad, si se tienen informas de su frecuencia como infección y el hecho, de que algunas dejan secuelas irreversibles. Estos datos se han obtenido por encuestas -- que han efectuado diferentes grupos de trabajo en diversos estados de la República Mexicana (Tabla 1) (6).

El uso de fármacos que tienen acción sobre los distintos protozoarios y helmintos, parásitos del hombre, debe basarse en el conocimiento de sus efectos farmacológicos sobre el parásito, su ciclo biológico en el hospedero humano y sus efectos adversos en este último. Lo anterior indudablemente contribuye a evitar la producción de iatrogenia y/o fracasos terapéuticos por el uso de los medicamentos antiparasitarios en forma incorrecta.

En México, el estudio de los medicamentos antiparasitarios es de gran interés, debido a su impacto sanitario por lo que se requiere de una evaluación sistemática y completa. Más aún, en vista de que sus efectos adversos han sido solo parcial e insuficientemente estudiados, a pesar de su empleo generalizado y repetido en grandes porciones de la población.

Las enfermedades parasitarias, particularmente las ocasionadas por amibas y helmintos, constituyen un problema endémico. Su raíz se localiza en: la débil estructura sanitaria, en los raquíticos recursos higiénicos y económicos de las poblaciones rurales pequeñas o de los cinturones de miseria de las grandes ciudades; también a la falta de educación y a la dificultad de proporcionar asistencia médica y demás aspectos sanitarios a toda la población. Por tanto, las infecciones y reinfestaciones son

frecuentes (6) originando de esta manera, que el consumo de medicamentos antiparasitarios sea muy alto, y que la misma persona pueda recibir más de un tratamiento o que pueda recurrir a la automedicación.

En relación al estudio de los efectos adversos de algunos medicamentos antiparasitarios, en los últimos años se han generados informes - que ponen de manifiesto la parcialidad de estos y al mismo tiempo, señalan la necesidad de verificar en nuestro medio, a aquellos estudios experimentales y clínicos que puedan parecer dudosos o insuficientes, ya que difícilmente serán cuestionados en los países desarrollados que no afrontan una problemática parasitaria como en el caso de nuestro país y otros en vías de desarrollo.

Desgraciadamente, los medicamentos antiambianos y antihelmínticos no han sido objeto hasta ahora, de estudios sistemáticos en nuestro país para determinar sus reacciones adversas; estos datos son sin embargo, indispensables para la evaluación de riesgo que puedan constituir aquellos medicamentos que han mostrado producir efectos adversos en sistemas experimentales no humanos. Debe además tenerse en mente, que los efectos indeseables pueden deberse no solo a la acción del fármaco, sino también a impurezas de la materia prima o a contaminantes presentes en el proceso de elaboración del medicamento. Por tal motivo, en el presente trabajo se emplearon solo los principios activos de los medicamentos antiparasitarios, tal como son utilizados por los laboratorios farmacéuticos en nuestro país, buscándose de esta forma, evitar la interferencia de contaminante presentes durante el proceso de elaboración; aún cuando, el uso del principio activo no descarta la posibilidad de impurezas con actividad genotóxica (6).

Recientemente por ejemplo, se analizaron por cromatografía en placa fina, muestras de pantoato de pirvinio observándose en algunas de ellas, la presencia de impurezas, precisamente en aquellas que habían mostrado mayor actividad mutagénica en un sistema microbiano de prueba. (6) Esto conducirá a una investigación que pueda aclarar si las impurezas también son responsables de dicha actividad.

Debemos hacer notar que un estudio adecuado de los efectos adversos potenciales de cualquier medicamento, debe comprender, no solo estudios en organismos de prueba no humanos, sino también la evaluación en humanos, que por razones terapéuticas, estén expuestos a éste tipo de fármacos.

Gracias a investigaciones de esta índole se ha logrado ya prevenir a la población consumidora así como a quienes medican, de los posibles riesgos que son inherentes al uso de algunas drogas específicas. Lo anterior ha conducido a que en dichos fármacos se observe un cambio en sus contraindicaciones, al encontrarse nuevas reacciones adversas potenciales; un buen ejemplo lo constituye el metronidazol. Estudios realizados en 1971, reportan de él lo siguiente: no se ha informado de reacciones serias provocadas por el metronidazol, las más frecuentes son náuseas y diarrea; otras reacciones son: urticaria, vértigo, dolor de cabeza, incomodidad vaginal y uretral. Rara vez hay un color oscuro en la orina, en el tratamiento de tricomonas, y puede ser usado durante el embarazo.

En 1973 como resultado de estudios más profundos sobre el metronidazol se añaden a las anteriores, las siguientes reacciones adversas; anorexia, dolor del epigastrio, calambres abdominales, constipación y sabor

metálico, glositis, estomatitis, leucopenia moderada, incoordinación, atada y orina oscura. Señalándose que no debe ser usado en los primeros tres meses del embarazo.

Los estudios del año 1977 aportaron un mayor número de conocimientos del metronidazol, que en años anteriores no se habían tomado en consideración; así, además de las contraindicaciones y reacciones adversas ya señaladas en 1973, se manifestó que este medicamento perdía su eficacia a medida que los microorganismos se hacían más resistentes, y en informes más recientes se concluye que el metronidazol es carcinogénico en ratones y mutagénico en ciertas bacterias, con concentraciones normalmente obtenidas en fluidos corporales. De ahí que cualquier riesgo potencial por su uso, solo es parcialmente justificado en pacientes con amebiasis seria o persistente, más no en mujeres gestantes (6).

Es así que, aún cuando los fármacos antiparasitarios presentados en la tabla 2 han probado ser los más efectivos y tener menos efectos adversos (cuando menos en niños), deben ser investigados con mayor profundidad ya que se desconocen, o se conocen mal, sus riesgos genotóxicos (6, 61). Lo anterior ha traído como consecuencia obvia el surgimiento en muchos países, entre ellos México, de programas de monitoreo masivo y de análisis de un gran número de compuestos químicos y/o de sus metabolitos - activos mediante múltiples sistemas de prueba.

Tabla 1

FRECUENCIA DE PARASITOSIS EN LA REPUBLICA MEXICANA (Promedios generales)

<u>Protozoarios</u>	%	<u>Helmintiasis</u>	%
Giardiasis	18.9	Ascariasis	26.0
Amibiasis	15.9	Tricocefalosis	21.3
Tricomonirosis	11.9	Enterobiasis (oxiuriasis)	20.0
		Uncinariasis	19.2
		Himenolepiasis	15.8
		Strongilidiosis	4.3
		Teniasis	1.5

FUENTE: Referencia 6

T A B L A 2

ANTIPARASITARIOS COMUNEMENTE UTILIZADOS EN MEXICO

ANTIPROTOZOARIOS

Metronidazol
 Cloroquina
 Diyodohidroxiquinolinas
 Clorohidroxiquinolinas
 Emetina
 Dehidroemetina
 Furazolidona
 Pirimetamina
 Clorofenoxamina
 Eticlorigifen
 Nimorazol
 Timidazol

ANTIHELMINTICOS

Piperazina
 Hexilresorcinol
 Pirvinio
 Tiabendazol
 Tetramizol
 Diclorofeno
 Clorofenilsalicilamida
 Pirantel
 Mebendasol
 Niclosamida

FUENTE: Referencia 6

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS DE PRUEBA PARA LA IDENTIFICACION DE --
AGENTES GENOTOXICOS.

I.- PRUEBAS DE INTERACCION CON EL ADN.

Estas son una serie de pruebas in vitro, que permiten detectar si el compuesto en estudio reacciona directamente con la molécula del ADN así, como identificar que tipos de productos se obtienen de dicha interacción. De esta forma, se ha llegado a conocer que compuestos como el metil metano sulfonato producen alquilaciones principalmente en la posición 6 - de la guanina. Con la información anterior es posible postular un modelo para explicar las mutaciones por transición G:C \rightarrow A:T, que resultan de la acción del metil metano sulfonato.

II.- PRUEBAS EN ORGANISMO VIVOS.

a).- Microorganismos.

Virus.- El empleo de estos organismos permite detectar la capacidad de las sustancias para inducir mutaciones génicas en el genoma viral y/o induciendo la liberación y replicación de los profagos que se encuentran integrados en el ADN del hospedero, identificándose dicho proceso biológico por la generación de lisis celular (Método de inducción de fagos) (46).

Bacterias.- En diferentes especies bacterianas se puede determinar actividad genoletal o inducción de mutaciones génicas. Además, el empleo de estos sistemas permite no solo detectar acción genotóxica, sino también -- postular el posible mecanismo de reparación o producción de daño al ADN. - Salmonella typhimurium, Escherichia coli y Bacillus subtilis.

Hongos.- La ventaja que ofrece el empleo de estos microorganismos en-

cariotes, es la de poder detectar daño directo e indirecto al ADN (mutaciones génicas, recombinación cromosómica y segregación cromosómica defectuosa) Aspergillus nidulans, Sacharomyces cerevisiae y Neurospora crassa. Además de que su ADN está organizado de una forma con mayor similitud al de los mamíferos.

b).- Cultivo de Células de Mamíferos.

Las líneas celulares de órganos o tumores de mamíferos, permiten al igual que los hongos, detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, numéricas y estructurales, en un tiempo relativamente corto, solo - que con la ventaja de ofrecer un modelo más adecuado para la extrapolación de resultados al hombre (HaLa, CHO, EHK, etc.).

c).- Insectos.

El insecto más utilizado, es la mosca de la fruta Drosophila melanogaster, por el amplio conocimiento que se tiene de su genética y por ser un organismo que se reproduce en un lapso corto, generándose así - grandes poblaciones que requieran de un mantenimiento mínimo. Por todo ello, este es el sistema animal más rápido para detectar mutaciones génicas (de tipo recesivo ligadas al sexo) y cromosómicas (segregación defectuosa y translocaciones) en células germinales; presenta también la capacidad de metabolizar los compuestos en forma muy similar a los mamíferos y es susceptible de usarse como detector biológico.

ch).- Plantas.

Estas permiten la identificación de sustancias distribuidas en forma natural en el medio ambiente. Se han empleado para detectar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas producidas por contaminantes am-

bientales como plaguicidas, herbicidas, fertilizantes químicos, etc.

En vista de que existen indicios de que las plantas metabolizan las sustancias en forma diferente de como lo hacen los mamíferos, es probable entonces, que algunos compuestos que no tienen efecto directo sobre estos puedan verse convertidos en metabolitos activos por la acción de las plantas y constituir un riesgo para los consumidores. Tradescantia paludosa, Vicia faba, etc.

d).- Pruebas en Mamíferos.

Uno de los sistemas no humanos más estudiados es el ratón, a través de quién se pueden detectar mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas somáticas y germinales. Estas pruebas no son tan rápidas como las anteriores y su costo es mayor. Sin embargo ofrece la facilidad de poder realizar un análisis de los cambios morfológicos de los espermatozoides, que permite evaluar un riesgo potencial de transmisión de defectos genéticos hereditarios inducidos por la exposición a agentes que causen alteraciones en el ADN celular. En el humano la prueba anterior también puede ser realizada como indicador de alteraciones reproductivas, así mismo se cuenta en la actualidad con pruebas para identificar en forma directa o indirecta, lesiones cromosómicas numéricas y estructurales en médula ósea y en linfocitos sanguíneos, así como la presencia de más de un cromosoma Y en los espermatozoides.

A diferencia del ratón, en el cual se tiene una situación controlada, en el hombre, estos estudios se realizan en general en individuos expuestos en forma circunstancial a contaminantes químicos presentes en su hábitat, fuente de trabajo, alimentación o por exposición a agentes tera-

péuticos (7).

Es pertinente señalar que en vista de que ninguno de los sistemas enlistados, resulta ser el ideal para evaluar el efecto de las sustancias mutagénicas sobre la población humana y su descendencia, se han diseñado estrategias de monitoreo que permitan la identificación de compuestos con un riesgo genético potencial sobre los seres vivos, principalmente el hombre.

De aquí que la identificación, a través de estudios epidemiológicos en poblaciones humanas expuestas a situaciones laborales riesgosas - para la salud, haya recibido una amplia publicidad desde hace algunos años, como resultado de la detección de grupos de trabajadores con alta incidencia de cáncer. Estos grupos incluyen a personal: de hospitales expuesto a gases anestésicos; de industrias químicas y distribuidoras expuesto a éter bis-clorometilo; de la industria del caucho y similares expuesto a benceno, cadmio y carbón mineral; de la industria metalo-siderúrgica por exposición a arsénico, níquel o cromatos, así como en diferentes fábricas en donde los empleados se ven expuestos a cloropreno, benzo(a)pireno, coke y asbestos.

En vista de que los diferentes sistemas de monitoreo difieren - en el tipo de daño genético detectado, es recomendable que cualquier estrategia de muestreo conjuntamente o en forma previa al estudio epidemiológico, contenga una batería de sistemas de prueba. Una de las ventajas de dicha estrategia es que de esta forma se pueden confirmar las evidencias de actividad genética, al medir varios eventos que produzcan impacto en el material genético. En el entendido de que en la medida que se obtenga un ma-

por número de resultados positivos en distintos sistemas, el riesgo es mayor

Dentro de la batería de detección, resulta recomendable el uso de sistemas bacterianos como pruebas primarias de muestreo, por ofrecer diversas ventajas: bajo costo, fácil realización, reproducibilidad de resultados, corta duración, además de ser muy sensibles en la detección de compuestos potencialmente nocivos para el hombre y su medio ambiente. Esto último se ha confirmado a través de múltiples investigaciones durante los pasados 14 años, donde podemos ver que existe una alta correlación entre la actividad carcinogénica con respecto a las acciones mutagénicas y/o genotóxicas, de agentes químicos evaluados en una amplia variedad de sistemas de ensayo, que van desde los organismos procariotes hasta los eucariotes. Los estudios realizados con bacterias demostraron por ejemplo, que del 63 al 92% de los compuestos carcinogénicos, son también mutagénicos en el ensayo de reversión de mutaciones de Salmonella typhimurium desarrollado por Ames (36,45); y cuando el sistema indicador de Escherichia coli $polA^+/polA^-$ fue usado conjuntamente con el de Salmonella, el porcentaje de compuestos carcinogénicos con actividad genotóxica en estos sistemas se elevó a un 95%. Sin embargo, el principal problema con estos resultados siempre ha sido y será, el de la extrapolación de los mismos al hombre (52).

Actualmente está bien establecido que muchos carcinógenos son mutágenos en diversos sistemas de prueba, pero existen datos inadecuados en cuanto a la correlación inversa. Este hecho es sumamente importante debido a que los compuestos químicos identificados primariamente como mutágenos a través de cualquier sistema de ensayo, pueden tener no solo actividad mutagénica potencial sino también manifestar acción carcinogénica en -

el humano (11).

Así, el desarrollo de pruebas rápidas de muestreo, le ha proporcionado al hombre la oportunidad única de eliminar o controlar en nuestro medio, a los agentes que puedan causar enfermedades de origen genético. Este avance debe no solo permitirnos reducir dichos padecimientos, sino también disminuir la carcinogénesis ambiental e industrial, por tanto se debe dar a esta área de investigación, la mayor prioridad posible.

CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS MICROBIANOS DE PRUEBA

La mayoría de los sistemas bacterianos de monitoreo proveen ensayos de mutación puntual (mutación génica) al estudiar la reversión de cepas con características auxotróficas a prototrofas. El mejor ejemplo conocido es la reversión de mutantes de Salmonella typhimurium his^- a his^+ diseñada por el Dr. Bruce N. Ames y extensamente usada en el mundo (1). Los mutantes revierte su información genética, por sustitución de un par de bases o por mutaciones causantes de corrimiento de las bases constituyentes del ADN. Además, la sensibilidad de estas cepas ha sido aumentada al hacerlas deficientes en el sistema de reparación por escisión (al deletar el gene uvrB) y al remover la capa de lipopolisacárido de la pared celular (característica denominada rfa).

Racientemente se ha transferido a las cepas de prueba estandar TA1535 y TA1538, el plásmido pKM101 que contiene al gen mutador muc, dando por resultado las cepas derivadas TA100 y TA98, razón por la cual, son más sensibles a la acción de agentes mutagénicos (12).

Otros sistemas bacterianos miden daño genotóxico determinando -

la inhibición diferencial entre cepas deficientes en reparar el daño ocasionado al ADN, respecto a la reparación realizada por cepas tipo silvestre, con lo cual se tiene un indicador altamente sensible de actividad genotóxica. De estos, entre los mas conocidos y ampliamente utilizados se encuentra al sistema desarrollado por H. Rosenkranz y colaboradores que emplea la cepa W3110 $polA^+$ thy^- y su mutante derivada p3478 $polA_1^-$ thy^- de Escherichia coli (58), y al ensayo "RSC" de Bacillus subtilis diseñado por T. Kada (21,22).

Ambos sistemas han sido usados para estudiar la actividad genotóxica de una amplia variedad de compuestos químicos ambientales. Existen además otros ejemplos de ensayos que emplean bacterias y levaduras deficientes en los mecanismos de reparación y que son usados también como organismos indicadores.

No obstante sus muchas ventajas, una de las limitaciones de los sistemas microbianos para la detección de compuestos mutagénicos, se deriva de la ausencia en las bacterias, de sistemas enzimáticos adecuados para la activación o detoxificación de los agentes químicos, normalmente presentes en los sistemas de mamíferos. Por ello muchos carcinógenos conocidos que se sabe requieren activación metabólica, han resultado negativos en ensayos de mutagenicidad microbiana (34). Esto ha traído como consecuencia el desarrollo de diversas estrategias para la detección de dichos metabolitos activos. Entre ellos podemos citar:

- a.- El empleo de homogenados provenientes fundamentalmente de hígado de roedores, aunque también se emplean de diferentes órganos o tejidos, así como de diversas especies de mamíferos, incluyendo al humano. Es-

tos preparados enzimáticos microsomales ejercen su acción in vitro sobre los compuestos.

- b.- Utilización de fluidos corporales como orina y sangre, de individuos (animales de laboratorio o humanos) expuestos in vivo a los agentes químicos.
- c.- El ensayo vía hospedero, en el que los microorganismos se introducen en el peritoneo o en la sangre del hospedero (ratón) al que se le administra la sustancia en estudio (7).

En el laboratorio donde se realizó la presente investigación, se ha abordado la evaluación genotóxica de medicamentos a través de una batería de pruebas que incluyen:

- a.- Determinación de mutaciones génicas Salmonella typhimurium y Saccharomyces cerevisiae.
- b.- Efectos en células somáticas y germinales de ratón: Médula ósea y sangre periférica (Micronúcleos en eritrocitos policromáticos).
Espermatozoides; Anomalías en el número y morfología.
- c.- Análisis citogenético en linfocitos humanos en sangre periférica.

Dado que el diseño del proyecto y la interpretación de los resultados tuvieron como base, el análisis de información acerca de:

- a.- Características de los agentes genotóxicos.
- b.- Naturaleza de las moléculas blanco de la acción de mutágenos y carcinógenos, así como el papel del metabolismo sobre estos compuestos.
- c.- Estructura y función del material genético
- ch.- Mecanismos de alteración y protección del ADN.
- d.- Características de los medicamentos objeto de estudio.
- e.- Características de los ensayos de genoletalidad.

Cada uno de éstos aspectos será objeto de un análisis particular, que se expone a continuación.

CLASIFICACION DE AGENTES GENOTOXICOS

El término de agentes genotóxicos abarca, a los compuestos que producen efectos tóxicos, tanto letales como heredables en el material genético de procariotes y en el de las células germinales y somáticas de los eucariotes. Es así que los mutágenos, carcinógenos y compuestos genotóxicos químicos, físicos o biológicos, pueden ser clasificados convenientemente bajo este nombre. Por otra parte, el uso de éste término no implica que todos los carcinógenos, mutágenos y compuestos genotóxicos deban ejercer sus efectos biológicos adversos por medio de interacciones directas con el ADN.

Al hablar de mutágenos, se tiene al menos la idea clara de que estos compuestos de alguna manera dañan al material genético. No así en el caso de los carcinógenos, donde no siempre se les relaciona con un daño al ADN. En este caso, se debe de tener en mente que la característica esencial de estos últimos compuestos reside también en su habilidad para inducir cambios heredables en el fenotipo celular, por lo cual la aplicación del término de agente genotóxico, resulta ser adecuado. Tales cambios fenotípicos heredables, pueden involucrar alteraciones de tipo estructural y/o cambios en la regulación de la información genética.

A diferencia de los dos anteriores, los compuestos genotóxicos aún cuando también interaccionan con el ADN directa o indirectamente, no producen cambios fenotípicos heredables, pues provocan la muerte de la célula dañada.

Hoy en día, el gran número de compuestos genotóxicos químicos y su ubicuidad en nuestro habitat, ha captado la atención de la mayoría de

los estudios de evaluación de riesgo; por tanto en esta sección, trataremos únicamente de la clasificación y características generales de los agentes genotóxicos químicos. Este tipo de compuestos pueden ser divididos convenientemente en dos grupos: los que requieren previa metabolización, para manifestar sus efectos genotóxicos y los activos per se.

1.- Precursores de Agentes Genotóxicos (precarcinógenos, premutágenos y pregenotóxicos).

Esta clase de agentes genotóxicos comprende un gran número de compuestos con diversas estructuras químicas. Dichos precursores pueden ser agrupados en las siguientes categorías:

- a.- Hidrocarburos policíclicos aromáticos y heterocíclicos.
- b.- Aminas aromáticas y heterocíclicas primarias, secundarias y terciarias y azo compuestos (azo colorantes).
- c.- Compuestos nitroarilos y nitrofuranos.
- d.- Nitrosaminas y nitrosocarbamatos.
- e.- Alquiltriazinas y dialquilhidrazinas.
- f.- Acetanida, tiamidas y carbamatos.
- g.- Ciertos hidrocarburos clorados (cloruro de vinilo)
- h.- Productos naturales como ciertas micotoxinas y pirrolizidinas, etc.

Los agentes precursores no poseen propiedades genotóxicas per se, pero son convertidos a su forma activa por el sistema metabólico que poseen ciertos organismos. Debe hacerse notar que cuando los compuestos precursores son convertidos en agentes genotóxicos por medio de reacciones químicas espontáneas en los organismos vivos, como en el caso de ciertos N-metil-N-nitroso compuestos, se les considera como agentes genotóxicos y no como precursores. Así, estos últimos compuestos serán inactivos en los

sistemas biológicos que carezcan de las enzimas necesarias para convertirlos a su forma genotóxica final. Es así que se ha encontrado que los productos metabólicos de los agentes precarcinógenos, promutagénicos y proge-netales, son mas efectivos que los compuestos originales, esto es en término de potencia genotóxica.

2.- Agentes Genotóxicos.

Los compuestos químicos de este grupo, por ejemplo los agentes alquilantes poseen las propiedades intrínsecas necesarias, es decir, no requieren de activación enzimática para interaccionar con los blancos celulares críticos, iniciando por tanto los procesos genotóxicos.

En general, los agentes genotóxicos producen resultados positivos en sistemas de prueba donde sus precursores son negativos.

a.- Compuestos Carcinogénicos.

Al tener en consideración las estructuras de los carcinógenos químicos, se ha llegado a la importante generalización de que la mayoría de dichos agentes son compuestos fuertemente electrofílicos, principalmente los alquilantes y arilantes, aunque también se conocen algunos acilantes.

Existen desde luego, algunas excepciones a la generalización de que los agentes carcinogénicos son compuestos electrofílicos. Un ejemplo de estos lo constituye la 6-mercaptopurina, de la cual se ha reportado que causa un incremento de ciertos tumores en el sistema hematopoyético de ratas y ratones.

b.- Compuestos Genoletales.

Dentro de ésta clasificación se encuentra al tipo de compuestos que aún causando un daño mínimo al ADN, requiere ser removido, pues de no ser así provocará la inactivación del mismo, y en consecuencia la muerte de la célula, (ej. el solo entrecruzamiento en las cadenas del ADN/cromosoma bacteriano, de no ser eliminado es capaz de matar a la bacteria) no importando la concentración empleada del compuesto.

Este tipo de agentes también posee en general, la particularidad de ser compuestos fuertemente electrofílicos, solo que en este caso la molécula es bifuncional, es decir bieleétrica, característica -- que genera los entrecruzamientos de cadenas en el ADN (ej. ciclofosfá mida).

Sin embargo, la característica de provocar entrecruzamientos, no es exclusiva de los agentes bifuncionales. Existen otros compuestos como el ácido nitroso que también pueden inactivar al ADN de esta forma.

Además, se puede considerar que un compuesto carcinogénico y/o mutagénico es también genoletal, cuando se encuentra presente en concentraciones elevadas, de tal forma que su acción se vea superada por el daño letal.

c.- Compuestos Mutagénicos (relación entre mutágenos y carcinógenos).

Como en el caso de los compuestos carcinogénicos, la mayoría de los mutagénicos son también agentes electrofílicos. Estas similitudes químicas junto con la evidencia de que los primeros poseen actividad mutagénica, concuerda con la carcinogénesis química. Sin embargo, estas propiedades compartidas no constituyen una prueba concluyente de una asociación causal. Lo que sí resulta claro es que los agentes geno

tóxicos electrofilicos son capaces de reaccionar con los centros nucleofílicos de todas las macromoléculas celulares, ejemplos: ADN, ARN y -- proteínas, donde cualquiera de ellas puede ser el blanco crítico de la carcinogénesis química. Es posible que muchas las mismas entidades químicas puedan inducir neoplasia y mutación, los blancos primarios -- clave puedan diferir en cada uno de estos procesos (58).

Algunos resultados recientes, indican que puede existir una correlación formal entre mutagenicidad en bacterias y carcinogenicidad -- en mamíferos, lo que ha provocado gran especulación y debate sobre la utilidad de los sistemas de prueba bacterianos en la predicción de -- riesgos en mamíferos, más aún cuando existen algunas excepciones aparentes en la correlación entre actividad mutagénica y carcinogénica.

NATURALEZA DE LOS BLANCOS CRITICOS DE MUTAGENOS Y CARCINOGENOS QUIMICOS

Se ha establecido claramente que el ADN es el verdadero, aunque no necesariamente, el blanco primario de los mutágenos químicos. Este hecho se ve influenciado por ciertos factores o procesos mediados por el hospedero, como son las enzimas de reparación y replicación del ADN, la -- respuesta inmunológica, así como las involucradas en el metabolismo celular, que en conjunto han sido propuestos como los eventos iniciales clave en la inducción de efectos genotóxicos (15). Desafortunadamente, el conocimiento actual del mecanismo de producción de estos efectos y particularmente el de los carcinógenos químicos es, en el mejor de los casos, fragmentario. No obstante, se sabe con certeza que los efectos biológicos adversos de dichos compuestos dependen de sus interacciones iniciales con -- los blancos celulares específicos. De ahí que la naturaleza de la interacción inicial entre un agente genotóxico y su blanco celular crítico, sea

indudablemente un factor determinante y dependiente completamente, de las propiedades fisicoquímicas de los componentes que interaccionan bajo las condiciones que prevalecen en el microambiente de la célula blanco. Por tanto los efectos genotóxicos, son probablemente complejos y están sujetos a variación entre diferentes especies, individuos y tejidos. Sin embargo, parece razonable inferir que la magnitud de tal efecto será una función de la interacción inicial, que a su vez es función de la concentración del agente genotóxico en el locus blanco y en donde el sistema metabólico enzimático, juega un papel muy importante al influir en la concentración del agente químico en el microambiente celular. Es así que dichas enzimas deben ser consideradas como claves determinantes en la magnitud y naturaleza de los efectos biológicos de los agentes genotóxicos.

PAPEL DEL METABOLISMO EN LA MUTAGENESIS Y CARCINOGENESIS QUIMICA

Puesto que la mayoría de las drogas sufre transformación metabólica, las reacciones bioquímicas que tienen que ser consideradas bajo el título de metabolismo de las drogas son numerosas y diversas. El sitio principal del metabolismo de las drogas es el hígado, aunque otros tejidos u órganos también pueden participar. Un hecho característico de casi todas estas transformaciones es, que los productos metabólicos son más polares que las drogas originales; estos metabolitos suelen ser menos liposolubles, más ionizados a pH fisiológico, y por ende su capacidad de ligarse a proteínas plasmáticas y tisulares o de almacenarse a las grasas disminuye, lo que ahora les obstaculiza atravesar las membranas tisulares. La biotransformación no solo fomenta inactivación de compuestos, sino también resulta a menudo en una activación de estos (30). Las reacciones químicas por las que se cumple la biotransformación de los compuestos pueden clasificarse en:

- A.- Reacciones No Sintéticas (reacciones de fase I).
- B.- Reacciones Sintéticas (reacciones de fase II).

REACCIONES DE FASE I

Dentro de las reacciones no sintéticas se incluye a: las oxidaciones, reducciones e hidrólisis.

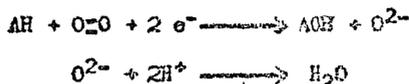
I.- Reacciones de Oxidación.

1.- Reacciones Mediadas por el Sistema Microsómico Hepático.

La mayoría de las reacciones oxidativas son catalizadas por enzimas localizadas en el retículo endoplásmico, entre las que se distinguen una serie de hemoproteínas conocidas como citocromo P-450 ó Monooxi-

genasas.

El mecanismo general de estas reacciones en el cual, un átomo de oxígeno es incorporado a un sustrato, mientras que el otro es reducido simultáneamente a agua, puede ser esquematizado de la siguiente forma:



La naturaleza del verdadero intermediario hidroxilante, indudablemente una forma oxigenada del citocromo P-450 reducido, permanece incierta; podría ser un superóxido, representado como el complejo droga-P-450⁺². O⁻². En forma general el citocromo P-450 puede ser considerado como una oxígeno transferasa y muchas de las reacciones llevadas a cabo por el sistema microsomal hepático pueden ser consideradas como reacciones de hidroxilación.

El citocromo P-450 realiza la oxidación primaria y los pasos subsiguientes (por ejemplo: la conversión del alcohol a aldehído y de éste último a ácido) puede ser catalizado por otras enzimas o proceder en forma no enzimática.

2.- Reacciones No Mediadas por el Sistema Microsomal Hepático.

a).- Reacciones de Aromatización de Cicloalcanos.

Un buen ejemplo es la formación de ácido benzoico a partir de ácido hexahidrobenczoico por un sistema enzimático mitocondrial presente en el hígado de conejo. Las enzimas mitocondriales del hígado de rata son menos activas y aquellas de gato, ratón, perro, mono y hombre son completamente inactivas.

b).- Oxidación de Alcoholes y Aldehídos.

La alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa, son enzimas no muy específicas localizadas en la fracción soluble del hígado, las cuales catalizan muchas transformaciones oxidativas importantes.

c).- Oxidación de Purinas.

Muchos derivados de las purinas (6-mercapto purina, teofilina y caseína) se sabe que sufren oxidación in vivo y parece probable que la Xantina oxidasa (que normalmente interactúa con hipoxantina y xantina) pueda participar en alguna de estas reacciones. La 6-mercapto purina produce genotoxicidad en el ensayo en disco de E. coli (14).

ch).- Oxidación por Monoaminoxidasa (MAO).

Esta enzima desamina en forma oxidativa muchas aminas presentes en la naturaleza, así como a un gran número de drogas. Los productos de reacción son comúnmente oxidados por otras enzimas a los correspondientes ácidos carboxílicos. La MAO es una enzima mitocondrial que se encuentra principalmente en hígado, riñón, intestino y sistema nervioso. Sus sustratos incluyen a la fenil etil amina, tiramina, catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) y derivados del triptófano.

d).- Deshalogenación.

Ciertos insecticidas halogenados, anestésicos y otros compuestos pueden sufrir deshalogenación en un organismo animal. El metabolismo del insecticida DDT (clorofenotano) en moscas domésticas resistentes a este, es un buen ejemplo de deshidrohalogenación. Ciertos estudios indican que el clorofenotano es carcinogénico en hígado de ratón (40), aún cuando falta determinar el metabolito activo.

II.- Reacciones de Reducción.

Azo y Nitrorreducción.

Estas reacciones ocurren con homogenados hepáticos de hígado de conejo y rata. En contraste con el sistema microsomal hepático, el cual se halla confinado principalmente en el hígado, estas reductasas se encuentran distribuidas en diferentes tejidos del organismo. Aunque se ha encontrado diferencias entre los sistemas azo y nitrorreductasa, los dos contienen muchas características en común. Ambos involucran reacciones anaeróbicas, requieren NADPH y son estimulados por flavina.

La capacidad para reducir azo compuestos es muy débil en tejidos mamíferos (16), siendo las bacterias de la flora intestinal las responsables de la reducción de muchos compuestos, lo que permite que un gran número de drogas puedan ser absorbidas y posteriormente metabolizadas por el organismo.

El metronidazol (un nitrocompuesto), debe su actividad mutagénica a la formación de derivados hidroxilamino o amino, producidos por una reducción enzimática catalizada por las nitrorreductasas presentes en bacterias y microsomas hepáticos de mamíferos (51).

Otro ejemplo de nitrorreducciones lo constituyen los nitrofuranos. El AF-2 (furfilfuramida) fue usado en Japón como conservador de alimentos durante los años 1965 a 1974, cuando fue sacado del mercado, al probarse su genotoxicidad en sistemas bacterianos. Esto condujo a estudios más profundos sobre el AF-2 con diversos sistemas de ensayo, que llevaron a considerar a éste como un compuesto potencialmente carcinogénico para los seres humanos (11).

En cuanto a los organismos procariotes, se ha propuesto que E. coli posee por lo menos dos enzimas nitrorreductoras, la reductasa I y la

reductasa II. Las mutantes resistentes a nitrofuranos, han perdido la actividad enzimática de la reductasa de tipo I (62).

III.- Reacciones de Hidrólisis.

El metabolismo por hidrólisis está restringido a ésteres y amidas. Las numerosas enzimas hidrolítica, esterasas y amidasas, se encuentran en plasma sanguíneo y otros tejidos que incluyen el hígado, comúnmente en la fracción soluble de las células. Las esterasas y amidasas de diferentes tejidos o especies pueden tener distintos sustratos.

REACCIONES DE FASE II .

I.- Reacciones de Conjugación.

Este tipo de reacciones implican la existencia de acoplamiento entre el compuesto (o su metabolito) y un sustrato endógeno, que puede ser un carbohidrato, un aminoácido, un grupo acilo o un sulfato orgánico.

Se ha visto que las reacciones sintéticas generalmente causan la inactivación del compuesto primitivo, aunque en ciertos casos pueden producir la activación de la molécula.

1.- Síntesis de Glucoronidos.

Entre las moléculas pequeñas normalmente presentes en el cuerpo que pueden reaccionar con drogas o con sus metabolitos, se encuentra al ácido glucurónico. Los ácidos glucurónicos se combinan con fenoles, alcoholes, aminas aromáticas y ácidos carboxílicos para formar los correspondientes conjugados.

El UDPGA sirve como donador de ácido glucurónico a varios aceptores, las enzimas que llevan a cabo este proceso son las transferasas. Se

localizan en los microsomas hepáticos y en otros tejidos. En todas las reacciones hay un ataque nucleofílico llevado a cabo por un átomo rico en electrones (oxígeno, nitrógeno o azufre) sobre el carbono de la posición 1 del ácido glucorónico de la UDPGA.

2.- Síntesis de Ribósidos y Ribosidofosfatos.

Ciertos carbohidratos diferentes del ácido glucorónico pueden participar en reacciones sintéticas con compuestos extraños. Se pueden formar ribonucleósidos y ribonucleótidos con análogos de las purinas y las pirimidinas, e indudablemente estas son catalizadas por los mismos sistemas enzimáticos, localizados en la fracción soluble de la célula, responsables de la síntesis de nucleósidos y nucleótidos de purinas y pirimidinas normales. El interés de estos análogos de base se debe a su uso como agentes anticancerígenos.

3.- Reacciones de Acilación.

a).- Reacciones de Acilación con Acetatos.

Un gran número de ácidos pueden formar derivados con la CoA para formar el derivado acil-CoA. El grupo acilo (ej. acetilo) es transferido entonces a un aceptor adecuado como lo podría ser una amina aromática. Las enzimas responsables están localizadas en la fracción soluble del hígado, así como en otros tejidos.

b).- Reacciones de Acilación con Aminoácidos.

En este caso, el ácido carboxílico extraño forma un derivado con la CoA, que a su vez, es conjugado con una amina del organismo, que puede ser glicina, ornitina o glutamina.

4.- Conjugación con Sulfatos.

Estos compuestos son llamados también sulfatos pétreos, son formados, por la reacción de grupos fenólicos, grupos hidroxílicos alifáticos o de ciertos grupos amino, con una forma activa del sulfato. Las enzimas responsables de la activación del sulfato y de la transferencia de este a un aceptor, se localizan en la fracción soluble del hígado. La reacción inicial es la formación de adenosina 5' -fosfosulfato (AFS) a partir del ión sulfato y ATP, siguiendo una reacción con otra molécula de ATP para formar 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAFS). El grupo sulfato es entonces transferido a un aceptor fenólico en presencia de una transferasa apropiada (sulfotransferasa).

El compuesto N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno, deriva del compuesto no hidroxilado, puede sufrir una conjugación con el PAFS, produciendo así un compuesto extremadamente reactivo y este último es considerado el metabolito carcinógeno del 2-AF.

5.- Reacciones de N-, O-, y S-Metilación.

Las metilaciones se llevan a cabo por una vía metabólica en la cual la S-adenosilmetionina sirve como donador de metilos. Existe un gran número de enzimas metil transferasas, una de estas es la catecol O-metiltransferasa (COMT), que se encuentra en la fracción soluble del sobrenadante de hígado de rata y otros tejidos. Esta enzima puede catalizar la transferencia de un grupo metilo al grupo fenólico(-OH) de la epinefrina, norepinefrina y otros derivados de los catecoles. La metilación ocurre en la posición meta.

ACTIVACION DE LOS PRECURSORES DE AGENTES GENOTOXICOS

1.- Reacciones Primarias de Activación Mediadas por Monooxigenasas.

Las acciones genotóxicas de los agentes precursoras, dependen de la presencia de los sistemas enzimáticos apropiados.

Ciertos compuestos lipofílicos carecen de un grupo funcional electrofílico y son esencialmente no reactivos. Tales casos requieren una reacción oxidativa inicial, que introduzca un grupo funcional dentro del compuesto para subsecuentes transformaciones metabólicas. En la mayoría de los casos, la biotransformación es un proceso multienzimático donde cada paso es catalizado por una enzima diferente. La reacción metabólica primaria (reacción de oxidación inicial) es por lo general, catalizada por un grupo importante de enzimas oxidativas llamadas oxidasas de función mixta o monooxigenasas. Dichas enzimas están localizadas en la envoltura nuclear y en los microsomas (fragmentos de retículo endoplásmico liso, generados por destrucción celular que engloban enzimas tales como el citocromo P-450). Estos microsomas pueden ser obtenidos de homogenados de diferentes órganos o tejidos principalmente de hígado, al centrifugar a estos a una velocidad de 9000 a 12000 xg durante 30'. La solución sobrenadante denominada fracción S-9, es nuevamente centrifugada solo que ahora a 105000 xg durante una hora, de donde el sedimento es colectado. La fracción microsomal así obtenida, está constituida por 3 componentes esenciales: un grupo de hemoproteínas (o una familia de hemoproteínas muy semejantes) conocidas como citocromo P-450, que actúa como oxidasa terminal, una NADPH-citocromo P-450 reductasa y una fosfatidil colina (flavoproteína).

El término P-450 se refiere a la habilidad de la forma reducida

de la hemoproteína para reaccionar con monóxido de carbono, produciendo un complejo con un pico de absorción a 450 nm.

En un sistema in vitro que contenga microsomas hepáticos, pueden ser oxidados varios compuestos, siempre y cuando los siguientes cofactores estén presentes: NADPH, O₂ y Mg⁺². El requerir NADPH y oxígeno, clasifica a este sistema enzimático como un sistema de oxidasas de función mixta, también llamadas monooxigenasas. (16).

La especificidad para el sustrato parece residir en la hemoproteína, y existen evidencias de la presencia de múltiples formas del citocromo P-450 dentro de cualquier tejido, por ejemplo los citocromos P-450 y el P-448. Esta multiplicidad de formas, junto con el hecho de que las monooxigenasas son enzimas inducibles o adaptativas, proveen a los tejidos mamíferos un sistema extremadamente versátil capaz de catalizar la oxidación de una diversidad de sustratos. Las reacciones catalizadas por el sistema monooxigenasa incluye: hidroxilación aromática y alifática, formación de óxidos de areno, N-desalquilación, N-hidroxilación, O-desalquilación, S-desalquilación, N-oxidación, S-oxidación, desaminación, desulfonación, deshalogenación y desalquilación de metaloalcanos.

2.- Reacciones Subsecuentes a la Activación por Monooxigenasas.

Los caminos metabólicos seguidos por ciertos compuestos extraños después de la activación primaria, pueden incluir una reacción catalizada por una transferasa, que transfiere un agente conjugante endógeno, por ejemplo ácido glucorónico en la forma de UDPGA o sulfato en forma de PAPS, a un grupo funcional del compuesto extraño. Tales reacciones de conjugación conducen generalmente, a cambios dramáticos en las propiedades físico químicas de los sustratos, lo cual limita las reacciones de biotransforma-

ción y conduce a una rápida excreción del compuesto vía bilis y/u orina. A consecuencia de lo anterior, la conjugación con la molécula endógena representa con frecuencia, el paso final del metabolismo de muchos compuestos extraños. Más aún, los productos de tales reacciones, carecen generalmente de actividad biológica. Sin embargo, existen ciertas excepciones a la regla. Así, se cree que ciertas reacciones de conjugación juegan un papel importante en la activación de intermediarios de compuestos genotóxicos.

Los conceptos actuales de la activación metabólica, posterior a las reacciones primarias, en las N-hidroxisaminas y N-hidroxilamidas se han derivado principalmente del estudio de los metabolitos del 2-aminofluoreno (2-AF). La sulfonación o glucoronización de las N-hidroxisaminas producen moléculas químicamente reactivas capaces de interaccionar con ciertas moléculas intracelulares como el ADN.

No obstante que la hidroxilación es considerada como un paso esencial en la activación de arilamidas genotóxicas, existen evidencias que sugieren que la N-acetilación pueda representar el paso importante en la producción de compuestos carcinógenos; dicha reacción es catalizada por la arilamida N-acetiltransferasa que convierte al 2-AF en 2-acetil-aminofluoreno.

Por otra parte, aún cuando en los hidrocarburos policíclicos aromáticos, la oxidación primaria conduce directamente a la formación de compuestos electrofílicos altamente reactivos como los epóxidos. Las reacciones posteriores que sufren dichas moléculas con la finalidad de "desactivarla", pueden originar intermediarios con actividad genotóxica. Así, -enzimas "desactivantes" como la epóxido hidratasa puede jugar un papel importante en la activación indirecta de hidrocarburos policíclicos aromáticos como el benzo(a)pireno.

A pesar de que actualmente parece claro que la reacción primaria de monooxigenación, es el evento inicial en la activación de muchos precursores de agentes genotóxicos, existen rutas alternas para la activación de estos compuestos. Uno de dichos caminos metabólicos es a través de la formación de radicales libres. Así mismo, la producción de la correspondiente hidroxilamina, en compuestos con grupos amino, se encuentra implicada como paso esencial en la activación de las aminas aromáticas genotóxicas. En el caso de la activación de nitrosaminas y compuestos relacionados, la conjugación de los metabolitos resultantes de las reacciones primarias de monooxigenación (hidroxilación de las moléculas originales), conduce a la generación de moléculas genotóxicas.

3.- Reacciones Primarias de Activación No Mediadas por Monooxigenasas.

No obstante que la activación de la mayoría de los precursores de agentes genotóxicos requieren de un paso de oxigenación inicial, existen otros tipos de reacciones metabólicas primarias que conducen a la generación de agentes genotóxicos. Este es el caso de los nitrosocompuestos. Se cree que la activación de la 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO), involucra la reducción de la molécula para formar el correspondiente N-hidroxiilo (4-hidroxi aminoquinolina-1-óxido). Tal reducción puede ser mediada por diferentes nitrorreductasas, y algunas de estas enzimas se encuentran presentes en los organismos bacterianos (39).

Aún cuando existen evidencias que sugieren que la 4-hidroxi aminoquinolina-1-óxido es un compuesto mutagénico, dicho agente puede ser metabolizado a una forma (s) más reactiva (s) por conjugación con ciertas especies de ARN_t.

Existen además ciertos casos en que la reducción catalizada por azo reductas (de las que existen por lo menos dos, una soluble y una micro

sómica en el hígado de rata) no conducen a la destoxificación de azo compuestos genotóxicos, por el contrario dichas reacciones llevan a la activación de estos.

En otros casos, un tercer tipo de reacción metabólica primaria como la hidrólisis catalizada por una esterasa o amidasa, puede conducir a la escisión de compuestos precursores, que pueden originar agentes genotóxicos o intermediarios de estos últimos.

I.- ESTRUCTURA Y FUNCION DEL MATERIAL GENETICO: ACIDOS DESOXIRIBONUCLEICO (ADN) Y RIBONUCLEICO (ARN).

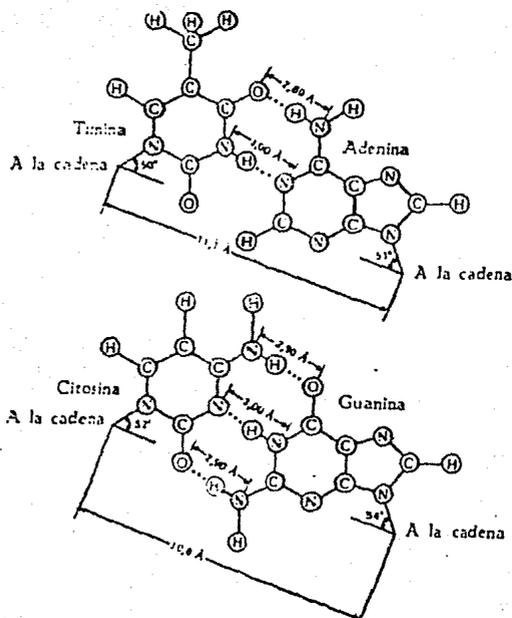
Los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico son macromoléculas con capacidad de almacenar y transferir la información genética, por lo que son componentes principales de la célula.

El ADN está constituido por dos cadenas polinucleotídicas (2'-desoxirribonucleótidos) que se hallan enrollados en forma de hélice, alrededor de un mismo eje formando así una cadena duplex. Ambas cadenas o hebras son antiparalelas, es decir, sus enlaces fosfodiéster 3' → 5' internucleotídicas van en direcciones opuestas. Las bases púricas (guanina y adenina) y pirimidínicas (timina y citosina) de cada una de las hebras, están apiladas en el interior de la cadena duplex con sus planos paralelos entre sí y perpendiculares al eje de la hélice doble. Las bases de una de las hebras están apareadas en el mismo plano con las bases de la otra hebra. El apareamiento de las bases que constituyen a las dos hebras es tal, que solo encajan en la estructura determinados pares de bases que pueden ligarse entre sí por enlaces de hidrógeno. Los apareamientos permisibles son A-T y G-C, que son precisamente los pares de bases que muestran equivalencia en el ADN (Figura 1).

Los nucleótidos del ADN están constituidos por una azúcar (2'-desoxirribosa), un grupo fosfato en la posición 5' del azúcar y una base nitrogenada en la posición 1' de la misma molécula, los constituyentes del ARN son los ya mencionados a excepción de la azúcar que en este caso es ribosa (28).

En las células eucariotas la mayor parte del ADN reside en los cromosomas del núcleo celular, mientras que una pequeña fracción (del 0.1

FIGURA 1



Dibujos a escala y modelos espaciales compactos de los pares de bases adenina-timina y guanina-citosina, unidos por puentes de hidrógeno. El primero tiene dos enlaces de hidrógeno y el segundo tres. Los pares de guanina-citosina están algo más próximos - entre sí, son más compactos y, por tanto, más densos que los pares de adenina-timina.

FUENTE: Pauling, L. y Corey, R. B. (1956). Arch, Bio. Chem. -
 Biosphys., 65:164, Academic Press, Inc., Nueva York.

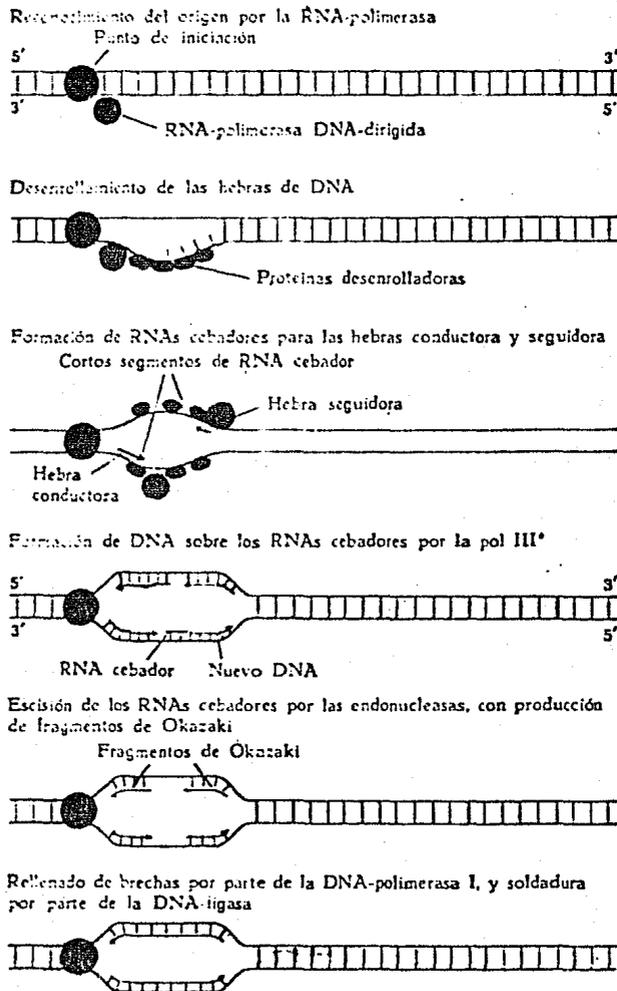
al 10% dependiendo del organismo o del tipo de la célula) se encuentra en otros organelos de la misma (mitocondria, cloroplastos, etc.).

La cantidad de ADN cromosómico por célula es generalmente constante pero difiere de organismo a organismo. Mientras que algunos virus solo contienen 5,600 pares de nucleótidos en el ADN, la bacteria contiene al rededor de 5×10^6 y las células humanas aproximadamente 6×10^9 pares de nucleótidos.

Durante la duplicación, el ADN debe girar para desenrollar las cadenas. Para mantener un razonable grado de rotación en su medio ambiente viscoso celular, una ADNasa introduce puntos de giro al cortar una de las dos cadenas. Cada una de estas es separada y copiada a través de un mecanismo semiconservativo, lo cual requiere del apareamiento de bases complementarias que se unen por enlaces de hidrógeno. Son entonces producidas dos nuevas cadenas, cada una contiene una hebra vieja y una nueva; posteriormente los puntos de giro son nuevamente cerrados por una ADN ligasa. (Figura 2).

Un super empaquetamiento del ADN unido a ARN, histonas y otras proteínas da como resultado la formación de los cromosomas humanos; en conjunto, el ARN, las histonas y las otras proteínas son componentes esenciales para el funcionamiento normal del ADN eucariote. En los organismos procariones quienes carecen de membrana nuclear, también se encuentran estas mismas moléculas ligadas al material genético.

Figura 2



Hipotética secuencia de etapas en la replicación del ADN, avanzando en una sola dirección, hacia la derecha, desde el punto de iniciación. Simultáneamente, por un proceso similar, la replicación también comienza desde el punto de iniciación y avanza hacia la izquierda. FUENTE: Ref. 28

II.- CAUSAS, TIPOS DE ALTERACIONES DEL ADN Y MECANISMOS DE PROTECCION.

A.- Causas Generales de Alteraciones Genéticas..

El ADN es una estructura de peso molecular elevado que sufre - reacciones complejas durante su duplicación, reparación y funcionamiento. Por tanto no es sorprendente que esta estructura pueda ser alterada por agentes físicos, químicos o biológicos. Los agentes externos pueden alterar al ADN sin necesidad de modificación enzimática (agentes genotóxicos), o requiriendo de una previa activación metabólica para ejercer su acción (agentes pregenotóxicos). A su vez, los agentes pre- o genotóxicos pueden actuar directamente sobre la molécula del ADN, o indirectamente al alterar las enzimas relacionadas con su reparación y/o replicación.

Las causas de daños genotóxicos se pueden clasificar en:

Físicos :

- a).- Rompimiento mecánico del ADN.
- b).- Alteración por radiaciones de alta energía (ionizantes, rayos X, U.V., etc.).
- c).- Producción de sitiosapurínicos y apirimidínicos por elevación de la temperatura.
- ch).- Inducción de sistemas de reparación del ADN propensos a error.

Químicos :

- a).- Alteración o remoción de bases del ADN.
- b).- Incorporación de bases alteradas.
- c).- Alteración del esqueleto del ADN.

ch).- Inducción de sistemas de reparación del ADN propensos a error.

Biológicos :

1.- Enzimáticos:

- a).- Activación de compuestos pregenotóxicos.
- b).- Errores de los sistemas constitutivos de replicación y/o reparación del ADN.

2.- No enzimáticos:

- a).- Presencia de bacteriófagos en el genoma hospedero.
- b).- Presencia de transposones en el ADN hospedero.

B.- Tipos de Alteraciones Genéticas.

El tipo de alteraciones genéticas puede ser de dos clases: la que involucra un fragmento grande de ADN y, otro que solo se produce al alterar un número pequeño de bases del material genético. El primer tipo lo forman las alteraciones cromosómicas, adiciones, deleciones y translocaciones, etc. (su reversión espontánea es siempre cero). El segundo lo constituyen las alteraciones génicas, entre las que se encuentran las lesiones inactivantes y mutaciones, originadas éstas últimas por sustitución, deleción o adición de bases; cuya reversión espontánea, a diferencia de las de tipo cromosómico, es mayor de cero. El diagrama 1 resume en forma general el tipo de alteraciones al material genético.

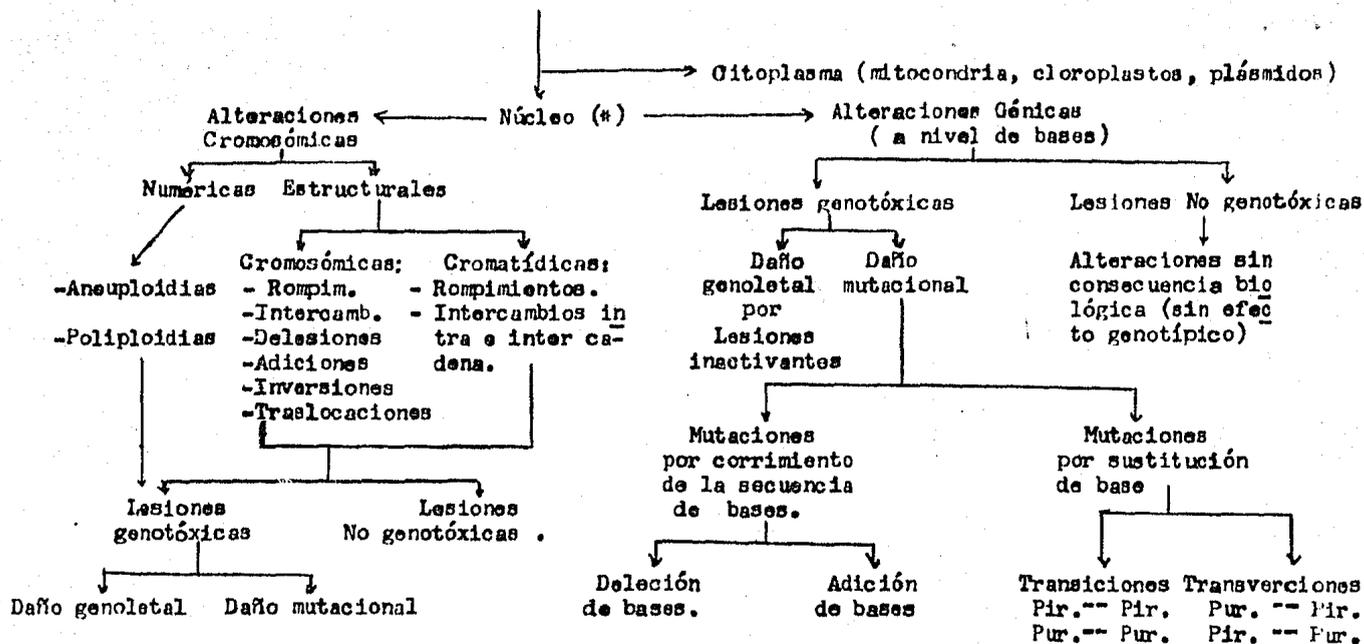
C.- Mecanismos de Protección.

El mantenimiento correcto de la información genética en la célula es tan importante, que existen diversos mecanismos que protegen al ma-

TIPO DE ALTERACIONES AL ADN

ALTERACIONES AL

ADN EN:



(*)

En el caso de organismos procariones, deberá entenderse como genoma procarionte. - Solo algunas de las alteraciones cromosómicas de los eucariotes son sufridas por los procariones. Las lesiones génicas atañen a ambos.

FUENTE: Adaptación y modificación de la Ref. 15
M.T. Maza y C. Arundr.

terial genético del daño que puede sufrir, reparando la alteración una vez que se ha registrado. Algunos de estos mecanismos celulares de protección, se resumen de la siguiente forma:

- Estructurales:**
- Membrana celular; sólo permite el paso de ciertas moléculas.
 - Membrana nuclear (eucariotes); protege al ADN durante la replicación.
 - Condensación del ADN; lo protege de la acción de las ADNasas.

- Enzimáticas:**
- Destrucción de agentes químicos dañinos.
 - Fidelidad de las enzimas que replican o reparan el ADN.
- Enzimas que reparan: a) enzima fotorreactivante, b) U.V. - endonucleasa, c) APendonucleasas, d) endonucleasas de bases metiladas, e) N-glucosilasas, f) insertasas de purinas, g) -desmetilasas, h) exonucleasas, i) ADN polimerasas, j) ADN - ligasa, k) enzimas de recombinación.
- Enzimas que replican: a) enzimas desestabilizantes del ADN b) ARN polimerasas dependientes de ADN, c) polimerasas Pol I, Pol II, Pol III-copol III y ADN ligasa.
- Enzimas inducibles de reparación propensa a error (repara--ción de daños genotales no reparados por los sistemas comtitutivos celulares.

Ambos tipos de mecanismos dependen, para su normal funcionamiento, del mantenimiento del pH y concentraciones iónicas adecuadas.

Puesto que los mutágenos pueden ser activados por ciertas enzimas e inactivados por otras, es imposible predecir con certeza, si un compuesto que es fuertemente mutagénico en un organismo lo sea en otro. Tam- poco es posible asegurar que un compuesto que no es genotóxico en un orga- nismo lo sea en otro.

A.- Causas Generales de Alteraciones Genéticas (Efecto de los diferentes - agentes en el ADN).

En vista de la gran diversidad de factores físicos, químicos y biológicos que producen alteraciones en el ADN, a continuación se ilustran los mecanismos de genotoxicidad más relevantes tomando como modelos a algu- nos agentes representativos.

Se pueden distinguir en primer lugar a los agentes que dañan al ADN sólo durante la replicación o reparación (ejemplo; análogos de base) y, a los que lo alteran antes, durante o después de estos procesos (agentes productores de radicales libres, agentes alquilantes, etc.) (15).

AGENTES QUÍMICOS.

1.- Análogos de Base.

Los análogos de base son sustancias, cuya estructura es muy cer- cana a la de las bases normales del ADN por lo que pueden ser incorporadas erróneamente en el mismo, sin destruir su capacidad para replicarse. Un e- jemplo de ellos lo constituye, la 5-metil-citosina, el 5-metil-uracilo. -- Cualquier compuesto que se asemeje en estructura a las bases normales, ten

drá primero que ser unido al azúcar correspondiente (2'-desoxirribosa) y a un trifosfato, para generar una molécula parecida a un desoxirribonucleótido; solo de esta forma podrá ser incorporado en la cadena del ADN. Cualquier compuesto con analogía estructural a una base normal que no siga este proceso, no será introducido a la doble hélice. Debe hacerse notar que cuando se tiene el azúcar unido al fosfato, esta molécula también es incapaz de incorporarse al ADN. Para llegar a formar parte de éste, se necesita de la presencia de la 2'-desoxirribosa, una base normal o análogo de base, además de trifosfatos.

El sistema que replica al ADN aparentemente, puede reconocer alguna parte de la molécula de la 2'-desoxirribosa y los fosfatos, presumiblemente verificando la posición y el ángulo de los nucleótidos que se van a incorporar con respecto a las cadenas del ADN ya presentes.

Los uracilos halogenados en la posición 5, como el 5-bromo-uracilo, 5-cloro-uracilo y el 5-iodo-uracilo, constituyen un ejemplo clásico de los análogos de base, éstos pueden ser incorporados en el ADN en lugar de la timina (base normal). El bromo-uracilo es incorporado probablemente en forma más eficiente, porque el bromo ocupa un volumen similar y posee el mismo radio de Vander Waals que el grupo metilo de la timina, pero el bromo por su fuerte carácter electronegativo cambia el equilibrio tautomérico de la molécula.

La incorporación de los análogos al ADN, se ve incrementada por la existencia de un desbalance en la concentración de las bases normales. Por ejemplo, la cantidad de 5-bromo-uracilo incorporada en el ADN, aumenta cuando hay un abatimiento de la concentración de timina, producida por aminopterina o 5-fluoro-desoxiuridina, que bloquean su síntesis de novo.

El 5-bromo-uracilo (5-BrU) y sus desoxirribonucleótidos son altamente mutagénicos, probablemente porque el 5-BrU sufre con mucho mayor frecuencia que la timina, un desplazamiento en el equilibrio tautomérico que ocasiona que el análogo de base se tienda a aparearse con guanina, en lugar de adenina (forma normal de apareamiento). El cambio ocurre también cuando el 5-BrU es ocasionalmente incorporado en el ADN en lugar de la citosina.

Este apareamiento erróneo hace entonces que por replicaciones posteriores, esta molécula análoga produzca mutaciones al ADN causando transiciones en ambos sentidos, de A-T a G-C y viceversa, dependiendo de que el error en el apareamiento se presente durante subsecuentes replicaciones, o durante la incorporación inicial de 5-BrU (fig. 3a y 3b).

Otro análogo de base, la 2-aminopurina (análogo de la adenina) se aparea en forma tautomérica normal con timina, inclusive con citosina, pero en su forma tautomérica rara solo lo hace con citosina dando por resultado, lugar a transiciones en ambos sentidos, A-T a G-C y G-C a A-T. A pesar de que la 2-aminopurina se incorpora muy poco, es altamente mutagénica, probablemente por su capacidad de aparearse erróneamente, tanto en su forma tautomérica rara como normal (15).

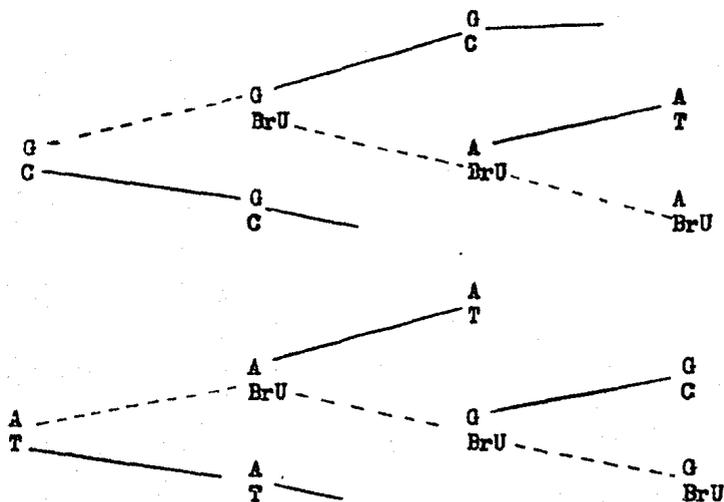
2.- Efecto del Acido Nitroso Sobre el ADN.

Cuando el nitrito de sodio (NaNO_2) es expuesto a pH menor de 3.3 se produce ácido nitroso que es capaz de desaminar a la G, C y A. La proporción de desaminación decrece en este orden.

La desaminación de C a U y de A a HX, son mutagénicas, pues producen transiciones de G-C a A-T y de A-T a G-C. La xantina que resulta de la desaminación de la guanina se aparea con citosina y por tanto no produ

FIGURA 3

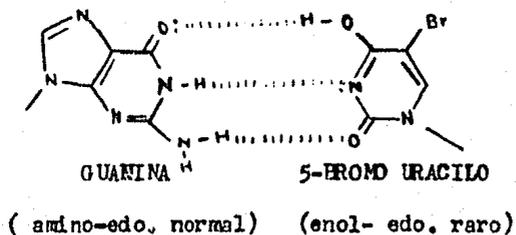
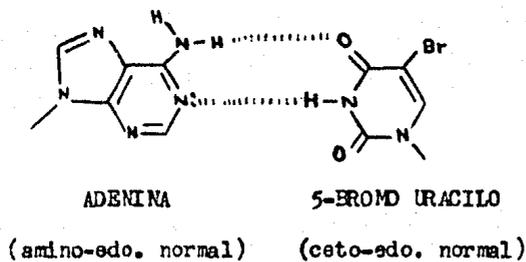
a).- Producción de transiciones GC → AT por acción de 5-BrU.



error en
la incor-
poración.

error en
la repli-
cación.

b).- Equilibrio tautomérico de la 5-BrU.



ce cambio alguno.

El efecto del ácido nitroso sobre el ADN, además de ocasionar transiciones, produce también inactivación del ADN al inducir entrecruzamientos en la doble hélice (Fig. 4) (4).

3.- Agentes Alquilantes.

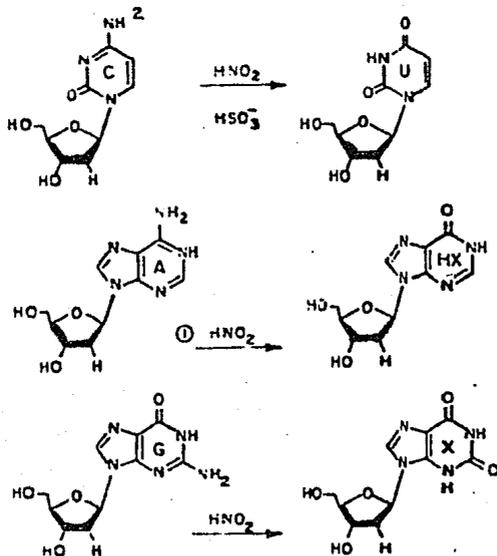
Entre los agentes alquilantes se incluye a un gran número de moléculas que liberan uno, dos o más iones carbonilo y en consecuencia son llamados agentes alquilantes mono, di o polifuncionales respectivamente. Probablemente todos los agentes alquilantes tienen un efecto mutagénico y, pueden producir mutaciones puntuales (transiciones), ruptura y/o entrecruzamientos de la cadena del ADN.

Los agentes alquilantes se ionizan en solventes polares y originan la liberación de iones carbonilo, que reaccionan fácilmente con los grupos nucleofílicos del ADN, como son los grupos fosfato y los nitrógenos u oxígenos de las bases.

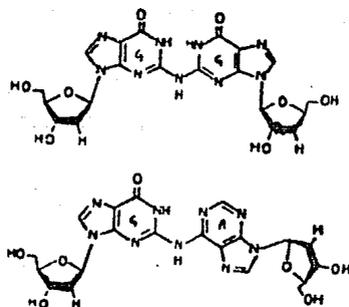
Los compuestos alquilsulfatos (ej. dimetilsulfato) y alquilsulfonatos (ej. metil metanosulfonato) producen transición G-C a A-T por alquilación de la G en la posición 7, que a su vez desplaza el equilibrio tautomérico, por lo que ahora la G se aparea con T generando dicha transición. La alquilación del N-7 de la G, puede también producir en menor grado, la hidrólisis del enlace glucosídico por inestabilización de la base, resultando de esta forma, la liberación de la purina alquilada y la formación de un sitio apurínico. La generación de estos sitios apurínicos produce rompimiento del enlace fosfodiéster si son atacados por álcalis (OH^-). Este mecanismo ha sido señalado como el responsable de la ruptura del esqueleto del ADN por agentes alquilantes, aunque también la alquilación de los grupos fosfato por formación de triésteres, inducen este tipo de daño.

FIGURA 4

EFECTOS DEL ACIDO NITROSO EN EL ADN



Desaminación oxidativa de la citosina, adenina y guanina por acción del ácido nitroso (in vitro e in vivo).



Generación de uniones covalentes entre G y G o G y A por acción del ácido nitroso, que se manifiestan como entrecruzamientos en la doble hélice.

Los agentes alquilantes polifuncionales pueden generar entrecruzamientos en el ADN inter e intracadena, debido a que poseen 2 grupos funcionales cargados positivamente, que interaccionan con los centros nucleofílicos de éste y pueden actuar en forma mono o bifuncional (ej. ciclofosfamida, mitomicina C, etc.) (Fig. 5).

Entre los agentes alquilantes monofuncionales se tienen también a los N-nitroso compuestos. Estos son altamente carcinogénicos e inducen rompimientos, aberraciones cromosómicas, así como mutaciones puntuales. Un ejemplo de N-nitroso compuesto lo constituye el MNNG (1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina). Existen referencia en el sentido de que el MNNG origina transiciones y transversiones solo en fase de síntesis de ADN (fase de crecimiento logarítmico), posiblemente por metilar las bases del ADN de cada una sencilla de la región en duplicación, o al interferir con las enzimas del sistema de replicación. Otros autores señalan, que el MNNG produce también mutaciones en fase estacionaria solamente en bacterias $lexA^+/recA^+$, lo que hace pensar en la participación del sistema de reparación "SOS" en la inducción de mutaciones por este agente alquilante (24).

Las dialquilnitrosaminas son compuestos estables, que solo son activas (genotóxicas) después de la remoción metabólica de uno de los dos grupos alquilo. Las acilnitrosamidas (MNNG) por su parte, a diferencia de las dialquilnitrosaminas no requieren activación metabólica para ejercer sus acciones sobre el ADN, por ser moléculas menos estables (fig 6).

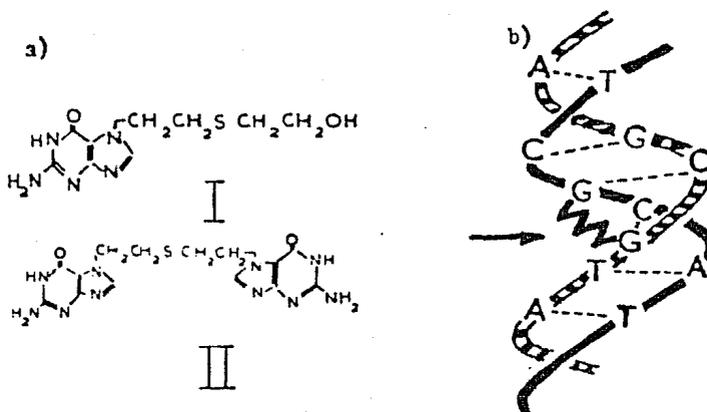
4.- Hidroxilaminas.

Las hidroxilaminas (HAs) son agentes reductores débiles, que generan H_2O_2 y radicales libres en presencia de O_2 y trazas de metales.

La HA y la N-metil hidroxilamina reaccionan específicamente con

FIGURA 5

PRODUCCION DE ENTRECruzAMIENTOS EN EL ADN POR AGENTES BIFUNCIONALES

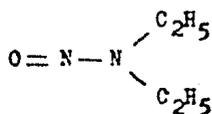


a.- Productos de reacción entre el ácido nucleico y mostazas de sulfuro.

b.- Representación diagramática de la reacción de un agente alquilante bifuncional con el ADN. La cadena alquilante esta representada por la línea zigzaguante entre G y G. FUENTE: Referencia 4.

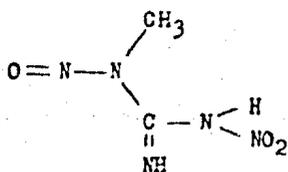
FIGURA 6

DIALQUILNITROSAMINAS GENOTOXICAS



Dietyl-nitrosamina

(compuesto pregenotóxico)



1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina

(MNNG, compuesto genotóxico)

FUENTE: Referencia 15

citosa y producen derivados N-OH en las posiciones 4 y 6 de ésta. Tal suceso conduce a un equilibrio tautomérico diferente por lo que ahora la C se aparea con A y no con G (fig. 7).

La HA produce mutaciones tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. El efecto inactivante de la HA sobre el ADN depende de la presencia de oxígeno y se requieren concentraciones mucho menores que para la producción de mutaciones. La permeabilidad celular constituye una barrera para la hidroxilamina, lo que condiciona existan bajas concentraciones de HA en el interior de la célula, teniéndose así alteraciones inactivantes y rompimientos cromosómicos como efecto principal.

5.- Agentes Intercalantes.

Ciertos compuestos como las aminoacridinas se intercalan y/o apilan con las bases del ADN de doble cadena (fig. 8) produciendo mutaciones puntuales por corrimiento de la lectura (frameshift). Un mecanismo para la generación de este tipo de lesiones por agentes intercalantes, es el propuesto por Streisinger, quién sugiere la estabilización de asas (loops) intracadena formadas por el mal apareamiento de una región del ADN que haya sufrido rompimiento del enlace fosfodiéster, tras lo cual, durante la síntesis reparativa deleta o adiciona una o más bases (55, 59).

Químicamente, las acridinas y compuestos intercalantes relacionados, son más efectivos a pH neutro y contienen en su molécula uno o más anillos aromáticos en su estructura y por lo menos un grupo electrofílico.

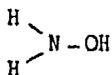
AGENTES FISICOS

1.- Luz Ultravioleta (U.V.).

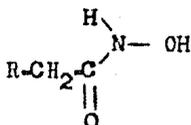
La luz U.V. presenta efectos directos e indirectos sobre el ADN.

FIGURA 7

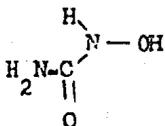
a) N-HIDROXILAMINA Y COMPUESTOS RELACIONADOS



N-Hidroxilamina.



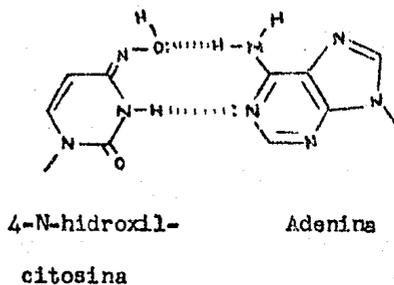
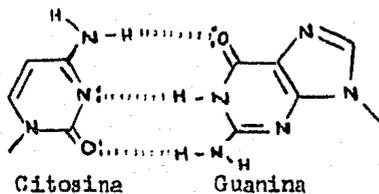
N-Hidroxicarbamatos.



N-Hidroxiureas.

FUENTE: Ref. 15

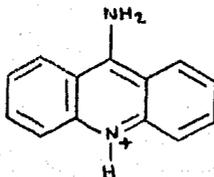
b) Producción de mutaciones C-G a T-A por acción de N-OH compuestos.



FUENTE: Ref. 57

FIGURA 8

ESTRUCTURA QUIMICA DE LA 9-AMINOACRIDINA.



FUENTE: Referencia 55

Su primer efecto origina fotoproductos en el ADN, como los dímeros entre pirimidinas adyacentes (dímeros de T-T y C-T). Este tipo de lesiones ocasiona inactivación del ADN así como mutaciones puntuales. Estos dímeros - pueden ser revertidos a su forma original por medio de reparación enzimática (ver capítulo de reparación del ADN).

El efecto indirecto se presenta, cuando la luz U.V. es absorvida por ciertos compuestos del microambiente, produciéndose de esta forma - radicales libres y peróxidos orgánicos, que alteran al ADN.

2.- Radiaciones Ionizantes.

Las radiaciones ionizantes como los rayos alfa, beta, gamma y X, generan alteraciones en el ADN, al interactuar directamente con el material genético de células deshidratadas o de esporas. En células hidratadas, estas radiaciones alteran al ADN vía la formación de radicales libres (15).

Las radiaciones ionizantes inciden sobre las moléculas presentes en el medio, originando la formación de radicales libres por liberación de un electrón. Dicho electrón es atrapado por el agua, que de esta forma actúa ahora como otro radical libre. En presencia de oxígeno birradical ($\cdot O - O \cdot$) se tiene la formación de radicales peróxido ($R \cdot O - O \cdot$) que son compuestos químicos muy reactivos y que al interactuar con el ADN producen rompimientos de la cadena, liberación de bases o hidroxilación de las mismas.

AGENTES BIOLOGICOS

1.- Enzimáticos; errores de los sistemas constitutivos de replicación y/o reparación del ADN.

Dentro de esta clasificación se encuentran a aquellos errores - enzimáticos que alteran la secuencia del ADN, pero se debe hacer notar --

que aquellos sistemas enzimáticos de reparación o replicación constitutivos, alterados por el microambiente (sistemas inducibles propensos a error, así como por la acción de agentes químicos o físicos) no entran en esta clasificación. Por tanto, enzimas como las llamadas mutadoras son consideradas como agentes biológicos genotóxicos, puesto que introducen errores en la síntesis de reparación del material genético en una proporción varias veces mayor al nivel basal (1 error cada 10^9 bases incorporadas, en el caso de Poli).

2.- No Enzimáticos; Es cualquier secuencia de ADN que se introduzca al material genético del hospedero y genere algún cambio genotípico.

a).- Bacteriófagos.

La incorporación de genomas virales en el ADN del hospedero, en muchos casos causa la inactivación funcional del gene afectado. Tales moléculas virales, pueden permanecer introducidas en el material genético del hospedero sin expresar la gran mayoría de sus genes. Más aún, este tipo de virus es replicado conjuntamente con el ADN recipiente y en consecuencia es transferido a la descendencia de la célula hospedera. La salida del genoma viral de su estado de represión, puede ocasionar también que se pueda transportar parte del ADN de la célula infectada, junto con el del virus, a otra célula (transducción), o en el momento de la formación de los virus maduros, las proteínas de la cápside puedan envolver a fragmentos del genoma celular (transfección).

b).- Presencia de Transposones.

Estos elementos son pequeños fragmentos de ADN (pocos genes), - limitados por regiones de secuencias de bases repetidas e invertidas, que les permite insertarse en forma específica (también puede ser inespecífica) en un genoma receptor, ocasionando al igual que los bacteriófagos, la inactivación funcional del gene afectado (daño genotóxico).

B.- Tipos de Alteraciones Genéticas.

Aún cuando exista una amplia gama de alteraciones del ADN y, una variedad de mecanismos que pueden ocasionarlas. A continuación se hará énfasis únicamente en las alteraciones de tipo génico, por su relevancia en el estudio de evaluación de la genotoxicidad de medicamentos, tema de ésta Tesis.

Las alteraciones génicas producidas por agentes físicos, químicos o biológicos (originadas tanto en fase de división o en interfase), conducen finalmente, no importando el organismo involucrado, a dos tipos de efectos: genotóxicos y/o no genotóxicos (diagrama 2)

1.- Lesiones No Genotóxicas.

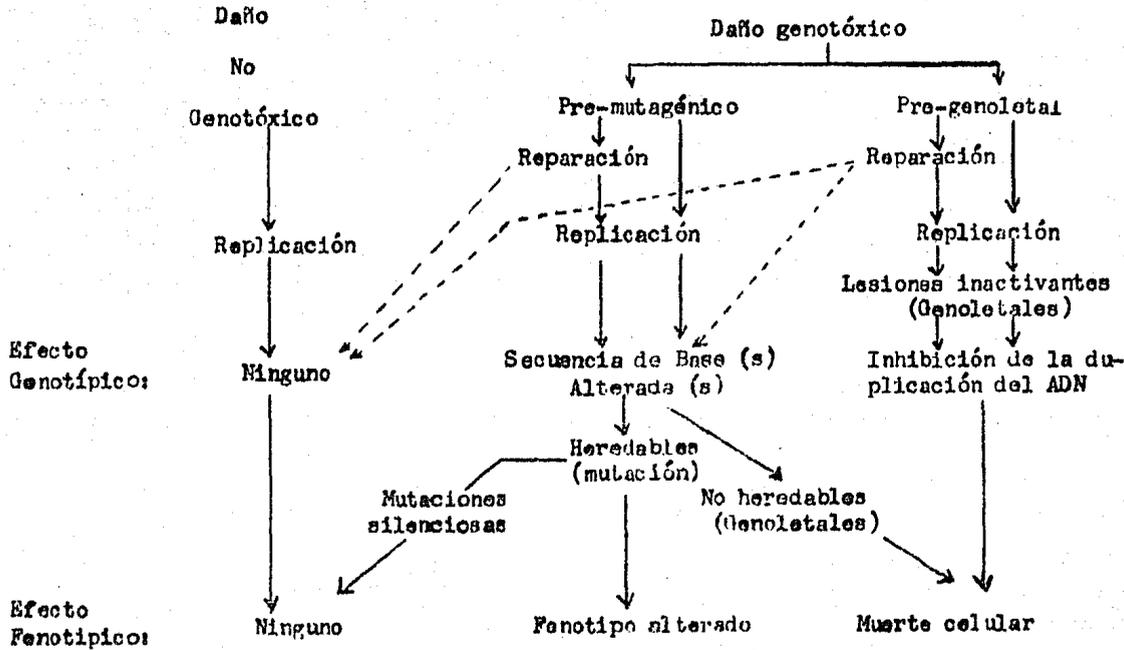
Se consideran lesiones no genotóxicas a las alteraciones sobre la molécula del ADN, que no previenen la duplicación del material genético (lesiones inactivantes), ni tampoco inducen cambios heredables (mutaciones), ni letales en la secuencia del mismo. Generalmente estas lesiones involucran la modificación química o enzimática de las bases o de los grupos fosfatos del ADN, en sitios que no interfieren con el apareamiento de las bases o con la conformación helicoidal de esta macromolécula. Este es el caso de la metilación o hidroxilación de pirimidinas en la posición 5, o la generación de Xantina, cuya presencia en la doble hélice no produce efectos genotóxicos (26,57).

2.- Lesiones Genotóxicas.

Dentro de este tipo de lesiones se incluyen a las premutagénicas y a las pregenotóxicas, que afectan tanto el material genético cariótico así como al extracariótico en células germinales y somática. Este tipo de lesiones, a diferencia de las no genotóxicas, se tratarán de remo-

TIPOS DE ALTERACIONES AL ADN Y SU POSIBLE CONSECUENCIA GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA

DIAGRAMA 2



FUENTE: Adaptación de la referencia 15
M.T. Moza y C. Arundr.

ver a través de los sistemas de reparación celular, de lo contrario se convertirán con toda seguridad, en lesiones mutagónicas o genotóxicas. Los sistemas de reparación no siempre pueden actuar en forma eficaz sobre todas las lesiones genotóxicas; en estos casos las que sean mal reparadas, generarán a su vez lesiones mutagónicas y/o genotóxicas (diagrama 2).

a).- Lesiones Premutagénicas.

El daño premutagénico al igual que el no genotóxico, tampoco puede prevenir la duplicación del ADN, pero sin embargo si origina el cambio de uno o más pares de nucleótidos en las células hijas del organismo que sufrió dicho daño. Se pueden distinguir en este caso, dos tipos de daño biológico por alteración de la secuencia del ADN: la muerte celular (por afectación de genes vitales) y las mutaciones a nivel génico, las cuales son viables (heredables). A su vez éstas últimas se clasifican según su mecanismo de producción en: mutaciones por sustitución de base (s) o por corrimiento del patrón de lectura (frameshift) (fig 9).

i).- Mutaciones por Sustitución de Base (s).

Se ha clasificado a estos tipos de alteración en la forma siguiente:

Transición; cuando hay el cambio de un par A-T a G-C o a la inversa, es decir cuando hay una sustitución de una purina por otra purina, o de una pirimidina por otra pirimidina.

Transversión; se denomina así al cambio de un par A-T a T-A o C-G o bien a la inversa, T-A a A-T o C-G a A-T, es decir cuando hay un cambio de una purina por una pirimidina y viceversa.

Estos dos tipos de mutaciones corresponden al reemplazamiento

de un par de bases por otro diferente. La mayoría de las sustituciones de base, cuando ocurren en genes estructurales, provocan mutaciones de sentido equivocado (missense) trayendo como consecuencia el reemplazo de un aminoácido por otro no igual. El fenotipo del organismo mutado va a depender del cambio de base ocasionado, así como del sitio en el cual ocurra. Sin embargo, debido a la degeneración del código genético, una mutación en un codón no siempre producirá la inserción de un aminoácido diferente al original (mutación silenciosa). Así pues, si la mutación de sentido equivocado ocurre en un gene involucrado en actividad enzimática, casi siempre se producen enzimas poco eficientes o una cantidad disminuida de la de tipo normal (a este tipo de mutantes se les denomina hipomorfos). Cuando la enzima mutante compete por el sustrato con la de tipo silvestre, actúa como antimorfo, es decir se produce un antagonismo entre las enzimas.

Las sustituciones de base también pueden generar alguno de los tres tripletes de terminación llamados codones sin sentido (nonsense) que no codifican para ningún aminoácido, estos son UAG (ambar), UGA (ópalo) y UAA (cocre). Cuando se encuentran este tipo de tripletes en el ADN, no son traducidos y entonces se origina la terminación prematura de la cadena polipeptídica.

Las mutaciones de sentido equivocado son menos drásticas que las de sin sentido, puesto que estas últimas generalmente destruyen la función enzimática, mientras que las de sentido equivocado pueden traer como consecuencia, la pérdida o cambio de un aminoácido, que en determinados casos pasa fenotípicamente inadvertido.

Se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar la sustitución de bases:

- Un compuesto mutagénico puede reaccionar químicamente con las bases del ADN modificándolas, posteriormente durante la replicación, esta base alterada puede inducir un nuevo patrón de apareamiento.
- Si el compuesto mutagénico es una base nitrogenada análoga (por ej. 5-BrU) a las bases del ADN, puede incorporarse durante una primera replicación produciendo en la siguiente, un apareamiento con una base diferente, al sufrir un cambio en su equilibrio tautomérico.
- Se ha propuesto también que se presentan alteraciones por sustitución de base debido, a la interferencia de algún compuesto mutagénico con las enzimas de replicación del ADN; el resultado de dicha alteración provoca una mala incorporación de bases en la región del ADN en duplicación (MNEG).
- Existen sistemas de reparación que al intentar remover ciertas lesiones del ADN, pueden ocasionar la generación de mutaciones por sustitución de base. Lo anterior ocurre durante la intervención del sistema de reparación propenso a error "SOS" (24).

ii).- Mutaciones por Corrimiento del patrón de lectura (frameshift).

Este tipo de mutaciones acarrea consecuencias mucho más drásticas que las producidas por sustitución de bases, debido a que la adición o deleción de bases ocasiona que la secuencia de tripletes del ADN se modifique enormemente. Dicho mecanismo de mutación se descubrió durante las investigaciones con proflavina y amarillo de acridina (59) (fig. 9 y 10).

Las deleciones o inserciones de una base o bases en el genoma, causan un corrimiento en la lectura de los codones a partir del sitio donde se insertan o deletan bases, por tanto este tipo de lesiones son llamadas de corrimiento de la secuencia de bases (frameshift). Este cambio generalmente genera productos enzimáticos no funcionales.

FIG. 9

TIPOS DE MUTACIONES PUNTALES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ADN original	A	T	G	C	T	G	C	A	T	T
	T	A	C	G	A	C	G	T	A	A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
sustitución	A	T	G	C	X	G	C	A	T	T
	T	A	C	G	Y	C	G	T	A	A

	1	2	3	5	6	7	8	9	10
delección	A	T	G	T	G	C	A	T	T
	T	A	C	A	C	G	T	A	A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
inserción	A	T	G	C	T	T	G	C	A	T
	T	A	C	G	A	A	C	G	T	A

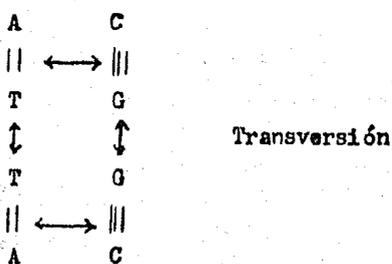
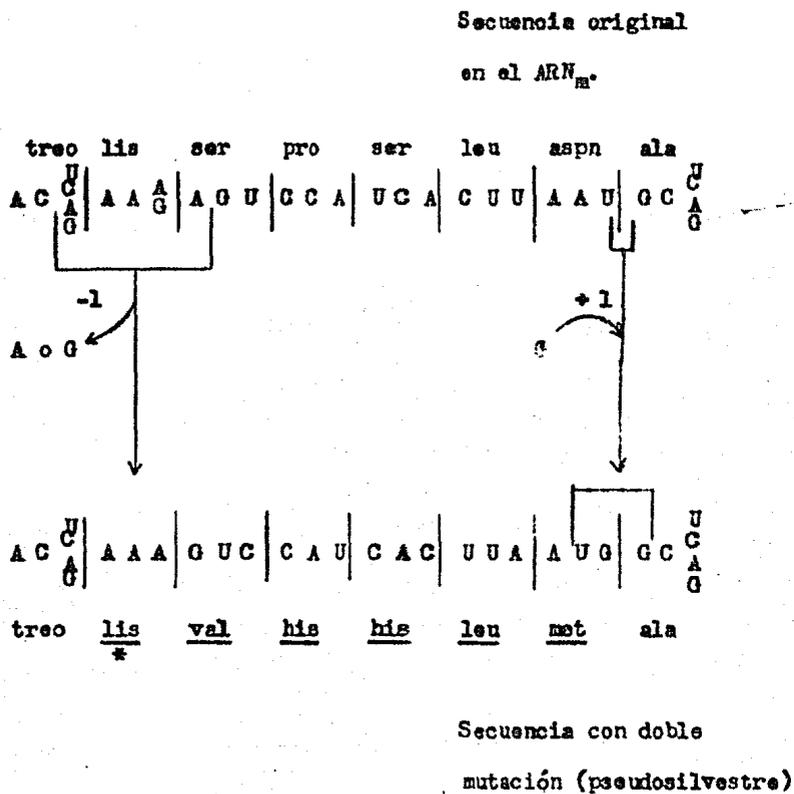


FIGURA 10

CAMBIO DE SECUENCIA GENERADA POR MUTACIONES FRAMESHIFT.



* Los aminoácidos subrayados son los únicos que cambian.

FUENTE: Referencia 59

SUPRESION DE MUTACIONES.

Se conoce con este nombre a aquel (los) mecanismo (s) que restaura (n) total o parcialmente la actividad original de un gene mutado. Así, existen reversiones (supresiones) verdaderas, cuya característica es la restauración exacta, de la secuencia original de bases.

En el caso de las mutaciones frameshift, se requiere la adición o deleción en el sitio original de la lesión, del mismo número de bases aumentadas o disminuidas. Al igual que la reversión verdadera, también puede ocurrir una adición o deleción cerca del lugar donde ha ocurrido otra con anterioridad, generándose así una mutante pseudosilvestre (reversión no verdadera). Estos dos tipos de supresiones son intracistrónicas por haberse - llevado a cabo en el mismo gene.

Por otra parte, las sustituciones de base también pueden corregirse en forma verdadera o no, por una segunda mutación de éste tipo en el mismo cistrón (reversión intracistrónica).

En ambos casos (frameshift y sustitución de bases), la supresión de una mutación también es factible de generarse por mutaciones en diferentes genes (reversion extracistrónica). Los supresores pueden originarse en genes que controlan la síntesis del ARN_t o de las enzimas que unen a los diferentes aminoácidos con sus respectivos ARN_t.

b.- Lesiones Pregenoletales.

Este tipo de lesiones previene la duplicación del ADN en el lugar o región alterada, a menos de que esta sea eliminada por los sistemas de reparación. El bloqueo de la replicación del material genético, ha sido ampliamente estudiado en bacterias expuestas a irradiación con luz U.V. -

(66), aunque también se han utilizado otros tipos de agentes genotóxicos. Se ha visto así mismo, que la mayoría de las lesiones inactivantes, entre las que podemos contar a: las alteraciones de base (s) no codificantes, -remoción de bases, dímeros de pirimidina, entrecruzamientos por unión covalente intra e intercadena (cross-links) y rupturas del enlace fosfodiéster, -son factibles de ser eliminadas por sistemas de reparación enzimáticos específicos.

C.- Mecanismos de Protección del Material Genético (Mecanismos de Reparación Enzimáticos)

Cuando las células son expuestas a condiciones ambientales adversas, éstas tienen que mantener entre otras cosas, la integridad de su ADN con el fin de sobrevivir y lograr la continuidad genética. Lo anterior es realizado por los sistemas enzimáticos de reparación constitutivo e inducible.

Cuando el ADN de la célula es dañado, los sistemas de reparación pueden presentar dos comportamientos diferentes frente a la lesión:

I.- Ignorarla (metilación o etilación del C-5 de la guanina, presencia de Xantina). No hay reparación.

II.- Tratar de removerla.

1.- A través de los sistemas de reparación constitutivos.

a).- Por mecanismos prerreplicativos:

— Sin síntesis reparativa (al reparar la lesión no se produce hidrólisis ni resíntesis enzimáticas, de los enlaces glucosídico y/o fosfodiéster)

— Con síntesis reparativa (se presenta la hidrólisis y resíntesis enzimáticas de los enlaces glucosídico y/o fosfodiéster).

b).- Por mecanismos postreplicativos

— Con síntesis reparativa.

2.- A través de sistemas de reparación inducibles propensos a error.

— Con síntesis reparativa.

Debemos entender por reparación, cualquier intento de la célula por tratar de remover lesiones del material genético, no importando la consecuencia final. Por tanto, el efecto resultante de la reparación de un daño puede conducir a:

- a).- Un aumento en el porcentaje de células sobrevivientes, o que la sobrevida permanezca igual.
- b).- Una disminución o aumento en el número de células mutadas entre la población sobreviviente. El segundo caso traerá como consecuencia, una mayor variabilidad genética individual.

1.- Sistemas de Reparación Constitutivos.

a).- Mecanismos Prerreplicativos sin Síntesis Reparativa.

En este tipo de mecanismos están comprendidos los procesos de reparación llevados a cabo por las enzimas: fotorreactivante, transalquilasas e insertasas, que se caracterizan por revertir lesiones del ADN que no precisan de ruptura del enlace fosfodiéster ni glucosídico.

Fotorreactivación.

La fotorreactivación fue el primer proceso enzimático de reparación del ADN identificado en las bacterias (69). Este, parece ser específico para dímeros de timina, que es el fotoproducto principal de irradiación con luz U.V. (longitud de onda menor a 300 nm), e involucra la monome

risación de los dímeros (ruptura del ciclobutano) por la enzima fotorreac-
 tivante (E.F.) que utiliza energía absorbida de una irradiación posterior
 con luz de longitud de onda mayor a 300 nm. La mayoría de las enzimas fo-
 torreactivantes estudiadas, de diferentes especies, requieren de un cofac-
 tor de bajo peso molecular para su actividad, aunque no es siempre un cro-
 mófomo quién absorbe la luz. La enzima fotorreactivante existe en todas las
 células vivas incluyendo a los mamíferos (fig. 11).

Transalquilasas.

Las transalquilasas, son enzimas que transfieren el grupo alqui-
 lante de la base modificada a un grupo sulfidrilo (-SH) de la cisteína de
 una proteína aceptora. Existe en E. coli e hígado de rata, la O⁶-metil y -
 etil guanina transalquilasa y, en este último se han identificado además -
 otras 3 transalquilasas diferentes.

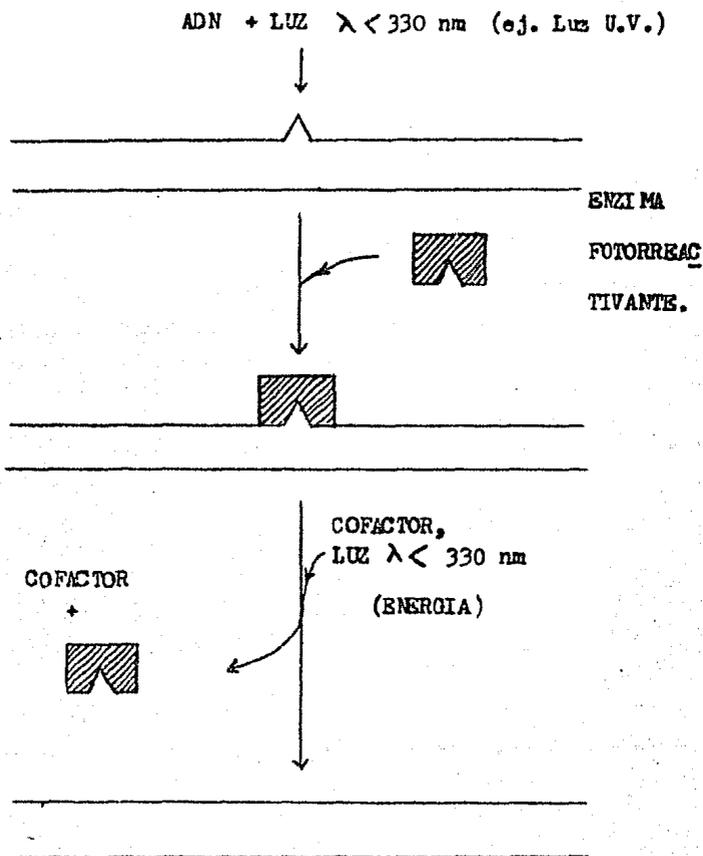
La O⁶-alquilguanina transalquilasa (solo la metil) actúa también
 en la llamada respuesta adaptativa en E. coli, cuando la bacteria es sometida
 a bajas concentraciones de MNNG o de N-nitroso-dimetil-amina. Al mo-
 mento de que estas mismas bacterias son expuestas ahora a concentraciones
 mayores del mutágeno inductor, se observa una mayor sobrevivencia y resisten-
 cia a mutaciones, que cuando no se induce la respuesta adaptativa. Dicho e-
 efecto es transitorio y solo elimina grupos metilos del oxígeno 6 de la gua-
 nina.

Insertasas.

Son enzimas que insertan purinas en forma específica en sitios
 apurínicos en el ADN de cadena doble, protegiéndolo así de la acción de az
calis. La insertasa de purinas en fibroblastos humanos in vitro, puede uti-
 lizar como moléculas donadoras de purina, a las bases guanina y adenina --
 preferentemente que a los nucleósidos o nucleótidos trifosfatados. Aparen-

FIGURA 11

FOTORREACTIVACION DE DIMEROS DE TIMINA



 = DIMERO DE TIMINA

 = ADN DUPLIX

FUENTE: Referencia 28.

temente esta enzima no requiere de energía para la formación del enlace glucosídico (12).

En E. coli existe otra insertasa de purinas, que también reconoce sitios apurínicos en ADN de doble cadena. Utiliza como donadores de la base solo a nucleótidos trifosfatados, dATP y dGTP. Esta enzima, al igual que la anterior inserta purinas en forma específica (31).

a).- Mecanismo Prerreplicativo con Síntesis Reparativa.

El presente mecanismo de reparación se caracteriza por la eliminación exonucleotídica, de la región que posea el daño. Este proceso se realiza en 4 pasos, el de incisión (ruptura del enlace glucosídico y/o fosfodiéster) que es efectuado por ADN-glucosilasas y endonucleasas, es seguido por los de escisión (eliminación de la región dañada) resíntesis y ligación, llevados a cabo por exonucleasas, ADN polimerasas y ligasa respectivamente.

Mecanismo de Incisión.

ADN-Glucosilasas.- Estas enzimas hidrolizan el enlace glucosídico (unión - 2'-desoxirribosa y la base), reconociendo específicamente ciertas bases alteradas presentes en el ADN. Tal actividad enzimática conduce a la formación de sitios apurínicos o apirimidínicos, sustratos a su vez de una AP - endonucleasa. La presencia de sitios apurínicos o apirimidínicos en el ADN puede ocasionar la ruptura del enlace fosfodiéster por ser sensibles a la acción de los álcalis; este efecto también es observado in vivo. Los sitios apurínicos son factibles de ser reparados por una insertasa de purina.

Uracil ADN glucosilasa

Fué la primera enzima de este tipo en ser reportada, y se sabe actúa sobre ADN de doble cadena, así como en ADN de cadena sencilla, liberando uracilos (generados por desaminación de la C), al hidrolizar el enlace glucosídico. No actúa sobre ARN, ni requiere de Mg^{++} para su actividad. Carece de actividad de endonucleasa apurínica y su actividad de glucosilasa no depende de una fuente energética. Esta enzima fué descubierta en E. coli aunque también se ha aislado en Bacillus subtilis y en placenta humana, Así mismo, se han aislado mutantes de E. coli (ung^{-}), carentes de dicha actividad enzimática. Presenta un peso molecular de 24,000 (26, 29.).

3-Metil Adenina ADN glucosilasa

Partiendo de la existencia de una glucosilasa específica para ADN con residuos de uracilo, se investigó la posibilidad de la presencia de otras glucosilasas en E. coli, lográndose aislar una actividad de 3-metil Adenina-ADN glucosilasa en esta misma bacteria, capaz de liberar residuos de 3-metil adenina de ADN de doble cadena alquilado con dimetil -- sulfato, metil metano sulfonato o MNMG. Al igual que la glucosilasa anterior, esta es una enzima específica y no reconoce otro tipo de lesiones; no requiere de iones divalentes, cofactores u otra fuente de energía para su accionar, ni tiene tampoco actividad de endonucleasa. Es una proteína de peso molecular bajo, $M_r = 19,000 \pm 2,000$ y es codificada por el gene tag. esta enzima ha sido también aislada de placenta humana (26, 44).

Hipoxantina-ADN glucosilasa

Peter Karrat en 1978, reportó la existencia de otra glucosilasa diferente a las 2 ya existentes. La hipoxantina-ADN glucosilasa, libera re

siduos de hipoxantina de ADN conteniendo moléculas de desoxinosina monofosfato, originados por desaminación de la adenina. No requiere iones divalentes, y actúa mucho más eficientemente en ADN de doble cadena que en el de una sola hebra. Es específica para este tipo de daño y carece también de actividad de endonucleasa. Tampoco requiere de fuente energética para realizar la hidrólisis enzimática ni escinde a la xantina. Es codificada por un gene diferente a ung y tag y tiene un peso molecular mayor que las dos anteriores glucosilasas, $M_r = 30,000$ (23).

Actualmente se conocen por lo menos, 7 diferentes N-glucosilasas en E. coli.

Endonucleasas.- Se caracterizan por tener actividad enzimática sobre el enlace fosfodiéster del ADN, no requieren de extremos libres y su acción produce mellas en la cadena polinucleotídica, dejando extremos 3' y 5' libres. Se han identificado endonucleasas en E. coli, como la U.V. endonucleasa y las AP endonucleasas, que reconocen daños específicos en el ADN.

Endonucleasas de sitios apurínicos (AP endonucleasas) con actividad asociada de exonucleasa.

Escherichia coli posee dos actividades enzimáticas de endonucleasa sobre sitios apurínicos. Una es una AP endonucleasa que además tiene actividad de exonucleasa 3' \rightarrow 5', es la responsable de la actividad principal de incisión en sitios apurínicos (90% de la actividad total). El 10% restante de actividad de endonucleasa sobre sitios apurínicos es llevada a cabo por otra endonucleasa que no tiene actividad asociada de exonucleasa 3' \rightarrow 5'.

La endonucleasa VI ha sido señalada como responsable de la actividad enzimática endonucleotídica principal sobre sitios apurínicos. Tiene

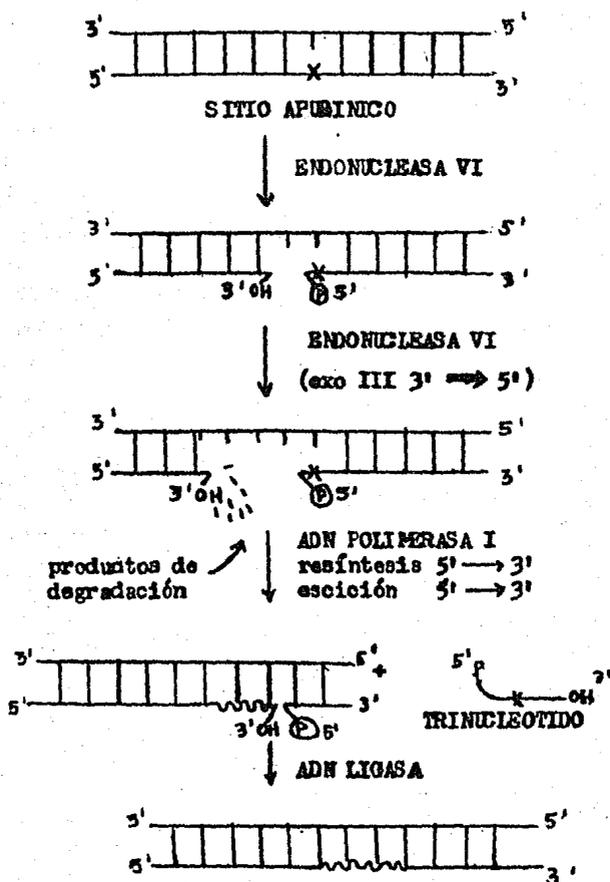
asociada una actividad 3' → 5' exonucleolítica conocida como exonucleasa III. La actividad de endo VI/exoIII durante algún tiempo fué atribuida a la endonucleasa II (endoII/exoIII), pero ésta última no es específica, pues está formada por dos enzimas, una que reconoce sitios apurínicos y otra a bases alquiladas o ariladas, estableciéndose de ésta manera que la endonucleasa VI (endo VI / exo III) era la responsable del 90% de la actividad específica sobre sitios apurínicos. Esta enzima es dependiente de Mg^{++} y tiene su pH óptimo a 8.5. Es una proteína monomérica de un peso molecular de 32,000 d., es inhibida por EDTA, actúa sobre ADN de doble cadena con sitios apurínicos y genera un corte que presenta extremos libres 3'-OH y 5'-fosfato, al extremo 5' del sitio apurínico. La actividad exonucleolítica 3' → 5' no escinde al sitio apurínico, por degradar en dirección opuesta a éste. Sin embargo, la brecha producida por degradación previene la acción de ligasa y permite así la intervención de la ADN polimerasa I, que resintetiza y escinde en dirección 5' → 3' dejando una mella con extremos libres 3'-OH/5'-fosfato, liberando a su vez un fragmento de dos a tres nucleótidos, conteniendo el sitio apurínico. A esta acción le sigue la actividad de ADN ligasa. Es codificada por el gen xthA, y mutantes xthA⁻ no poseen la actividad de endonucleasa VI (fig. 12) (17, 23 y 65).

Endonucleasas de sitios apurínicos sin actividad asociada a exonucleasa.

La endonucleasa IV se encuentra presente en células xthA⁻, donde la endonucleasa VI se encuentra ausente. La endonucleasa IV ha sido señalada como la responsable del 10% de actividad remanente, sobre sitios apurínicos en mutantes deficientes de la endonucleasa VI. Fue aislada de E. coli y se encontró que era más resistente al calor que la endonucleasa

FIGURA 12

ACCION DE LA ENDONUCLEASA VI



FUENTE: Referencia 17.

VI, además no requiere de Mg^{++} , es activa en presencia de EDTA y no tiene actividad asociada de exonucleasa. Mutantes xthA⁻, carantes de la actividad principal de AP endonucleasa (sin el 90% de actividad) solo son ligeramente más sensibles a la acción de MN6 (agente alquilante productor de sitios apurínicos), en comparación con las silvestres debido a la eficiencia de la endonucleasa IV en la reparación de sitios apurínicos (26).

U.V. endonucleasa o Correndonucleasa II.

Es específica para reconocer lesiones abultantes, que distorciónan la molécula de ADN . Es codificada por los genes uvrA y uvrB y el producto génico conjunto es llamado U.V. endonucleasa. El gene uvrC no está directamente relacionado con la incisión propiamente dicha, pero se requiere de su actividad para la escisión de la lesión, aunque generalmente se refieren a la U.V. endonucleasa como producto génico conjuntamente controlado por estos tres genes. La U.V. endonucleasa reconoce dímeros de pirimidinas, aductos grandes y entrecruzamientos de cadena. Carece de actividad de exonucleasa y su actividad endonucleolítica genera extremos libres 3'-OH/5'-fosfato al extremo 5' de la lesión. Se requiere de ATP para su actividad. Mutantes en alguno de los 3 genes uvr, presentan un porcentaje menor de sobrevivida que las cepas silvestres, al ser irradiadas con luz U.V. o al exponerlas a compuestos productores de aductos. La reparación de los entrecruzamientos de cadena (cross-links) requiere de la actividad uvr⁺. La remoción de esta lesión trae como consecuencia, en cepas uvr⁺ un aumento en el porcentaje de mutaciones. Sin embargo, uvr⁻, no son mutadas por compuestos que generen entrecruzamientos, pero su por ciento de supervivencia es muy bajo en comparación con las uvr⁺ expuestas a una dosis igual de compuesto. Debe recordarse que los entrecruzamientos de cadena si no -

son removidos, son letales (24, 26).

La U.V. endonucleasa (o enzimas con actividad equivalente) ha sido encontrada en todos los organismos estudiados a la fecha. El Xeroderma pigmentosum, es una enfermedad que se presenta en pacientes que carecen de la actividad de U.V. endonucleasa, y son por consiguiente más sensibles a la exposición a la luz U.V. (ej. exposición radiación solar) (- fig. 13) (28).

Se ha reportado la existencia de un modelo alternativo para la escisión de dímeros de timina. En este modelo no se involucra la acción de la U.V. endonucleasa, en su lugar una enzima con actividad de N-glucosilasa y de AP endonucleasa, reconoce a los dímeros e hidroliza a las bases del extremo 5' del dímero, dando origen a la producción de un sitioapurínico que permite ahora la generación de una incisión (fig. 14) (13).

Además de las endonucleasas mencionadas, existen otras con diferentes especificidades (o carencia de ellas) de sustrato; entre las que se encuentran, la endonucleasa I, la endonucleasa III, endonucleasa V, endonucleasa VII (actúa en ADN de cadena sencilla), desoxirribonucleasas I y II, etc. (24).

Mecanismo de Escisión, Resíntesis y Ligación.

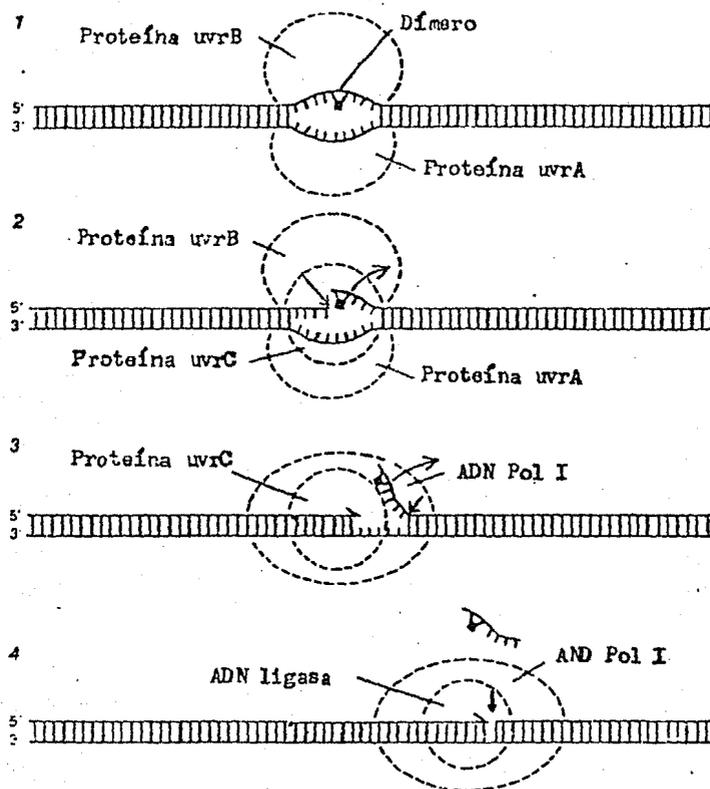
En estos procesos se involucra a un conjunto de enzimas que actúan una vez que se ha realizado la incisión en el enlace fosfodiéster. -

ADN Polimerasa I

Es la enzima señalada como la responsable principal de la resíntesis de la cadena y escisión del daño al ADN. Posee tres actividades enzimáticas: exonucleasa 3' → 5' (prueba de la lectura) que reconoce bases incorporadas erróneamente al momento de la reparación; exonucleasa 5' → 3',

FIGURA 13

MODELO CONVENCIONAL DE ESCISION DE DIMEROS DE PIR.-PIR. EN EL ADN .



REF. 20

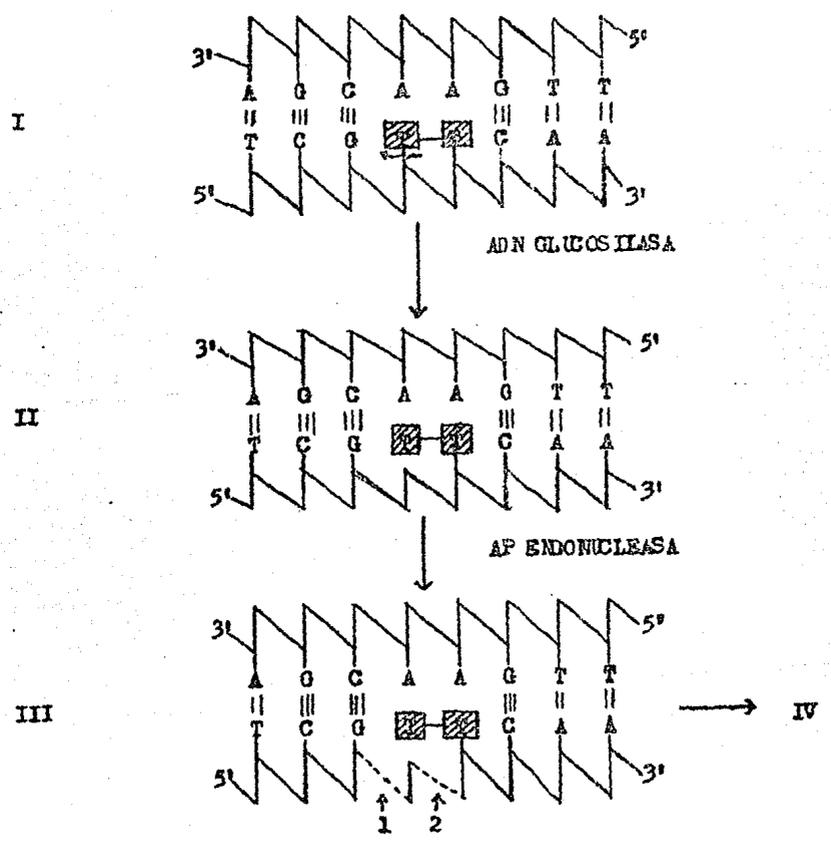
- 1.- Reconocimiento de la lesión por las proteínas *uvrA* y *uvrB*.
- 2.- Incisión de la cadena al extremo 5' de la lesión por acción conjunta de las proteínas *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*.
- 3.- Resíntesis de la región dañada y escisión del fragmento con la lesión por la ADN Pol I.
- 4.- Unión del enlace fosfodiéster por la ADN ligasa.

FIGURA 14

FUENTE: Referencia 13

VIA ALTERNA PARA LA ESCISION DE DIMEROS EN ADN IRRADIADO CON LUZ U.V.

(Fago T4 y *M. luteus*)



I.- Reconocimiento de la lesión y acción de la actividad de N-glucosilasa en la timina del extremo 5' del dímero.

II.- Acción de la actividad de AP endonucleasa, que hidroliza el enlace fosfodiéster en la posición 1 o 2 (III). Ambas actividades (I y II) son realizadas por el producto génico del gene T4v del fago T4.

IV.- Proceso de escisión, resíntesis y ligación del ADN.

responsable de la escisión de la lesión del ADN, y polimerasa 5' → 3' - (requiere extremos libres 3'-OH para actuar) que resintetiza la brecha formada, cerrándola y dejando una mella con un extremo 3'-OH.

En las figuras anteriores, se ha señalado la acción de la polimerasa I para la reparación de sitios apurínicos, y fotoproductos. También es importante en la reparación de sitios con lesiones distorcionantes de la hélice, como en el caso de los aductos grandes, entrecruzamientos, etc.

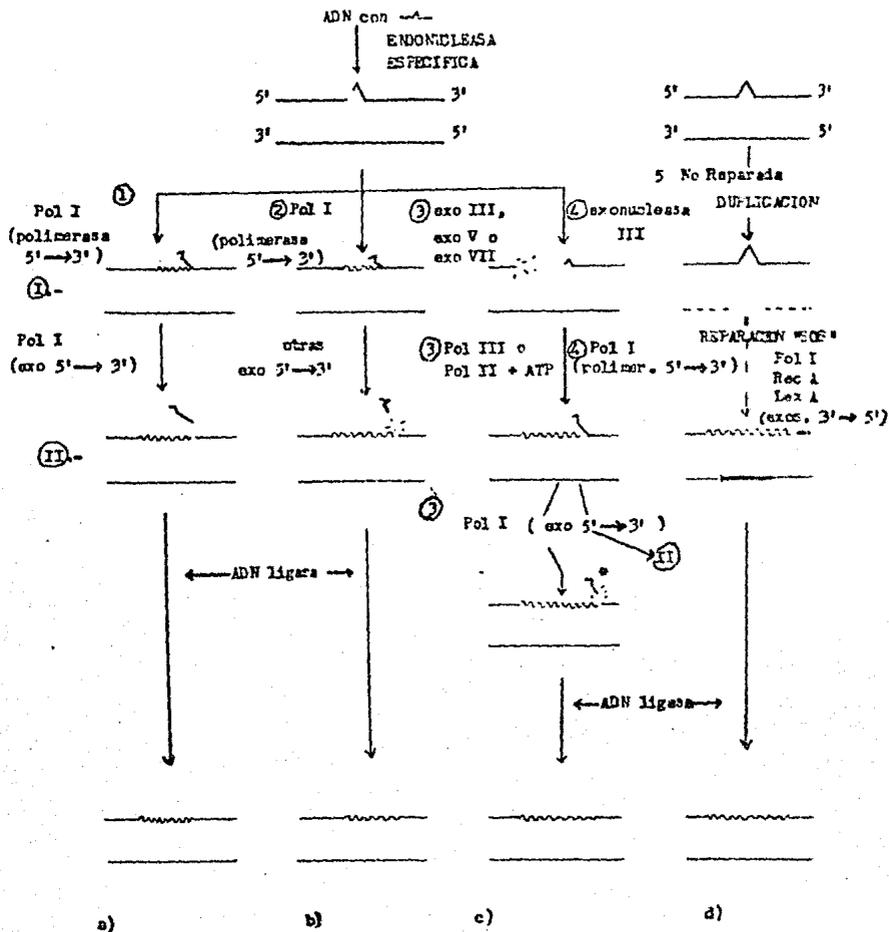
La carencia de la actividad de polimerasa I en células mutadas, con y sin actividad de exo 3' → 5' produce que dichas células mutantes - sean mucho más sensibles a la acción de agentes cuya reparación requiera - de la polimerasa I (U.V., metil metano sulfonato, MNND, mitomicina C, etc.). Además de sobrevivir menos son más fácilmente mutadas. En la generación de mutaciones, se requiere de la función de los genes lexA⁺ y recA⁺, para la actividad de un sistema de reparación inducible propenso a error llamado - "SOS".

La actividad enzimática de la polimerasa I puede ser suplida por la presencia de otras exonucleasas 3' → 5' y/o 5' → 3', y de las polimerasas II y III (ésta última tiene una actividad más débil de exo 5' → 3' que la Pol I) sin embargo, la sobrevivencia es menor y el porcentaje de degradación y resíntesis son mayores.

En la figura 15 se puede observar que la acción de Pol I (polimerasa 5' → 3' y exonucleasa 5' → 3') al actuar genera brechas de reparación cortas, y el tiempo de cerrado es también pequeño (fig. a) al compararse con otros caminos alternos.

La carencia de la actividad de exo 5' → 3' de la Pol I, pero que aún contenga su actividad de polimerasa (fig. b) genera la formación -

FIGURA 15

MODELOS PROPUESTOS DE REPARACION POR ESCISION EN *E. coli*.

a)

b)

c)

d)

— = lesión que requiera de una endonucleasa.

* = Fragmento que contiene la lesión; 20 nucleótidos/dímero o 3-4 nucleótidos/ sitio apurínico.

- 1.- Camino seguido por una lesión distorsionada de la hélice del ADN en bacterias polA⁺.
- 2.- Camino seguido por una lesión distorsionada de la hélice del ADN en bacterias deficientes en la activ. 5'— 3' exonucl. pol I.
- 3.- Camino seguido por un sitio apurínico, reparado por una endonucleasa con o sin act. de exo III. Esta también es la vía de una lesión distorsionada en bacterias polA₁⁻.
- 4.- Camino seguido por un sitio apurínico, reparado por la endonucleasa VI (endo IV/ exo III) en bacterias polA⁺.
- 5.- Lesión no reparada por los sistemas constitutivos; pasa a replicación e induce la reparación propensa a error ("SOS") en bacterias lexA⁺/recA⁺, y pueden o no ser polA⁺ y/o uvr⁺.

REF (13, 17 y 20)

de brechas mayores hacia el extremo 3', a causa de la acción no coordinada con otras exonucleasas 5' → 3' (13).

Cuando no existe la acción de polimerasa de Pol I (con o sin su actividad de exonucleasa 5' → 3'), se tiene la acción de la Pol II o Pol III. Estas enzimas precisan para su actividad, de la formación de una brecha mayor hacia el extremo 5', por lo que se presenta la acción de una exonucleasa 3' → 5' (Exo V o VII) antes de la actividad de resíntesis de dichas polimerasas. Al igual que con la Pol I, la carencia de coordinación con la actividad 5' → 3' exonucleolítica que actúe con la Pol II o III - hace que la brecha crezca también hacia el extremo 3', teniéndose así una mayor y más tardada resíntesis que las 2 anteriores (fig. c) (5, 28).

ADN Ligasa.

Una vez que el proceso de resíntesis y escisión ha concluido, - la polimerasa deja un ADN discontinuo por mallas con extremos libres 3'-OH/5'-fosfato. La ADN ligasa de E. coli además de la presencia de estos extremos libres adyacentes, requiere de ADN de doble cadena, de NAD (ATP para - la ligasa de T4), para la restauración del enlace fosfodiéster. La formación de dicho enlace, se realiza a través de la formación de un intermedio Enzima-(lis)-AMN. La reacción de ligación es reversible. La ADN ligasa puede actuar como endonucleasa dependiente de AMP, relajando así al ADN su per helicoidal. En E. coli la ADN ligasa es una sola molécula polipeptídica codificada por el gene lig y tiene un peso molecular entre 74,000 a -- 77,000 daltones. La ligasa de E. coli no puede ligar a ADN con malla en ambas cadenas, en cambio la T4 ADN ligasa si es capaz de unir este ADN.

Mutantes en la actividad de ADN ligasa son sensibles a la acción de U.V. y MS en comparación con las células silvestres. Esta enzima, al -

igual que la actividad de Pol I, se encuentra en tejidos eucariotes (fig - 16) (27).

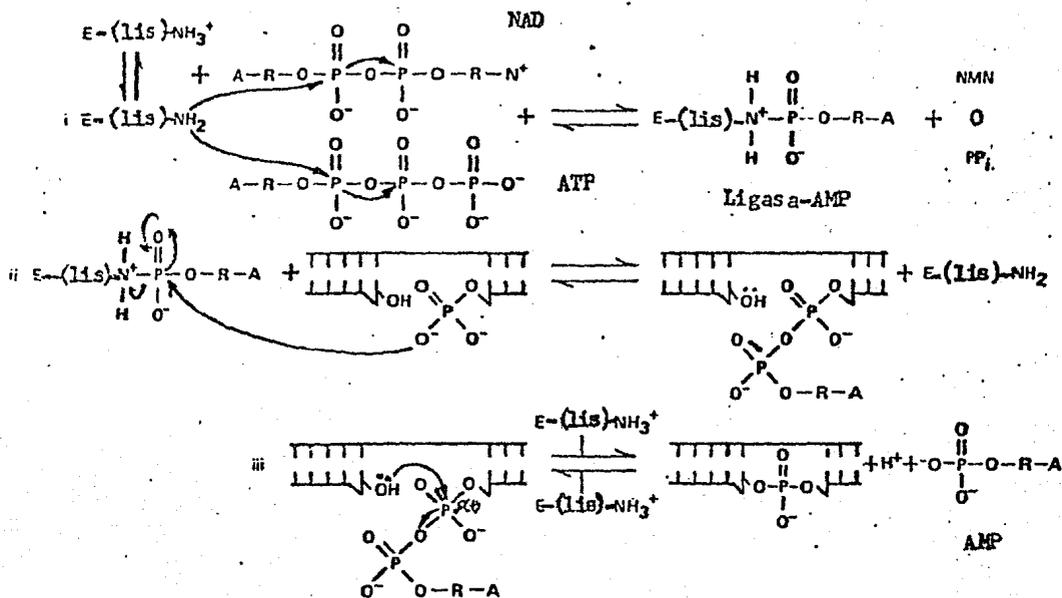
b).- Mecanismos Postreplicativos (Procesos asociados a la recombinación).

Las alteraciones producidas al material genético que no hayan sido removidas por los sistemas prerreplicativos, bloquean el proceso continuo de la replicación del ADN (lesiones no codificantes, también llamadas lesiones inactivantes) u originan errores en la lectura (lesiones codificantes).

Cuando la horquilla de replicación (replicón), alcanza a una lesión inactivante no escindida, el apareamiento correcto de base en la cadena dañada se vuelve imposible. Se postula que la actividad 3' → 5' - exonucleolítica (prueba de la lectura) verifica el correcto apareamiento entre la molécula molde y la base incorporada y puede detener el proceso de la duplicación o síntesis reparativa en la región con una lesión inactivante. La síntesis de la nueva cadena se interrumpe para ser reiniciada en algún punto de la molécula del ADN, más allá de la lesión no codificante. Como consecuencia se tendrán brechas en la cadena hija. Dichos huecos no pueden corregirse por medio de la reparación por escisión que requiere de una cadena complementaria intacta y deben ser reparados mediante otro proceso. En este tipo de daños, una cadena recién sintetizada tiene una brecha (ADN con peso molecular bajo) y la parental la lesión inactivante. Si la brecha ha de repararse correctamente, debe recobrase la información faltante. Las brechas que provocan las lesiones no codificantes en las cadenas hijas son trasladadas, por medio de recombinación a la cadena progenitora intacta; teniéndose ahora una cadena con la lesión, apareada con una cadena no dañada y otra doble hélice con una cadena no dañada apareada

FIGURA 16

MECANISMO DE ACCION DE LA ADN LIGASA



FUENTE: Referencia 27

con una cadena con brecha. La primera doble cadena puede ser reparada por escisión y la segunda por resíntesis de la brecha, generándose de esta forma moléculas con peso molecular normal. Las lesiones no codificantes se pueden presentar en cadenas opuestas muy cerca una de la otra. Tales lesiones al replicarse originan brechas que se traslapan. Su reparación no puede ser realizada por los sistemas constitutivos celulares, por tanto deben inducirse sistemas de reparación como el "SCS" para restaurarlas. Alteraciones en los sistemas enzimáticos replicativos y/o en presencia de análogos de base, originan mala incorporación de bases (MMG) que dará por resultado errores en la región de replicación (24).

Mecanismo de Recombinación.

La proteína RecA (producto génico de recA) tiene dos muy diferentes funciones: es una enzima que promueve la recombinación entre cadenas de ADN, y es una proteasa que regula las funciones "SCS". En la recombinación tal como ocurre en la reparación postreplicativa, su primera función es promover el apareamiento homólogo entre dos moléculas de ADN, es decir, juntar regiones con una secuencia de bases complementarias y alinear las de manera precisa para un intercambio de cadenas. RecA puede promover el apareamiento homólogo, entre una cadena sencilla de ADN (o su equivalente; cadena doble con brecha) y un dúplex. Este apareamiento también es llevado a cabo con ADN circular tanto como lineal, pero no así con ADN dúplex intacto.

No está claro aún el mecanismo exacto de apareamiento, pero es probable que el dúplex con una separación de cadena sencilla, y el ADN intacto, primero entren en contacto no específico mediante Rec A, y luego -

se muevan en relación con el otro, hasta que se alineen las bases complementarias. El presente proceso requiere de energía, que aparentemente es suplida por hidrólisis de ATP efectuada por RecA, que adopta una configuración activa al unirse a las brechas en los dúplex.

Son necesarias grandes cantidades de proteína RecA (una molécula por 5 pares de bases) para el apareamiento homólogo. Una vez alineadas las moléculas, RecA promueve el intercambio recíproco de cadenas, que se lleva a cabo mediante el cruzamiento de una cadena sencilla.

En presencia de ATP, RecA realiza el intercambio de cadenas al moverse sobre las moléculas de ADN (migración de rama). En forma complementaria, se requiere de la acción de alguna nucleasa para cortar las cadenas intercambiadas, ADN polimerasa para "rellenar" las brechas, y una ADN ligasa para restaurar la continuidad del dúplex. En la reparación por recombinación, se hayan también comprometidos los productos génicos de recB, recC, recF y otros, pero su papel no ha sido elucidado aún (fig. 17) (20).

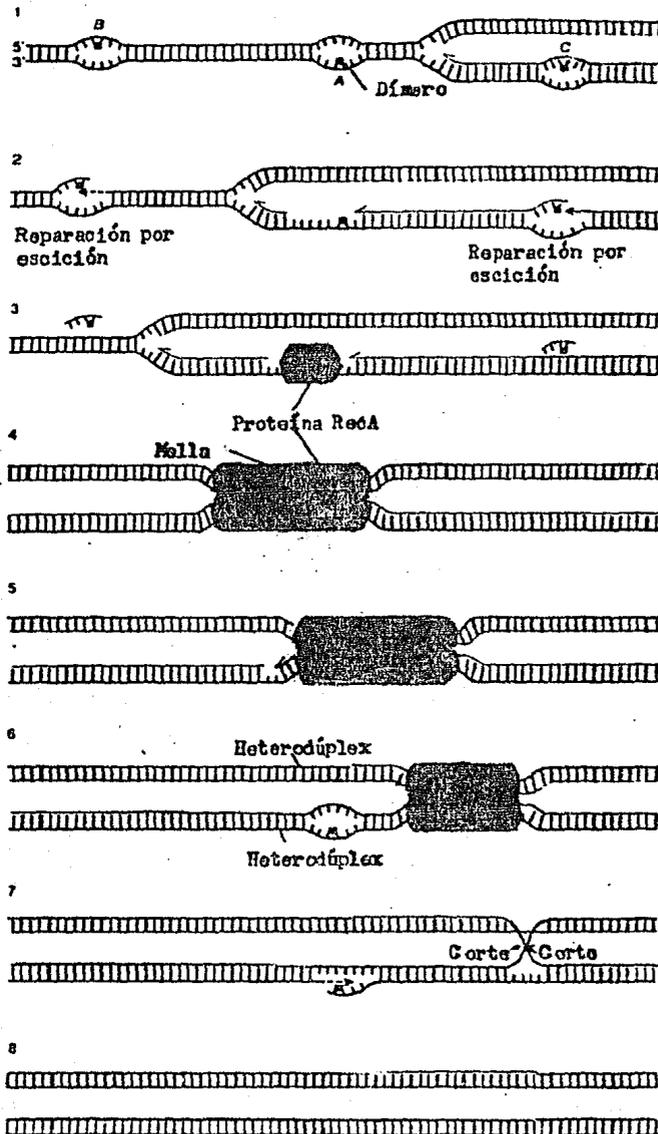
2.- Sistemas de Reparación Inducibles Propensos a Error.

Como ya mencionamos RecA tiene funciones de proteasa, como parte de un sistema regulatorio, que ha sido señalado como responsable de la generación de errores al momento de reparar lesiones que no pudieron ser removidas por los sistemas constitutivos de reparación.

Radman en 1974 llamó a este sistema de reparación, "SOS" partiendo de la idea de que era inducido como respuesta de daño al ADN, para rescatar a la célula de una emergencia; de hecho la reparación "SOS" es la última oportunidad de la célula para sobrevivir, muy probablemente con alguna (s) mutación (es), aunque en última instancia el resultado mutacional pasa a segundo término (teniéndose una gran variabilidad genética en-

FIGURA 17

MECANISMO DE RECOMBINACION



FUENTE: Referencia 20

tre la población).

Evelyn M. Witkin en 1976, definió a la reparación "SOS" como una actividad de reparación del ADN propensa a error, dependiente de recA⁺ y lexA⁺, inducida por agentes con la habilidad en común de dañar al ADN, interrumpir su síntesis o hacerla más lenta (66).

La reparación "SOS" forma parte de un conjunto de funciones inducibles, reguladas por recA⁺/lexA⁺ y que en forma colectiva son conocidos como funciones "SOS".

Las bacterias con un genotipo recA⁻ y/o lexA⁻ carecen de muchas funciones presentes en la cepa silvestre, en adición a la ausencia de recombinación, por lo que se dice que lexA⁺ y recA⁺ son genes altamente pleiotrópicos (tabla 5).

La inducción de las funciones "SOS" es iniciada por la activación de RecA al unirse a ADN dúplex con brecha, quien ahora funciona como proteasa y rompe a la proteína LexA, que es el represor de todos los genes conocidos como las funciones "SOS" incluyéndose así mismo. De esta forma las células pasan de un estado no inducido (con baja transcripción de los genes reprimidos) a uno inducido, donde la síntesis de proteínas se eleva grandemente. Este paso experimentalmente puede ser bloqueado en presencia de cloranfenicol, al impedir la síntesis proteica. Cuando se completa la reparación y todo el ADN está en forma de doble cadena, RecA no se activa más como proteasa de LexA. La proteína LexA recién sintetizada ya no es inactivada y puede reprimir nuevamente a los genes de las funciones "SOS"; la célula retorna así al estado no inducido.

Entre los genes reprimidos por la proteína LexA se han identificado a lexA, recA, uvrA, uvrB, umuC, al gene que codifica para una proteína inhibidora de la exonucleasa V, así como también la liberación del profago

TABLA 5

EFECTOS FENOTÍPICOS DE *recA⁻/lexA⁻* en *Escherichia coli*.

FENOTIPO	<i>recA⁺/lexA⁺</i>	<i>recA⁻/lexA⁺</i>	<i>recA⁺/lexA⁻</i>	FUNCIONES DEPENDIENTES DE <i>recA⁺/lexA⁺</i>
Sensibilidad al U.V. y a los rayos X.	+	+++	++	Repara. "SCS", inh. de la exonucleasa V, rep. cadena sencilla.
Inducibilidad del profago λ por irradiación con U.V.	+	-	+/-	Fase fágica lítica
Degradación del ADN después de irradiar con U.V.	+	+++	+++	Inhibidor de la exo V
Reactivación mutagénica Weigle del fago lambda.	+	-	-	Reparación "SCS".
Mutación Bacteriana (U.V.)	+	-	-	Reparación "SCS".
División celular retardada después de irradiación con U.V. (crecimiento filamentososo).	+	-	-	Inhibidor del septo.
Síntesis aumentada de RecA, seguida al tratamiento con U.V., ácido nalidíxico, etc.	+	-	-	Síntesis de RecA.
Reparación por excisión de "parchado muy grande".	+	-	-	Reparación "SCS".
Inducibilidad de las funciones "SCS" en mutantes <u>tif-1</u> .	+	-	-	Funciones "SCS".
Reparación posreplicativa sensible a cloramfenicol.	+	-	-	Reparación "SCS".
Habilidad de recombinación.	+	-	+	Ninguna.
Permeabilidad normal.	+	-	?	?

FUENTE: Referencia 66

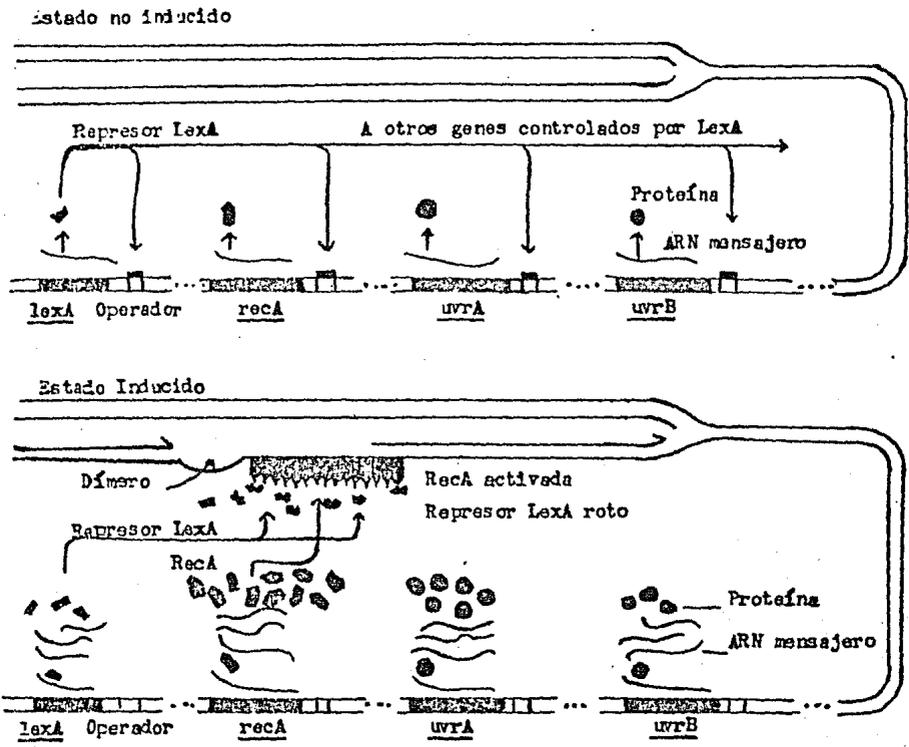
lambda (λ) (fig. 18).

Además se han identificado mutantes de recA⁺ que "encienden" las funciones "SOS" al elevar la temperatura a 42°C, sin requerir daño - previo al ADN, dichas mutantes se conocen como tif-1. Así mismo existen - mutantes de recA (zab⁻ y lexB⁻) que son incapaces de inducir las funcio- nes "SOS", pero realizan en forma normal los proceso de recombinación. Es así como se ha propuesto que RecA tiene dos sitios o regiones con función distinta; una involucrada en la recombinación y la otra en funciones de - proteasa de LexA (fig. 18).

El gen lexA puede ser también mutado y obtenerse en esta for- ma, bacterias que no induzcan bajo ninguna circunstancia funciones "SOS", como en el caso de las mutantes lexA⁻ en las que es producido un superre- presor resistente a la acción de RecA, ocasionándose un estado no induci- do permanente. Por otra parte, mutantes spr⁻ sintetizan una proteína LexA no funcional y en este caso, las funciones "SOS" se expresan constitutiva mente en la célula. Otras mutantes como rnm⁻, ts1⁻, lex-113, expresan en - forma constitutiva o nunca expresan una o varias funciones "SOS". Por ejem- plo bacterias rnm⁻ no presentan mutabilidad después de ser irradiadas por U.V. ; cepas ts1⁻ expresan en forma constitutiva a cualquier temperatura - al inhibidor del septo, observándose por tanto un crecimiento filamentosos y, a la proteína RecA al elevar la temperatura a 42°C, teniéndose a las - funciones restantes no inducidas en forma normal.

El gen umuC es importante en la inducción de mutaciones como - respuesta a un daño al ADN ; umuC codifica dos péptidos, uno mayor y otro menor que según se ha sugerido de alguna forma interfieren con la repara- ción libre de error, ocasionándose de esta forma la aparición de mutacio-

FIGURA 18



MODELO PARA LA REGULACION DE LAS FUNCIONES

• S O S •

FUENTE: Referencia 20

nas al momento de reparar el daño. Aún cuando éste mecanismo no esté claro se ha propuesto, que los productos géricos de umf pueden hacer "infieles" a las polimerasas existentes, alterando su actividad de la prueba de lectura 3' → 5' exonucleolítica, aunque no se ha podido descartar la posibilidad de la síntesis de polimerasas "infieles", ausentes en estados no inducidos (20, 24 y 66).

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CEPAS pol A⁺ y pol A₁⁻ DE Escherichia coli.

La cepa W3110 auxótrofa a timina (thy⁻) depende de ésta y de tiamina para su crecimiento y, es normal en su actividad de Pol I.

La cepa p3478 thy⁻ también depende de tiamina y timina para crecer, pero tiene actividad de polimerasa reducida (0.5-1.0% de la actividad normal de polimerasa I). Fué aislada de la cepa W3110 thy⁻ con el fin de probar si la Enzima de Kornberg, era la responsable de la duplicación del material genético o si sólo participaba en el mecanismo de reparación de daño al ADN (10).

Aislamiento de la cepa mutante p3478.

Para tal fin De Lucia y Cairns, utilizaron a la cepa W3110 - thy⁻ pol A⁺ a la que sometieron a la acción del potente mutágeno MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) en medio líquido durante 20 min. Pasado éste tiempo una alícuota de este cultivo fué sembrada en cajas de agar para aislar colonias mutantes. Dichas colonias se dejaron crecer y cada una fué probada (miles) hasta encontrar a aquella que presentó actividad de ADN polimerasa reducida (pol A₁⁻).

Para comprobar que la clona p3478 tenía actividad de polimerasa deficiente, éstas células fueron sonicadas y los extractos enfrentados con ADN de timo de carnero también sonicado en presencia de dATP, dGTP, dCTP y ³HdTPP. Es así que por medio de la incorporación de la marca radioactiva (centelleos/minuto) se demostró que poseía una actividad de 0.5-1.0% de la actividad normal de polimerasa.

Algunas propiedades de la cepa silvestre (W3110) y la mutante (p3478).

La cepa mutante al igual que la cepa original se multiplica a la misma velocidad, pueden ambas crecer en agar mínimo y en completo en un intervalo de temperatura de 25°C hasta 42°C; la diferencia de la cepa original y la mutante en cuanto a crecimiento, es que ésta última crece en un tamaño de colonia ligeramente más pequeño que la cepa original, además de que en ocasiones se ha reportado que la cepa mutada parece tener dificultad en salir de la fase estacionaria (aunque dicho fenómeno no se ha estudiado lo suficiente). Ambas cepas resultaron igualmente sensibles a la acción de los bacteriófagos T₄, T₅, T₇, lambda y al ϕ X174 ADN.

La cepa silvestre pol A⁺ es resistente a la presencia de metil metano sulfonato (100% de sobrevida), a concentraciones que en el caso de la cepa mutada pol A₁⁻ solo se obtiene una colonia resistente por cada 10⁷ células, en presencia del mismo mutágeno.

Gross y Gross en 1969, reportaron que la cepa aislada por De Lucia y Cairns (p3478), además de tener una actividad reducida de polimerasa, presentaba una gran sensibilidad a compuestos que dañan al ADN como es el caso de la luz U.V. y del metil metanosulfonato ya mencionado, señalando también que este tipo de características dependían de una sola mutación (paso mutacional), pues cuando se revierte dicha mutación, las cepas adquieren poca sensibilidad a la U.V, al MS6 y la actividad de polimerasa es similar a la de la cepa original.

En ese mismo reporte, esta pareja de investigadores identi-

ficó que la mutación que afectaba la actividad de polimerasa, se encuentra localizada entre el gene *mtE* y *rha*, aproximadamente al minuto 75 del cromosoma de Escherichia coli. La mutación es recesiva con respecto al gene silvestre pues en una bacteria que contenga a ambos genes (*pol A*⁺ y *pol A*₁⁻) se tendrá una actividad normal de ADN polimerasa. La mutación de la cepa p2478 es de tipo ambar (UAG) ya que responde a los supresores *Su II*⁺ y *Su III*⁺ (suprimen dicha mutación). Tanto la cepa silvestre como la mutada llevan a cabo la recombinación genética en forma normal (10, 18).

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS CEPAS *rec*⁺ Y *rec*⁻ DE Bacillus subtilis.

Aislamiento de la cepa H-17.

Esta cepa fué aislada de bacterias Marbur 15 *argA-15 trp-3*, a través del método de aislamiento de una colonia, de quienes se obtuvo como una cepa receptora estable con propiedades transformantes, que se denominó H-17 (NIG 17) *argA-15 trp-3 rec*⁺.

Aislamiento de la cepa M-45.

Cuando se sometió a la cepa H-17 *rec*⁺ a la acción de MNNG - (500 ug/ml a pH de 6.0) se obtuvieron muchas colonias mutantes que fueron sensibles a varios tipos de radiaciones; entre éstas se aisló a una cepa con gran sensibilidad a rayos gamma y luz U.V. Dicha cepa se denominó M-45 (NIG 45) *argA-15 trp-3 rec-45*, que era deficiente en el mecanismo de recombinación del ADN, al presentar baja capacidad de transformación (en presencia de ADN transformante), transfección (con el

fago PES I) y, alta sensibilidad a la luz U.V., rayos gamma, mitomicina C y metil metanosulfonato. Por otra parte presenta un mecanismo de -
escisión de lesiones del ADN normal (Hcr⁺), al igual que la cepa H-17
por lo que se puede decir que ambas cepas son pol A⁺ (54).

MATERIAL Y METODOS

La preparación de todos los medios y soluciones empleados en las diferentes técnicas a realizar, estarán descritas en el apéndice.

1.- Material Biológico.

a) Origen de las cepas de E. coli.

Las cepas de E. coli pol A_1^- y pol A^+ fueron generosamente donadas por el Doctor Herbert S. Rosenkranz; del Department of Microbiology, New York Medical College, Valhalla, New York 10595.

b) Preservación de las cepas.

Las cepas estaban contenidas originalmente en pequeños viales con medio semisólido (al 0.6% de agar), sembradas por picadura. De los viales se toma una asada de bacterias, que es disuelta en medio líquido HA+T y se realiza el aislamiento por estrias en cajas de agar HA+T (agar al 1.5%), se incuban a 37°C en la oscuridad. Una vez que las colonias estén bien crecidas, se ponen una por una en 10 ml de medio líquido HA+T y se incuban por agitación a 37°C en la oscuridad, - hasta que los 2 cultivos alcancen la fase estacionaria, pol A^+ a las 18 hr y pol A_1^- a las 19 hr. A ambos cultivos se les verifica la actividad de polimerasa I en forma indirecta, al enfrentarlas a compuestos genotóxicos (metil metanosulfonato, etil etanosulfonato, cristal violeta, etc.) y no genotóxicos (cloramfenicol). Así mismo, de estos mismos cultivos bacterianos se obtienen reservas de cultivo primario y subcul-

tivos (reservas secundarias).

Reservas de Cultivos Primarios.

A porciones de 1 ml de cultivo de pol A_1^- o pol A^+ de fase - estacionaria, se les adiciona glicerol a una concentración final del 10% y son almacenadas a -20°C .

Reservas de Cultivos Secundarios.

Se hace crecer un cultivo primario tomando una asada de la - bacteria e inoculando en 10 ml de medio líquido HA + T, se incuba a 37°C y se deja que alcance la fase estacionaria, una vez crecidas las cepas se ponen por medio de estriado sobre tubos que contengan agar inclinado o en cajas con agar HA + T (método de estrias en paralelo), se incuban toda la noche a 37°C y se transfieren al refrigerador (4°C) hasta su uso.

Es muy importante que a las reservas secundarias antes de u sarse, se verifique la respuesta al cloranfenicol (control negativo) y MSE (control positivo) por medio del ensayo estandar. Si alguna ce pa no responde a estos compuestos, se debe desechar y realizar otro - cultivo secundario a partir de los cultivos primarios.

Para evitar que la cepa pol A_1^- revierta a su fenotipo pol A^+ , debe tenerse cuidado de taparla o incubarla en la obscuridad, así como no hacerla crecer en medio completo, por ser un medio que favorecía - el desarrollo de la cepa pol A^+ surgidas espontáneamente entre la pobla ción de pol A_1^- .

Los tubos o cajas que contengan cultivos secundarios, deben ser desechados al mes o mes y medio, debiéndose obtener nuevas reservas para asegurar de esta forma que cada cepa mantenga sus características originales (53).

c) Origen de las Cepas de Bacillus subtilis.

Las cepas de B. subtilis rec⁺ y rec⁻ fueron generosamente donadas por el Doctor Tsuneo Kada; Institute of Genetics, Misima, Sizuoka-Ken 411, Japan.

Reservas de Bacterias.

Se toma una asada de las cepas y se siembra por separado en 10 ml de caldo nutritivo (Medio completo Oxoid B-2) y se dejan crecer toda la noche, para posteriormente tomar 3 ml de cultivo y adicionarles 1 ml de glicerol al 50%. Se mezclan perfectamente y se congelan rápidamente en hielo seco y se almacenan a -80°C.

Cuando las cepas son utilizadas para prueba de genoletalidad, se descongelan y se siembran en 10 ml de caldo nutritivo incubándose durante 18 hrs. a 37°C. Deben de someterse en forma rutinaria a los controles (+) 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) y mitomicina C (mit.C) para asegurarse de que su respuesta sea la correcta.

A partir de estos cultivos bacterianos se obtuvieron las formas esporuladas de las cepas de B. subtilis.

Obtención de Esporas

A cajas con agar Shaffer modificado se le agregaron 0.5 ml de cultivo de toda la noche de la cepa M-45 o H-17 (crecidas en caldo nutritivo). Se esparcen bien con un triángulo de vidrio en la superficie de la caja, se dejan secar y se incuban a 37 °C durante 9 días. Pasado éste tiempo las esporas son raspadas con una espátula estéril y colocadas en 20 ml de medio mínimo de Davis Mingioli (M.M.D.M.), se resuspenden y se transfieren a tubos de centrifuga en porciones de 5 ml, añadiéndoles entonces lisozima a una concentración final de 2 mg/ml y se incuban a 37°C / 30 min. Pasado este tiempo se les agrega dodecil sulfato de sodio (SDS; concentración final de 1%), se agita y se deja incubar a 37°C durante otros 30 min. A continuación, se centrifugan los tubos a 3,200 rpm durante 6 min; se retira el sobrenadante y se lava 6 o más veces con agua destilada estéril hasta hacer desaparecer la espuma del detergente. Así, la pastilla resultante se resuspende en 2.5 ml de agua destilada/ tubo, se juntan todas las porciones en un sólo y se ajusta el número de esporas a 3×10^7 esporas/ ml de agua destilada estéril, con ayuda de una cámara de Neubauer.

Reserva de Esporas.

Las esporas se mantienen en suspensión con agua destilada estéril a temperatura ambiente, o a 4°C. Se ha visto que ésta última permite la viabilidad de las esporas durante 1 o 2 años y después de éste tiempo, se deben desecar y obtener nuevas reservas de esporas, para no correr el riesgo de que las cepas esporuladas pierdan sus mar-

cadores genéticos (22).

A partir de las esporas también se puede obtener bacterias - al sembrarlas en caldo nutritivo B-2 y, dejándolas crecer toda la noche.

e) Homogenado Hepático.

Método de Inducción de Enzimas Microsomales de Hígado de Rata .

Se utilizaron ratas macho de 200 a 250 gr de peso, de la cepa Wistar-80 a las que se les administró por vía intraperitoneal, 500 mg/kg de peso, de aroclor 1254 diluído en aceite de maíz a una concentración de 200 mg/ ml. Durante un período de 5 días después de la inoculación, se mantuvo a los animales inoculados con alimento especial para ratas y se les permitió tomar agua ad libitum. Veinticuatro hrs antes de sacrificarlas (cuarto día), se les retira el alimento pero no el agua, esto es con el fin de que el animal pierda grasa del hígado y el homogenado no quede grasoso (8).

f) Preparación de la Fracción S-9.

Todo el material ocupado para la disección, así como las soluciones que se utilizan deben de esterilizarse previamente.

Al quinto día de tratamiento las ratas macho son sacrificadas por descerebración. Se coloca al animal en zona estéril que se logra por ejemplo, con dos mecheros Bunsen, uno a cada lado del animal - que tendrá la parte abdominal hacia arriba. Esta región se limpia perfectamente con alcohol; con la ayuda de pinzas y tijeras se quita toda

la piel de esta región, con otras tijeras y pinzas se quita el músculo del abdomen y se dejan al descubierto las vísceras. Con un juego de tijeras y pinzas más pequeños se retira el hígado. De aquí en adelante todo el proceso se realiza a 4°C con el fin de evitar la inactivación de las enzimas hepáticas; se coloca el hígado en un vaso de precipitados tarado que contenga 15 ml de una solución fría de cloruro de potasio (KCl) 0.15 M y se determina el peso del hígado, aproximadamente 15 gr, se lava con la misma solución cuantas veces sea necesario para quitar toda la sangre. En otro vaso de precipitados se agregan 3 ml de KCl 0.15 M por cada gramo de hígado. Se corta en pedazos pequeños con ayuda de unas tijeras largas y se homogeniza por medio de un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogenizado así obtenido se pasa a un vaso de precipitados de 250 ml, de aquí se transfiere a tubos de centrifuga se equilibran y se centrifugan a 9,000 xg a 4°C durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante (fracción denominada S-9) se envasa en frascos o viales en diversas cantidades según se requiera, se congelan en hielo seco (aproximadamente 5 min) y se almacenan en un ultracongelador a -80°C.

La cantidad de S-9 que se agrega en cada experimento es sumamente importante para obtener una respuesta, por lo que debe tenerse precaución de averiguar cual es la cantidad óptima antes de realizar cualquier prueba de genotoxicidad. Para lograr éste objetivo, debe de llevarse a cabo una curva dosis-respuesta con una concentración constante de un compuesto con acción mutagénica conocida y, que requiera de activación metabólica con diferentes cantidades de S-9. Los mutágenos u-

tilizados para este ensayo fueron benzo (a) pireno y 2-aminoantraceno a una concentración de 10 mcg y 0.5 mcg por caja respectivamente.

g) Mezclas de Activación Metabólica.

1.- Preparación de la Mezcla S-9 / ml (Amas y col.)

NADP	0.0030 gr.
G-6-P	0.0013 gr.
Sol. de MgCl 0.4/KCl 1.65 M	0.02 ml.
Amortiguador de fosfatos de sodio	
0.2 M pH= 7.4	0.9 ml.
Fracción S-9	0.1 ml o según se determine *

*.- La cantidad óptima de la fracción S-9 / ml de Mezcla de activación, fué determinada por ensayo de diversas cantidades de fracción S-9 (20 a 400 ml/ ml de Mezcla de activación) según el método de Amas y col. con 2 cepas de Salmonella typhimurium TA 98 y TA 100 con 2 compuestos - pregenotóxicos control; un hidrocarburo policíclico aromático (benzo - (a) pireno) y una amina aromática (2-aminoantraceno) (1).

2.- Preparación de la Mezcla S-9/ml de E. coli (Hyman y col. 19)

NADP	0.0023 gr.
G-6-P	0.0017 gr.
MgCl 0.1 M	0.06 ml.
KCl 0.1 M	0.25 ml.
Amortiguador de fosfatos de sodio	
1.0 M pH= 7.4	0.39 ml.
Fracción S-9	0.30ml.

3.- Solución de cofactores para E. subtilis (Tsuno Kada y col. 21)

Solución Amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM
 MgCl 8 μ M
 KCl 33 μ M
 pH= 7.2

4.- Preparación de la Mezcla S-9/ ml , para E. coli (Mc Garrol y Piper)

NADP 0.0015 gr.
 G-6-P 0.00065 gr.
 Sol. MgCl₂ 0.4 M/ KCl 1.65 M 0.01 ml
 Amortiguador de fosfatos de sodio
 0.052 M pH= 7.4 0.965 ml
 Fracción S-9 0.035 ml

(37)

2.- Material Químico.

a) Sustancias de Prueba.

Los compuestos químicos antiparasitarios fueron obtenidos de diferentes industrias farmacéuticas.

Compuestos Antiambianos.

La dehidroemstina, el difosfato de cloroquina de Laboratorios Wintrop; diyodohidroxiquinolina y yodoclorohidroxiquinolina de laboratorios Carnot.

Compuestos Antihelmínticos.

El hexilresorcinol, hidroxinaftoato de bifenilo y mebendazol de laboratorios Columbia; niclosamida de laboratorios Bayer; pamoato de pirantel de ICN Farmacéutica; pamoato de pirvinio de laboratorios - Columbia.

Compuestos Control.

Como controles negativos se usó al cloranfenicol levógiro - de laboratorios Megafarma S.A. y ampicilina de laboratorios Carnot. Los controles positivos fueron: Ciclofosfamida de Schering Mexicana S.A.; furazolidona de lab. Columbia; diclorhidrato de quinacrina, 4-nitroqui nolina-1-óxido, benzo (a) pireno, 2-aminoantraceno, etil metanosulfona to, metil metanosulfonato, mitomicina C, 2-amino fluoreno y cristal - violeta de Sigma Chemicals; N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina de Aldrich.

El solvente utilizado fué el DMSO (dimetil sulfóxido), a -- excepción del difosfato de cloroquina, dehidroematina y clorhidrato de quinacrina que fueron disueltos en agua destilada estéril. Se sabe que un compuesto que ha sido preparado en un solvente y se congela, pierde su actividad química. Para evitar tal efecto todas la soluciones se pre pararon el día de la elaboración de cada experimento.

b) Reactivos.

Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), fosfato monobásico

de potasio (KH_2PO_4), fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de amonio ($\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro manganoso tetrahidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), dextrosa anhidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), cloruro de magnesio (MgCl_2), dicromato de sodio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cloroformo (CH_2Cl) fueron obtenidos de Baker Analyzed Reactivo.

La timina, clorhidrato de tiamina, lizosima, D-glucosa-6-fosfato, beta-niacin-adenin-dinucleótido fosfato, dimetil sulfóxido, se obtuvieron de Sigma Chemicals, hidrolizado ácido de caseína, púrpura de bromocresol (indicador de pH 5.2-6.8), dimetil sulfóxido de Mark; dodecil sulfato de sodio de Bio.Rad Laboratories; ácido sulfúrico industrial de reactivos Analíticos Reasol; Aroclor 1254 de Analabs INC.

c) Equipo.

Plancha de calentamiento para 60 tubos Multiblok Hentex de temperatura regulable y un mezclador para tubos Super-mixer de Lab-Line Instruments INC.; plancha de agitación magnética de Laboratory Stirrer; potenciómetro Zeromatic II y centrifuga clínica de Beckman; baño de agua con agitación y temperatura controlada y un microscopio óptico de American Optical; autoclave Cyclomaticontrol de Marsh Instrument Company; un cuenta colorías New Brunswick Scientific; refrigerador y congelador de 4°C y 20°C respectivamente de IEM de México; ultracongelador

de 0 a -100°C de Kelvinator Comercial Products IIC.; balanza analítica de Metler; centrifuga Survall RC-5 Superspeed refrigerated centrifuge; incubadora ajustable y horno para secado de material.

ENSAYOS DE GENERALIDAD.

Escherichia coli.

1.- ENSAYO DE DIFUSION EN AGAR SIN S-9 (ENSAYO ESTANDAR).

A partir de las reservas secundarias, se preparó un cultivo de toda la noche (aproximadamente 2×10^9 cel./ml) sembrando una asa da de bacterias en 10 ml de medio HA+T líquido e incubándolo a 37°C -- con agitación durante 18 hrs para la W3110 pol A⁺ y 19 hrs para la ce pa p3478 pol A₁⁻. Ambas cepas se incuban en la oscuridad.

Del cultivo de toda la noche se toma 0.1 ml en un tubo con tapón de rosca estéril y se adicionan 2 ml de agar semisólido HA+T man tenido a una temperatura entre 42-47°C. Se mezclan y se vierten en una caja de medio sólido HA+T, esparciendo perfectamente con un movimiento rotatorio, se coloca en una superficie plana y se deja solidificar (a proximadamente 5 minutos). Cuando la superficie del agar ha solidifi- cado, se coloca en el centro de la caja un disco de papel filtro de a- proximadamente 6 mm de diámetro (tipo antibiótico) estéril, se le adi- ciona a éste 10 o 20 mcl del compuesto. Después de la incubación en la oscuridad a 37°C durante 18-24 hrs, se miden los diámetros de inhi bición de crecimiento.

Se puede también utilizar 0.1 ml del cultivo diluido 1:10000 en lugar de las bacterias no diluidas, ésta modificación dá más sensibi lidad al ensayo y evita la presencia de halos dobles de crecimiento, - que se llegan a obtener con el uso del cultivo concentrado.

El disco de papel filtro puede ser sustituido si se practica la horadación de un pozo en el centro de la caja de aproximadamente - 12 mm de diámetro (una vez seco el agar semisólido con las bacterias) A continuación se sella con 0.1 ml de agar semisólido, de tal manera - que el pozo quede con una capacidad final de 100 μ l. Esta segunda modificación al método permite la aplicación de una mayor cantidad de compuesto de prueba (100 μ l/caja).

Interpretación de Resultados.

Un diámetro de inhibición de crecimiento menor para la polA⁺ en relación con el de la pol A₁⁻, se considera como respuesta genotípica positiva (+); cuando los halos de inhibición son iguales, el compuesto no es genotípico (-). El presente criterio de interpretación no es establece un número mínimo de mm de diferencia entre pol A⁺ - pol A₁⁻, - para considerar a un compuesto negativo o positivo (67).

2.- ENSAYO DE SUSPENSIÓN LÍQUIDA MODIFICADO SIN S-9.

En este ensayo también se utiliza un cultivo de toda la noche (con los tiempos de incubación arriba mencionados). El número - de bacterias se ajusta en lo posible a una concentración final de 2,000 a 3,000 unidades formadoras de colonias/ ml de medio líquido HA+T. En un tubo de tapón de rosca se colocan 0.1 ml de esta dilución (200 a - 300 u.f.c./tubo) y se les adiciona 20 μ l del compuesto de prueba o solvente. Se mezclan perfectamente con ayuda de un vórtex y se incuban durante 2 hrs a 37° C con agitación baja. Al término de la incubación, -

se agregan a cada tubo 2 ml de agar semisólido HA+T conservado a temperatura de 42-47°C. Se mezclan rápidamente y se vierten en cajas de agar sólido HA+T; se dejan solidificar y se incuban a 37°C durante 24 a 36 hrs. Cumplido el tiempo de la incubación, se cuenta el número de colonias sobrevivientes y se calcula el % e índice de supervivencia para cada compuesto.

Interpretación de Resultados.

El % de supervivencia se calcula al dividir el número de colonias sobrevivientes con el compuesto de prueba, entre el número de colonias sobrevivientes con el solvente correspondiente.

El índice de supervivencia (I.S.) se obtiene al dividir el % de supervivencia de la pol A_1^- entre el de la pol A^+ . I.S. \geq 0.95 se interpreta como compuesto no genoletal; I.S. entre 0.85-0.95, se considera como compuesto de actividad genoletal dudosa; I.S. $<$ 0.85 se toma como un compuesto genoletal (58).

3.- ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON S-9.

Para este ensayo se utilizaron las mismas condiciones mencionadas para el método sin S-9. Se deben tener bacterias concentradas o diluidas 1:10,000 (0.1 ml) junto con los 2 ml de agar de superficie y se agregan 0.5 ml de Mezcla S-9, preparada según Ames y colaboradores (100 μ l de homogenado/ ml de mezcla de activación). Una vez seca la superficie de la caja se coloca un disco de papel filtro, al que se le añade 20 μ l del compuesto de prueba. Se incuba a 37°C en la oscuridad

durante 24 hrs. La interpretación de resultados es la misma que para el ensayo de difusión en agar sin S-9.

4.- ENSAYO DE SUSPENSION LIQUIDA CON S-9.

En éste ensayo se utiliza a las bacterias diluidas (2,000 a 3,000 u.f.c./ ml de medio HA+T) y se toma una alícuota de 1 o 0.1 ml en un tubo con tapón de rosca, al que se le adiciona el compuesto de -- prueba o solvente (10 o 20 μ l), a ésta mezcla se le agrega diferentes - cantidades de mezcla de activación S-9 y se incuba durante 60 a 90 min a 37°C con agitación lenta (ver tabla 15). Al término del tiempo de incubación, en los ensayos 1 al 4 se toman 110 μ l de la mezcla incubada y se adicionan a un tubo con 2 ml de agar semisólido HA+T. En los ensayos 5 al 10 se agregan directamente los 2 ml de agar semisólido. En ambos casos se mezclan los tubos y se vierten en cajas de agar sólido, se dejan solidificar y se incuban en la oscuridad a 37°C durante 24-36 hrs.

El cálculo del % a I.S. , se realiza como ya se indicó anteriormente.

5.- ENSAYO DE MICROSUSPENSION (M.S.A.).

Método de microplaca.

De un cultivo de toda la noche en 10 ml de medio líquido - HA+ T (pol A₁⁻ y pol A⁺) a 37°C con agitación, se ajusta una suspensión bacteriana a aproximadamente 20,000 u.f.c./ ml de medio líquido.

- 1^{er} Paso.- Se agregan 50 μ l de medio líquido del pozo 1 al 12, de una microplaca de plástico desechable estéril.
- 2^o Paso.- Se añaden 50 μ l del compuesto al pozo número 1 y se hacen diluciones dobles del pozo 1 al 12.
- 3^o Paso.- Se adicionan 50 μ l de mezcla de activación S-9 o solución de cofactores (preparada según Mc Carrol, Piper y Keech) según sea el caso, del pozo 1 al 12 (*).
- 4^o Paso.- A todos los pozos de prueba, se les añade 50 μ l de la suspensión bacteriana 20,000 u.f.c./ml con lo cual, ahora cada pozo contiene 1,000 u.f.c.
- 5^o Paso.- Se mezclan perfectamente todos los pozos.
- 6^o Paso.- Se cierra la microplaca y se sella, para evitar una excesiva evaporación.
- 7^o Paso.- Se incuban a 37°C/ 24 hrs sin agitación en la oscuridad.
- 8^o Paso.- Se determina la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.).

C.M.I. es la concentración mínima de un compuesto, capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Interpretación de Resultados.

Se determina el último pozo sin crecimiento bacteriano aparente. Los pozos con crecimiento presentan turbidez y los claros inhibi

(*).- La solución de cofactores se prepara igual que la mezcla de ac tivación, pero no lleva S-9 (0 μ l de fracción S-9/ ml de solu ción), éste se sustituye por solución amortiguadora.

ción del mismo.

Dos o más pozos de crecimiento a favor de la $polA^+$ con respecto a la $polA_1^-$, se interpreta como actividad genoletal positiva (37).

Para facilitar la determinación del crecimiento bacteriano, se puede utilizar un indicador de pH, púrpura de bromocresol; a cada pozo se le añade 10 μ l (de una solución 2mg/ml de agua destilada) y se observa el color producido. Un color azul oscuro indica ausencia de crecimiento; un color verde-amarillento indica la presencia de éste.

Bacillus subtilis.

1.- METODO RAPIDO DE ESTRIAS SIN S-9.

Las cepas H-17 rec^+ y M-45 rec^- se hacen crecer en 10 ml de caldo nutritivo E-2 Oxoid o Nutrient Broth Difco, con agitación a una temperatura de 37°C, durante toda la noche.

Cada cultivo se estría en la superficie seca de una caja de medio completo y se deja secar. Las estrias se hacen de tal forma que tengan un ángulo de separación de aproximadamente 45 grados una con respecto de la otra. Se debe evitar que se junten ambas estrias, se coloca un disco de papel filtro estéril conteniendo los 20 μ l del compuesto de prueba o solvente. El disco se pone en el extremo donde ambas estrias están formando el ángulo (ver figura 24 y 25). Se incuban a 37°C/ 24 horas y se determinan las zonas de inhibición de crecimiento.

A éste método se le pueden hacer dos modificaciones; la pri-

nera es utilizar bacterias congeladas a -80°C , en lugar de las de cultivo de toda la noche; y la segunda es realizar una incubación fría (4°C) durante 24 hrs, previa a la incubación de 37°C (22).

Interpretación de Resultados.

Se considera como compuesto genoletal, a aquel que genera zonas de inhibición de crecimiento mayores en M-45 que en la H-17. La diferencia de inhibición debe ser mayor o igual a 4 mm para considerarse, como respuesta genoletal positiva (+) (62).

2.- ENSAYO " REC " CON ESPORAS SIN S-9.

En una caja de petri vacía se ponen, 100 μl de una suspensión de esporas con una concentración de 3×10^7 esporas/ ml de agua - destilada estéril. Se adiciona a continuación 10 ml de agar completo semisólido al 0.8% con una temperatura de $42-45^{\circ}\text{C}$. Se mezclan perfectamente el agar y las esporas, con un movimiento rotatorio, se dejan solidificar en una superficie plana durante aproximadamente 10 minutos. Se coloca en el centro de la caja un disco de papel filtro estéril, al que se le agregan 20 μl del compuesto de prueba o solvente. Se incuban a 37°C durante 18-24 hrs y, se mide el diámetro de inhibición de crecimiento.

En éste ensayo también, se pueden incuban las cajas a 4°C / 24 hrs antes de pasarlas a 37°C y, utilizar bacterias en sustitución de esporas (22).

3.- ENSAYO "REC" CON ESPORAS Y S-9

El método es el mismo que para el ensayo "REC" sin S-9, la única modificación es la de añadir 0.3 ml de la mezcla de activación S-9 preparada según Amas y col. junto con el 0.1 ml de las esporas (22). Todos los ensayos con S-9 llevaron su control con la solución de cofactores correspondiente. El volumen de la fracción S-9/ ml de mezcla de activación es sustituido (como en el caso de E. coli) por el amortiguador de fosfatos empleado en cada mezcla de activación.

4.- OTROS ENSAYOS CON ESPORAS Y S-9.

A).- A un tubo con 2 ml de agar completo semisólido al 0.8% se le adiciona 0.1 ml de esporas H-17 o M-45 (3×10^7 esporas/ ml de agua destilada estéril) y 0.5 ml de la mezcla de activación metabólica preparada como indica Amas y col. (ver sección material biológico). Se mezcla con ayuda de un vórtex y se agrega en cajas con agar completo sólido. Se dejan solidificar y posteriormente se les coloca en el centro, un disco de papel filtro que contiene 20 μ l del compuesto de prueba o solvente. Las cajas se incuban a 37°C durante 24 horas en la oscuridad.

B).- A cajas de M.M.V.B. sólido complementadas con 10 μ g de trp y 10 μ g de arg/ ml de agar, se les adiciona 0.1 ml de esporas H-17 o M-45 y se esparcen con ayuda de un triángulo de vidrio flameado con alcohol. Se dejan secar y se horzdan 2 pozos por caja, se sellan con 5 gotas de agar sólido del mismo medio. A estos pozos se les añaden

100 μ l de una mezcla que contiene 50 μ l del compuesto de prueba, en un pozo y solvente en el segundo; a ambas se les adiciona 50 μ l de la mezcla de activación preparado como indica Amas y col. Las cajas se incuban 24 hrs a 37°C.

C).- Para éste ensayo se utilizan cajas de agar sólido de M.M.V.B. complementadas con 2% de caldo nutritivo Oxoid (v/v). A éstas se les esparce 0.3 ml o 0.5 ml de la mezcla de activación metabólica preparada conforme a Amas y col. con ayuda de un triángulo de vidrio flameado en alcohol. Las cajas se dejan secar y posteriormente se estrián asadas de las esporas H-45 y H-17, según el método rápido de estrías ya descrito. La mitad de las cajas se incuban a 4°C durante 24 hrs antes de pasarlas a 37°C. Las restantes se incubaron directamente a 37°C durante 24 horas.

D).- Preincubación S-9 + compuesto.

Al igual que en el ensayo anterior, se utilizan cajas de agar sólido de M.M.V.B. + 2% de caldo nutritivo (vol./vol). A estas cajas se les practica la horadación de 2 pozos. Se sellan y se estrián las esporas a partir de cada pozo (una estria H-45 o H-17 por pozo), después a cada pozo se le adiciona 100 μ l de una mezcla: compuesto-mezcla de activación o solvente-mezcla de activación (2:1) incubada previamente durante 20 min a 37°C en un tubo de vidrio con tapón de rosca. La mezcla de activación se preparó según Amas y col. Las cajas se incubaron 24 hrs a 37°C.

E).- A una caja de petri vacía, se le añade 0.1 ml de esporas H-17 -

o M-45 (de una suspensión de 3×10^7 esporas/ ml de agua) + 0.1 ml a 1 ml de fracción S-9 (homogenado). Sobre ésta caja, se vierten 10 ml de agar completo semisólido al 0.8% Difco u Oxoid. En el caso del Benzo (a) pireno, se usaron 5 ml de agar semisólido por caja y 0.05 ml de esporas. La temperatura del agar debe ser entre 42 a 45 °C. Se mezcla la caja perfectamente por rotación y se deja solidificar sobre una superficie plana. Después de 10 min, se coloca en el centro de la caja, un disco de papel filtro estéril con 20 µl de solución de cofactores preparada según T. Kada y col (ver inciso g de la sección de material biológico). Al mismo disco se le añaden 20 µl del compuesto de prueba o solvente. Se incuban a 37°C durante 24 hrs en la obscuridad (21).

F).- Ensayo de Microsuspensión (M.S.A.)

Método de Microplaca

De un cultivo de toda la noche en medio completo Oxoid o Difco, se ajustan las bacterias a una concentración de 20,000 u.f.c./ ml de medio líquido completo (38).

1^{er} Paso.- Se agregan 50 µl de medio líquido completo , del pozo 1 al 12 en una microplaca estéril.

Los pasos del 2 al 8 son idénticos al M.S.A. de E. coli.

Medicamentos Utilizados en la Quimioterapia de la Helminthiasis y Amibiasis.

En cuanto a los compuestos antiparasitarios que se evaluarán en éste estudio, podemos mencionar algunos datos previos sobre su genotoxicidad reportados en la literatura. Bignami en 1974 (3) refiere que la iodo clorohidroxiquinolina induce mala segregación cromosómica en Aspergillus y mutaciones en un sistema bacteriano no especificado. Otras publicaciones señalan que el mebendazol no induce mutaciones en S. typhimurium (60). - En 1976 Rosenkranz y col. (48) reportaron que la cloroquina interacciona con el ADN e inhibe el crecimiento de una cepa de Escherichia coli (deficiente en la enzima de reparación del daño al ADN, la polimerasa I). MacPhae y Podger en 1977 (33) evaluaron la capacidad de ocho drogas antihelmínticas, de inducir mutaciones génicas en bacterias (S. typhimurium) entre las que se encuentran el emboato de pirantel y la niclosamida que no tuvieron efectos mutagénicos, y el emboato de pirvinio que indujo dichos efectos sólo en presencia de las enzimas microsomales de hígado de rata.

En 1978 (64) en un estudio de 25 drogas antihelmínticas contra las que se encuentra a la cloroquina, obtuvieron resultados negativos en Bacillus subtilis, mientras que en S. typhimurium, al hacer interaccionar este medicamento con nitritos en medio ácido y a 37°C recuperó derivados con capacidad mutagénica. En este mismo reporte Futikawa y col. también reportaron que el hidroxinaftoato de bafenio, el pamoato de pirantel y de pirvinio dieron resultados negativos en la prueba de recombinación de B. subtilis, más no así en S. typhimurium en el ensayo con nitritos.

Schüpbach en 1979 (56), al igual que en nuestro laboratorio (8) encontró que la cloroquina induce mutaciones por corrimiento en S. typhimurium.

En nuestro laboratorio se encontró que : los compuestos antiambianos emetina y cloroquina inducen mutaciones por corrimiento, al igual que los antihelmínticos niclosamida y pirvinio. Este último, indujo además mutaciones por sustitución de base. La niclosamida es capaz de inducir mutaciones por corrimiento en S. typhimurium al ser activada por el sistema S-9, reacción que parece también llevarse a cabo in vivo de acuerdo a lo que se realizó en ratones (8). El pamoato de pirvinio a su vez indujo mutaciones por corrimiento y sustitución de bases, tanto en presencia como en ausencia del sistema de transformación metabólica.

En el mismo estudio dieron resultados negativos los antiambianos difodihidroxiquinolina e iodoclorohidroxiquinolina así como los antihelmínticos: bfenio, hexilresorcinol, mebendazol, piperacina y pirantel.

Se denomina Antihelmíntico a los fármacos que se emplean para liberar al organismo de los gusanos que reciben el nombre de helmintos.

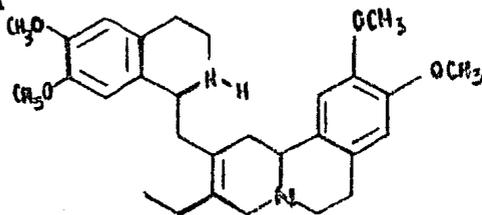
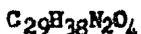
El vocablo antihelmíntico no debe reservarse para los fármacos que actúan localmente para expulsar los gusanos del tubo digestivo, porque hay helmintos que invaden también los demás órganos y tejidos.

Se denomina antiambianos a los fármacos que se emplean para liberar al organismo de los parásitos que reciben el nombre de amibas, no importando que éstas sean de tipo intestinal, hepáticas, etc.

Hay medicamentos objeto de nuestro estudio cuya acción farmacológica no solo es útil en el tratamiento de las helmintiasis o ambiasis sino que poseen propiedades químicas para curar otro tipo de parasitosis humana; en el presente capítulo, se hará mención sólo a la acción antihelmíntica o antiambiana de los fármacos, sin referirnos a sus otras acciones o propiedades medicamentosas.

COMPUESTOS ANTIAMBIANOS

DEHIDROEMETINA

Fórmula EstructuralFórmula Química

P.M. 478.61

Nombre Químico

6', 7', 9', 10' tetrametoxi-2,3 dehidroemetano.

La dehidroemetina es un polvo blanco cristalino, soluble en agua y en alcohol.

Acción Antiambiiana.

Se ha estudiado la relación estructura química y actividad antiambiiana de varias sustancias afines a la dehidroemetina, pero ninguno de los muchos derivados ensayados, tanto in vitro como in vivo, se puede comparar con ella en cuanto a potencia ambiicida.

La dehidroemetina conserva las propiedades antiambiianas de la emetina pero con menor toxicidad; la primera difiere del alcaloide original en la falta de hidrógeno en las posiciones 2 y 3.

La dehidroemetina tiene acción directa sobre E. histolytica y es mucho más eficaz contra las formas móviles que contra los quistes; causa la degeneración del núcleo y la reticulación del citoplasma de la amiba; acaba con los parásitos por impedir la multiplicación de los trofozoítos. Inhibe la síntesis proteica, tal vez al evitar la unión del tARN-a.a.

al ribosoma. Aminorra también la glucólisis aeróbica.

Absorción, Destino y Excreción.

La dehidroemetina se absorbe de los lugares de administración parenteral y se elimina o detoxifica lentamente. La vía principal de eliminación es el riñón. Aunque aparece en la orina en 20 a 40 min. después de la inyección todavía se encuentra en ella de 40 a 60 días después de que se ha terminado el tratamiento. La acción tóxica por acumulación es un peligro constante. En el hígado es donde el alcaloide se halla a mayor concentración, este es el motivo por el cual es más efectiva contra la amibiasis hepática que en la intestinal. También se encuentran cantidades apreciables en pulmón, riñón y bazo.

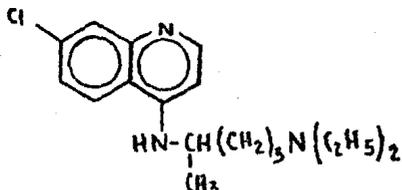
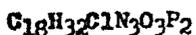
Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El fármaco se prepara en ampolletas de 2 ml que contienen 60 mg del diclorohidrato en solución acuosa. La vía de administración es parenteral (subcutánea o intramuscular). El tratamiento se hace por período de 10 días con 80 mg diarios, si se da una dosis de 120 mg por 10 días es más eficaz que 65 mg diarios de emetina. La dosificación recomendada es una inyección intramuscular de hasta 1.5 mg/Kg diarios durante 10 días. La dosis total no debe exceder de 1g.

Usos Terapéuticos.

Es el fármaco sustituto de la emetina en el tratamiento de los abscesos amebianos, hepatitis amebiana aguda o crónica (30, 47).

DIFOSFATO DE CLOROQUINA

Fórmula EstructuralFórmula Química

P.M. 515.87

Nombre Químico

- 1,4 Pentanediamina, N'-(7 cloro-4-quinolinil)-N₁, N^o-dietilfosfato (1:2). 7-cloro-4-(4-(diethylamino)-1-metilbutil amino fosfato de quinolina.

El difosfato es un polvo blanco y amargo, soluble en agua; las soluciones son estables.

Acción Antiamibiana

La cloroquina tiene la misma cadena lateral alquílica que la quinacrina pero se distingue de ésta por tener un núcleo quinolínicico y no acridínico y carecer del radical metoxilo.

Los estudios in vitro con trofozoitos de E. histolytica revelaron que la cloroquina es un compuesto antiamibiano y supera en este efecto la acción farmacológica de las 8-quinolinas (dihidroxiquinolina e iodoclorohidroxiquinolina), pero no a la acción de la emetina. Las concentraciones elevadas de cloroquina en plasma motivaron su uso para hepatitis -- ambiana.

Es indispensable administrar sistemáticamente un medicamento, -- que sea eficaz contra amibiasis intestinal, a todos los pacientes que se --

dé cloroquina para amibiasis hepática, ésta asociación terapéutica disminuye la frecuencia de recidivas.

Absorción, Destino y Excreción.

La cloroquina se absorbe por completo por el tubo digestivo, y solo se elimina con las heces pequeñas cantidades de la misma. Alrededor del 50% del medicamento se liga a componentes plasmáticos no difusibles. La excreción de la cloroquina se deposita en notable proporción en los tejidos. La concentración del fármaco en el hígado, bazo, riñón o pulmones es de 200 a 700 veces superior a la plasmática, en leucocitos es también muy elevada, en el encéfalo y la médula espinal solo contiene de 10 a 30 veces la cantidad que se encuentra en plasma.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El fosfato de cloroquina, U.S.P. (fosfato de Aralen, Avloclor, Resoquina) se expende en comprimidos que contienen 250 a 500 mg del difosfato, aproximadamente 60% de este difosfato es la cantidad correspondiente de la base. El fosfato de cloroquina se administra en tabletas por vía bucal, antes o después de la comida, cuando es necesario se puede administrar por vía intramuscular. La serie acostumbrada de fosfato de cloroquina para amibiasis extraintestinal en adultos es de 1g diario durante dos días, seguidos de 500 mg diarios durante dos o tres semanas. Se sugiere que el tratamiento de la cloroquina debe seguir inmediatamente a la administración de la emetina, o administrar ambos fármacos.

Toxicidad y Efectos Secundarios

Ninguna de las manifestaciones de toxicidad es grave y todas desaparecen con rapidez al suspender la medicación.

A causa de la toxicidad baja del medicamento, este sistema de -

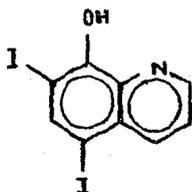
dosificación puede aumentarse si es necesario. La cloroquina no colorea las heces ni la piel como la quinacrina. Los principales efectos secundarios son el prurito y los trastornos gastrointestinales.

Usos Terapéuticos.

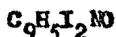
Es el fármaco de elección para el tratamiento de amibiasis extra intestinal como amibiasis hepática y pulmonar, así como abscesos amibianos. El medicamento es poco eficaz para la amibiasis del colon (30, 47).

DIYODOHIDROXIQUINOLINA (IODOQUINOL)

Fórmula Estructural



Fórmula Química.



P.M. 396.95

Nombre Químico.

8-Quinolinol, 5,7 diodo o 5,7-diodo-8quinolinol.

Es un polvo de color pardo amarillento, inodoro, casi insoluble en agua, soluble en dimetil sulfóxido (DMSO).

Acción Antiamibiana.

Las 8-hidroxiquinolinas son directamente antiamibianas pero se desconoce el mecanismo de acción, los fármacos de este tipo son completamente ineficaces contra el absceso y hepatitis amibiana y parecen actuar única

mente sobre microorganismos en el interior del intestino. Estos compuestos son eficaces contra las formas móviles y quísticas, pero su actividad para eliminar quistes probablemente dependa de la capacidad para destruir los trofozoitos al bloquear (se supone), sistemas enzimáticos esenciales.

Estos medicamentos tienen eficacia con el paciente que expulsa quistes, pero son mucho menos útiles para tratar la disentería amibiana aguda. Se desconoce si son eficaces en la amibiasis intestinal, única_{mente} por presentarse en el interior del intestino o también en parte por_{que} aparecen en la circulación.

Absorción, Destino y Excreción.

Después de la administración bucal, se absorbe parte variable pero importante de la dosis ingerida. En el ser humano puede obtenerse en la orina, principalmente en forma de glucorónido. Comparando la absorción intestinal de la diyodohidroxiquinolina con la de la iodoclorohidroxi_{quin}olina, la primera se absorbe solo un 33%. La mayor parte de estos fármacos se excreta por heces.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

La diyodohidroxiquinolina, U.S.P. (diodequin, yodoquin, bicoquin, quindoleina) se expenden en tabletas que poseen 210 o 650 mg del medicamento o suspensión. En amibiasis intestinales, la dosis para adultos es de -- 650 mg, tres veces al día durante 20 días. Los niños deben recibir parte de la dosis del adulto. El curso inicial no debe repetirse sin un período de reposo de 2 a 3 semanas. En el tratamiento de amibiasis intestinales se debe administrar diyodohidroxiquinolina simultáneamente con otro anti_{amibi}ano intestinal eficaz, o emplear los dos fármacos en series alternadas.

Toxicidad y Efectos Secundarios.

La administración de diyodohidroxiquinolina a los niños para tratar la diarrea crónica ha guardado relación con atrofia óptica y ceguera permanente.

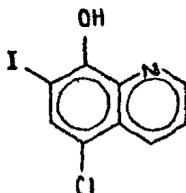
Los efectos secundarios de las 8-hidroxiquinolinas incluyen furunculosis generalizada (toxicoderma por yodo), escalofríos, fiebre, dermatitis benigna a grave, irritación y pruritos anales. Estos fármacos están contraindicados en pacientes de daño hepático o intolerancia al yodo.

Usos Terapéuticos.

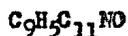
Las 8-hidroxiquinolinas son eficaces para la amibiasis intestinal. La diyodohidroxiquinolina es útil en la amibiasis o giardiasis rebelde al tratamiento con quinacrina, en la disentería balantidiásica y en las infecciones intestinales por Disentamoeba fragilis (30, 47).

IODOCLOROHIDROXIQUINOLINA (CLIOQUINOL)

Fórmula Estructural



Fórmula Química



P.M. 305.50

Nombre Químico

8'-quinolinol, 5-cloro-7-iodo, o 5-cloro-7-iodo-8-quinolinol

Es un polvo de color pardo amarillento, inodoro, casi insoluble en agua, soluble en DMSO.

Acción Antiamibiana.

Igual a la diiodohidroxiquinolina.

Absorción, Destino y Excreción.

Después de la administración oral se absorbe parte variable pero importante de la dosis ingerida. En el ser humano se excreta en orina principalmente en forma de glucorónido. La iodoclorohidroxiquinolina se absorbe más que la diiodohidroxiquinolina. La mayor parte de estos fármacos se excreta por heces.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

La iodoclorohidroxiquinolina, N.F. (Vioform) se vende en varios preparados en forma de supositorios que poseen 250 mg, polvo y tabletas con cubierta entérica (cada una con 250 mg). La iodoclorohidroxiquinolina se administra para la amibiasis en forma de tabletas bucales; una serie consis

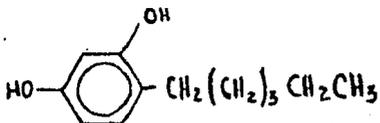
te en 500 a 750 mg, tres veces al día durante 10 días. Este régimen se repite después de un período de reposo de ocho días. Puede administrarse con otro antiambiano intestinal eficaz.

Toxicidad y Efectos Secundarios.

La reacción tóxica más importante es la neuropatía mioclónica - subaguda, esta enfermedad es un padecimiento semejante a la mielitis. Otros trastornos de sensibilidad profunda, debilidad muscular en las piernas, - signos piramidales y ataque leve a las extremidades superiores, ocurre con menor frecuencia visión borrosa y ceguera, trastornos del sistema nervioso autónomo, cambios psicológicos y coloración verdosa de la lengua. Los efectos secundarios son iguales a las 8-hidroxiquinolinas.

Usos Terapéuticos.

Es eficaz contra la amebiasis intestinal y se aconseja para tratar los portadores asintomáticos de quistes (30. 47).

COMPUESTOS ANTIHELMINTICOS**HEXILRESORCINOL.**Fórmula EstructuralFórmula QuímicaC₁₂H₁₈O₂

P.M. 194.27

Nombre Químico

1,3-bencendiol, 4-hexil o 4-hexilresorcinol o m-hidroxi-p-hexil-ferol.

Es un polvo blanco soluble en agua.

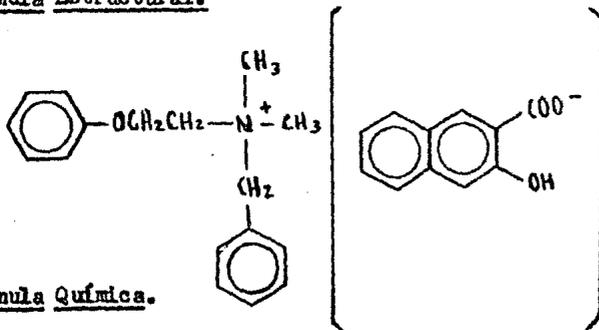
Además de su acción antiséptica y fungicida, este compuesto es utilizado para el tratamiento de infecciones intestinales causadas por trémátodos, aunque sólo se encontró reportado como fármaco de primera elección en el caso de Fasciolopsis buski (paraliza a éste verme).

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

No se encontró reportado, ni la vía de administración, dosis y farmacocinética, solo la presentación; cápsulas con 0.5 g en aceite de olivo y cápsulas de 0.1 y 0.2 g (25, 47).

HIDROXINAFTOATO DE BENENIO

Fórmula Estructural.



Fórmula Química.



Nombre Químico.

N,N-dimetil-N-(2-fenoxietil)-bencenmetanomonio sal con ácido 3-hidroxí-2-naftalen carboxílico (1:1) o bencil dimetil(2-fenoxietil) amonio 3-hidroxí-2naftoato (1:1).

Es un sólido cristalino de color amarillo pálido muy poco soluble en agua y de sabor amargo, soluble en DMSO.

Acción Antihelmíntica.

Se utiliza para el tratamiento de los anquilostómidos, ya que es un compuesto con amonio cuaternario en su estructura, esta cualidad hace al hidroxinaftoato eficaz contra una gran variedad de nemátodos parásitos. Se usa mucho contra las infecciones por Necator americanus y Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides y Trichostrongylus orientalis. Carece de eficiencia contra Strongyloides stercoralis y tiene solo moderada actividad frente a Trichuris trichiura.

Absorción, Destino y Excreción.

En las primeras veinticuatro horas de la ingestión de una dosis terapéutica, no se excreta en la orina más del 0.5% de fármaco administra-

do.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El hidroxinaftoato de bafenio (Alcopar, Fedal, Uncin), se vende en bolsitas que contienen una dosis de 5 g equivalente a 2.5 g de bafenio base. Se administra por vía oral, con el estómago vacío y después no se dan alimentos cuando menos por 2 hrs. La dosis única óptima es de 5 g, a los niños de menos de 23 kg se les prescribe la mitad de la dosis. Ni antes ni después de administrar hidroxinaftoato de bafenio hay que dar purgante, los cuales pueden incluso disminuir el efecto de la medicación.

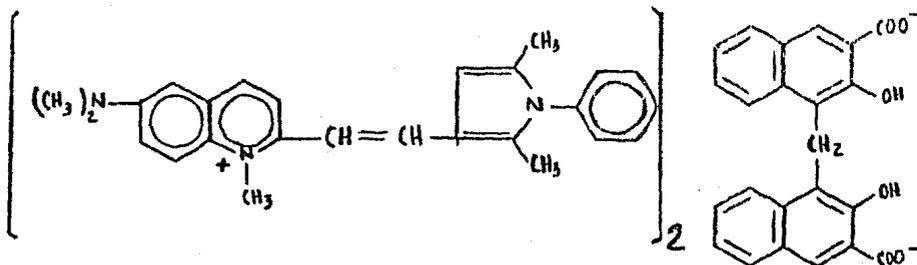
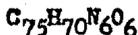
Toxicidad y Efectos Secundarios.

El hidroxinaftoato de bafenio no parece producir efectos secundarios graves. Por su sabor amargo esta sustancia provoca a veces náuseas, vómitos; para evitar tal efecto se administra suspendida en solución concentrada de azúcar. En algunos pacientes puede provocar diarrea ligera y transitoria. No debe de administrarse en pacientes con vómitos intensos y grave deshidratación.

Usos Terapéuticos.

La indicación principal para el uso de este fármaco es en las anquilostomiasis, no hay duda que este medicamento es el mejor contra la Ancylostoma duodenale, no así para el Necator americanus que parece ser menos efectivo. En las infestaciones por Ascaris lumbricoides el hidroxinaftoato de bafenio es eficaz para eliminar los parásitos o disminuir considerablemente su número. La terapéutica con una sola dosis de bafenio produce 80% de curaciones en las parasitosis por Trichostrongylus orientalis (47).

PAMOATO DE PIRVINIO

Fórmula Estructural.Fórmula Química.Nombre Químico.

6-(dimetilamino)-2-2-(2,5 dimetil-1-fenil)-2H pirrol-2il) etilendi-1-metil-quinolina.

Acción Antihelmíntica.

La molécula de pamoato de pirvinio posee un nitrógeno cuaternario que está separado de uno terciario por una cadena resonante de enlaces dobles y sencillos alternados, estas características la poseen todos los colorantes cianínicos.

Las cianinas en los gusanos interfieren en los sistemas enzimáticos respiratorios que tienen un papel menor o ninguno en los tejidos de músculos. La actividad antihelmíntica de este compuesto está asociada con la inhibición de la respiración en los organismos aerobios y con la interferencia en la absorción de la glucosa exógena en los helmintos intestinales.

Se han revisado los efectos del pamoato de pirvinio en las helmintiasis humanas y en las de los animales, este compuesto tiene notable acción oxiuricida pero en ensayos contra Trichuris y Necator en el hombre no ha dado buenos resultados.

Absorción, Destino y Excreción.

Cuando se administra por vía bucal, el pirvinio no se absorbe en cantidades apreciables por el tubo digestivo. Este medicamento dá color rojo brillante a las heces, por lo que se excreta en éstas.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El pamoato de pirvinio, U.S.P. (Povan, Irvirin, Vanquin) se encuentra en el mercado en forma de suspensión que contiene 10 mg de pirvinio base por ml, y también hay tabletas que contienen el equivalente de 50 mg de pirvinio base.

Para el tratamiento de la oxiuriasis en niños y en adultos, se administra por vía bucal una sola dosis de pamoato de pirvinio equivalente a 5 mg de pirvinio base por kg de peso corporal hasta un máximo de 350 mg.

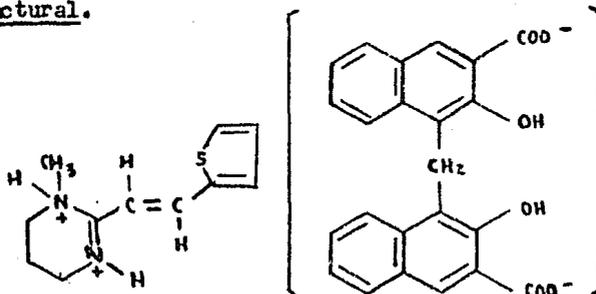
Toxicidad y Efectos Secundarios.

Este medicamento se tolera bien y solo produce efectos secundarios mínimos que no impiden el tratamiento. Entre los efectos secundarios que producen el pamoato de pirvinio se encuentran náuseas, vómitos y dolores cólicos, el vómito es el efecto secundario más frecuente cuando se emplea la suspensión, pero no se producen en pacientes que toman las tabletas.

Usos Terapéuticos.

El pamoato de pirvinio es el mejor medicamento contra la oxiuriasis. Con el método de una sola dosis se obtiene una elevada proporción de curaciones. No obstante por el gran peligro de reinfestación, debe hacerse la investigación de los huevos del parásito en el ano durante 5 semanas, - por lo menos, después del tratamiento. El valor del pirvinio contra la estrombiloidiasis no ha sido definitivamente establecido, pero no menos de 7 días de tratamiento son necesarios para que una persona pueda ser curada.

P A M O A T O D E P I R A N T E L

Fórmula Estructural.Fórmula Química. $C_{54}H_{30}N_2O_6S$

P.H. 594.68

Nómbra Químico.

Trans-1.4,5,6-tetrahidro-1 metil-2-2-(2-tienil) vinil pirimidina.

El pamoato es una sal cristalina blanca prácticamente insoluble en alcohol y agua, es soluble en DMSO. Es insípida y estable.

Acción Antihelmíntica.

El pirantel y sus análogos son agentes despolarizantes del bloque neuromuscular. Producen acción nicotínica intensa y persistente, que resulta en parálisis espásmica del verme. El pirantel es eficaz contra un cinarias, oxiuros y ascárides, pero es ineficaz contra tricocéfalos.

Absorción, Destino y Excreción.

El pirantel se absorbe escasamente por el aparato gastrointestinal, se excreta menos del 15% por la orina, como el fármaco sin modificaciones y sus metabolitos, pueden obtenerse en heces solo en pequeña proporción, en relación a la dosis.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El pamoato de pirantel (Antiminth, Combantrin, Panopir, Piranven-

F) se expende en forma de suspensión oral, en la cual cada ml posee 50 mg de la base. Se administra por la boca a cualquier hora del día sin relación con la ingestión de alimentos y bebidas. Para tratar las infestaciones por Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis o Ancylostoma duodenale, debe de administrarse una sola dosis única de 11 mg/kg, hasta un máximo de 1g en el caso de oxiuros suele ser prudente repetir el tratamiento después de dos semanas. Contra Necator americanus se administra la misma dosis una vez durante tres días.

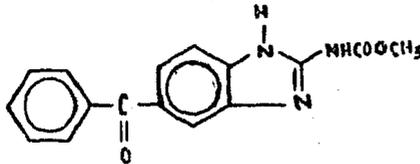
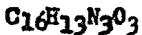
Toxicidad y Efectos Secundarios.

En el ser humano se observan a veces molestias gastrointestinales, al igual que cefalalgia y vahídos; sin embargo estos efectos no persisten. El efecto del pamoato de pirantel no se ha estudiado en mujeres embarazadas, no se aconseja para niños menores de 1 año.

Usos Terapéuticos.

El pamoato de pirantel puede considerarse como droga de elección para tratar ascariasis y enterobiasis. Se han logrado índices altos de cura con tratamiento de una sola dosis. De manera análoga, se han obtenido frecuencia alta de curación en la anquilostomiasis y la necatoriasis, y el fármaco parece ser tan eficaz como el befenio en este sentido (30, 47).

MEBENDAZOL

Fórmula Estructural.Fórmula Química.

P.M. 295.30

Nombre Químico.

Metil N-(5-benzoil-2 bencimidazolil) carbamato.

Es un polvo amorfo amarillento, muy poco soluble en agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos, soluble en DMSO y de sabor no desagradable.

Acción Antihelmíntica.

El mebendazol es eficaz contra ascariasis, enterobiasis y uncinariasis en infestación única o mixta.

El fármaco es nematocida por virtud de la capacidad para inhibir irreversiblemente la captación de glucosa. La inmovilización y la muerte del parásito ocurre lentamente y la depuración del aparato gastrointestinal quizá solo sea completa 3 días después del tratamiento. El fármaco inhibe el desarrollo de las larvas de uncinarias in vitro en concentración de 50 mg/ml; concentraciones mucho mayores carecen de efecto sobre las larvas plenamente formadas. Poco después de comenzar el tratamiento, los huevos de Trichuris y uncinarias no se convierten en larvas.

Absorción, Destino y Excreción

Se absorbe sólo una pequeña parte de la dosis administrada por vía oral y en término de 24 a 48 hrs puede recuperarse en la orina 10%. - La mayor parte del material excretado por los riñones es el derivado descarboxilado del mebendazol.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

El mebendazol (Mebensole, Vermox y Vertex) se expende en forma de tabletas que poseen 100 mg del fármaco, se administra por vía oral, y - la misma dosificación se aplica a adultos y a niños, para tratar la ascariasis, la tricuriasis y la uncinariasis, se administra 100 mg por la mañana y por la tarde en 3 días consecutivos. No se necesitan ayuno ni purgas.

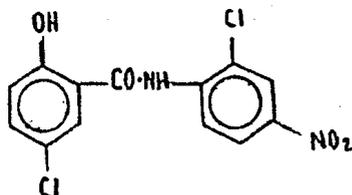
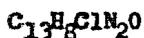
Toxicidad y Efectos Secundarios.

Probablemente como resultado de la escasa absorción, el mebendazol no ha causado efectos tóxicos generales en el uso clínico, incluso en presencia de anemia y desnutrición. En casos de infestación masiva de vermes han ocurrido síntomas pasajeros de dolor abdominal y diarrea. El mebendazol no debe de administrarse a mujeres embarazadas, ni utilizarse en pacientes con reacciones alérgicas al fármaco.

Usos Terapéuticos.

El mebendazol es el fármaco de elección para tratar las infestaciones por Trichuris trichiura. Es particularmente útil en el tratamiento de las infestaciones dobles o triples, pues también tiene gran actividad contra ascariasis, uncinariasis y enterobiasis (30, 47).

N I C L O S A M I D A

Fórmula Estructural.Fórmula Química.

P.M. 327.12

Nombre Químico.

N-(2'-cloro-4'-nitrofenil)-5-clorosalicilamida

Es un polvo amarillento, inodoro e insípido, insoluble en agua, soluble en DMSO.

Acción Antihelmíntica.

La niclosamida actúa principalmente sobre los céstodos, como Enterobius vermicularis, Hymenolopis nana e Hymenolopis diminuta. La niclosamida en bajas concentraciones, estimula la absorción de oxígeno en los parásitos, pero en altas concentraciones la respiración exógena es inhibida y la absorción de la glucosa bloqueada. Los gusanos afectados por la niclosamida tanto en el intestino como in vitro, se vuelven más sensibles a la acción de las enzimas proteolíticas. Después de la administración de niclosamida, es posible que hayan sido digeridos los proglótidos y el escólex y no puedan ser identificados.

Absorción, Destino y Excreción.

Aún no está bien elucidado, pero no se absorbe por el tubo digestivo.

Preparados, Vía de Administración y Dosis.

La niclosamida (Cestocide, Mansonil, Iomasan) se expende en tabletas con sabor a vainilla de 500 mg. Se administra por vía oral. Debe prepararse al paciente en ayunas desde la noche anterior, si la persona padece de estreñimiento crónico, se le dá un laxante antes de administrar el medicamento. La dosis recomendada para el adulto es de 2 g; las tabletas deben de masticarse, a los niños de dos a ocho años se les administra la mitad de la dosis, a los menores de 2 años se les suministra la cuarta parte. Para obtener segmentos del parásito menos digeridos y un escólex identificable, se da un purgante dos horas después de la dosis de niclosamida.

Toxicidad y Efectos Secundarios.

La niclosamida produce raramente trastornos gastrointestinales, no tiene acción irritante directa, ni ha producido efectos desfavorables cuando se ha administrado a pacientes debilitados y mujeres embarazadas. No ha revelado trastornos de función hepática ni renal, ni alteración del número de corpúsculos de la sangre. El tratamiento de niclosamida contra Taenia solium es peligroso, porque la digestión de los anillos muertos del gusano ponen en libertad a los huevos viables en la luz intestinal; es por esto que se debe de dar un purgante 2 horas después de haber ingerido el medicamento para expulsar del intestino todos los segmentos muertos del parásito antes de que sean digeridos. En el caso de T. saginata como no hay riesgo de cisticercosis el purgante no es necesario.

Usos Terapéuticos.

Es el fármaco de elección contra Diphyllobothrium latum, H. nana, T. saginata. También es eficaz contra T. solium pero hay peligro de cisticercosis por la administración del fármaco (30, 47).

RESULTADOS:

Como ya hemos mencionado, una de las formas de medir genotoxicidad es determinando el daño al ADN que se traduce como muerte celular (daño genoletal). Ambos sistemas bacterianos utilizados en este trabajo, tienen la característica en común de medir dicho tipo de daño.

Sistema de Escherichia coli pol A⁺/ pol A⁻. (Fig. 18).

1.- Verificación de la actividad de la enzima Pol I en las cepas polA⁺ y - polA₁⁻

Una de las formas más rápidas y sencillas de checar de manera rutinaria la presencia de las características pol A⁺ (W 3110) y pol A₁⁻ (p2438), es mediante el ensayo de difusión en agar (E.D.A.) usando como compuestos control positivos al R.M.S., M.M.S., MNNG (agentes alquilantes del ADN), cristal violeta (C.V.), etc. y como control negativo al cloranficol. Los resultados de ésta prueba se presentan en la tabla 6 (compuestos sin mezcla de Activación Metabólica).

Los compuestos utilizados como controles positivos poseen la característica en común de dañar al ADN, por lo que la bacteria para sobrevivir deberá reparar el daño causado a éste, por medio de los diversos sistemas de reparación que posea.

La cepa pol A₁⁻ al ser deficiente en la actividad de polimerasa I (Pol I), no puede reparar en forma normal lesiones que requieran de la participación de ésta enzima: Por consiguiente las bacterias pol A₁⁻ son más sensibles a la acción de compuestos genoletales, cuya reparación sea -

FIGURA 18

PRUEBAS DE GENOLETALIDAD EN Escherichia coli

PROTOSCOLOS EXPERIMENTALES

ALTERNATIVOS

Halos de Inhibición
(Diámetro del halo)

Cualitativo

W3110 polA⁺



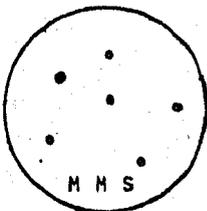
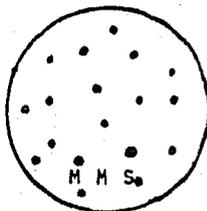
P3478 polA₁⁻



con 0,5 - 1.0 % de la
actividad normal de polimerasa I

Indice de Supervivencia (I.S.)
(Conteo de colonias)

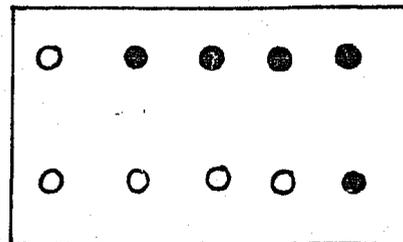
Cuantitativo



Concentración Mínima
Inhibitoria (C.M.I.)

Semicuantitativo

pol A⁺



pol A₁⁻

EVALUACION DE LA GENOLETALIDAD DE MUTAGENOS CONOCIDOS
 EN EL ENSAYO DE DIFUSION EN AGAR (E.D.A.)
 DE *E. coli* EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE
 ACTIVACION METABOLICA (S-9)

TABLA NO. 6

COMPUESTO	DISCO µg/20 µl	Mezcla de activación metabólica S-9 * 0.5ml/caje	φ de inhibición de crecimiento en (mm).		Diferencia de inh. de crec. (mm)
			pol A ⁻	pol A ⁺	
DMSO	20 µl	+	0	0	N.I.
2-AF	200	+	0	0	N.I.
2-AA	200	+	0	0	N.I.
DMSO	20 µl	-	0	0	N.I.
C. V.	10	-	8	1	7
CLORAN	15	-	10	10	0
M M S	10 µl	-	60	29	31
E M S	840	-	10	0	10
	10 µl	-	17	7	10
M N N G	250	-	37	20	17

N.I. = Resultados no interpretables.

* = Mezcla preparada según Ames y col.

DMSO = Dimetil sulfóxido.

M.N.N.G. = N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

2-AF = 2-Acetil aminofluoreno.

2-AA = 2-Amino antraceno.

C.V. = Cristal violeta.

M.M.S. = Metil metano sulfonato.

E.M.S. = Etil metano sulfonato.

dependiente de la Pol I. En el E.D.A., dicha característica se reflejará como un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco, mayor para la cepa deficiente en la actividad de polimerasa que para la actividad normal, como se muestra en las fotografías 1, 2, 3 y 4 .

El cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático, que se sabe no interactúa con el ADN, sino que inhibe síntesis de proteínas al interaccionar con la peptidil transferasa a nivel de ribosomas, por consiguiente afectará en igual proporción a ambas cepas de E. coli. En el ensayo de difusión en agar éste compuesto produce halos de inhibición de crecimiento del mismo diámetro (21, 52).

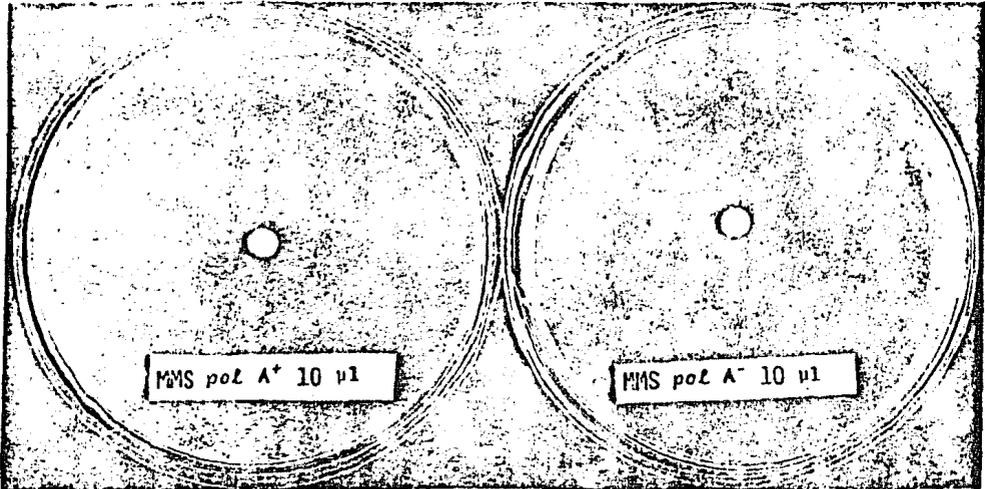
2.- Genotoxicidad de los Fármacos de Prueba

a) Ensayo en Suspensión Líquida (E.S.L.) (fig. 19).

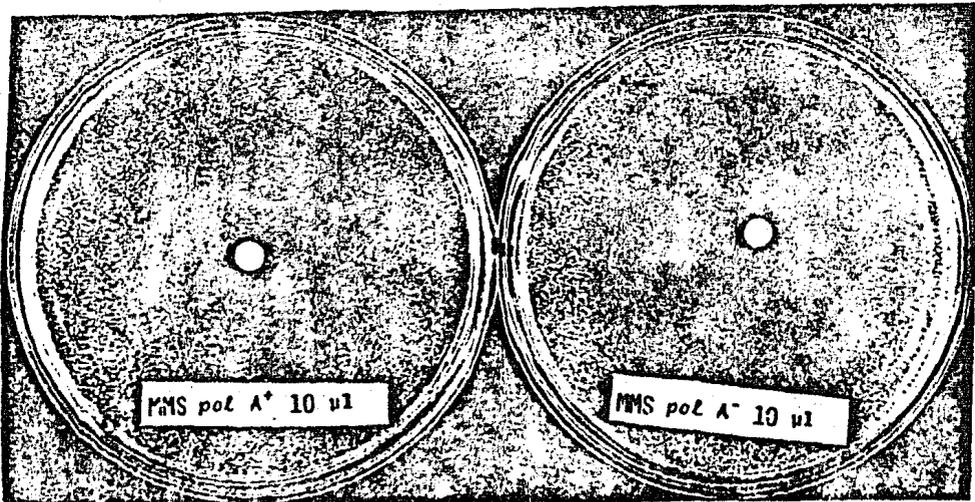
Al haberse trabajado con anterioridad a nuestro estudio el ensayo de difusión en agar en el laboratorio (43), se decidió en primer término, establecer las condiciones óptimas del ensayo de suspensión líquida (E.S.L.) para su uso rutinario. Esta decisión estuvo basada en las desventajas presentadas por el E.D.A. (tabla 20) y por las referencias que existían en la literatura, que indicaban que el E.S.L. podía minimizar dichas deficiencias (52,53).

La tabla 7 nos muestra los resultados obtenidos con un compuesto control positivo y uno negativo en el ensayo en suspensión líquida (fot. 5,6) En éste ensayo se calcula el % de supervivencia de ambas cepas, frente a una misma concentración de compuesto, tomando como 100% de sobrevida la correspondiente a las bacterias expuestas al disolvente

FOTOGRAFIA 1

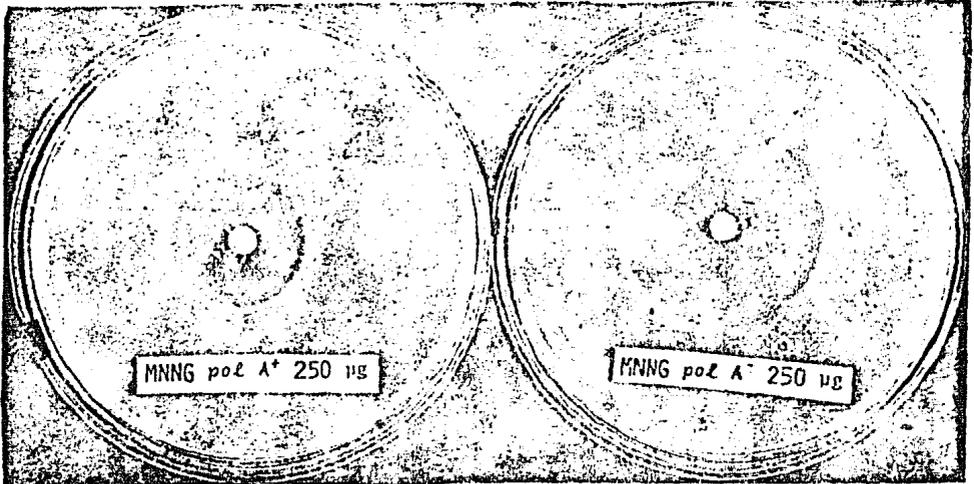


Diámetro de inhibición de crecimiento de las cepas pol A⁺ y pol A₁⁻ producidos por 10 µl de MMS. En esta prueba se usaron bacterias de un cultivo de toda la noche sin diluir.

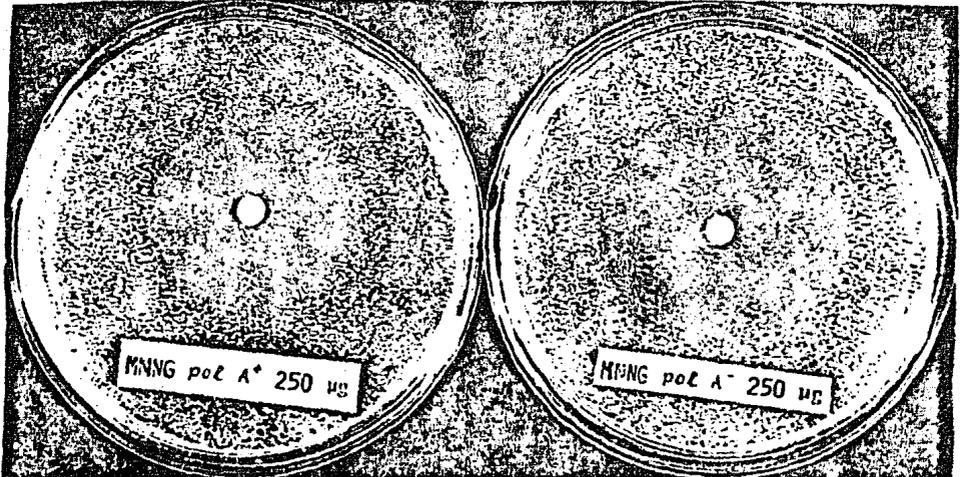


FOTOGRAFIA 2.- Es el mismo caso que la fotografía 1, sólo que aquí las bacterias se encuentran diluidas 1:10,000.

FOTOGRAFIA 3



Diámetro de inhibición de crecimiento de las cepas pol A⁺ y pol A⁻ producidos por 250 mcg de MNNG. En esta prueba se usaron bacterias de un cultivo de toda la noche sin diluir.



FOTOGRAFIA 4 -- Es el mismo caso que la fotografía 3, sólo que aquí las bacterias se encuentran diluidas 1:10,000.

FIGURA 19

PRUEBAS DE GENOLETALIDAD

EN Escherichia coli.

ENSAYO EN SUSPENSION LIQUIDA

(E. S. L.)

Cultivo de toda la noche 2×10^9 u.f.c./ml

Dilución

2×10^3 u.f.c./ml

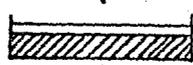
0.1 ml

Compuesto (20 ml)

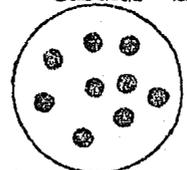


2 hrs/37°C

2 ml de agar semisólido

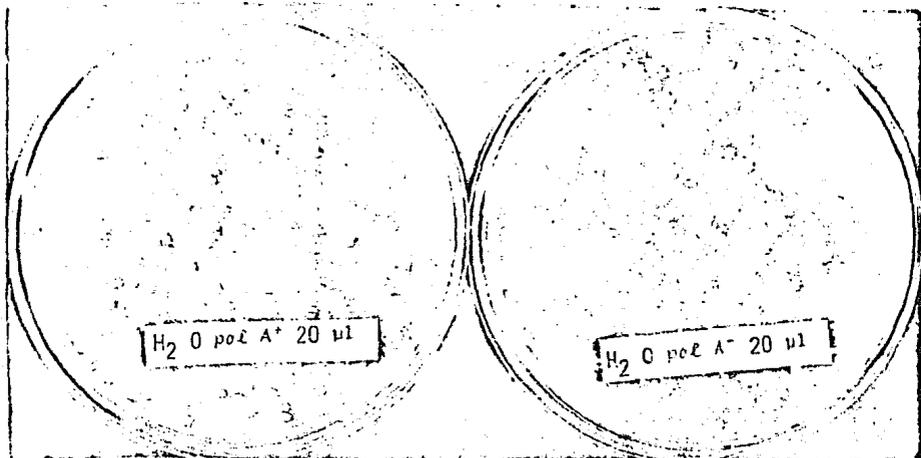


Incubar 24 hrs/37°C

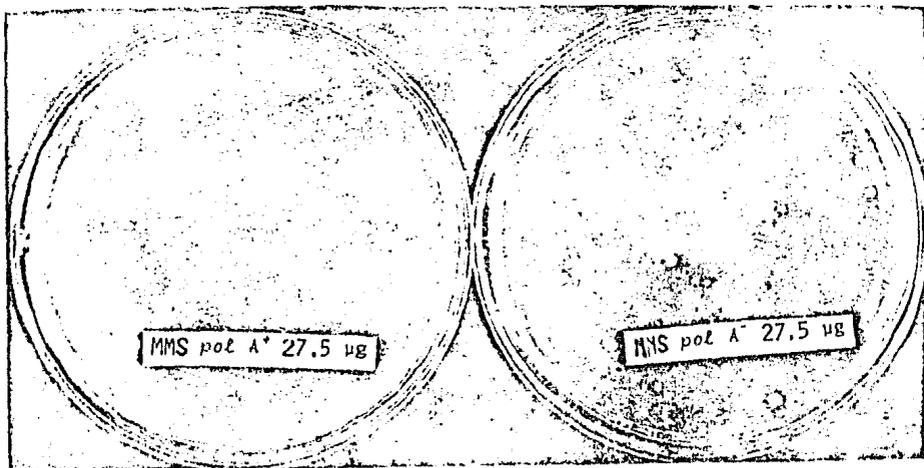


I. S. = % Supervivencia $polA^-$ / % Supervivencia $polA^+$

FOTOGRAFIA 5



Ensayo en suspensión líquida.- Cajas conteniendo bacterias pol A₁⁺ y pol A⁺ expuestas a 20 ml de solvente. (100% de supervivencia).



FOTOGRAFIA 6.- Ensayo en suspensión líquida usando como compuesto control (+) al MMS. Nótese la mayor sobrevida de la cepa pol A⁺.

ENSAYO DE GENOLETALIDAD EN SUSPENSION LIQUIDA (E.S.L.)
E. coli (COMPUESTOS CONTROL)

TABLA NO. 7

COMPUESTO µg / 20µl solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Índice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
CONTROL SOLVENTE										
H ₂ O 20 µl	235	176	334	209	100	100	100	100	1.00	1.00
CONTROL POSITIVO										
E.M.S. 80	119	166	194	196	49.8	94.3	58.1	94.0	0.53	0.62
CONTROL SOLVENTE										
DMSO 20 µl	175	193	281	194	89.7	84.8	84.1	92.8	1.05	0.91
CONTROL NEGATIVO										
CLORANFENICOL 30	177	182	222	150	90.8	80.0	78.3	77.5	1.10	1.04

utilizado en cada caso. El % de supervivencia de la pol A_1^- se divide entre el de la pol A^+ para obtener así el índice de supervivencia (I.S.), que es una medida cuantitativa indirecta de daño al ADN. Para considerar a un compuesto como genoletal es decir, que produce muerte por daño al ADN, el I.S. debe ser menor a 0.85, por otro lado I.S. mayores a 0.95 son considerados no genoletales; valores cuyo rango sea de 0.85 a 0.95 no son determinantes para establecer la ausencia o presencia de dicha actividad.

En las tablas 8 a la 11, podemos observar claramente que entre el rango de concentraciones usadas, aparecen I.S. menores a 0.85, - valor indicativo de genoletalidad. Para determinar las concentraciones a probar de los fármacos se hicieron ensayos previos, tomando en cuenta como criterio para fijar la máxima concentración a utilizar, el límite de solubilidad de los compuestos, en vista de que no existían en la literatura datos previos que nos indicaran el rango de concentraciones a emplear en este ensayo.

Cuando la concentración empleada produjo cero % de supervivencia en una o en ambas cepas, se realizaron ensayos posteriores con concentraciones menores a fin de establecer el rango óptimo de pruebas.

La figura 19 resume gráficamente el comportamiento de los 4 compuestos antiparasitarios genoletales detectados. Como se puede observar, las gráficas se agrupan en 2 rangos de concentración; el primero pertenece a los 2 compuestos antihelmínticos (pamoato de pirvinio y 4-hexilresorcinol) con actividad genoletal a partir de un rango de dosis comprendidas entre $20-30 \times 10^{-9}$ moles/caja.

ENSAYO DE SUSPENSION LIQUIDA
E. coli (COMPUESTOS GENOLETALES)

TABLA NO. 8

COMPUESTOS DE PRUEBA PAMDATO DE PIRVINIO moles/20µl solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Indice de Superv. EXPERIMENTO	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		1	2
DMSO 20 µl	253	18	281	194	100	100	100	100	1.00	1.00
17.4x10 ⁻⁹	183	143	204	154	72	76.7	72.4	79.6	0.93	0.91
34.7x10 ⁻⁹	131	131	137	143	50	70.0	48.80	73.9	0.74	0.66
52.1x10 ⁻⁹	87	123	65	116	32.9	66.0	23.1	60.0	0.49	0.39
69.5x10 ⁻⁹	64	128	55	114	25.4	68.6	19.5	58.9	0.36	0.33
86.8x10 ⁻⁹	37	124	34	104	14.7	66.5	11.9	53.8	0.22	0.22

(COMPUESTOS GENOLETALES)

TABLA NO. 9

DIIDODHIDROXIQUI- NOLINA moles/20µg solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Índice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
DMSO 20 µl	281	194	250	152	100	100	100	100	1.00	1.00
101x10 ⁻⁹	202	129	185	103	71.7	66.7	73.9	67.8	1.08	0.98
151x10 ⁻⁹	145	124	154	120	51.6	64.1	61.5	78.8	0.81	0.78
202x10 ⁻⁹	130	123	115	92	46.3	63.3	46.0	60.5	0.67	0.76
252x10 ⁻⁹	85	97	85	77	30.1	50.0	34.1	50.9	0.60	0.67
303x10 ⁻⁹	44	76	51	56	17.4	39.3	20.2	36.7	0.44	0.55

TABLA NO. 10

(COMPUESTOS GENOLETALES)

HEXILRESORCINOL moles/20µg solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Indice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
DMSO 20 µl	303	193	248	316	100	100	100	100	1.00	1.00
15.4x10 ⁻⁹	200	125	208	200	66.1	64.8	69.8	63.4	1.02	1.10
30.9x10 ⁻⁹	122	115	129	178	40.4	59.4	43.2	56.4	0.68	0.77
41.2x10 ⁻⁹	84	91	87	155	27.7	47.0	29.4	49.00	0.59	0.60
51.5x10 ⁻⁹	35	70	31	107	11.6	36.2	10.3	34.00	0.32	0.30
61.8x10 ⁻⁹	17	47	20	73	5.7	24.6	6.7	23.2	0.23	0.29

ENSAYO DE GENOLETALIDAD EN SUSPENSION LIQUIDA
E. coli (COMPUESTOS GENOLETALES)

TABLA NO. 11

COMPUESTO DE PRUEBA moles/20µl solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Indice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
DEHIDROEMETINA										
H ₂ O 20 µl	663	594	791	965	100	100	100	100	1.00	1.00
62.7x10 ⁻⁹	621	569	727	897	94.0	96.	91.9	93.0	0.98	0.99
125x10 ⁻⁹	464	490	630	882	70.0	82.4	79.7	91.4	0.85	0.87
167x10 ⁻⁹	41	48	50	875	6.0	8.0	6.4	18.1	0.45	0.35
250x10 ⁻⁹	7.0	31	19	95	1.1	5.2	2.4	9.9	0.21	0.25

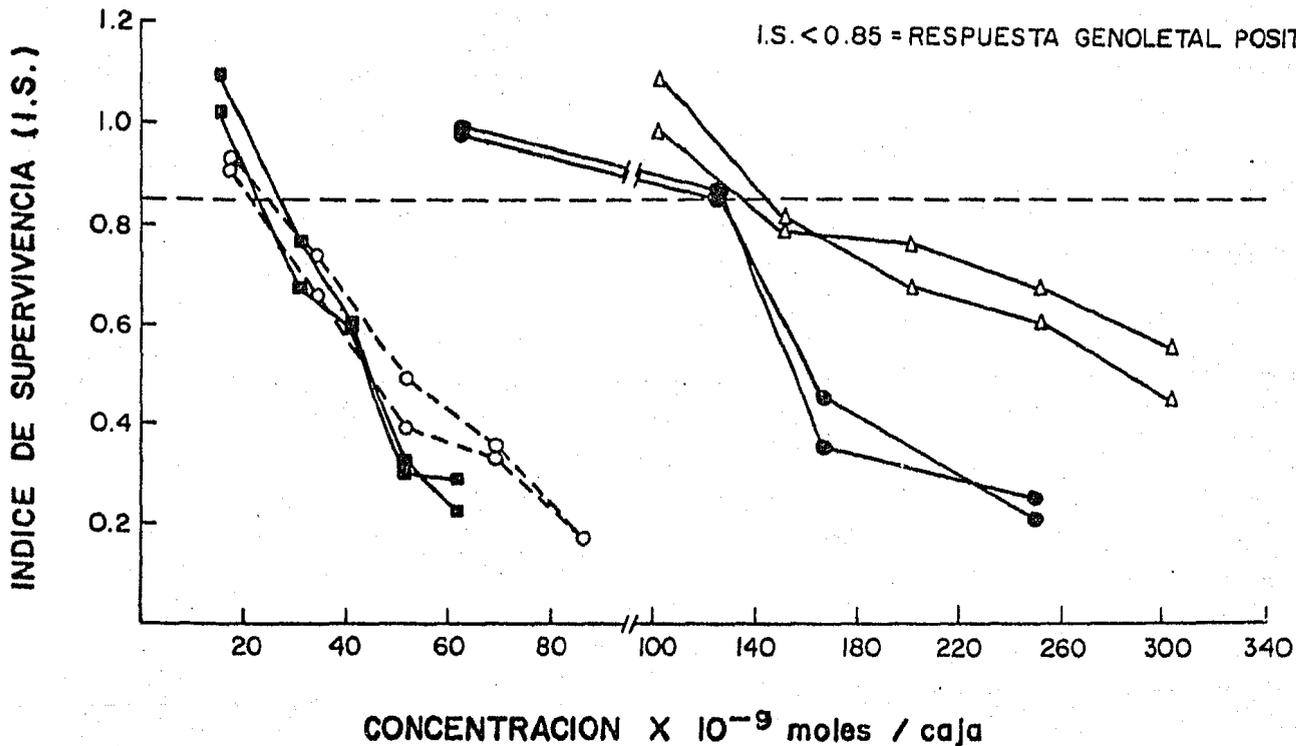
EFEECTO GEMOLETAL DE COMPUESTOS ANTIAMEBIANTES Y ANTIHELMINTICOS

EN EL SISTEMA DE PRUEBA $polA_1^- / polA^+$ de E. coli.

ENSAYO EN SUSPENSION LIQUIDA.

- --- ○ PAMOATO DE PIRVINIO.
- — ■ 4 - HEXILRESORCINOL.
- △ — △ DIODOHIDROXIQUINOLINA.
- — ● DEHIDROEMETINA.

I.S. < 0.85 = RESPUESTA GEMOLETAL POSITIVA



El segundo grupo está constituido por 2 compuestos antiacidobianos (dehidrohematina y diyodohidroxiquinolina) que presentan actividad genoletal a partir de dosis comprendidas entre $125-150 \times 10^{-9}$ moles/caja.

En las tablas 12 a la 14, se muestra a aquellos compuestos que no produjeron I.S. menor a 0.85; entre éstos, el hidroxinaftoato de beferio y la niclosamida caen dentro del rango de genotoxicidad dudosa. El pamoato de pirantel y el mebendazol, son dos compuestos que claramente mostraron en este ensayo, carecer de actividad genoletal. Los 4 compuestos anteriores son fármacos antihelmínticos. Los resultados gráficos de estos datos, se pueden ver en la figura 20.

La iodoclorohidroxiquinolina (tabla 14) es un caso muy particular, puesto que los I.S. son por mucho, mayores a 1.00 (fig. 21), lo que indica una mayor sensibilidad de las bacterias que sí reparan, comparadas con las deficientes en reparación.

El difosfato de cloroquina fué el único compuesto que no se probó en este método, debido a que al ensayarse en M.S.A. con y sin activación metabólica y en el ensayo de difusión en agar sin activación, se encontró respuesta genoletal, decidiéndose ya no ensayarse en el de suspensión líquida (E.S.L.).

En vista de que uno de los objetivos iniciales al utilizar el ensayo de suspensión líquida, era encontrar un método que incluyera activación metabólica, se ensayaron diversas condiciones de prueba con Mezcla S-9, cuyos resultados se encuentran resumidos en las tablas 15 y

(COMPUESTOS "No Genotóxicos")

TABLA NO. 12

HIDROXINAFTOATO DE BENFENIO moles/20µg solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Índice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1+		EXPERIMENTO 2+		EXPERIMENTO 1+		EXPERIMENTO 2+		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
	pol A ₁	pol A ⁺	pol A ₁	pol A ⁺	pol A ₁	pol A ⁺	pol A ₁	pol A ⁺		
DMSO 20 µl	298	316	153	183	100	100	100	100	1.00	1.00
112x10 ⁻⁹	185	197	114	136	62.0	62.5	72.6	74.2	0.99	0.98
168x10 ⁻⁹	137	170	104	127	45.9	53.7	66.5	69.2	0.85	0.96
225x10 ⁻⁹	134	159	94	121	45.0	50.2	58.9	66.3	0.90	0.90
338x10 ⁻⁹	111	136	91	115	37.3	43.0	58.2	62.8	0.87	0.93
451x10 ⁻⁹	88	109	88	115	29.4	34.5	55.8	62.8	0.85	0.89

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD EN SUSPENSIÓN LÍQUIDA (S.S.L.)
E. coli (CONJUNTO NO GENOTÓXICO)

TAHLA NO. 13

COMPUESTO DE PRUEBA moles/20µl solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Índice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 2 pol A ₁ ⁻ pol A ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
<u>ANTIHELMINTICOS</u>										
<u>MEBENDAZOL</u>										
DMSO 20 µl	299	180	414	208	100	100	100	100	1.00	1.00
203.2x10 ⁻⁹	289	167	395	168	96.0	92.0	95.3	80.8	1.04	1.18
<u>NICLOSAMIDA</u>										
DMSO 20 µl	253	187	175	193	100	100	100	100	1.00	1.00
305.6x10 ⁻⁹	208	178	150	184	82.4	94.6	85.4	95.6	0.87	0.89
<u>PAMBATU DE FIRAWTEL</u>										
DMSO 20 µl	210	110	218	117	100	100	100	100	1.00	1.00
1,050.98x10 ⁻⁹	226	108	228	112	107.8	98.9	104.4	96.0	1.09	1.00

EFFECTO GENOLETAL DE COMPUESTOS ANTIAMIBIARIOS Y ANTIHELMINTICOS

EN EL SISTEMA DE PRUEBA $polA_1^- / polA^+$

DE Escherichia coli.

ENSAYO EN SUSPENSION LIQUIDA.

I.S.

I = ZONA DE GENOLETALIDAD DUDOSA (0.85-0.95)

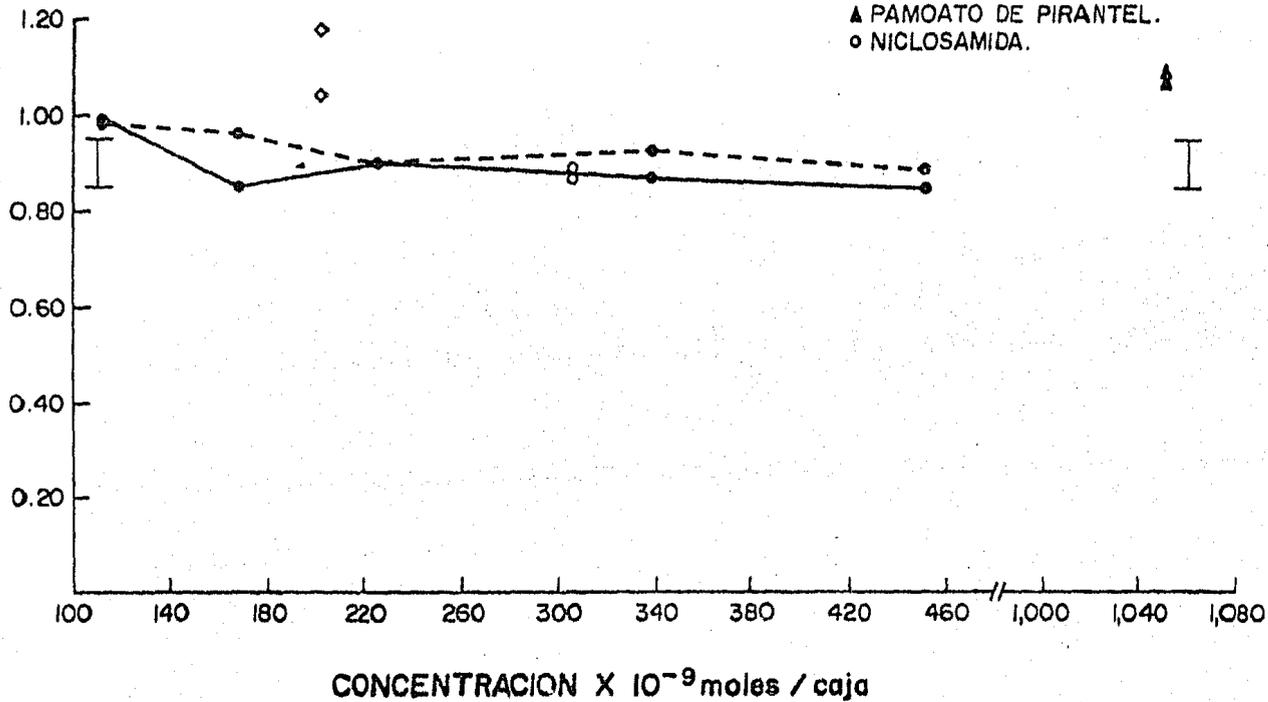
EXP. 1 —●— } HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO.
 EXP. 2 - -●- - }

◇ MEBENDAZOL.

▲ PAMOATO DE PIRANTEL.

○ NICLOSAMIDA.

INDICE DE SUPERVIVENCIA (I.S.)



TAOLA NO. 14

(COMPUESTOS "No Genotóxicos")

YODOCLOROHIDROXI QUINOLINA moles/20µg solvente	Número de colonias/caja (PROMEDIO)				% de Supervivencia				Indice de Superv.	
	EXPERIMENTO 1+		EXPERIMENTO 2+		EXPERIMENTO 1+		EXPERIMENTO 2+		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
	pol A ₁ ⁻	pol A ⁺	pol A ₁ ⁻	pol A ⁺	pol A ₁ ⁻	pol A ⁺	pol A ₁ ⁻	pol A ⁺		
DMSO 20 µl	250	152	157	123	100	100	100	100	1.00	1.00
16.4x10 ⁻⁹	97	24	53	35	38.9	16.0	33.8	19.1	2.43	1.77
32.7x10 ⁻⁹	57	10	27	15	22.9	6.4	17.2	8.4	3.60	2.05
49.1x10 ⁻⁹	38	5	19	5	15.2	3.1	11.9	2.7	4.95	4.35
65.6x10 ⁻⁹	33	3	19	3	13.2	2.1	12.10	1.6	6.03	7.38
98.4x10 ⁻⁹	5	2	4	2	1.9	1.1	2.3	1.1	1.70	2.13

EFFECTO GENOLETAL DE COMPUESTOS ANTIAMIBIARIOS Y ANTIHELMINTICOS
EN EL SISTEMA DE PRUEBA $\text{polA}_1^- / \text{polA}^+$

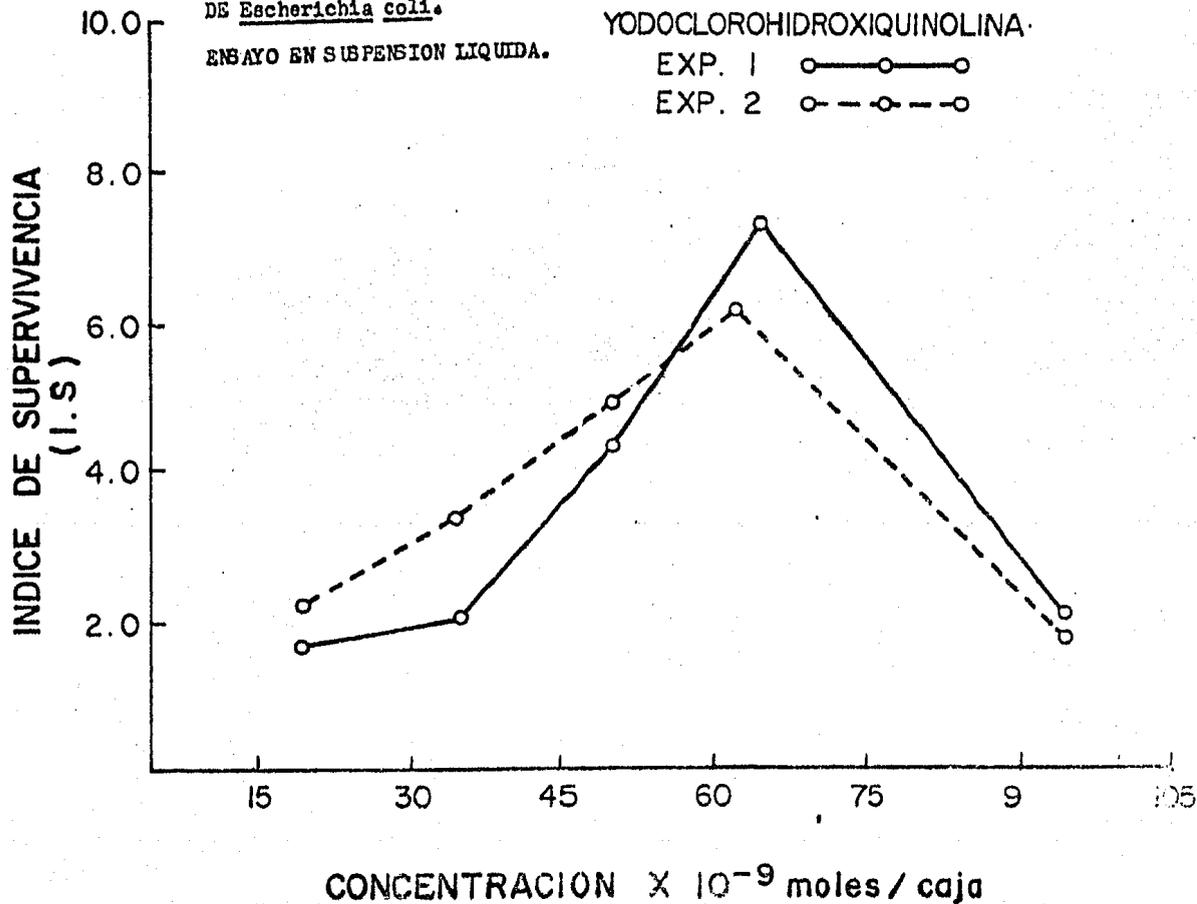
DE Escherichia coli.

ENSAYO EN SUSPENSION LIQUIDA.

YODOCLOROHIDROXIQUINOLINA.

EXP. 1 ○—○—○

EXP. 2 ○-○-○



16.

La primera tabla (Tabla 15), nos muestra el uso de diferentes concentraciones de bacterias, ml de fracción S-9 (homogenado hepático /ml de mezcla de activación; mezcla S-9), ml de mezcla S-9, tiempos de incubación y compuestos pregenotóxicos empleados. No obstante todas estas variables introducidas al método, no se pudo detectar actividad genoletal en ninguna de las dos cepas al usar como testigos positivos, a agentes pregenotóxicos conocidos (2-AF, 2-AA, benzo (a) pireno y ciclofosfamida), que se sabe requieren de activación metabólica para manifestar su acción.

Después de ensayarse las diferentes variantes metodológicas y obtener resultados negativos, se planteó la posibilidad de que las mezclas de activación utilizadas, por alguna razón no estuvieran activando a los compuestos pregenotóxicos y por consiguiente no se produjo daño genoletal. Por tanto se diseñó el experimento de la tabla 16 - (que es igual al ensayo 9 de la tabla 15), en el cual se trabajó simultáneamente con las 2 cepas de E. coli y con una de Salmonella typhimurium la TA 98, que detecta compuestos mutagénicos "frameshift". Este efecto, se identifica por un aumento en el número de las revertantes protótrofas a histidina (his⁻ → his⁺) al adicionar un compuesto mutagénico; en este caso las revertantes espontáneas de la TA 98 fueron 45 colonias/caja, pero en presencia del compuesto pregenotóxico + activación metabólica, éste número se elevó hasta 1,483, dato indicativo de que la mezcla S-9 utilizada sí estaba activando al compuesto pregenotóxico pero que por alguna otra razón no era genoletal en las cepas de E. coli.

TABLA NO. 15

ENSAYO DE GENOLETALIDAD EN SUSPENSION LIQUIDA +S-9 (E.9L + S-9)
E. coli

Bacterica cantidad incubada (ml) ENSAYO	Mezcla S-9 Incubada (μ l)	μ l de Fracción S-9/ml de mez- cla S-9	Cantidad de compuesto o solvente (DMSO) in- cubada.	Tiempo de incu- bación a 37 °C
1.- 1	100	10	2AF 20 μ g/10 μ l	90 min.
		100	2AF 20 μ g/10 μ l	90 min.
2.- 1	100	10	CICLOF 10 μ g/10 μ l	90 min.
		100	CICLOF 10 μ g/10 μ l	90 min.
3.- 1	100	10	2AF 1000 μ g/10 μ l	60 min.
		100	2AF 1000 μ g/10 μ l	60 min.
4.- 1	100	10	Benzo (a)p. 250 μ g/10 μ l	90 y 60 min.
		100	Benzo (a)p. 250 μ g/10 μ l	90 y 60 min.
5.- 0.1	500	20	2AF 10 μ g/10 μ l	90 min.
		200	2AF 10 μ g/10 μ l	90 min.
6.- 0.1	500	20	Benzo (a)p. 265 μ g/10 μ l	90 min.
		200	Benzo (a)p. 265 μ g/10 μ l	90 min.
7.- 0.1	500	20	2AF 100 μ g/20 μ l	90 min.
		200	2AF 100 μ g/20 μ l	90 min.
8.- 0.1	500	20	Benzo (a)p. 25 μ g/20 μ l	90 min.
		200	Benzo (a)p. 25 μ g/20 μ l	90 min.
9.-* 0.1	500	20	2AA 100 μ g/10 μ l	90 min.
		200	2AA 100 μ g/10 μ l	90 min.
10.- 0.1	1	300	2AA 100 μ g/10 μ l	60 min.
	10	300	2AA 100 μ g/10 μ l	60 min.

Las mezclas de activación de los ensayos del 1 al 9 fueron preparadas como indica Ames y col., vaciando solo la cantidad de fracción S-9 según se señala en cada ex- perimento. La mezcla de activación del ensayo 10, fué preparada según Hyman y - col.

En los ensayos del 1 al 4, el término de la incubación se sembraron solamente - 1104//caja para así sembrar una cantidad proporcional de u.f.c. con respecto a - los ensayos restantes.

* Este ensayo se realizó conjuntamente con Salmonella typhimurium. Ver tabla 10.

TODOS LOS ENSAYOS REALIZADOS (1 \rightarrow 10) con E. coli, PRODUCERON I.S. \rightarrow 0.9

TABLA NO. 16
 ENSAYO NO. 9
 EVALUACION DE LA GENOTOXICIDAD DE MUTAGENOS CONOCIDOS
E. Coli y S. Typhimurium EN PRESENCIA DE S-9

Bacteria cantidad incubada (ml)	Mezcla de activación S-9 (µl) incubada	µl de Fracción S-9/ml de mez cla S-9	Cantidad de compuesto o solvente (DMSO) incubada 200µg/10µl	Tiempo de incubación (minutos)	<u>Escherichia</u> <u>coli</u> I.S.	<u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> TA98 No revertinte/caja
0.1	500	0 (Sol. Cof.)	DMSO	90	1.00	45
0.1	500	0 (Sol. Cof.)	2-AA	90	0.97	50
0.1	500	20	DMSO	90	1.00	49
0.1	500	20	2-AA	90	0.95	1,483*
0.1	500	200	DMSO	90	1.00	N.P.
0.1	500	200	2-AA	90	1.09	N.P.

* Para Salmonella typhimurium, se considera una respuesta mutagénica positiva cuando el número de colonias por caja doble al menos, al de las cajas control correspondientes.

Para el ensayo de mutagenicidad de Salmonella typhimurium se utilizaron cajas de M.M.V.8. y bacteria con centrada ($1-2 \times 10^{-8}$ u.f.c./0.1 ml)

N.P. = No probado.

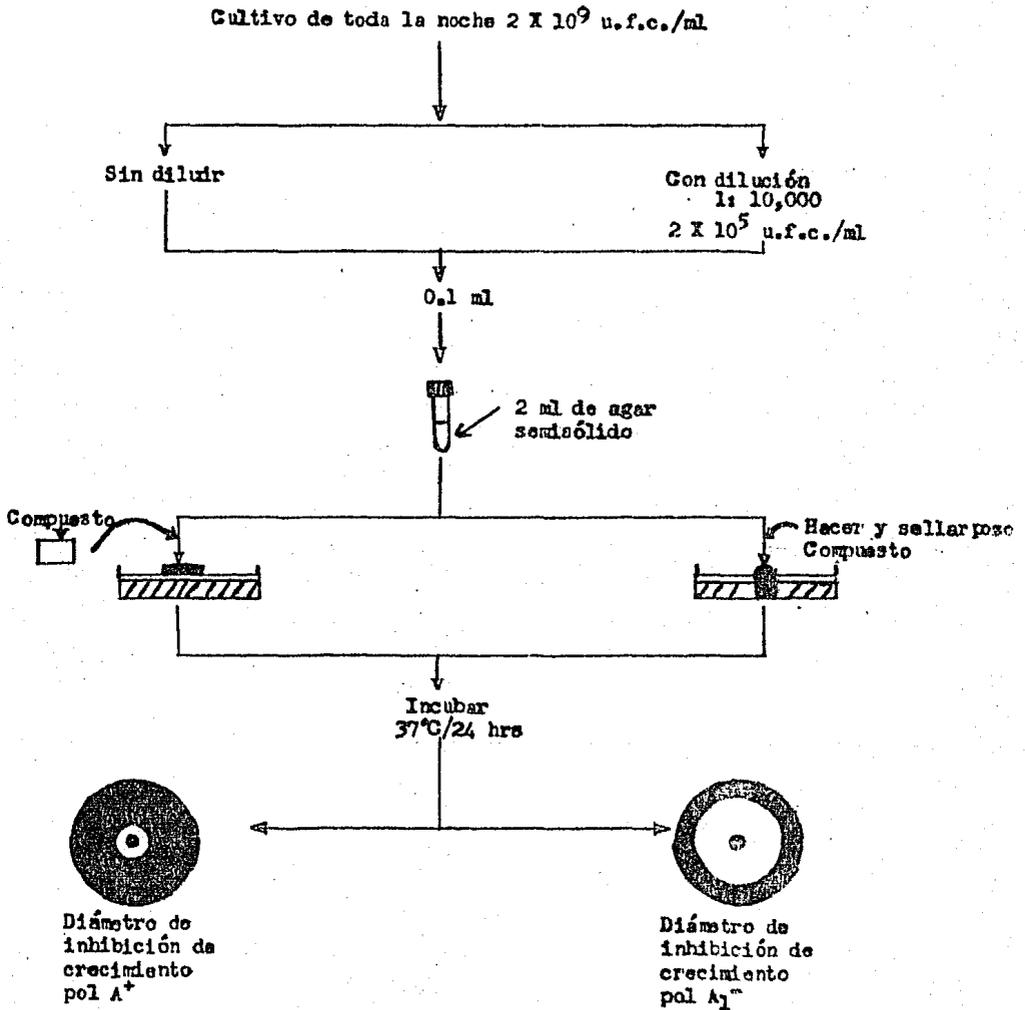
b) Ensayo de Difusión en Agar (E.D.A.) (fig. 22)

Este método, ya había sido puesto en marcha en un trabajo anterior al nuestro, pero en vista de la necesidad de establecer un ensayo que incluyera activación metabólica, decidimos retomarlo y ensayar - en él, primero sin S-9, a los compuestos antiparasitarios probados en el ensayo en suspensión líquida. Al método de difusión en agar (E.D.A.) original le incorporamos 2 modificaciones con el fin de aumentar su sensibilidad: La primera consistió en sustituir el uso del disco de papel filtro por un pozo, practicado en el centro del agar, con el objeto de aumentar la cantidad del compuesto de prueba de 10 mcl/disco a 100 mcl/pozo. La segunda modificación consistió en utilizar bacterias diluidas 1: 10,000 y no las concentradas; éste cambio estuvo encaminado a dar mayor sensibilidad al ensayo y como se ve en las fotografías 1 al 4, los halos de inhibición de crecimiento generados, son mayores al usar cultivos bacterianos diluidos. Al mismo tiempo se evita la presencia de dobles halos de inhibición de crecimiento, como en el caso del MS, que dificulta generalmente el precisar el diámetro de muerte celular (fotografía 1) (36, 53).

Usando este sistema rápido con S-9 se probaron los 10 compuestos antiparasitarios, encontrándose 3 que en éste ensayo, produjeron halos de inhibición de crecimiento mayores (con un mínimo de 4 mm de diferencia) en la pol A_1^- , con respecto a la pol A^+ . De estos 3 fármacos los 2 antihelmánticos genoletales en el ensayo en suspensión líquida, pamoato de pirvinio y hexilresorcinol, resultaron nuevamente genoletales en el de difusión en agar (tabla 17).

FIGURA 22

PRUEBAS DE GENOLETALIDAD

EN Escherichia coli.ENSAYO DE DIFUSION EN AGAR
(E.D.A.)

ENSAYO DE GENOTIPIEDAD POR DIFUSION EN AGAR (E.D.A.) DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS
EN E. coli

TABLA NO. 17

COMPUESTO	FOZD molesX10 ⁻⁹ /100μl	Diámetro de inh. de crecimiento (mm)				Diferencia de inh. de crec. (mm)	
		EXPERIMENTO 1 por A ₁ ⁻ por A ₁ ⁺		EXPERIMENTO 2 por A ₁ ⁻ por A ₁ ⁺		EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
<u>ANTIAMBIOTICOS</u>							
DIIODOHIDROXI QUINOLINA	5,040	0	0	0	0	N.I.	N.I.
IODOSILOLIDROXI QUINOLINA	5,820	14	16	14	16	-2	-2
DEHIDROEMELINA	6,690	10	9	12	10	1	2
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	4,310	10	6	11	6	4	5
<u>ANTHELMIINTICOS</u>							
HIDROXIRACILATO DE BEFENIO	6,764	7	8	6	7	1	1
HEXILRESORCINOL	15,440	26	16	28	17	10	11
MENENDAZOL	2,030	0	0	0	0	N.I.	N.I.
NICLOSAMIDA	1,530	0	0	0	0	N.I.	N.I.
PAMATO DE PIRANTEL	5,250	0	0	0	0	N.I.	N.I.
PAMATO DE PIRIVHID	4,340	5	0	5	0	5	5

N.I. = Resultado no interpretable.

El difosfato de cloroquina fué detectado como compuesto gené-
letal en esta prueba, dando una diferencia de inhibición de crecimiento
de 4 a 5 mm más en la pol. A_1^- que en la pol. A^+ esta diferencia es prác-
ticamente igual a la del pamoato de pirvinio, solo que el difosfato de
cloroquina fué más tóxico para ambas cepas.

El pamoato de pirvinio, al ser menos tóxico no inhibió el -
crecimiento de la pol. A^+ mientras que el difosfato de cloroquina le --
produjo una inhibición de crecimiento de 6 mm.

En el ensayo de difusión en agar, así como en el de suspen-
sión líquida, la yodoclorohidroxiquinolina (I.Q.) inhibió más el creci-
miento de la cepa pol. A^+ que el de la pol. A_1^- , en este caso la diferen-
cia de inhibición de crecimiento en el ensayo de difusión en agar, dió
un resultado de - 2 mm.

Es así que, sin las 2 modificaciones introducidas al método
de difusión en agar, no hubiera sido posible detectar la acción gené-
letal de estos 3 compuestos, ni la actividad de la yodoclorohidroxiquino-
lina.

Ensayo de Difusión en Agar con S-9 .

Una vez probados los compuestos sin S-9, decidimos realizar
este mismo ensayo con incorporación de activación metabólica. Para esto
se usó una mezcla de activación preparado conforme a Ames y col., que --
se adicionó a los 2 ml de agar junto con la bacteria. Este ensayo es el
recomendado por Rosenkranz y col. para la detección de compuestos pre-
genotóxicos a través del método de difusión en agar (53).

En la tabla 6 se ven los resultados obtenidos con el uso de dos compuestos pregenotóxicos conocidos. En ambos casos no se detectaron halos de inhibición de crecimiento. En este ensayo se utilizan bacterias diluidas 1:10,000 y disco de papel filtro, debido a que no se necesitaron cantidades de estos compuestos tan altas, que requirieran más solvente (> 20 ml) para ensayarse. Las cantidades usadas para el 2-AA y 2-AF fueron mucho mayores a los reportados como genotóxicos por Rosenkranz y col. (53) en vista de que las concentraciones originales habían resultado negativas en ensayos previos realizados en el laboratorio.

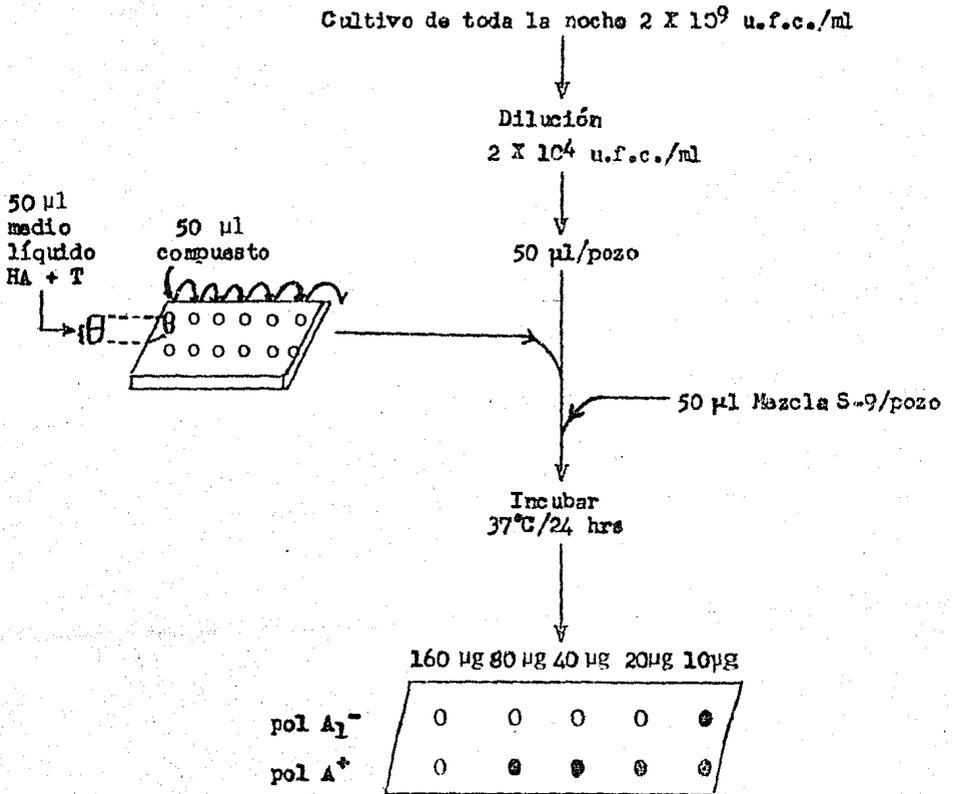
c) Ensayo de Microsuspensión (M.S.A.)

Nuevamente se requirió buscar otro método que permitiera el ensayo de los compuestos pregenotóxicos. En esta ocasión se recurrió al ensayo de microsuspensión reportado por McCarroll y Piper que utiliza microplacas de titulación con aproximadamente 2,000 a 3,000 bacterias/pozo (Fig. 22). En la tabla 18, se muestra claramente la activación de la ciclofosfamida, compuesto que para ejercer su efecto genotóxico requiere de activación metabólica. La mezcla de activación fue preparada según Mc Carroll y solo hubo dos cambios con respecto a la técnica original; en nuestros ensayos utilizamos siempre medio HA + T y no caldo completo, debido a que existen referencias en la literatura (53) que señalan que el uso de medios nutritivos favorece el desarrollo de las mutantes espontáneas por A^+ , entre la población de pol A_1^- con lo cual se puede tener un cultivo con poblaciones mixtas, que no servirían a los propósitos de este ensayo. La segunda modifica

FIGURA 23

PRUEBAS DE GENOTIPIEDAD
EN Escherichia coli.

ENSAYO DE MICROSUSPENSION
(M.S.A.)



G.M.I. pol A⁺ > G.M.I. pol A₁⁻

TABLA 18 ENSAYO DE GENOTETALIDAD EN MICROSUBPENSIÓN EN *Escherichia coli*.

COMPUESTO	EXPERIMENTO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA				POZOS DE DIFERENCIA	
		polA ⁻ (S-9)	polA ⁺ (S-9)	polA ⁻ (S-9)	polA ⁺ (S-9)	-(S-9)	+(S-9)
DMSO (SIGMA)	1Q	6.25	12.50	6.25	12.5	1	1
	2Q	6.25	6.25	6.25	12.5	0	1
M.N.N.G. *	1Q	0.09	1.5	-	-	4(+)	-
	2Q	0.05	0.75	-	-	4(+)	-
CLORANFENICOL	1Q	0.13	0.13	-	-	0	-
	2Q	0.13	0.13	-	-	0	-
CICLOFOSFAMIDA (§)	1Q	2 24	2 24	7	2 24	0	5(+)
	2Q	2 24	2 24	7	4 47	0	6
ANTIAMIIBIANTOS		molesx10 ⁻⁹ /pozo					
DIODOHIDROXIQUI	1Q	78.1	78.1	78.1	158.7	0	1
NOLINA	2Q	78.1	78.1	158.7	314.9	0	1
IODOCLOROHIDROXI	1Q	1.5	3.1	3.1	3.1	1	0
QUINOLINA	2Q	1.5	3.1	3.1	3.1	1	0
DEHIDROEMETINA	1Q	417.9	417.9	417.9	417.9	0	0
	2Q	417.9	417.9	417.9	417.9	0	0
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	1Q	21.3	337.3	0.33	337.3	4(+)	10(+)
	2Q	21.3	337.3	0.33	337.3	4(+)	10(+)
ANTIHELMINTICOS		molesx10 ⁻⁹ /pozo					
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO	1Q	281.8	281.8	140.9	281.8	0	1
	2Q	281.8	281.8	281.8	281.8	0	0
HEXILRESORCINDL	1Q	25.7	51.5	51.5	51.5	1	0
	2Q	25.7	51.5	51.5	51.5	1	0
MEBENDAZOL	1Q	253.9	253.9	253.9	253.9	0	0
	2Q	253.9	253.9	128.7	253.9	0	1
NICLOSAMIDA	1Q	596.1	596.1	596.1	596.1	0	0
	2Q	596.1	596.1	596.1	596.1	0	0
P. PIRANTEL	1Q	327.9	327.9	657.5	657.5	0	0
	2Q	327.9	327.9	657.5	657.5	0	0
P. PIRVINIO	1Q	4.3	135.5	17.4	135.5	5	3
	2Q	4.3	135.5	17.4	135.5	5	3

(§) = Disuelto en DMSO

* = El EMS no fué usado como control (+), por presentar una C.M.I. de 400 µg/pozo para polA⁻ y 800 µg/pozo para polA⁺ es decir, 1 pozo de diferencia.
Ref. (Mc. Carrol)

(+) = Se considera como respuesta genotetal positiva cuando existen 2 ó más pozos de diferencia a favor de la polA⁺ (polA⁺ - polA⁻).

ción consistió en añadir al final del tiempo de incubación de la placa 10 ml/pozo de una solución de púrpura de bromocresol, que es un indicador de pH, para facilitar así la diferenciación de los pozos con crecimiento bacteriano de aquellos en los que no lo hubo. Lo anterior es principalmente útil en el caso de aquellos compuestos que precipitan en el fondo del pozo y no permiten determinar la presencia de crecimiento (identificado por la formación de turbidez en el medio y de un botón de bacterias en el fondo del pozo). De hecho, la sola adición de S-9 causa turbidez al medio. Por lo tanto, para cada compuesto nos aseguramos de que por sí solo no fuera capaz de virar el color del indicador. El medio HA + T es en realidad una solución amortiguadora con requerimientos mínimos para el crecimiento y con un pH de 7.4; en estas condiciones, el púrpura de bromocresol da una coloración azul rey intensa. En cambio, cuando las bacterias crecen en el medio y utilizan la glucosa como fuente de carbohidratos, los productos metabólicos generados en la fermentación, disminuyen el pH del medio por debajo de 5.5 con lo cual el color observado es un verde-amarillento, claramente distinguible del azul rey.

En cada ensayo en la misma placa se corrieron en distintos pozos controles positivos (MNND o MS6 sin S-9 y ciclofosfamida o diclorhidrato de quinacrina +/- S-9).

En el ensayo de microsuspensión (M.S.A.) se determina la concentración mínima del compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria. Se considera como respuesta genotóxica positiva, cuando la C.M.I. (Concentración Mínima Inhibitoria) de la pol A⁺ es 2 μ g

cos mayor que la de la pol A_1^- , es decir la C.M.I debe ser por lo menos 4 veces mayor en la cepa con actividad de reparación normal, que en la de la cepa deficiente (37).

Por éste ensayo, sólo 2 compuestos resultaron genotetales con y sin S-9, el difosfato de cloroquina (DFC) y el pamoato de pirvinio (P. Pirv.). El primero resultó ser más genotetal en presencia de activación metabólica (S-9), que en ausencia de la misma, dando con S-9 10 pozos de diferencia entre la concentración mínima inhibitoria (C.M. I.) de la pol A^+ — pol A_1^- . Sin S-9 sólo hay 4 pozos de diferencia. El pamoato de pirvinio contrariamente al difosfato de cloroquina en presencia de S-9, disminuyó su genotetalidad en 2 pozos. Sin activación resultó una diferencia de 5 pozos mientras que con S-9 sólo se van 3 pozos (tabla 18).

Todos los resultados obtenidos en los distintos ensayos con *Escherichia coli*, se resumen en la tabla 19, el proceso histórico en la figura 23 y las ventajas y desventajas de dichos ensayos en la tabla 20.

TABLA 19

EFFECTO GENOLETAL DE MEDICAMENTOS
ANTIAMIBIANTOS Y ANTIHELMINTICOS
EN EL SISTEMA DE PRUEBA

Escherichia coli $po1A^-/po1A^+$

COMPUESTO	ENSAYO DE SUSPEN- SION LIQUIDA	ENSAYO DE DIFU- SION EN AGAR	ENSAYO DE MICROSUS- PENSION (M.S.A.)	
			-(S-9)	+(S-9)
<u>ANTIAMIBIANTOS</u>				
DIIODHIDROXI QUINOLINA	+	-	-	-
IODOCLOROHI - DROQUINOLINA	-	-	-	-
DEHIDRODEMETI- NA	+	-	-	-
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	N.P.	+	+	+
<u>ANTIHELMINTICOS</u>				
HIDROXINAFTOR- TO DE BEFENIO	+/-	-	-	-
HEXILRESORCINOL	+	+	-	-
MEBENDAZOL				
NICLOSAMIDA	+/-	-	-	-
PANOTATO DE PI- RANTEL	-	-	-	-
PANOTATO DE PIR- VINIO	+	+	+	+

N.P. = no probado

+ resultado positivo

- resultado negativo

+/- resultado dudoso

FIGURA 23

DIAGRAMA HISTORICO DE LA EVALUACION
DE LA GENOLETALIDAD DE MEDICAMENTOS
ANTIPARASITARIOS EN Escherichia coli

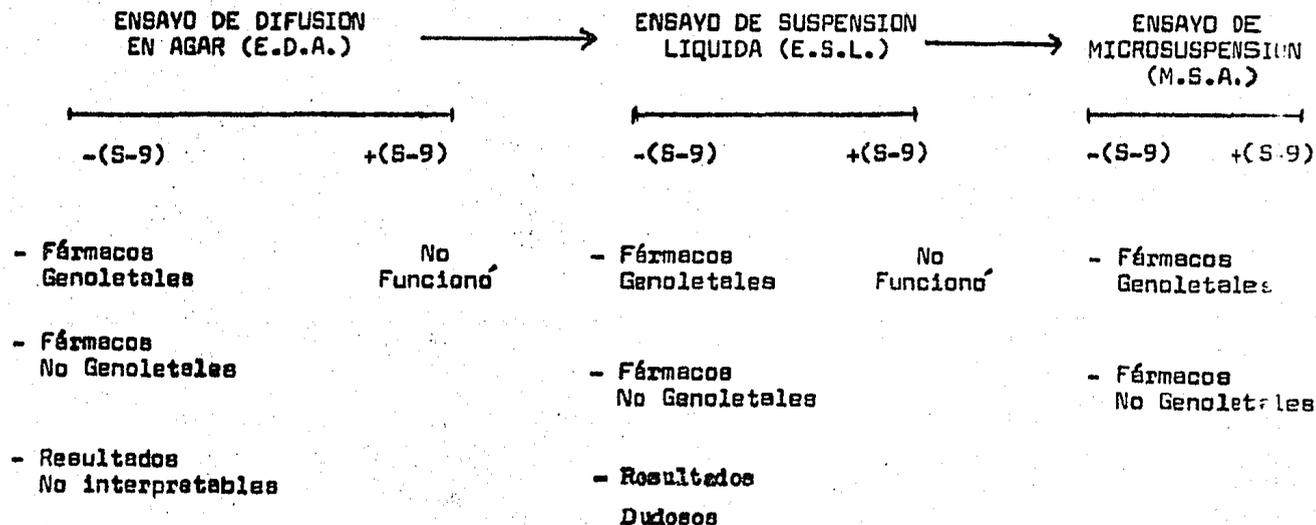


TABLA 20

PRUEBAS DE GENOTIPALIDAD EN Escherichia coli
Ventajas y Desventajas de los Métodos Alternativos

MÉTODOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Difusión en Agar (E.D.A.)	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Rápido (24 hrs.) 2.- Es el más económico 3.- No se requiere conocer la concentración adecuada a probar. 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Solo es cualitativo 2.- Los compuestos no difusibles en Agar, no generan halos de inhibición de crecimiento 3.- No son detectados - compuestos volátiles.
Suspensión líquida (E.S.L.)	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Rápido (24 hrs.) 2.- Es cuantitativo 3.- Detecta compuestos no difusibles en agar 4.- Detecta compuestos volátiles. 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Se requiere determinar el rango de concentraciones a probar. 2.- Es el menos económico.
Microsuspensión (M.S.A.)	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Rápido (24 hrs.) 2.- Es más económico que el E.S.L. 3.- No se requiere conocer la concentración a probar 4.- Detecta compuestos no difusibles en Agar 5.- Detecta compuestos volátiles. 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Es semicuantitativo 2.- Las diluciones del compuesto dejan amplios rangos de concentración entre uno y otro pozo.

Nota: - La pared de E. coli por ser un Gram (-), impide el paso de ciertos compuestos de P.M. elevado.

- Compuestos que dañen al ADN y que requieran de sistemas de reparación - donde no se necesite de Pol I, no podrán ser detectados por ninguno de los tres ensayos de este sistema

Sistema de Bacillus subtilis REC⁺/ REC⁻

1.- Verificación de la Actividad de Reparación por Recombinación en las Cepas H-17 rec⁺ y M-45 rec⁻.

De los 3 métodos alternativos mostrados en las figura 24 a - la 27, el Método Rápido de Estrías y el Ensayo REC con esporas, se pueden usar rutinariamente para verificar el buen estado de las cepas H-17 rec⁺ y M-45 rec⁻.

Los compuestos genoletales, utilizados como controles positivos son la 4-Nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) y la mitomicina C (Mit.C) que inhiben más a la cepa M-45 rec⁻ deficiente en la reparación por recombinación que a su parental H-17 rec⁺, como se aprecia claramente en - la tabla 21.

En este ensayo se ha establecido que para considerar a un com puesto genoletal, debe de existir una diferencia de por lo menos 4 mm - de diámetro en el halo, o zona de inhibición de crecimiento entre una y otra cepa (21, 22).

2.- Genoletalidad de los Fármacos de Prueba.

a) Método Rápido de Estrías.

La tabla 22 nos muestra los resultados obtenidos en el estudio de los 10 fármacos antiparasitarios a través de éste método. Como se puede ver, ninguno de los medicamentos produjo una zona de inhibición de crecimiento mayor a los 4 mm, por tal motivo, se procedió a la obtención de las esporas de ambas cepas como se indica en la sección

FIGURA 24

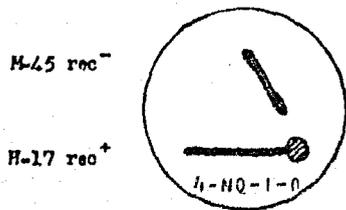
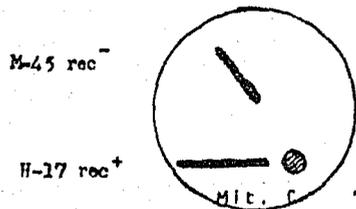
PRUEBAS DE GENOLETALIDAD EN

Bacillus subtilis

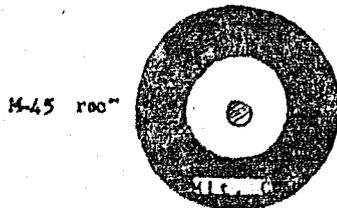
PROTUCOLOS EXPERIMENTALES-

ALTERNATIVOS

Zonas de Inhibición
(longitud de la zona)
cualitativo



Halos de Inhibición
(Diámetro del halo)
cualitativo



Concentración Mínima
Inhibitoria (C.M.I.)
semicuantitativo

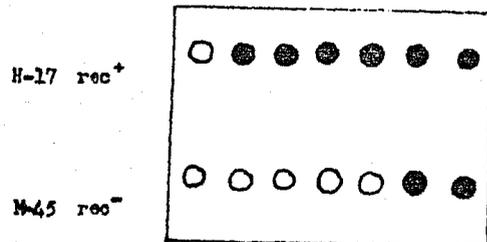


FIGURA 25

PRUEBAS DE GENOTIPALIDAD
EN Bacillus subtilis

METODO RAPIDO
DE ESTRIAS

Cultivo de toda
la noche

o

Esporas
 3×10^7 esp./ml H₂O dest.

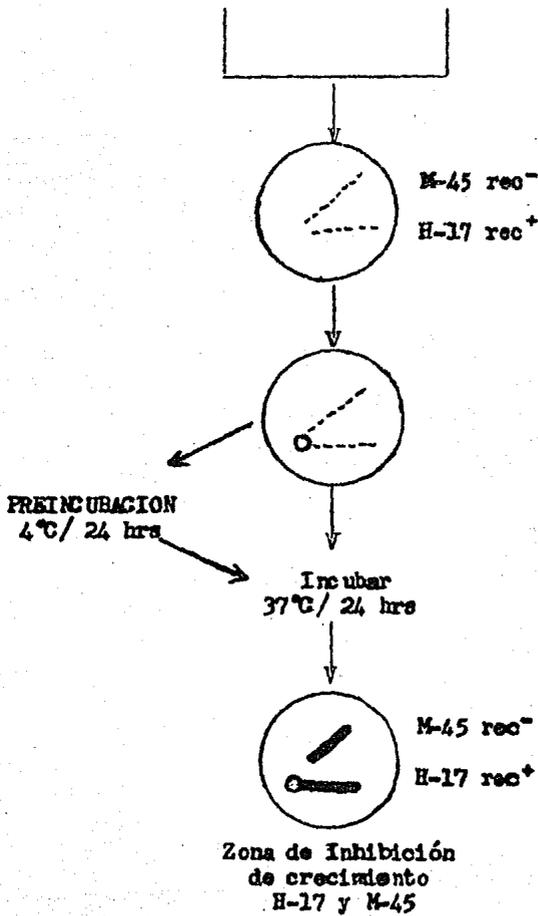


FIGURA 26

PRUEBAS DE GENOLETALIDAD

EN Bacillus subtilis

ENSAYO REC

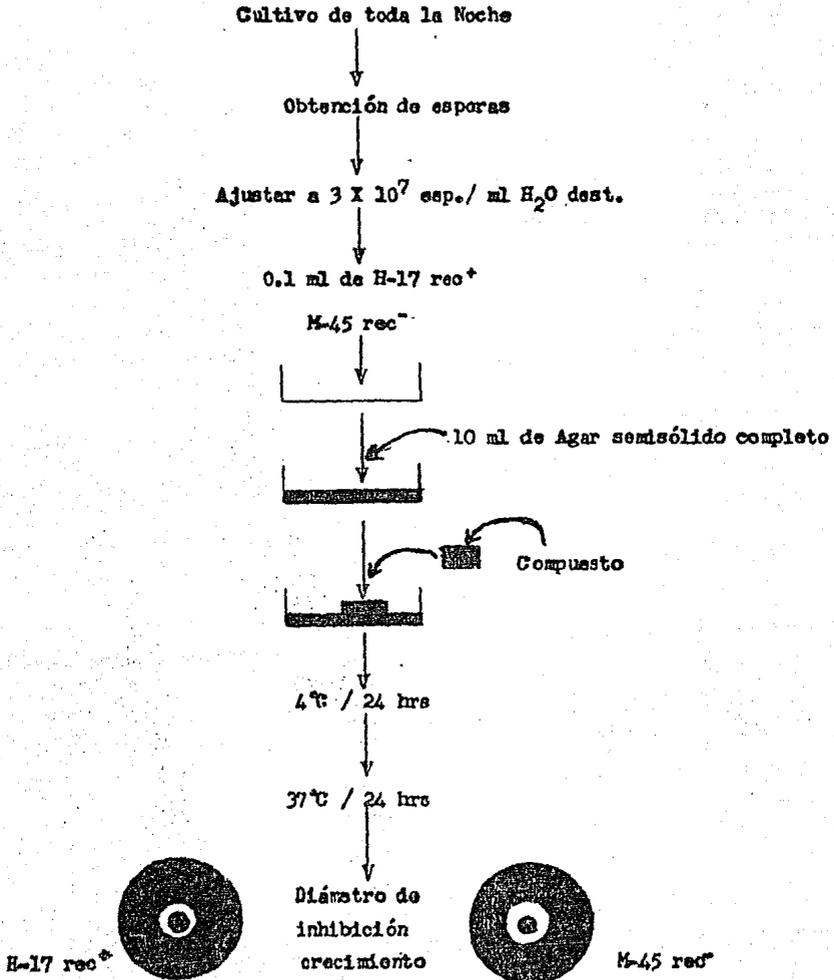
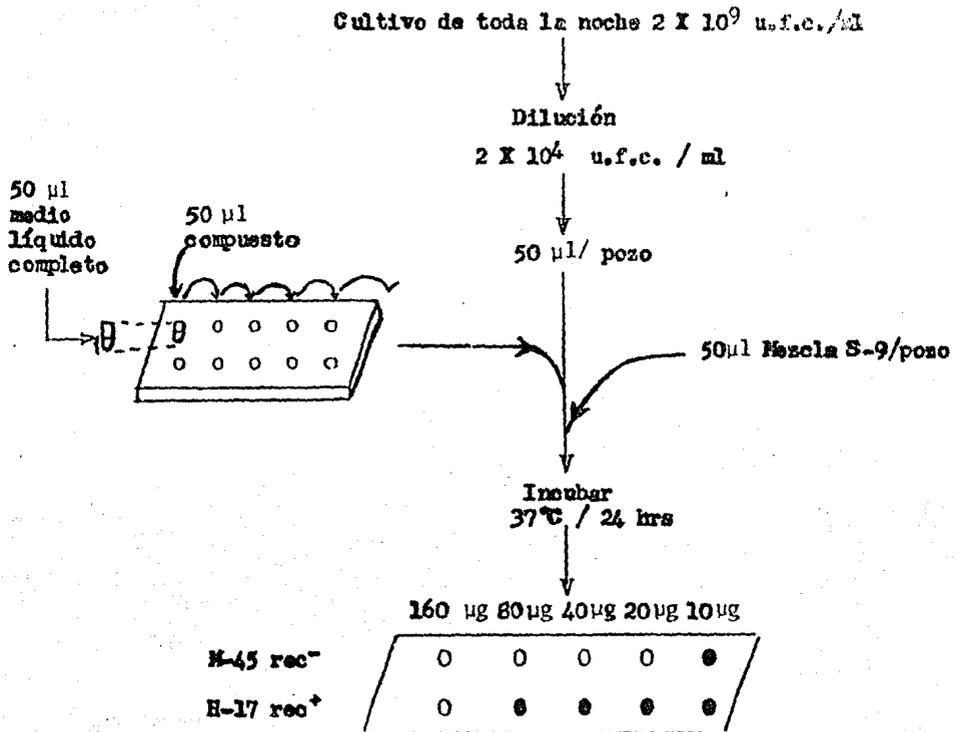


FIGURA 27

PRUEBAS DE GENOTIPALIDAD
EN Bacillus subtilis

ENSAYO DE MICROSUSPENSION
(M . S . A .)



C.M.I. H-17 rec⁺ > C.M.I. M-45 rec⁻

TABLA 21

 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE GENOLETALIDAD DE MEDICAMENTOS
 ANTIPARASITARIOS EN Bacillus subtilis.

COMPUESTO	µg/20 µl	METODO RAPIDO DE ESTRIAS			Activa. Metab. S-9	ENSAYO REC					
		zona de inh. de crec. en mm.				Diámetro de inhibición de crecimiento (mm)			ESPORAS		
		H-17	M-45	Dif.		H-17	M-45	Dif.	H-17	M-45	Dif.
H ₂ O	20	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	0	0	N.I.
DMSO	20	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	0	0	N.I.
4-NQO	2x10 ⁻¹	4	12	8(+)	-	1	3	2(-)	7	16	9(+)
Mit. C	2x10 ⁻¹	6	15	9(+)	-	11	22	11(+)	14	25	11(+)
2-AF	100				+	0	0	N.I.	0	0	N.I.
2-AA	200				+	0	0	N.I.	0	0	N.I.
Benzo[a] Pireno	100				+	0	0	N.I.	0	0	N.I.
Ciclofop famido	500				+	0	0	N.I.	0	0	N.I.

(+) = Compuesto genoletal. Diferencia ≥ 4 mm.

TABLA 22

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE GENOTETALIDAD DE
MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS EN *Aspilus subtilis*

COMPUESTO DE PRUEBA	moles/20 µl	METODO RAPIDO DE ESTRIAS			Activa. Metab. S-9	ENSAJO REC					
		zona de inh. de crec. en mm.				Diámetro de inhibición de crecimiento (mm)					
		H-17	M-45	Dif.		BACTERIAS			ESPORAS		
				H-17	M-45	Dif.	H-17	M-45	Dif.		
ANTIAMIBIANTOS											
DEHIDROEMETINA	1,337x10 ⁻⁹	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	5	7	2(-)
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	8,615x10 ⁻⁹	0	1	1	-	6	8	2(-)	44	30	-14(?)
DIODDHIROXI- QUINOLINA	1,001x10 ⁻⁹	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	3	4	1(-)
IODOCLOROHI- DROXIQUINOLINA	1,964x10 ⁻⁹	0	0	N.I.	-	7	9	2(-)	7	7	0(-)
ANTIHELMINTICOS											
HIDROXINAFTOATO DE BEFEND	902x10 ⁻⁹	0	0	N.I.	-	2	2	0(-)	1	1	0(-)
HEXILRESORCINOL	3,088x10 ⁻⁹	10	12	2	-	20	20	0(-)	23	24	1(-)
MEBENDAZOL	406x10 ⁻⁹	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	0	0	N.I.
NICLOSAMIDA	306x10 ⁻⁹	9 y 12	12 y 13	3 y 1	-	14	17	3(-)	21y22	25y24	4(+) y 2(-)
PAMOATO DE PIRVINIO	869x10 ⁻⁹	2	3	1	-	2	3	1(-)	11	11	0(-)

TADLA 22 continuación

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE GENOLETALIDAD DE
MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS EN Bacillus subtilis

COMPUESTO DE PRUEBA	moles/20 µl	METODO RAPIDO DE ESTRIAS			Activa. Metab. S-9	ENSAYO REC					
		zona de inh. de crec. en mm.				Diámetro de inhibición de crecimiento (mm)			ESPORAS		
		H-17	M-45	Dif.		H-17	M-45	Dif.	H-17	M-45	Dif.
PAMATO DE PIRANTEL	$1,076 \times 10^{-9}$	0	0	N.I.	-	0	0	N.I.	0	5	5(+)
	µg/20 µl										
FURAZOLIDONA	200	20	22	2	-	13	15	2(-)	25	32	7(+)

N.I. = Resultado No Interpretable.

(-) = Compuesto No Genoletal: Diferencia menor a 4 mm.

(+) = Compuesto Genoletal: Diferencia menor o igual a 4 mm.

(?) = Resultado No Esperado.

de material y métodos, para la realización del ensayo REC.

b) Ensayo REC.

Este ensayo se practicó primeramente con células vegetativas, mientras se esperaba el tiempo de esporulación de ambas cepas de Bacillus subtilis, en cajas con medio modificado de Sheaffer. La misma tabla 22 muestra que el presente método con bacterias no es adecuado para detectar a ningún compuesto genoletal, pero a diferencia del Método Rápido de Estrias, aquí la yodoclorohidroxiquinolina, el difosfato de cloroquina, el hidroxinaftoato de bifenilo, el hexilresorcinol y la niclosamida exhibieron actividad tóxica, apreciándose halos de inhibición de crecimiento en ambas cepas mayores a los registrados en el primer método ensayado.

Cuando se tuvieron las esporas listas y ajustadas a una concentración de 3×10^7 esporas/ml de H₂O destilada, el Ensayo REC se llevó a cabo con ellas, obteniéndose los resultados indicados en la misma tabla. Como puede observarse el pamoato de pirantel produjo una diferencia de 5 mm de diámetro de inhibición de crecimiento, mientras que con la niclosamida en un primer experimento se obtuvo la mínima diferencia genoletal y en el segundo solo se tuvieron 2 mm de diferencia. Así como en el caso del pamoato de pirvinio, se observó también con el hexilresorcinol, la diyodohidroxiquinolina y la dehidroemstina, un efecto tóxico mayor en el Ensayo REC con esporas, que el observado en el mismo ensayo pero con bacterias; dicho efecto es visto como una mayor inhibición de crecimiento en ambas cepas, pero con ausencia de genoletalidad.

El hidroxinaftoato de bafenio, produjo prácticamente la misma toxicidad en el Ensayo REC con esporas, que con el uso de células vegetativas, mientras que el mebendazol no generó halos de inhibición en ninguna de las 3 pruebas realizadas.

El difosfato de cloroquina fué muy tóxico para ambas cepas a través de este método, pero lo más llamativo es la presencia de una mayor letalidad sobre la H-17 rec⁺ que en la M-45 rec⁻.

Para verificar la presencia de la actividad genoletal en el Ensayo REC, se debe obtener una relación lineal dosis-respuesta es decir, el halo de inhibición de crecimiento en cada cepa deberá ser proporcional a la concentración aplicada; por tanto la diferencia de inhibición de crecimiento entre M-45 y H-17 tenderá a mantenerse constante, hasta el momento en que la inhibición de crecimiento en la H-17 sea cero.

Junto con las curvas dosis-respuesta del pamato de pirantel, niclosamida y difosfato de cloroquina, se hicieron las de mitomicina C (testigo +) y furazolidona, que en el Ensayo REC + esporas resultaron también genoletales. La furazolidona es un compuesto antiparasitario, reportado como genotóxico en la literatura (9,35) por lo que se decidió probar en este ensayo en forma adicional (tabla 23).

El análisis de las relaciones dosis-respuesta obtenidas con la mitomicina C y furazolidona, confirmaron la actividad genoletal de estos compuestos, como se puede observar por la persistencia de la diferencia en los halos de inhibición de crecimiento de 10 mm de diámetro

TABLA 23

RELACIONES DOSIS - RESPUESTA
 OBTENIDAS EN EL ENSAYO DE GENOLETALIDAD
 DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS EN ESPORAS DE Bacillus subtilis

CONCENTRACIONES	DIAMETRO DE INHIBICION DE CRECIMIENTO.		DIFERENCIA INTERPRÉT.	
	H-17	M-45		
Mit. C (µg/20µl)				
2×10^{-4}	14	24	+ 10	GENOLETAL
4×10^{-5}	6	17	+ 9	
2×10^{-5}	1	11	+ 10	
4×10^{-6}	0	0	0	
2×10^{-6}	0	0	0	
Furazolidona (µg/20µl)				
2×10^{-1}	29	33	+ 4	GENOLETAL
2×10^{-2}	25	32	+ 7	
2×10^{-3}	17	22	+ 5	
2×10^{-4}	7	11	+ 4	
2×10^{-5}	0	0	0	
Niclosamida (moles $\times 10^{-9}$/20µl)				
306	23	22	- 1	NO GENOLETAL
30.6	19	21	+ 3	(DUDOSO)
3.1	8	10	+ 2	
0.3	0	0	0	
P. Pirantel (moles $\times 10^{-9}$/20µl)				
1 076	0	5	+ 5	GENOLETAL
1 009	0	3	+ 3	
841	0	1	+ 1	
693	0	0	0	
505	0	0	0	
D. Cloroquina (moles $\times 10^{-9}$/20µl)				
8 615	46	31	- 15	?
5 815	36	24	- 12	
3 877	27	19	- 8	
1 938	18	13	- 5	
969	13	10	- 3	

en el caso de la mitomicina C y de 4 a 5 mm en la furazolidona (fig 28).

En el pamoato de pirantel la diferencia en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento, no se mantiene constante como en los resultados de la mitomicina C, al bajar la dosis de prueba, debido a que en la cepa rec⁺ no aparece halo de inhibición a ninguna de las concentraciones utilizadas. Aunque el tamaño del halo es relativamente pequeño en la cepa rec⁻ éste dato es sin embargo repetitivo, lo que es suficiente para indicar actividad genotetal, además de ser mayor de los 4 mm de inhibición de crecimiento requeridos.

Con la niclosamida se repitió el resultado obtenido en el primer experimento (tabla 22) del ensayo RSC + esporas, dando siempre una diferencia menor a los 4 mm de diámetro en el halo de inhibición y por consecuencia se le colocó entre los resultados no genotetales (o dudosos).

El resultado de la relación dosis-respuesta del difosfato de cloroquina fué similar al que aparece en la tabla 22 en el Ensayo RSC - con esporas, siendo notable la mayor inhibición en la cepa H-17 rec⁺ en comparación con la cepa M-45 rec⁻. Observándose además que en la relación dosis-respuesta, la diferencia en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento entre ambas cepas, es menor a medida que disminuye la concentración de difosfato de cloroquina (fig. 29).

Con respecto a los intentos de realizar los ensayos con acti vación metabólica, éstos no fructificaron y en ninguna de las 5 formas empleadas se obtuvo respuesta positiva con compuestos pregenotóxicos co

FIG. 28

EFFECTO GENOTOXICO DE MITOMICINA C Y FURAZOLIDONA

EN EL SISTEMA DE Bacillus subtilis

REC+ / REC-

- + - ● - - - Mit. C M-45 rec-
- - ○ - - - Mit. C H-17 rec+
- ● — — Furazolidona M-45 rec-
- ○ — — Furazolidona H-17 rec+

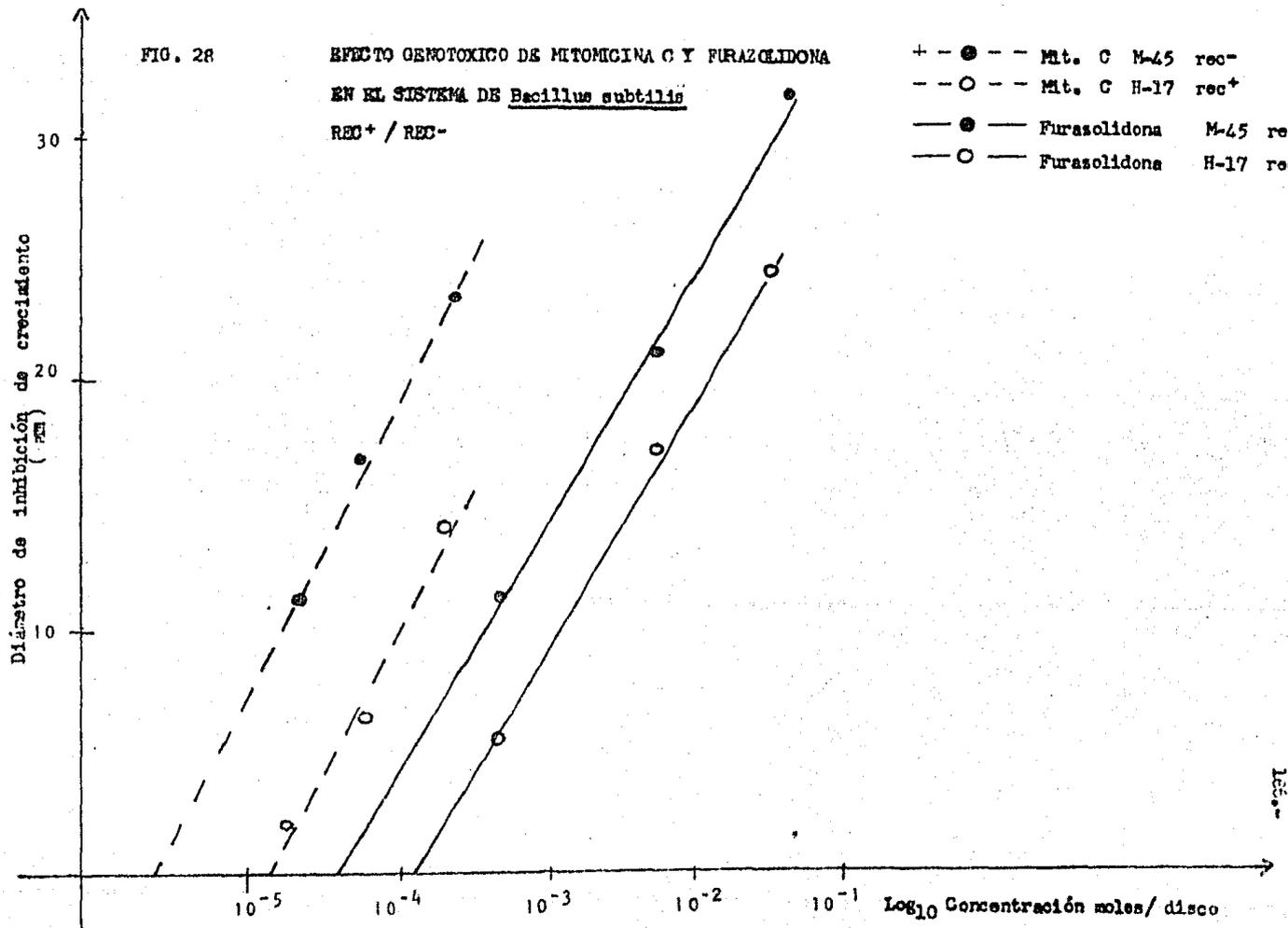
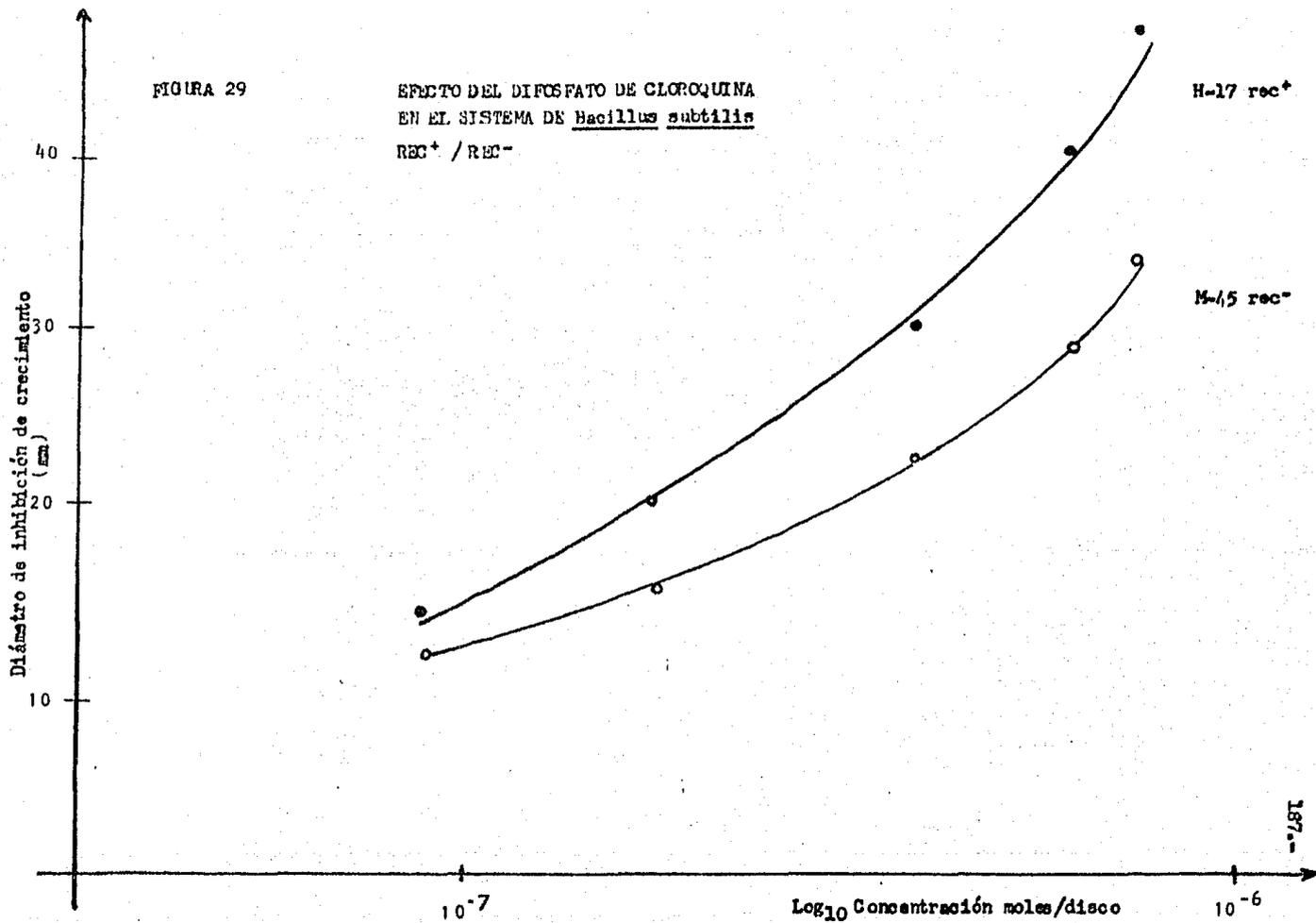


FIGURA 29

EFEECTO DEL DIFOSFATO DE CLOROQUINA
EN EL SISTEMA DE Bacillus subtilis
REC⁺ / REC⁻



nocidos (tabla 21. y ensayos A al E de las tablas 24 → 27).

El ensayo de microsuspensión no permitió detectar la concentración mínima inhibitoria en ambas cepas con ninguno de los controles positivos empleados (mitomicina C, 4-nitroquinolina-1-óxido, sin S-9; ciclofosfamida y benzo [a] pireno con S-9).

El proceso histórico de todos los ensayos empleados en el sistema de Bacillus subtilis REC⁺/ REC⁻, se muestra en la figura 30 y las ventajas y desventajas del mismo, se encuentran enunciadas en la tabla 28. Finalmente, los compuestos antiparasitarios así como las concentraciones detectadas genotales en los sistemas bacterianos utilizados; Escherichia coli y Bacillus subtilis, se encuentran resumidos en la tabla 29 donde se muestra también a los compuestos no genotales y las máximas concentraciones probadas.

TABLA 24 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS EN Bacillus subtilis y Salmonella typhimurium EN PRESENCIA DE S-9

ENSAYO A

COMPUESTO	DISCO µg/20 µl	Mezcla S-9 (0.5ml/caja)	<u>Bacillus subtilis</u> ESPORAS		*TA1535 EFECTO MUTAGE- NICO	<u>Salmonella typhimurium</u>	
			Diámetro de inh. de crec. (mm) H-17	M-45		Inh. de crec. TA 1538 de los rever- tantes alre- dedor del disco.	EFECTO MUTAGE- NICO de los rever- tantes alre- dedor del disco.
H ₂ O	20 µl	+	0	0		no	no
DMSO	20 µl	+	0	0		no	no
2-AA	200	-	0	0		no	no
2-AF	100	-	0	0		no	no
Ciclofosfamida	500	-	0	0		no	no
2-AA	200	+	0	0	+	si	++
2-AF	100	+	0	0			+++
Ciclofosfamida	500	+	0	0	+	no	

* En los resultados de S. typhimurium, el símbolo +, significa respuesta mutagénica positiva, por la presencia de colonias revertantes alrededor del disco, en número mayor al doble del espontáneo (TA1535 = 17 colonias/caja y TA1538 = 32 colonias/caja). En el ensayo con S. typhimurium se usaron cajas de medio sólido M.M.V.B. y agar semisólido al 0.6% de M.M. suplementado con biot.-hist.

Tabla 25

EVALUACION DE LA GENOLETALIDAD DE MUTAGENOS CONOCIDOS
EN Bacillus subtilisENSAYO B

Compuesto	Pozo µg/20 µl	Mezcla S-9 0.1 ml/pozo	ESPORAS	
			Diam. inh. de crec. (mm) H-17	M-45
Benzo (a)pireno	100	+	0	*
2-AF	100	+	0	*

* = Solo crecieron pequeñas colonias de M-45 alrededor del pozo
La cepa H-17 creció normalmente en toda la caja.

ENSAYO C

Compuesto	µg/20 µl	0.3 a 0.5 ml/caja	ESTRIAS DE ESPORAS O BACTERIAS			
			SIN PREINC. A 40C		CON PREINC. A 40C	
			ZONA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO (mm)			
			H-17	M-45	H-17	M-45
2-AA	200	+	0	0	0	0
2-AF	100	+	0	0	0	0
Ciclofosfamida	500	+	0	0	0	0
Benzo (a)pireno	100	+	0	0	0	0

TABLA 26

PREINCUBACION DEL COMPUESTO-MEZCLA ANTIVACION S-9

ENSAYO D

	Pozo µg/pozo	S-9 (1) (2)	ESTRIAS DE ESPORAS		<u>Salmonella typhimurium</u>
			zona de inh. de crec. (mm) H-17	M-45	EFEECTO MUTAGENICO TA1538 (3) (4)
2-AF	500	+	0	0	++
2-AA	200	+	0	0	+
Benzo (a)pireno	200	+	0	0	++

- (1).- Pozo conteniendo 100µl de la mezcla incubada (50µl compuesto + 50µl mezcla S-9 → 20/37°C en un tubo de vidrio estéril).
- (2).- Se usaron dos mezclas S-9 preparadas según Ames y col. La primera con 100µl de Frac - ción S-9 por ml de Mezcla S-9; la segunda con 10 µl de Fracción S-9/ml de mezcla S-9.
- (3).- La cepa TA1538 se sembró en cajas de M.M.V.B. (suplementadas con 0.1 ml de una solución 5 mM de biot/5 mM hist. esparcido en la superficie de la caja) al distribuir 0.1 ml de un cultivo de toda la noche en las cajas, con ayuda de un triángulo de vidrio.
- (4).- El símbolo + indica presencia de colonias revertantes alrededor del pozo, en número ma - yor al doble de espontáneo (respuesta mutagénica positiva).

TABLA 27

EVALUACION COMPARATIVA DE LA GENOTOXICIDAD DE MUTAGENOS CONOCIDOS
EN Bacillus subtilis y Salmonella typhimuriumENSAYO E

Compuesto	DISCO µg/20 µl	FRACCION S-9 POR CAJA (2)	<u>Bacillus subtilis</u> ESPORAS		<u>(3) Salmonella typhimurium</u>			
			de inh. de H-17	de crec. en mm M-45	Medio M.V.B. (4) TA1535	TA100	Medio Completo (5) TA1535	TA100 de inh. de crec. (mm)
2-AA	100	+	0	0	+	+	0	0
2-AF	100	+	0	0				
Benzo (a) pireno (1)	20	+	0	0				

(1).- Para este ensayo el solvente del benzo (a) pireno fué una mezcla DMSO-etanol 1:15.

(2).- Se utilizaron 0.1 ml, 0.3 ml, 0.5 ml, 0.8 ml y 1.0 ml de Fracción S-9/caja de 10 ml de agar semisólido completo al 0.8%.

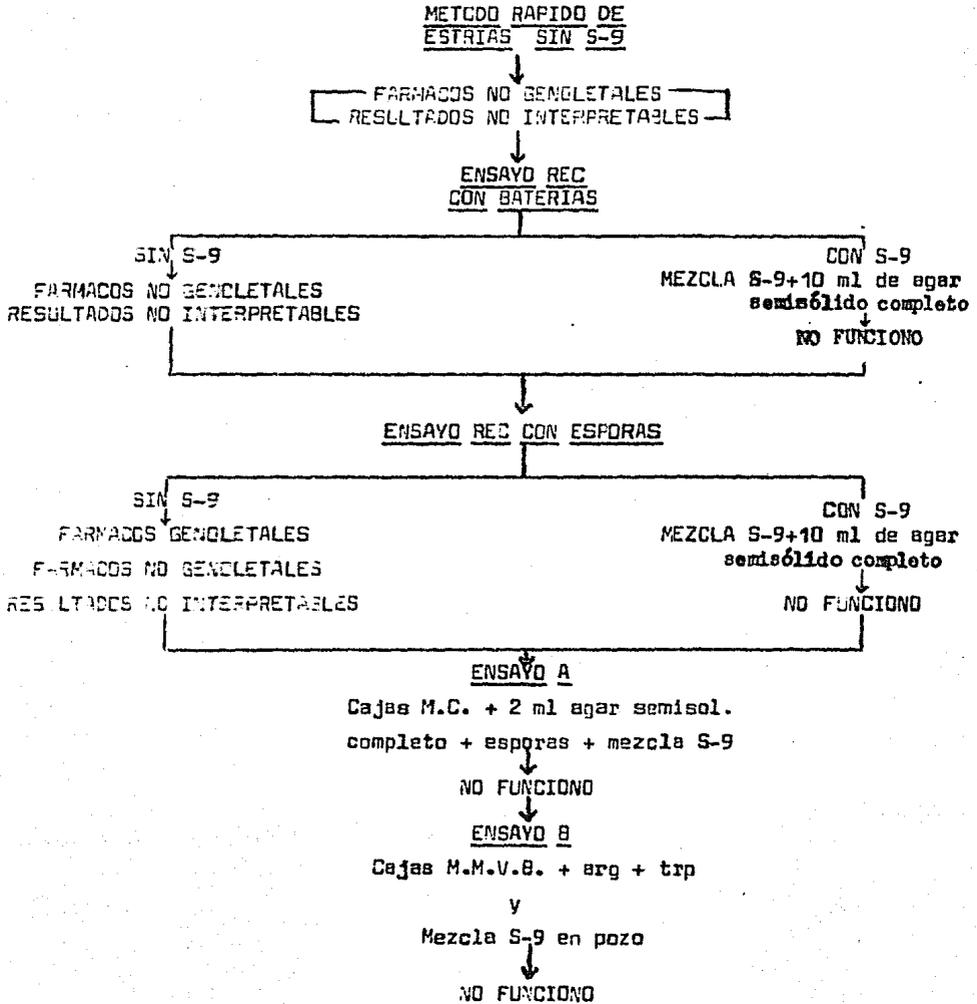
(3).- Para la TA1535 y TA100 la cantidad de Fracción S-9/caja fué de 0.3 ml y 20µl de solución de cofactores/disco. La solución de cofactores se preparó según Kada y col.

(4).- Se utilizó 0.1 ml de bacteria + Fracción S-9 + 2 ml de agar semisólido mínimo suplementado. Las cajas presentaban halo de inh. de crecimiento de colonias mutantes alrededor del disco, pero al observar al microscop. existían las colonias de crecimiento de fondo normales en el "halo de inhibición".

(5).- Se utilizó el mismo protocolo que para B. subtilis.

FIGURA 30

HISTORIA DEL DESARROLLO DE LAS PRUEBAS DE
GENOLETALIDAD EN Sacillus subtilis



continúa

FIGURA 30

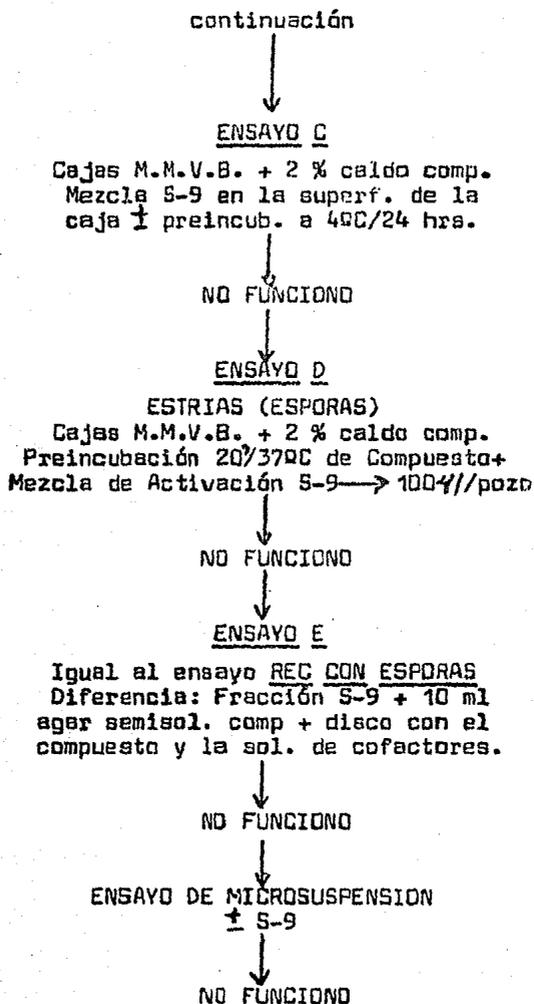


TABLA 28

Pruebas de Genotoxicidad en:

Bacillus subtilis REC⁺/REC⁻

Ventajas y Desventajas de los Métodos Alternativos

METODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Ensayo rápido de Estría	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido - Económico - Muy reproducible - Detecta compuestos Genotóxicos, No activos en otros sistemas de prueba - Utiliza organismos Gram (+) cuya pared celular es simple y por tanto más permeable a compuestos de P.M. elevado en comparación con los organismos de prueba Gram (-) 	<ul style="list-style-type: none"> - Solo detecta compuestos difusibles en Agar. - Es cualitativo. - Identifica únicamente compuestos cuyo daño al ADN se repare a través del mecanismo de recombinación.
Ensayo REC con Esporas	<ul style="list-style-type: none"> - Todas las arriba indicadas. - Más sensible que el Método de Estrías. 	<ul style="list-style-type: none"> - Todas las arriba citadas.

TABLA 29

CONCENTRACIONES UTILIZADAS DE
ANTIAMIBIANTOS Y ANTIHELMINTICOS EN
LOS DOS SISTEMAS DE PRUEBA

E. coli polA⁻/polA⁺ y B. subtilis Rec⁺/Rec⁻

COMPUESTOS GENOLETALES	— <u>Escherichia coli</u> —			<u>Bacillus subtilis</u>
	E.S.L. moles x10 ⁻⁹	E.D.A. molesx10 ⁻⁹	M.S.A. molesx10 ⁻⁹	E.D.A. molesx10 ⁻⁹
<u>ANTIAMIBIANTOS</u>				
DIIDODIHIROXI- QUINOLINA	151-303			
DEHIDROEMOTINA	125-250			
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	N. P.	4,310	1.32* +(S-9)	
<u>ANTIHELMINTICOS</u>				
PAMOATO DE PIRANTEL				1,076
PAMOATO DE PIRVINIO	34.7-86.8	4,340	17.2*	
HEXILREGORCINOL	30.9-61.8	15,440	-(S-9)	
COMPUESTOS NO GENOLETALES				
<u>ANTIAMIBIANTOS</u>				
IODOCLOROHIROXI QUINOLINA	98.2	9,820	1.5 ⁺	1,964
<u>ANTIHELMINTICOS</u>				
MEBENDAZOL	203	2,030	128.7 ⁺	406
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO (§)	451	6,764	140.9 ⁺	902
NICLOSAMIDA (§)	306	1,530	596.1	306

* Calculada a partir de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) para la polA₁⁻, 4 veces mayor = 2 pozos de diferencia mínima.

+ C.M.I. de polA₁⁻ (No Genoletales).

§ Genoletalidad dudosa

DISCUSION

1.- Resultados con Escherichia coli.

El proceso histórico de los diferentes ensayos con E. coli a los que se recurrió en éste estudio, dadas las limitaciones técnicas - encontradas para la evaluación de agentes pregenotóxicos, se puede ver en forma resumida en la figura 18.

Mientras que las figuras 19, 22 y 23 esquematizan de manera general, los 3 tipos de protocolos básicos utilizados.

El sistema de prueba de E. coli con sus 3 ensayos, permitió la detección de 5 compuestos genoletales, 3 de ellos antiambianos y 2 antihelmínticos (tabla 19). El ensayo en suspensión líquida (E.S.L.), detectó 4 de los 5, el ensayo de difusión en agar (E.D.A.) 3 y el ensayo de microsuspensión (M.S.A.) 2. De los 5 compuestos genoletales - sólo el pamoato de pirvinio (p. de piv.) se detectó en los 3 ensayos; el hexilresorcinol (h.r.) y el difosfato de cloroquina (d.f.c.) - en 2. La dihidrohidroxiquinolina (d.i.q.) y la dehidroemstina (d.h.e.) sólo en uno (E.S.L.).

Si en el sistema de Escherichia coli se usaron las mismas cepas bacterianas, ¿por qué no se encontraron los mismos resultados, independientemente del ensayo utilizado?, Para contestar esta pregunta se deben de tomar en consideración las características de cada sistema de prueba (tabla 20). El ensayo de difusión en agar (E.D.A.) por ejemplo, tiene como gran desventaja la necesidad de que el compuesto sea difusible a través del agar para ponerse en contacto con las bacterias. Así,

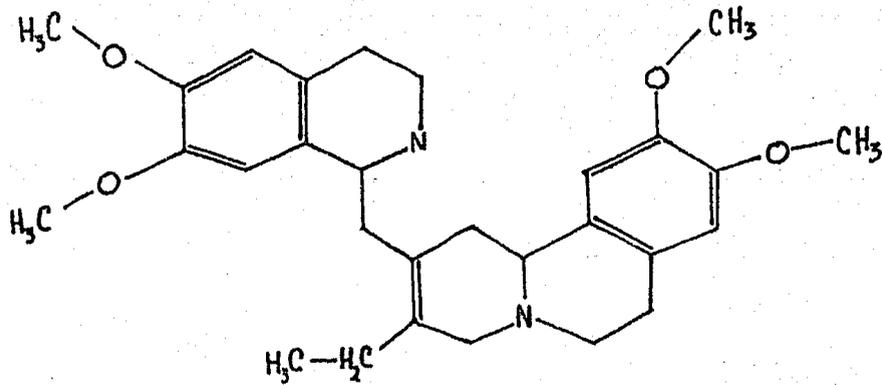
compuestos poco solubles en medio acuoso, volátiles a 37°C, de peso molecular (P.M.) elevado o que reaccionen con algún componente del agar, tienen una alta probabilidad de no ser detectados.

Con relación a lo anterior, la falta de genoletalidad de la dihidrohidroxiquinolina en el ensayo de difusión en agar (E.D.A.), pareciera ser más un problema de solubilidad (ver resultados tabla 17) que de peso molecular elevado o volatibilidad, pues es un compuesto muy hidrofóbico (fig. 31). Por otra parte, la carencia de genoletalidad de la dehidroematina en el ensayo de difusión en agar (E.D.A.) podría deberse a una reacción con algún componente del agar que altera su genoletalidad pero no su toxicidad, pues es difusible en agar y afecta por igual a ambas cepas (tabla 17).

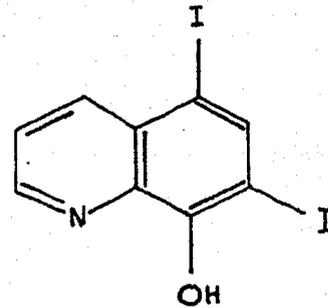
Ahora bien, si los ensayos en suspensión líquida y de microsuspensión son básicamente iguales, (bacterias + compuesto en suspensión); Por qué no se detecta actividad genoletal de los mismos compuestos en uno y otro ? La respuesta puede ser la misma que para la falta de genoletalidad del etil metanosulfonato (E.M.S.; compuesto control positivo en E.D.A. y E.S.L.) en el ensayo de microsuspensión (M.S.A.), en donde se presenta la dificultad de obtener rangos estrechos de concentración (ver pie de figura de la tabla 18). Es así que el hecho de realizar diluciones dobles del compuesto, condiciona un rango amplio de concentraciones; por ejemplo en el caso de la dehidroematina entre el pozo con la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) y el que presenta crecimiento, hay un rango de concentraciones que van desde los 208 a los 417.9×10^{-9} moles/pozo, por lo cual si se hubieran hecho di

COMPUESTOS ANTIAMIBIANOS

FIGURA 31



DEHIDROEMETINA



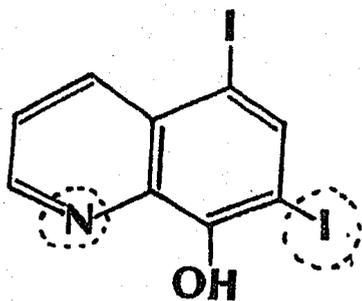
DIIDOHIPOXI-
QUINOLINA

199

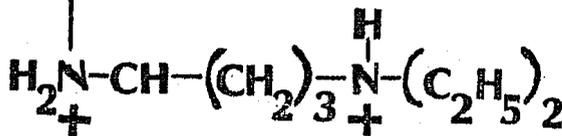
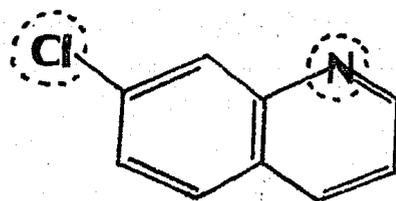
luciones intermedias probablemente se podría haber encontrado diferencia en la respuesta entre pol A_1^- y la pol A^+ .

El difosfato de cloroquina (d.f.c.) fué positivo en el ensayo de microsuspensión (M.S.A.) con y sin activación metabólica, y en el de difusión en agar sin activación. Aún cuando no se probó en el ensayo en suspensión líquida, se piensa que existe una alta probabilidad de que fuera positivo en éste, no sólo porque de los fármacos ensayados en los 3 sistemas, los compuestos positivos en el ensayo de microsuspensión (M.S.A.) y en el de difusión en agar (E.D.A.) lo fueran también en el de suspensión líquida (E.S.L.), sino por el tipo de estructura de éste compuesto que es muy semejante al de la diiodohidroxi quinolina (fig. 32). En efecto, ambos poseen el mismo anillo quinolí nico, además de que el difosfato de cloroquina ha sido encontrado genotóxico en otros sistemas de prueba (pag. 116-117). Lo que no se sabe es, si su genoletalidad en el ensayo de suspensión líquida, podría manifestarse a concentraciones menores que la diiodohidroxiquinolina, por ser un compuesto más soluble que ésta y pudiera así, penetrar más fácilmente en la bacteria. Lo único claro al respecto con el difosfato de cloroquina, es que su toxicidad supera la de la diiodohidroxi quinolina tanto en los ensayos de difusión en agar (tabla 17) y microsuspensión (tabla 18) y, probablemente su efecto genoletal en suspensión líquida se debiera presentar a concentraciones molares menores que ésta. Probablemente por tanto, el efecto genoletal del difosfato de cloroquina al graficarlo en la fig. 19, se encontraría en un rango de concentraciones menores al de la diiodohidroxiquinolina y de la dehidro

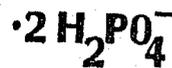
FIGURA 32



DIIDOHIDROXI-
QUINOLINA



DIFOSFATO DE
CLOROQUINA



emetina (compuestos antiambianos).

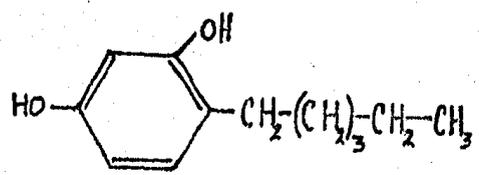
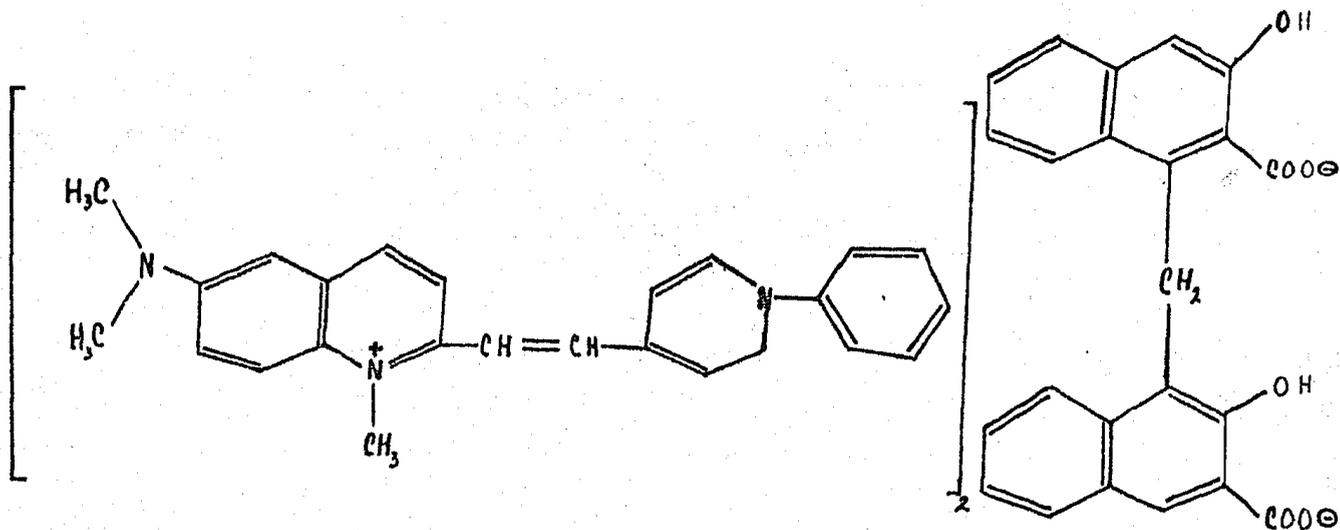
Otros datos que apoyan ésta hipótesis, son los obtenidos en microsuspensión (tabla 18), donde se vé que las concentraciones mínimas inhibitorias (C.M.I.) sin S-9 en pol A⁺, del pamoato de pirvinio y el hexilresorcinol (compuestos antihelmínticos) son menores que las de la diyodohidroxiquinolina y la dehidroemetina (compuestos antiambianinos), dato indicativo de mayor toxicidad de los primeros. En este ensayo, el difosfato de cloroquina (antiambiano) presenta su actividad genotóxica sin S-9, a concentraciones semejantes al hexilresorcinol -- (21.3 y 25.7 X 10⁻⁹ moles/ pozo respectivamente), y con S-9, a concentraciones molares menores aún que las del pamoato de pirvinio (0.33 y 17.4 X 10⁻⁹ moles de difosfato de cloroquina y pamoato de pirvinio/ pozo respectivamente).

Por lo anterior, es muy posible que la agrupación de los compuastos antiambianos y antihelmínticos de la figura 19, es el resultado de la casualidad y no de una relación de tipo estructura-efecto (fig. 31 y 33).

Con relación a la intervención de la activación metabólica - en los compuestos, el difosfato de cloroquina adquiere mayor actividad - en presencia de S-9, a diferencia del pamoato de pirvinio, el cual disminuye su genotoxicidad. Esta menor actividad en el ensayo de microsuspensión en presencia de activación metabólica, se puede deber a que las proteínas presentes en la Mezcla S-9, se unen inespecíficamente a las - moléculas del pamoato de pirvinio y por tanto disminuyen su acción -

FIGURA 33

COMPUESTOS ANTIHELMINTICOS



4-HEXILRESORCINOL

PAMOATO
DE
PIRVINIO .

2331-

genoletal al menguar la proporción de fármaco libre. Otra posibilidad sería la ocurrencia de un efecto metabólico de detoxificación, tras el cual, el metabolito producido presenta menor actividad genoletal.

Los mecanismos posibles de daño al ADN de los compuestos genoletales encontrados, no pueden deducirse directamente de nuestros resultados y sólo sabemos con certeza a partir de la literatura, que el difosfato de cloroquina es un agente intercalante en el ADN y a través de éste mecanismo puede generar daño genotóxico (produce mutaciones frameshift en S. typhimurium ref. 56 ; ver pag 53 agentes intercalantes y pag 61 mutaciones frameshift).

El hexilresorcinol es un compuesto fenólico, de éstos la literatura señala que su mecanismo de daño al ADN, es a través de la producción de radicales libres generados por autooxidación o la acción de otros factores oxidantes presentes en el medio (15).

De la dehidroematina, se sabe sólo que genera mutaciones frameshift (8), lo que aunado a los trabajos de Straisinger sobre compuestos productores de éstas mutaciones (ref. 59 y pag. 53), nos sugiere que este compuesto se puede intercalar y/o apilar en el ADN bacteriano.

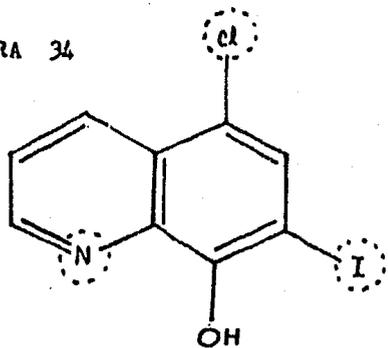
El pantoato de pirvinio, induce tanto mutaciones frameshift como por sustitución de base en S. typhimurium, sin embargo, éstos resultados no permiten sugerir algún camino posible de acción (8).

Como se ha mencionado, sólo de dos de los compuestos (difosfato de cloroquina y dehidroematina) existen datos previos en la lite-

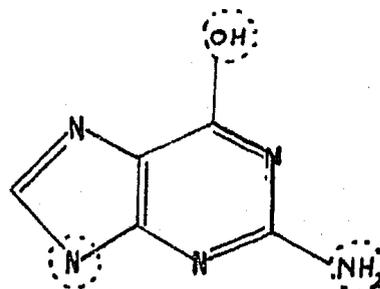
ratura que indican el tipo de daño posible que ocasionan al ADN, responsable de su efecto genotóxico. Actualmente no se conoce en que forma intervenga la reparación por escisión mediado por la polimerasa I (Pol-I), para eliminar éste tipo de lesiones.

El comportamiento de la yodoclorohidroxiquinolina (tabla 14 y fig. 21) en el ensayo en suspensión líquida, resulta aparentemente extraño en vista del mayor daño a la cepa pol A⁺ que repara normalmente, comparado con la pol A₁⁻, que es deficiente en la actividad de reparación mediada por la polimerasa I (Pol I). Este tipo de comportamiento ya ha sido reportado en la literatura (14, 37) donde se encontró una mayor inhibición de la pol A⁺ con compuestos análogos de base que son incorporados al ADN en sustitución de la base original (ver pag. 54 análogos de base). Entre los compuestos que inhiben más a la pol A⁺ que a la cepa deficiente pol A₁⁻, se encuentra a la purina, 5-bromo-, 5-fluoro- y 5-iodo-2'-desoxyuridina. Estos datos, aunados a los de De Lucia y Cairns (10) y a los de la referencia (23) donde se alude a las diferentes capacidades de las polimerasas de reparación y síntesis de ADN para incorporar análogos de base, nos ha llevado a pensar que el comportamiento de la W3110 pol A⁺ frente a la yodoclorohidroxiquinolina, es originado por un error en la discriminación entre éste fármaco y las bases normales del ADN. Si se observa la estructura de la molécula de la yodoclorohidroxiquinolina (fig. 34) y se compara con la de la purina o más específicamente con la guanina, se puede apreciar en efecto, cierta similitud estructural. Por ejemplo, la presencia de una estructura bicíclica plana con grupos sustituyentes en las posiciones 5 y 7 de la

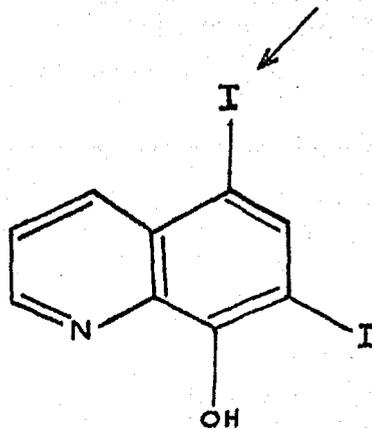
FIGURA 34



**IODOCLOROHIDROXI-
QUINOLINA**



GUANINA



**DIODOHIDROXI-
QUINOLINA**

yodoclorohidroxiquinolina (I.Q.), que corresponde a las posiciones sustituidas 2 y 6 de la guanina, aunado a la presencia de un átomo de nitrógeno en el anillo no sustituido de la yodoclorohidroxiquinolina, que encuentra su equivalente en el N-9 de la guanina.

Así, se plantea la hipótesis de que la polimerasa I no logra discriminar entre el análogo de base (yodoclorohidroxiquinolina) y la base normal (guanina), ocasionando un porcentaje mayor de incorporación de la yodoclorohidroxiquinolina (I.Q.) en sustitución de la guanina (G) en la cepa W3110 pol A⁺, que en su derivado p3478 pol A₁⁻, lo que conduce a su vez a una menor supervivencia de la pol A⁺. La p3478 - pol A₁⁻ al ser deficiente en la actividad de la polimerasa I depende de las polimerasas II y III, para eliminar lesiones del ADN que requieren de la participación del mecanismo de reparación por escisión (ver pag. 78 y 79 Mecanismos de reparación del ADN) y en vista de los resultados experimentales obtenidos, aparentemente Pol II y Pol III discriminan mejor a la guanina de la yodoclorohidroxiquinolina (I.Q.), teniendo ahora un % menor de incorporación de I.Q. en el ADN y en consecuencia mayor sobrevivencia en la pol A₁⁻.

Una forma de comprobar la incorporación de la yodoclorohidroxiquinolina al ADN, sería el desarrollo de un ensayo donde se diera a ambas bacterias una misma exposición a esta molécula marcada radioactivamente y se realizara posteriormente la detección de dicha marca

en el ADN, debida a la incorporación de la yodoclorohidroxiquinolina. Si la hipótesis planteada es cierta deberá encontrarse una mayor cantidad de marca radioactiva en la cepa pol A⁺ que en la pol A₁⁻.

Ahora bien, ¿por qué la diyodohidroxiquinolina y la yodohidroxiquinolina tienen acciones diferentes si son estructuralmente - hablando casi idénticas ? (fig 34). Aunque no se tiene la respuesta a ésta pregunta, una posible explicación podría ser en base a la existencia de un grupo sustituyente diferente; un cloro en lugar de un yodo, que le confiera a la molécula características fisicoquímicas diferentes. Debe hacerse notar que el grupo -Cl ocupa un volumen semejante al - OH de la guanina, a diferencia del - I que es mayor.

2.- Resultados con Bacillus subtilis.

Con respecto a B. subtilis podemos ver en las tablas 21 y 22 que el método más sensible para la detección de compuestos genotóxicos - fué el Ensayo REC con esporas. Con referencia a lo anterior, en la literatura (22) se hace mención al por qué de ésta mayor sensibilidad. - Al incubar esporas en cajas con medio completo, éstas empiezan a germinar y durante este período de tiempo la replicación del ADN es más lenta que cuando se encuentra en estado vegetativo, por consiguiente un compuesto genotóxico puede tener más probabilidad de reaccionar con el ADN y así manifestar su acción genotóxica (22).

Además de la posibilidad anterior, pensamos que en el momento de la germinación puede existir una permeabilidad mayor a los compuestos, en vista de que la espora para germinar, necesita destruir su doble pared celular que la protege y resintetizar una nueva para la fase vegetativa, siendo en éste lapso de tiempo más accesible al paso de los compuestos.

Los dos planteamientos anteriores podrían explicar el efecto letal mayor observado en el Ensayo REC + esporas. Ahora bien ¿por qué el pamoato de pirvinio, el difosfato de cloroquina, la dihidrohidroxiquinolina, el hexilresorcinol y la dehidroematina, fueron genocidas en el ensayo de E. coli pol A⁺ / pol A₁⁻ y en el de B. subtilis Rec⁺/ Rec⁻ no ?

Cierto es que ambos sistemas miden daño genocidal, pero debemos tener en cuenta el mecanismo de reparación involucrado en cada uno de ellos.

Los 5 compuestos arriba citados son genocidas en E. coli y a su vez igualmente son tóxicos para ambas cepas de B. subtilis. El dato anterior nos indica que en B. subtilis por lo menos, los compuestos sí están penetrando en las bacterias. Debemos recordar que la cepa H - 17 y M - 45 son rec⁺ y rec⁻ respectivamente, pero ambas son pol A⁺ y que éstos compuestos afectan más a E. coli pol A₁⁻ que a la pol A⁺. Este resultado implica además que aunque los compuestos afectan al ADN su mecanismo de reparación no requiere de tal paso de recombinación (rec⁺) pero que sí es indispensable la acción de la polimerasa I (Pol I) en la eliminación de éste daño.

La niclosamida al igual que en E. coli, da en B. subtilis un resultado no muy claro de su capacidad genocida, en vista de que se observan valores, que en ciertas concentraciones provocan una diferencia en el halo de inhibición de crecimiento de 3 mm, que es precisamente la frontera de los agentes que no provocan genocidalidad.

El difosfato de cloroquina presenta un comportamiento "anormal" en vista de los halos de inhibición mayores en H-17 rec^+ que en la M-45 rec^- , en el Ensayo REC con esporas (Tablas 22 y 23). La posible explicación de este hecho puede estar en el efecto pleiotrópico de rec A, más que en el mecanismo de reparación por recombinación en sí. - En la tabla 5 pag. 87, se puede observar los diversos fenómenos que se manifiestan por ausencia de la funcionalidad de uno o ambos genes (lexA y recA); entre estos efectos vemos que la característica rec^- produce alteraciones en la permeabilidad celular, aún cuando no sabemos si la aumenta o disminuye. Esta pudiera ser la explicación al efecto registrado en B. subtilis, donde la mutación rec^- disminuye tal vez, el paso del difosfato de cloroquina al interior de la bacteria, temiéndose así una menor muerte de la cepa rec^- que de la rec^+ . En la tabla 23 se ve claramente que la diferencia de inhibición de crecimiento del difosfato de cloroquina, no se mantiene constante como en el caso de los compuestos genoletales mitomicina C y furazolidona, de esta forma el efecto observado con el difosfato de cloroquina sí depende de la concentración utilizada, pues cuando se disminuye ésta, la diferencia entre los halos de inhibición de la H-17 y M-45 tiende a hacerse menor, a diferencia de los compuestos genoletales. Esta dependencia de la concentración puede ser consecuencia de la permeabilidad alterada en la cepa M-45 rec^- .

En el Ensayo REC para detectar compuestos pregenotóxicos con bacterias o esporas (tabla 21), los resultados fueron negativos con el uso de 4 compuestos que se conoce requieren activación metabólica -

(S-9). Por ésta razón, se introdujo una variante al método que lo ha
ce igual al ensayo de difusión en agar para S. typhimurium, donde se ha
visto la actividad genotóxica de los 4 compuestos mencionados, solo que
para B. subtilis se emplean cajas de medio completo y agar semisólido -
también completo (ver pie de figura del ensayo A tabla 24; y sección -
de material y métodos). Este ensayo se corrió conjuntamente con otro e
fectuado en 2 cepas de S. typhimurium: TA 1535 que detecta compuestos
mutagénicos por sustitución de base y la TA 1538 que es sensible a agen
tes mutagénicos frameshift. La tabla 24 muestra que la mezcla de activa
ción empleada fué capaz de activar a los 3 compuestos pregenotóxicos te
niéndose respuesta mutagénica en S. typhimurium, además de zonas de in
hibición de crecimiento entre el disco y la zona de mutantes para el -
2-aminoantraceno (2-AA) y el 2-acetilaminofluoreno (2-AF). Por el con
trario en B. subtilis no se generaron halos de inhibición de crecimen
to. Estos resultados nos llevaron a pensar que posiblemente algún com
ponente del medio completo podría estar interfiriendo con la activación
del compuesto es decir con la Mezcla S-9, o directamente con él. De a
quí surgió la decisión de emplear un medio idéntico al medio Mínimo de
Vogel Bonner empleado en S. typhimurium solo que adicionando arginina
+ triptófano en sustitución de histidina y biotina, por ser los pri
meros, los requerimientos nutricionales de B. subtilis.

Los resultados de este ensayo B (tabla 25), muestran que -
el medio empleado no fué adecuado para el crecimiento de la cepa M-45 -
aunque sí para el de la cepa H-17. Por tal motivo se empleó un medio -
un poco más rico (Ensayo C tabla 25). En esta ocasión se introdujo -

una preincubación a 4°C/24 hrs, pensando que posiblemente otro problema asociado fuera la falta de tiempo para que el compuesto difundiera en este medio; los resultados sin embargo fueron negativos.

Nuevamente se pensó que la falta de efecto se podría deber a algún componente del agar que estuviera impidiendo la activación del compuesto. De aquí que el ensayo D (tabla 26), se llevó a cabo efectuando una preincubación del compuesto más la mezcla de activación S-9 durante 20 min. a 37°C, fuera de las cajas con bacterias e incorporándose al término del tiempo señalado, 100 µl de ésta mezcla a un pozo practicado en el centro de la caja sembrada con bacterias. Esta nueva tentativa fué realizada conjuntamente con una cepa de S. typhimurium - TA 1538 para verificar la actividad de la mezcla empleada. El uso de preincubación fué adecuado para propiciar una respuesta mutagénica en la TA 1538 pero no efecto genoletal en B. subtilis, por tal motivo se buscó nuevamente información en la literatura al respecto y se encontró un método que utilizaba el ensayo REC, sólo que en éste la mezcla de activación difería con respecto a la empleada por nosotros en primera instancia (21).

La tabla del Ensayo E (tabla 27) resume los resultados generados al utilizar ésta última metodología, empleando 2 cepas de B. subtilis y 2 de S. typhimurium. La presente modificación permitió la detección de efecto mutagénico (aunque débil) en ambas cepas de Salmonella, pero no efecto genoletal al emplear medio completo en sustitución del medio mínimo de Vogel-Bonner tradicional. En B. subtilis donde se empleó medio completo, tampoco se detectó efecto genoletal en nin

guna de las 2 cepas (H-17 y M-45).

En la TA 1535 y TA 100 al utilizar cajas con medio mínimo de Vogel-Bonner se presentaron, como en los resultados del Ensayo A, halos de " inhibición de crecimiento " entre el disco de papel filtro y la zona de aparición de mutantes. La pregunta que nos surgió inmediatamente fué ; por qué en el medio de Vogel-Bonner la TA 1535 y la TA 100 presentan halos de inhibición de crecimiento y en medio completo no ? Vistos al microscopio los " halos de inhibición de crecimiento " presentaban un crecimiento bacteriano de fondo normal (bacterias microscópicas en el agar), de colonias his⁻ que no revirtieron a his⁺ y en consecuencia al depender de las trazas de histidina añadida al medio mínimo de Vogel-Bonner, solo pueden realizar pocas divisiones celulares, de aquí que solo sean observadas al microscopio (10 X). El medio completo permite que tanto las colonias his⁻ como las his⁺ crezcan con igual oportunidad, por lo cual no aparecen halos de inhibición de crecimiento en la TA 1535 y en la TA 100 con el empleo del medio completo. De los datos anteriores se puede concluir que el presente método es adecuado para activar agentes pregenotóxicos y dar una respuesta mutagénica, pero no genoletal.

El último ensayo probado en B. subtilis fué el de microsuspensión (M.S.A.), que es igual al utilizado en E. coli solo que con medio completo en lugar de HA + T. Sin embargo en esta ocasión con B. subtilis, no se pudo recurrir al empleo del púrpura de bromocresol como indicador de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, detido a que B. subtilis en medio completo no sigue una vía metabólica fer

mentativa, que disminuyera el pH del medio por debajo de 5.5 y pudiera ser detectado por el púrpura de bromocresol.

El medio completo dificultó también la apreciación del crecimiento bacteriano de tal forma que ni con mitomicina C se pudo establecer con claridad la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) en ambas cepas (38).

CONCLUSIONES

La importancia de estos hallazgos de genotoxicidad (6 de - 10 fármacos probados) radica en las características predictivas de los sistemas bacterianos, como detectores de compuestos potencialmente carcinogénicos para el hombre.

Debemos recordar en efecto, que muchos de los compuestos genotóxicos en bacterias y/o carcinogénicos en humanos, comparten la característica química de ser compuestos nucleofílicos y reaccionar con el ADN (ver para más detalles las páginas 19 a la 23, clasificación de agentes genotóxicos). Además, el uso de bacterias de prueba bacterianas (E. coli y S. typhimurium) para el ensayo de genotoxicidad, ha permitido verificar que de un 60 a un 90% de los compuestos identificados como carcinogénicos en bioensayos animales, también provocan daño genético, es decir por lo menos uno de cada dos compuestos genotóxicos en bacterias es carcinogénico en mamíferos.

En el caso de Bacillus subtilis (el menos eficiente en este estudio) existen reportes sobre la detección de pesticidas genotóxicos que muestran que el sistema es bastante eficaz para identificar este tipo de compuestos, en proporción similar a E. coli y S. typhimurium.

Ahora bien, si el hombre es un organismo mucho más complejo que los procariontes y sus sistemas de reparación de daño al ADN son eficientes, ¿qué peligro entrañan los compuestos detectados en sistemas procariontes con deficiencia en algún sistema de reparación ?

En primer lugar, estos sistemas de reparación no son siempre 100% eficientes en el humano de ahí la presencia de cáncer; y segundo, el origen de éste aunque aún no sea claro se sabe que involucra para su desarrollo, la generación de daño genotóxico en la llamada etapa de iniciación. Por tanto, lo expuesto con anterioridad justifica ampliamente el uso de sistemas bacterianos para la detección de compuestos potencialmente carcinogénicos en el hombre, en lo que se considera la fase de tamíz. Otras pruebas de mayor complejidad y relevancia para el humano, deberán continuar éste estudio para evaluar con más precisión los riesgos que constituyen los agentes identificados como genoletales.

En suma, la contribución de éste trabajo radica en que:

- 1.- Se logró establecer las condiciones adecuadas para el empleo del ensayo en suspensión líquida de Escherichia coli para la detección de agentes genoletales, en ausencia de activación metabólica (método más sensible que el ensayo de difusión en agar previamente estandarizado en el laboratorio).
- 2.- Se estandarizó el ensayo de microsuspensión en E. coli, para su uso en presencia y ausencia de activación metabólica.
- 3.- Se estandarizó así mismo; los ensayos de genoletalidad en Bacillus subtilis, tanto con bacterias como con esporas, siendo más sensible éste último.

- 4.- Se identificó como agentes genotetales a 6 de los 10 medicamentos antiparasitarios estudiados; antiambianos; Diyodohidroxiquinolina, dehidroemetina, difosfato de cloroquina; antihelmínticos; pamoato de pirantel, pamoato de pirvinio y hexilresorcinol.
- 5.- Los ensayos de Escherichia coli resultaron más eficientes que los de Bacillus subtilis en la identificación de los agentes genotetales.
- 6.- Se detectó una mayor actividad genotetal del difosfato de cloroquina en presencia del sistema de transformación metabólica y una disminución de la genotetalidad del pamoato de pirvinio en E. coli.

En virtud de éstos últimos hallazgos se postula que:

- 1.- El mecanismo requerido para reparar el daño genotetal producido por: pamoato de pirvinio, dehidroemetina, difosfato de cloroquina, diyodohidroxiquinolina y hexilresorcinol, es mediado por la actividad de la polimerasa I.
- 2.- La polimerasa I no discrimina entre la yodoclorohidroxiquinolina y la guanina, incorporando a la primera en el ADN y provocando una letalidad mayor en la cepa pol A⁺.
- 3.- Los sistemas bacterianos constituyen una herramienta útil en el estudio de mutágenos y carcinógenos.

A P E N D I C E .I.- Salmonella typhimurium.Soluciones.

1.- Soluciones para Complementar el Agar de Superficie Mínimo.

- a) L-histidina 0.5mM/ biotina 0.5mM; Para suplementar el medio con tra
sas de histidina.

Se disuelven 0.0077g de L-histidina + 0.122 g de biotina en 100ml de agua destilada. Esterilizar por filtración, guardar a 4°C en - la obscuridad.

- b) L-histidina 0.1 M/ biotina 0.5mM; Para suplementar el medio con -
exceso de histidina.

Se disuelven 1.5516 g de L-histidina + 0.0122 g de biotina en -
100 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración, guardar a -
4°C en la obscuridad.

2.- Soluciones para Preparación de Homogenado.

Cloruro de Potasio 0.15 M.

Se pesan 11.184 g de KCl y se disuelven en 1,000 ml de agua desti
lada. Se esteriliza 20 min. a 15 lb de presión (121°C) y se gur
da a 4°C o a temperatura ambiente.

3.- Soluciones para Mezcla S-9 (Ames y col.)

- a) Amortiguador de fosfatos 0.2 M y pH= 7.4

Pesar 2.2979 g de Na_2HPO_4 + 0.5244 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y se disuelven
en 100 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se esterili
za durante 20 min a 121°C.

b) Cloruro de Magnesio 0.4 M/ Cloruro de Potasio 1.65M.

Se disuelven 8.1332 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ + 12.3019 g de KCl en 1,000 ml de agua destilada. Se esteriliza durante 20 min a 121°C.

Las dos soluciones anteriores se almacenan a 4°C hasta su utilización.

Medios de Cultivo

1.- Medio de Cultivo Líquido (Caldo Nutritivo).

Se pesan 12.5 g de Nutrient Broth Oxoid (B-2) y se le adicionan 500 ml de agua destilada. Se disuelve y se esteriliza durante 20' a 121°C (15 lb de presión).

2.- Agares de Superficie (Semisólidos al 0.75% y 0.60%)

a) Agar de Superficie Mínimo.

Se pesan 0.6 g de Bacto agar + 0.5 g de cloruro de sodio. Se le adicionan 100 ml de agua y se esteriliza a 121°C durante 20'. Guardar a temperatura ambiente o 4°C.

Cuando se va a utilizar se funde, se deja enfriar un poco y se le adicionan 10 ml de la solución estéril de histidina 0.5mM/ biotina 0.5mM. Se mezcla y se distribuye en tubos con tapón de rosca (2 ml/ tubo), que se mantendrán a una temperatura de 42-45°C para evitar que se solidifique el agar.

b) Agar de Superficie Completo.

Se pesan 0.75 g de Bacto agar + 2.5 g de Oxoid (B-2) y se disuelven en 100 ml de agua destilada. Se esterilizan por autoclave a 121°C durante 20'. Se guarda a temperatura ambiente o a 4°C.

El día de la prueba se funde el agar, se mezcla perfectamente y se transfieren 2 ml a tubos con tapón de rosca. Se mantienen a $-42-45^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.- Medio Mínimo E de Vogel-Bonner.

a) Solución A (50X).

En 640 ml de agua destilada se disuelven en el siguiente orden: 10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 100 g de ácido cítrico $\cdot \text{H}_2\text{O}$ + 500 g de K_2HPO_4 anhidro + 175 g de $\text{Na}(\text{NH}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Una vez disuelta perfectamente ésta solución, se afora con agua destilada a 1,000 ml. Para evitar la contaminación de dicha preparación, se le adiciona 1 ml - cloroformo y se almacena a temperatura ambiente.

b) Cajas con Medio Mínimo E de Vogel-Bonner (H. M. V. B.).

En un matraz de 1,000 ml se ponen 7.5 g de Bacto Agar + 10 g de - glucosa que se disuelven en 400 ml de agua destilada. En otro matraz de 250 ml, se agregan 10 ml de la solución A (50 X) + 100 ml de agua destilada. Se esterilizan los matraces por separado a $121^{\circ}\text{C}/15'$. Se reúnen las 2 soluciones en el matraz de 1,000 ml y se mezclan perfectamente. Se distribuyen en cajas de petri estériles de 100x15; se añaden aproximadamente 25 ml agar/ caja.

c) Cajas de Medio Mínimo E. de Vogel-Bonner con exceso de histidina.

A las cajas con medio mínimo ya solidificadas, se les adiciona - 0.1 ml de la solución con exceso de histidina (0.1 mM de l-histidina/ 0.5mM de biotina). Con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril se distribuye uniformemente ésta solución sobre la superficie de la caja. Se deja secar perfectamente y se guardan a 4°C hasta su utilización.

4.- Medio Completo para Cajas (Sólido al 1.5% de Agar).

Se pesan 4 g de Nutrient Broth (Oxoid B-2) + 7.5 g de Bacto Agar (DIFCO) se les adiciona 500 ml de H₂O destilada, se autoclava a 121°C/ 20' y se preparan las cajas con aproximadamente 25 ml de agar por cada una de ellas.

II.- Escherichia coli.

Soluciones.

1.- Soluciones para Complementar el Medio HA+T.

a) Solución de Caseína al 1%:

Se disuelve 1g de caseína hidrolizada en 100 ml de agua destilada.

b) Solución de Clorhidrato de Tiamina (Vit. B₁):

Se disuelven 0.025 g de clorhidrato de tiamina en 10 ml de agua - destilada.

c) Solución de Timina (Base pirimidínica):

Se disuelven 0.025 g de timina en 10 ml de agua destilada.

Las tres soluciones anteriores se esterilizan por separado por - filtración (membrana Millipore de 0.25 micras de diámetro de poro) y se guardan a 4°C en la oscuridad.

2.- Solución para Preparación de Homogenado:

Cloruro de Potasio 0.15 M

Igual que el descrito para S. typhimurium.

3.- Solución para Mezla S-9 (Mc Carrol y Piper):

a) Amortiguador de Fosfatos 0.052 M pH= 7.4 .

Se pesan 0.5230 g de Na₂HPO₄ + 0.2028 g de NaH₂PO₄·H₂O y se disuel

ven en 100 ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza a 121°C/ 20'. Se almacena a 4°C en la obscuridad.

b) Solución de Cloruros 0.4 M de $HgCl_2$ / 1.65 M KCl:

Se prepara igual que para S. typhimurium.

4.- Soluciones para la Mezcla S-9 de Hyman y col.

a) Amortiguador de Fosfatos 1M pH= 7.4:

Pesar 1.015 g de Na_2HPO_4 + 3.929 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y disolver en 100 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 y esterilizar durante 20' a 121°C. Se guarda a 4°C.

b) Solución de Cloruros.

Solución 0.4M, de $HgCl_2$.

Pesar 0.953 g de $HgCl_2$ y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

Solución 0.1 M de KCl:

Pesar 0.746 g de KCl y disolverlos en 100 ml de agua destilada.

5.- Indicador de pH.

Solución de Púrpura de Bromocresol.

Se pesan 2 mg de púrpura de bromocresol y se le adiciona 1 ml de agua destilada. Esta solución es de color anaranjado. Se mantiene en la obscuridad a temperatura ambiente.

Rango de vire 5.2 (verde amarillento) - 6.8 (Azul).

Medios de Cultivo.

1.- Medios de cultivo para el crecimiento de las cepas. Caldo HA+T.

Solución A:

Pesar 3.5 g de K_2HPO_4 + 1.5 g de KH_2PO_4 + 0.5 de $(NH_4)_2SO_4$ + 0.289g

de citrato de sodio. $2H_2O$ (0.25 g de citrato de sodio anhidro) + 0.986 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.0493 g de $MgSO_4$ anhidro) y se disuelven en 250 ml de agua destilada.

Solución B:

Se pesan 2.5 g de dextrosa y se disuelven en 250 ml de agua destilada.

La solución A se autoclavea en un matraz de 1,000 ml y la B en uno de 500 ml a $121^\circ C / 20'$. Cumplido el tiempo de esterilización, se mezclan, se dejan enfriar un poco y se les añade: a) 5 ml de la solución de caseína al 1% + b) 1 ml de solución de clorhidrato de tiamina y c) 1 ml de la solución de tiamina estériles. Se envasa y almacena a $4^\circ C$.

2.- Agar de Superficie HA+T (semisólido al 0.75% de agar)

Solución A:

Igual que el medio líquido HA+T.

Solución B:

Se pesan 3.75 g de Bacto Agar + 2.5 g de dextrosa y se disuelven en 250 ml de agua destilada.

Se esterilizan en las mismas condiciones que el medio líquido y se complementa de igual forma. Se almacena a temperatura ambiente o a $4^\circ C$.

Cuando se va a emplear, se funde y distribuye en porciones de 2 ml en tubos con tapón de rosca. Se mantienen a una temperatura de $42-45^\circ C$.

3.- Medio HA+T para Cajas (sólido con 1.5% de agar).

Solución A:

Igual que el caldo y el agar de superficie HA+T.

Solución B:

Se pesan 7,5 g de Bacto Agar + 2.5 g de dextrosa y se disuelven en 250 ml de agua destilada.

La solución A y la B se autoclavean en las mismas condiciones que el caldo y agar de superficie. Se deja enfriar un poco, se mezclan y se suplementa con las soluciones usadas en 1 y 2. Se vierten aproximadamente 25 ml de agar / caja de petri de 100x15 y se dejan solidificar, se someten a prueba de esterilidad (incubación a 37°C durante 24 hrs). En las que no se presente crecimiento de algún organismo contaminante, se almacenan a 4°C.

III.- Bacillus subtilis.

Soluciones.

1.- Soluciones para Suplementar el Medio Mínimo de Vogel-Bonner

a) Solución de Arginina:

Se pesa 1 mg de arginina y se disuelve en 1 ml de agua destilada.

b) Solución de triptófano:

Se pesa 1 mg de triptófano y se disuelve en 1 ml de agua destilada.

Las soluciones anteriores se esterilizan por filtración (Membrana Millipore de 0.25 micras de diámetro de poro) se guarda a 4°C.

2.- Solución para Lavado de Esporas.

a) Medio Mínimo de Davis Mangioli.

Se pesan 7.0 g de K_2HPO_4 + 1.0 g de $(NH_4)_2SO_4$ + 0.3931 g de citra

to de sodio. $2H_2O$ (0.365 g de citrato de sodio anhidro) + 0.1971g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.1 g de $MgSO_4$ anhidro) + 1,000 ml de agua destilada.

b) Solución Amortiguadora "A".

Se prepara de la misma forma que la solución A del medio HA+T de S. coli.

Nota: Cualquiera de las 2 soluciones se puede emplear para el lavado de las esporas.

3.- Solución para Preparación de Homogenado.

Cloruro de Potasio 0.15 M (igual que S. typhimurium)

4.- Soluciones para la Mezcla S-9 (Ames y col.).

a) Amortiguador de fosfatos 0.2 M pH= 7.4

b) Solución de Cloruros $MgCl_2$ 0.4 M/ KCl 1.65 M

Ambas soluciones se preparan igual que para S. typhimurium.

5.- Soluciones para Mezcla S-9 (Tsuneo Kada y col.)

a) Fracción S-9 (Homogenado hepático), preparada conforme se indica en la pag. 102 .

b) Solución de Cofactores.

Amortiguador de Fosfatos 10mM pH= 7.2 :

Se pesa 0.079 g de Na_2HPO_4 + 0.0615 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y se disuelve en 100 ml de agua destilada. Se ajusta a pH de 7.2 y se esteriliza a 121°C/ 20'.

Solución de Cloruros:

De la solución de cloruros de S. typhimurium ya estéril, se hace una dilución 1:10 en agua destilada, de aquí se toman 20 μ l y se agregan a 100 ml de la solución de fosfatos anterior.

Medios de Cultivo.

1.- Medio de cultivo para el crecimiento de las cepas:

Es el mismo medio líquido completo que se utiliza para Salmonella.

2.- Agar de Superficie (semisólido al 0.6% de agar).

Se pesa 5 g de Nutrient Broth (Difco u Oxoid B-2) + 1.6 g Bacto Agar (Difco), se agragan 200 ml de agua destilada y se disuelve. Se esteriliza por autoclave a 121°C/ 20'.

Cuando se vaya a utilizar, se funde y se adicionan 2 ml de éste a tubos de vidrio con tapón de rosca o se mantienen en un matraz de 500 ml a 42-45°C.

3.- Medio completo para cajas (sólido al 1.5% de agar)

Se prepara igual que para S. typhimurium.

4.- Medio Mínimo de Vogel-Bonner para cajas (sólido al 1.5% de agar).

Se prepara igual que para S. typhimurium, solo que en éste caso se complementa con 1 ml de la solución de arginina+ 1 ml de la de triptófano/ 1,000 ml de medio, que se añaden después de esterilizar el medio de Vogel-Bonner y antes de vertir a cajas de petri. De esta misma forma se prepara el medio mínimo de Vogel-Bonner semisólido al 0.75% de agar, al preparar el medio con 7.5 g de agar en lugar de 15 g/ 1,000 ml. Nuevamente, se suplementa con las mismas cantidades de arginina-triptófano.

Para el caso de cajas suplementadas con caldo nutritivo en sustitución de arginina-triptófano, al medio mínimo de Vogel-Bonner se añade 2% de medio líquido completo (v/v).

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Ames, B.N., Mc Cann, J. y Yamasaki, E. (1975): Metods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian microsome mutagenicity test. Mutat Res 31: 347-364.
- 2.- Ariel Pérez Muñoz, H. y Lifshitz Guinzberg, A. (1975): Implicaciones clínicas de los mecanismos de acción de los antimicrobianos. Frensa Med Mex año XL nos. 3-4: 55-75.
- 3.- Bignami, M., Morpurgo, H., Pagliani, R., Carere, A., Canti, G., y Digliuseppe, G. (1974): Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in Aspergillus nidulans. Mut Res 26: 159-170.
- 4.- Brookes, P. y Lagley, P.D. (1961): The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids. Biochem. J. 80: 496-503.
- 5.- Cooper, P. (1977): Excision-repair in mutants of Escherichia coli deficient in DNA polimerase I and/or its associated 5'-3' exonuclease. Mol Gen Genet 150: 1-12.
- 6.- Cortinas de Nava, C. (1980) Capacidad carcinogénica, mutagénica y teratogénica de medicamentos amebicidas y antihelmínticos. en: Cristina Cortinas de Nava (Ed.) Posibles fuentes de riesgo en el consumo de amebicidas y antihelmínticos. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Mex. D.F. : 79-90.
- 7.- Cortinas de Nava, C., Ostrosky de Wegman, P. y Galván S. (1980). - Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratogénesis, en: Cristina Cortinas de Nava (ed.). Manual de métodos

para la identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales. I.I.B.M. 1: 1-18.

- 8.- Cortinas de Nava, C., Espinosa, J., García, L. y Zapata, A.M. (1981): Mutagenicity of antiamebic and antihelminthic drugs in the Salmonella typhimurium microsomal test system. Mut Res 117: 79-91.
- 9.- Chatterjee, S.N., Maitu, M. y Sujata, G. (1975): Interaction of furazolidine with DNA. Biochem Biophys Acta 402: 161-165.
- 10.- De Lucia, P. y Cairns, J. (1969): Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224: 1164-1165.
- 11.- De Serres (1976): In vitro metabolic Activation in mutagenesis testing. in: F.J. de Serres y J.F. Footsatal (ED.) Elsevier north Holland Biomedical Press: 3.
- 12.- Deutsh, A.W. y Iann, S. (1979): DNA binding a activity from cultured human fibroblast that is specific for partially depurinated DNA and inserts purines into apurinic sites. Proc Natl Acad Sci USA 76: No. 1 141-144.
- 13.- Errol, C. (1981): Recent developments in the enzymology of excision repair of DNA. Prog in Nucl Acid Res Mol Biol. 26:170-180.
- 14.- Eugene, R.F., Pirer, L. A. y Ruelius, H.W. (1976): Evaluation of a DNA polymerase-deficient mutant of E. coli for the rapid detection of carcinogens. Chem Biol Interac 15: 219-231.

- 15.- Freese, E. (1971): Molecular mechanisms of mutations en: A Hollander y De Serres, F.J. (Eds.) Chemical Mutagens, Plenum Press New York-London. 1: 1-53.
- 16.- Golstein, A., Aronow, L. y Kalman, S. (1974): Drug metabolism en: Golstein A., Aronow L. y Kalman S. (Eds) Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology. Second Edition. A wiley Biomedical-Health Publication: 227-300.
- 17.- Gossard, F. y Verly, G. (1978): Properties of the main endonuclease specific for apurinic sites of Escherichia coli (Endonuclease - VI). Eur. J. Biochem 82:321-332 .
- 18.- Gross, J. y Gross, M. (1969): Genetic analysis of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polimerase. Nature 224: 1166-1168.
- 19.- Hyman, J., Leifer, Z. y Rosenkranz, S. (1979): A quantitative procedure for diffusible and nondiffusible chemicals. Mut Res 74: 107-111.
- 20.- Howard, P. (1981): Inducible repair of DNA. Scientific American 224: No. 4 56-64.
- 21.- Kada, T. (1982): Rec-Assay with spores of B. subtilis with and without metabolic activation. Mut Res 97: 339-347.
- 22.- Kada, T., Hirano, K. y Shirasu, Y. (1980): Screening of environmental chemical mutagens by Rec-assay system with Bacillus subtilis en: A Hollander y De Serres, F. J. (Eds.) Chemical Mutagens. Plenum Publishing Corporation. 6: 149-173.

- 23.- Karrat, P. y Kimbahl, T. (1978): Enzymatic excision of free hypoxanthine and DNA containing Deoxyinosine monophosphates residues. The Journal of Biol Chem 253: No. 17 5977-5879.
- 24.- Kimball, R.F. (1978): The relation of repair phenomena to mutation induction in bacteria. Mut. Res. 55: 85-120.
- 25.- Kean, B. H., Donald, M. D. y Hoskins. M. D. (1976-1977): Drugs for intestinal parasitism en: Walter Modell (Ed.) Drugs of Choice 1976-1977. The C.V. Mosby Company: 356-369.
- 26.- Laval, J. y Laval, F. (1980): Enzymology of DNA repair en: R. Montesano, H. Bartsch y L. Tomatis (Eds.) Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Tests. IARC Scientific Publications No. 27: 55-73.
- 27.- Lehman, R. (1974): DNA Ligase: Structure, Mechanism, and Function. Science 186: 790-797.
- 28.- Lehninger, A.L. (1980): Nucleótidos y estructura covalente de los ácidos nucleicos en: Albert L. Lehninger (Ed.) Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona : 315-338, 871-940.
- 29.- Lindahl, T. (1974): An N-glucosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. Proc Natl Acad Sci USA. 71: No. 9 3649-3653.
- 30.- Litter, M. (1980): Farmacología Clínica y Experimental. Manuel Litter (Ed) Editorial el Ateneo C.V. Argentina 1ª Edición : 436-444.

- 31.- Livneh, Z. Elad, D. y Sperling, J. (1979): Enzymatic insertion of purine bases into depurinated DNA in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 76: No. 3, 1089-1093.
- 32.- Mac Gregor, J.T. y Johnson, I.J. (1977): In vitro metabolic activation of ethidium bromide and other phenanthridinium compounds: Mutageny activity in Salmonella typhimurium. Mut Res 48: 103-108.
- 33.- MacPhee, D.G. (1977): Mutagenicity tests on anthelmintics: microsomal activation of vipryrium embonate to a mutagen. Mut Res 48:307.
- 34.- Maron, D.M. y Ames, B.N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut Res in Press.
- 35.- Mc Colla, D.R. (1974): On the mutagenicity of nitrofurans. Mut Res 26: 3-16.
- 36.- Mc Cann, J., Choi, E., Yamasaki, E. y Ames, B.N. (1975): Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals. Proc Natl Acad Sci 72: 5132-5139.
- 37.- McCarrol, N.E., Piper, C.E. y Keech, B.N. (1981): An E coli micro-suspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens. Env Mut 3: 607-616.
- 38.- McCarrol, N.E., Piper, C.E. y Keech, B.N. (1981): A microsuspension adaptation of the Bacillus subtilis "rec" assay. Env Mut 3:607-616.
- 39.- Mc Coy, C. A., Rosenkranz, S. H. y Mermelstein, R. (1981): Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductases capable of activating nitrated polycyclics to mutagens. Env Mut 3:421-427.

- 40.- Miller, E.C., y Miller, J.A. (1980): The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretation en: A Hollaender y De Serres, F.J. (Eds.) Chemical Mutagens, Plenum Publishing Corporation. 1: 83-119.
- 41.- Ostrosky de Wegman, P. (1982): Boletín ALAMETA. Ostrosky de Wegman (ed) México D.F. No. 5: 1-12.
- 42.- Perry, L. K., Elledges, J. S. y Lichtman, R. M. (1982): Plasmid mediated enhancement of chemical mutagenesis en: Sugimura T., Kondo S. y Takebe H. (Eds.) Environmental Mutagens and Carcinogens. University of Tokyo Press: 113-120.
- 43.- Rangel Zarate, R. M. (1982): Estudio del efecto mutagénico de antibióticos y antihelmínticos en Salmonella typhimurium y Escherichia coli (Tesis UNAM): 45-54.
- 44.- Riazuddin, S. y Lindahl, T. (1978): Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from Escherichia coli. Biochem 17: 2110.
- 45.- Rinkus, S. J. y Legator, M. S. (1979): Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system. Cancer Res 39: 3289-3318.
- 46.- Ripley, L. S. y Shoemaker, H. B. (1982): Polymerase infidelity and frameshift mutation en: Lemontt J.F. y Generoso W. M. (Eds.) Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis. Plenum Press, New York and London. 20: 161-178.

- 47.- Rollo, I. M. (1980): Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis en: A. G. Gilman, L. S. Goodman (Eds). The Pharmacological Basic of Therapeutics. 6th ed. Mac Millan, New York : 1019-1026.
- 48.- Rosenkranz, H. S. (1971): Preferential inhibition by chloroquine in E. coli deficiente in DNA polymerase. Ems. News 5: 38-42.
- 49.- Rosenkranz, H. S. (1973): Sodium hipoclorite and sodium perborate; preferential inhibitor of DNA polimerase-deficient bacteria. Mut Res 21: 171-174.
- 50.- Rosenkranz, S., Carr, H. S. (1974): 2-haloethanols: mutagenicity - and reactivity with DNA. Mut Res 26: 367-370.
- 51.- Rosenkranz, H. S. y Speck, W. T. (1975): Mutagenicity of metronidazole: Activation by mammalian liver microsomes. Bioch Bioph Res Com 66: No. 2 520-525.
- 52.- Rosenkranz, H. S. y Poirier, L. A. (1979): Evaluation of mutagenicity and DNA-modifying activity of carcinogens and noncarcinogens in microbial systems. J. Natl Cancer Inst 62: 877-891.
- 53.- Rosenkranz, H. S. y Leifer, Z. (1980): Determining the DNA-modifying activity of chemical usin DNA-polymerase-deficient Escherichia coli en: A. Hollaender y De Serres F.J. (Eds) Chemical Mutagens. Plenum Press. New York and London. 6: 109-147.
- 54.- Sadais, Y. y Kada, T. (1976): Recombination-deficient mutants of -- Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 125: 489-500.

- 55.- Sakore, T.D., Shric, J. Tsai, Ch. y Sobel, H. M. (1977): Mutagen-nucleic acid intercalative binding: Structure of a 9 aminoacridine: 5-iodocytidylyl (3'→5') guanosine crystalline complex. Proc Natl Acad. Sci USA 74: No. 1 188-192.
- 56.- Schüpbach, M. E. (1979): Mutagenicity evaluation of two antimalarial agents chloroquine and mefloquine, using a bacterial fluctuation test. Mut Res 68: 41-49.
- 57.- Singer, B. (1980): Mutagenesis from a chemical perspective: Nucleic acid reactions, repair, translation and transcription en: Lemontt J. F. y Generoso, W.M. Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis. Plenum Press. New York and London 20: 1-42.
- 58.- Slater, E. E., Anderson, M. D. y Rosenkrans, H. S. (1971): Rapid detection of mutagens and carcinogens. Cancer Res 31:970-973.
- 59.- Streinsinger, G., Okada, Y. (1966): Frameshift mutations and the genetic code. Col Spring Harb Symp Quant Biol 31: 74-84.
- 60.- Styles, J. A. (1973): Cytotoxic effect of various pesticides in vivo and in vitro. Mut Res 21: 50-51.
- 61.- Suzuki, K. y Mitsuoka, T. (1978): Mutagenicity of intestinal bacteria. Mut Res 50: 295.
- 62.- Tazima, Y., Kada, T., y Murakomi, A. (1975): Mutagenicity of nitro furan derivatives, including furilfuramide, a food preservative. Mut Res 32: 55-80.
- 63.- Thompson, J. Y Thompson, W. (1979): Los dermatoglifos en la genética médica en: J.S. Thompson y M. Thompson (Eds). Genética Médica,

Segunda ed. Salvat Ed. S.A. Mallorca Barcelona España: 327-339.

- 64.- Tutikawa, K. (1978): Mutagenicity of the products generated by a reaction between chloroquine and nitrite. *Mut. Res.* 54: 230.
- 65.- Weiss, B. (1976): Endonuclease II of Escherichia coli is exonuclease III. *The Journal of Biol Chem* 251: no. 7 1896-1901.
- 66.- Witkin, E.M. (1969): The mutability toward ultraviolet light recombination-deficient strains of Escherichia coli. *Mut Res* 8: 9-14
- 67.- Wlodkowski, T. J. y Rosenkranz, H. S. (1975): Mutagenicity of sodium hypochlorite for Salmonella typhimurium. *Mut Res* 31: 39-42.
- 68.- Wright, A. S. (1980): The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mut. Res* 75: 215-241.
- 69.- Wun, K. L. y Sutterland, J. C. (1977): Photoreactivating enzymes from Escherichia coli: appearance of new absorption on binding to ultraviolet irradiated DNA. *Biochem* 16: 21-924.