

17
29**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA**

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

DETERMINACION DE MUTAGENICIDAD DEL SORBATO
 POTASICO POR EL METODO SALMONELLA-MICROSOMAL

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

GABRIEL MORENO HAGELSIEB

GUADALAJARA, JALISCO. 1988



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	6
Sorbato Potásico.....	6
Prueba Salmonella/Microsomal.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	20
Cepas.....	20
Sorbato Potásico.....	25
Ratas.....	26
Metodología.....	26
Confirmación de genotipos de las cepas de prueba.....	26
Prueba de reversión espontánea.....	29
Almacenamiento de las cepas de prueba.....	30
Preparación de la fracción S9.....	32
Prueba de mutagenicidad con preincubación.....	34
RESULTADOS.....	40
Confirmación de Genotipos de las Cepas de Prueba.....	40
Prueba de Reversión Espontánea.....	40
Prueba de Actividad de la Fracción S9.....	41
Prueba de Mutagenicidad sin Sistema de Activación.....	43
Prueba con Mezcla S9.....	43
DISCUSION.....	48
CONCLUSIONES.....	51
PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS.....	53
GLOSARIO.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	70

RESUMEN

La presente tesis versa sobre la Prueba de Mutagenicidad del Sorbato Potásico, aditivo alimenticio antimicrobiano de amplio uso, mediante el ensayo Salmonella typhimurium/microsomal de mamífero o prueba de Ames. La prueba constituye un método relativamente rápido y sencillo en la determinación de carcinógenos como mutágenos, sin embargo, esta prueba se realizó en un tiempo efectivo de nueve meses por incluir dentro de sus objetivos el establecimiento de la técnica, no solo para probar la mutagenicidad del sorbato potásico, sino también para la prueba posterior de otras sustancias. La prueba se llevó a cabo en las cepas TA97a, TA98, TA100 y TA102 mediante la técnica de prueba de incorporación en placa con preincubación, elegida por su mayor sensibilidad en el diagnóstico de mutagenicidad, resultando en todas negativa, esto es, el Sorbato Potásico No es Mutagénico para estas cepas de prueba.

ABSTRACT

The present thesis work is the Potassium Sorbate, a widely used antimicrobial food additive, Mutagenicity Assay, by the Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay or Ames test. The test constitutes a relatively practical and a short-term method for detecting carcinogens as mutagens, however, this test was performed in an actual nine months period, because it included the methods establishment as an objective, not just for testing potassium sorbate mutagenicity, but also, for testing other compounds later. The test was carried out on the bacterial tester strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 by the preincubation plate incorporation method, which was chosen because of its better sensitivity for mutagenicity detection. The results were negative, that is: Potassium Sorbate is Not Mutagenic to these tester strains.

INTRODUCCION

El uso de aditivos alimenticios se puede constatar fácilmente en las etiquetas de la mayoría de los alimentos procesados que se consumen. El Sorbato Potásico, asunto de esta tesis, se utiliza principalmente como conservador en muchos alimentos como se verá más adelante.

La seguridad de los aditivos alimenticios es un asunto, por lo tanto, de suma importancia ya que los consumidores podrían verse afectados por ellos. Existen leyes para su control que incluyen pruebas de carcinogenicidad para que se establezca su seguridad y uso.

Las pruebas microbiológicas de mutagenicidad, como se verá en la siguiente sección, especialmente la prueba Salmonella/microsomal, constituyen hoy en día un método que proporciona información de

un aspecto muy relacionado con la carcinogénesis y otras enfermedades que aparecen con la edad, apoyando así las investigaciones en este aspecto.

Estos preceptos son los que han consolidado la idea de establecer la metodología de la prueba mencionada, como un apoyo en la investigación, para lo cual se ha elegido realizar la prueba de mutagenicidad del Sorbato Potásico.

Así pues, los objetivos del presente trabajo son:

-Determinar la posible mutagenicidad del Sorbato Potásico mediante el ensayo Salmonella typhimurium/microsomal de mamífero o prueba de Ames, en las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102.

-Como objetivo secundario; con esta determinación y para la misma, establecer las condiciones para el ensayo mencionado con el fin de contar con esta herramienta en la investigación

sobre mutagenicidad ambiental, en el Centro de Investigación
en que se realizó la tesis (CIATEJ, A.C.).

ANTECEDENTES

SORBATO POTASICO

Para evitar la descomposición microbiana de los alimentos, se utilizan sustancias que reciben el nombre general de conservadores (Primo, 1982). Entre estos se encuentran el ácido sórbico y sus sales (Sofos et al., 1979; Primo, 1982; Rice y Pierson, 1982; Earle y Putt, 1984; Dziezak, 1986), conocidos en conjunto como sorbatos (Earle y Putt, 1984).

El ácido sórbico fue descubierto en Londres por el químico alemán A. W. Hofman en 1856, su nombre deriva del nombre científico del Fresno de montaña Sorbus aucuparia Linné, la planta parental del rowan berry porque se formaba por la reacción del aceite de rowan berry y fuertes álcali (Sofos et al., 1979). El descubrimiento de sus propiedades antimicrobianas se acredita a C. M. Gooding y

Best Food Inc. en 1945 (Earle y Putt, 1984; Dziezak, 1986), aunque Sofos et al. (1979), mencionan a E. Muller en Alemania en 1939 y al mismo C. M. Gooding en los E. U. A. en 1940.

Los sorbatos tienen un amplio espectro de inhibición sobre mohos y levaduras e incluso sobre algunas bacterias (Sofos et al., 1979; Primo 1982; Rice y Pierson, 1982; Earle y Putt, 1984; Dziezak, 1986), por lo que se les usa en gran variedad de alimentos entre los que se encuentran jugos de fruta, esencias y bebidas suaves (Sofos et al., 1979; Dziezak, 1986); quesos, mantequillas, margarinas y panadería (Primo, 1982; Earle y Putt, 1984; Dziezak, 1986); salsas, emulsiones grasas, vegetales fermentados, productos de tomate, frutas secas, conservas, azúcar y confitería (Sofos et al., 1979; Earle y Putt, 1984; Dziezak, 1986); entre otros (Tabla 1).

El ácido sórbico es la forma trans-trans del ácido hexa-2,4-dienoico (Sofos et al., 1979); tiene la estructura $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$ (Sofos et al., 1979; Primo 1982; Earle y Putt,

Tabla 1: APLICACIONES Y NIVELES DE USO DEL ACIDO SORBICO Y SORBATO POTASICO

PRODUCTO	NIVEL SUGERIDO DE USO (% en peso)
Batidos para pastel	0.05-0.30
Mercancías horneadas, como aerosol (10%) o adición directa	0.05-0.10
Cubiertas y rellenos de pasteles (frutas, helados, etc.)	0.05-0.10
Bebidas (carbonatadas y jugos no espumosos)	0.025-0.10
Productos de queso (21 CFR 19.500-19.788)	0.05-0.20
Frutas secas (aerosol o sumergir en 5-15%)	0.02-0.05
Jugos frescos de fruta para uso industrial	0.02-0.10
Pastas y rellenos para pay	0.05-0.10
Conservas, jaleas, compotas (21 CFR 150.110, 150.140, 150.141, 150.160, 150.161)	0.10 Max.
Margarina (21 CFR 166.110), como ácido	0.10 Max.
Productos de carne (salsa seca) (9 CFR 310.7, 2 1/2% residual)	0.10 Max.
Encurtidos (pepinos, chucruta, aceitunas, condimentos)	0.05-0.10
Ensaladas frescas (papa, ensalada de col, cítricos, gelatina y macarrones)	0.05-0.10
Adorno de ensalada (no valorizado)	0.10 Max.
Coctel de mariscos	0.075-0.10
Alimento semihúmedo para mascotas (nivel usual -0.3%)	0.20-0.50
Pescado ahumado y salado (aerosol 10% o sumergido 5%)	0.10 Max.
Jarabes (chocolate, lechería)	0.10-0.15
Jarabes (frutas y fuentes)	0.05-0.10
Vinos (27 CFR 240.1051)	0.02-0.10
Queso cottage cremoso (21 CFR 19.530)	0.05-0.10

CFR- Code of Federal Regulations U.S.A. (Dziazak, 1986).

1984).

Las propiedades antifúngicas de los sorbatos se pueden atribuir a su estructura (Earle y Putt, 1984). Dentro de la célula microbiana, los sorbatos inhiben numerosas enzimas importantes en el metabolismo de los carbohidratos, tales como la enolasa y la lactato deshidrogenasa; los sorbatos también intervienen con fuerza aunque no específicamente en el ciclo del ácido cítrico, inhibiendo a la malato deshidrogenasa, fumarasa y aspartasa, entre otras (Earle y Putt, 1984). Su mecanismo de acción sobre las bacterias no es aún muy claro (Sofos et al., 1979; Earle y Putt, 1984).

El sorbato potásico ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOK}$), es favorecido sobre el ácido sórbico en su uso sobre muchos alimentos por su mucha mayor solubilidad en agua (Earle y Putt, 1984). La solubilidad del ácido sórbico a 20°C en agua es de 0.16g/100ml, mientras que la de su sal potásica es de 139.2g/100ml (Primo 1982; Earle y Putt, 1984).

Los sorbatos están entre los conservadores más ampliamente investigados y han demostrado, en animales experimentales muy baja toxicidad aguda o crónica (Sofos et al., 1979; Earle y Futt, 1984). La idea de que pudiera tener un efecto mutagénico proviene de que son metabolizados de un modo similar al de otros ácidos grasos (Sofos et al., 1979; Earle y Futt, 1984; Dziuzak, 1986), de los cuales Ames (1983), menciona, especialmente de los insaturados y de la forma trans, que pueden dar origen a peróxidos, epóxidos y otras sustancias iniciadoras y/o promotoras de cáncer.

Es importante mencionar que en la dieta humana existen gran variedad de mutágenos y carcinógenos tanto naturales como artificiales (Sugimura, 1982; Ames, 1983, 1986; Ames et al., 1987). La detección de tales sustancias puede ser una parte importante de una estrategia para minimizar el cáncer y otras enfermedades relacionadas con la edad (Ames, 1983).

PRUEBA SALMONELLA/MICROSOMAL

La prueba de mutagenicidad salmonella/microsomal o prueba de Ames ha tenido un gran desarrollo desde sus inicios cuando Ames (1971), publicó la idea y métodos para detectar mutágenos con cepas derivadas de Salmonella typhimurium LT-2, las cuales se eligieron por su incapacidad para sintetizar histidina, así como por su sensibilidad para revertir tal mutación, ya fuera de corrimiento de estructura o bien de cambio de bases, al someterse a algunas sustancias de acción mutagénica conocida, de modo que tales cepas serían capaces de detectar en una prueba, si una sustancia era mutagénica como un mutágeno de corrimiento de estructura y/o de cambio de bases, dependiendo de la cepa o cepas cuyo número de colonias revertantes se viera aumentado al someterse a la acción de dicha sustancia.

El método consistía entonces en sembrar, mediante la técnica microbiológica de placa vertida, una capa de bacterias de un cultivo nocturno en agar mínimo glucosa con trazas de histidina,

esto último para permitir la formación de una ligera capa de colonias auxótrofas (his-), de modo que cualquier inhibición provocada por la sustancia a prueba pudiera observarse y porque muchas mutaciones requieren de la replicación del ADN para ocurrir (Ames, 1971; Ames et al., 1975; Maron y Ames, 1983). Se añadía entonces la sustancia a prueba en un punto alrededor del cual, debido a la difusión, habría diferentes grados de concentración. En caso de una respuesta positiva se esperaba ver un halo de inhibición y más allá un anillo de colonias revertantes después de 48 horas de incubación. Este método se había utilizado ya en otro trabajo (Ames y Whitfield, 1966), en el que se clasifican algunos mutágenos de corrimiento de estructura y del que tal vez surgió la idea.

Ames (1971), planteó entonces los siguientes razonamientos:

El ADN tiene la misma estructura doble helicoidal y los mismos cuatro nucleótidos en todos los organismos por lo que una prueba de mutagenicidad en bacterias es válida (además

de práctica por su velocidad de crecimiento y fácil manejo) para detectar mutágenos que puedan alterar el genoma de otras especies incluso el hombre.

Otra razón es que existe una relación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, razón por la cual esta prueba se desarrolló principalmente para detectar carcinógenos como mutágenos.

Cabe mencionar que un mutágeno puede además ejercer efectos teratogénicos, causar mutaciones en células germinales (Gentile y Plewa, 1982; Plewa y Gentile, 1982), inducir enfermedades cardíacas (Gentile y Plewa, 1982; Plewa y Gentile, 1982; Ames, 1983), o afectar el proceso de envejecimiento (Gentile y Plewa, 1982; Plewa y Gentile, 1982; Ames, 1983; Kada et al., 1986).

El siguiente paso fue el uso de diferentes concentraciones de la sustancia a prueba disueltas en su correspondiente placa de agar mínimo glucosa y la incorporación de un homogenado de hígado de

rata (u otros tejidos de mamífero), como representación del metabolismo de un mamífero, resolviéndose así el problema de algunas sustancias que requieren ser metabolizadas para dar lugar a un mutágeno, esto es activando un promutágeno en un mutágeno. En este trabajo (Ames et al., 1973), aparecen tres de las cinco cepas de S. typhimurium que se mencionarían después en la metodología general (Ames et al., 1975), las cepas TA1535, TA1537 y la TA1538. En el último artículo se incluyen además las cepas TA98 y TA100 derivadas de las cepas TA1538 y TA1535 respectivamente, con la única diferencia de que se les introdujo el plásmido pKM101 para darles mayor sensibilidad a mutagenesis como se explicará en la metodología.

Después se construyeron por medio de la ingeniería genética otras cepas (Levin et al., 1982a, 1982b, 1984), entre las que destacan la TA97 (Levin et al., 1982a) y la TA102 (Levin et al., 1982b, 1984), sensibles a otros tipos de mutágenos antes no detectados. Estas dos cepas se incluyen ya en la metodología general revisada para esta prueba (Maron y Ames, 1983).

Las características genéticas de las cepas incluyen además de la mutación en el gen marcador (el gen correspondiente en el operón histidina), características que permitan a los mutágenos llegar al ADN de la bacteria y asegurar que el daño persista y entonces se exprese (Maron y Ames, 1983). Estas características así como la mutación correspondiente al gen marcador de cada cepa se explicarán en la sección de materiales y métodos.

Entre las pruebas a corto plazo en bacterias para la detección de de carcinógenos y mutágenos, la prueba de Ames es la más utilizada y se ha validado en gran escala (Hofnung y Quillardet, 1986; Kier et al., 1986; Venitt et al., 1986), en un inicio probando carcinógenos como mutágenos desde los primeros trabajos (v.g. Ames et al., 1973; McCann et al., 1975), así como al desarrollar otras cepas (Levin et al., 1982a, 1982b, 1984).

Los trabajos de validación a gran escala como prueba de carcinogenicidad, consisten en tomar a consideración tres valores (Kier et al., 1986; Venitt et al., 1986):

- Sensibilidad; porcentaje de carcinógenos detectados en la prueba.
- Especificidad; porcentaje de no-carcinógenos correctamente identificados en la prueba (resultan negativos).
- Exactitud; porcentaje de resultados correctos.

Kier et al. (1986), hicieron una gran recopilación de resultados encontrando una superposición entre carcinogenicidad y mutagenicidad de aproximadamente un 80% (Tabla 2). Este análisis toma en cuenta datos de hasta 1981.

Maron y Ames (1983), mencionan una correlación de cerca del 93% fallando la prueba en la detección de pocas clases de carcinógenos tales como los pesticidas policlorinados, aclarando que algunos carcinógenos no detectados antes, pueden serlo hoy, ya sea con las nuevas cepas (ver v.g. Levin et al., 1982a, 1982b, 1984), y/o con modificaciones del método de prueba. A esto se le puede agregar el uso de homogenados de plantas verdes en la activación de promutágenos en mutágenos (Gentile y Plewa, 1982;

Tabla 2: FUNCIONAMIENTO DEL ENSAYO DE SALMONELLA EN LA IDENTIFICACION DE CARCINOGENOS

CARCINOGENOS	NO-CARCINOGENOS	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	EXACTITUD
123/154	4/6	79.9%	66.6%	79.4%

La figura anota el número de carcinógenos y no-carcinógenos correctamente identificados. El escaso número de no-carcinógenos probados constituye un problema para este cálculo. Los dos no-carcinógenos que dieron resultados positivos son muy discutidos como inequívocamente no-carcinógenos y para aclararlo se necesitan mayores estudios (Kier et al., 1986).

Plewa y Gentile, 1982; Plewa et al., 1983; Gentile et al., 1985, 1986).

Otro aspecto importante por añadir es que en la carcinogénesis se reconocen varios pasos, entre los que destacan la iniciación y la promoción (Sugimura, 1982; Ames et al., 1987).

La iniciación consiste en el daño al ADN (Sugimura, 1982; Ames et al., 1987); este daño puede ser una mutación puntual o un rearrreglo extenso del ADN, estos cambios genéticos afectan la

estructura de un gen normal, un proto-oncogén, para dar lugar a un gen canceroso, un oncogén (Quillardet et al., 1985).

La promoción no está necesariamente ligada a cambios en el ADN (Sugimura, 1982), y parece involucrar proliferación celular, o ciertos tipos de proliferación celular (Ames et al., 1987). Si las células animales han sido iniciadas por mutagenos endógenos o ambientales, la aplicación de un promotor incrementará la incidencia de tumores; así, compuestos con actividad promotora y sin actividad mutagénica pueden clasificarse como carcinógenos (Sugimura, 1982).

Así pues, las pruebas de genotoxicidad en bacterias son útiles para la identificación de posibles carcinógenos del tipo iniciador (v.g. Ames, 1971; Maron y Ames, 1983; Quillardet y Hofnung, 1985; Quillardet et al., 1985; Arnais et al., 1986; Hofnung y Quillardet, 1986; Venitt et al., 1986), aunque Sugimura (1982), sugiere incluir pruebas de carcinogenicidad utilizando algunas veces promotores de tumores, para identificar compuestos

como carcinógenos.

MATERIALES Y METODOS

CEPAS

Para hacer la prueba de mutagenicidad del sorbato potásico, se eligieron las cepas sugeridas para prueba general por Maron y Ames (1983), como son la TA97, TA98, TA100 y la TA102. Las cepas se adquirieron directamente del Dr. B. N. Ames de la Universidad de California, Berkeley, California. La cepa TA97a fue enviada en el sitio de la TA97, por la razón de que la última presentaba problemas de crecimiento por lo que se tuvo que reconstruir asignándose a la cepa así obtenida la clasificación de TA97a, teniendo ésta las mismas características de la TA97, pero con mejor crecimiento (Ames, comunicación personal).

Las características genéticas de estas cepas se resumen en la tabla 3:

Tabla 3: CARACTERISTICAS GENETICAS DE LAS CEPAS DE PRUEBA

Cepa <u>S. typhimurium</u>	Mutación <u>his</u>	Tipo de mutación	<u>rfa</u>	<u>uvrB</u>	<u>ptxM101</u>
TA97a	D6610	Corrimiento +4	+	+	+
TA98	D3052	Corrimiento -1	+	+	+
TA100	G46	Cambio AT-GC	+	+	+
TA102	G42B (pAQ1)	Cambio GC-AT	+	-	+

Ver la explicación en el texto.

Mutación rfa: Esta mutación causa una pérdida parcial de la barrera lipopolisacárida que cubre la superficie de la bacteria, e incrementa la permeabilidad a grandes moléculas que no penetran la pared celular normal (Maron y Ames, 1983).

Mutación uvrB: Esta es la delección de un gen que codifica para el sistema de reparación por escisiones del ADN, resultando en el incremento de la sensibilidad en la delección de muchos mutágenos. Esta delección se extiende hasta el gen bio y como consecuencia, estas bacterias requieren también de biotina para crecer (Maron y Ames,

1983). La cepa TA102 no contiene esta mutación pues fue construida primariamente para detectar mutágenos que requieren un sistema de reparación por escisiones intacto para actuar (Levin et al., 1982b; Maron y Ames, 1983).

Plásmido pKM101: El plásmido incrementa la mutagénesis química y espontánea realizando un sistema de reparación del ADN propenso al error normalmente presente en estos organismos (Walker y Dobson, 1979; Shanabruch y Walker, 1980; Maron y Ames, 1983).

A continuación se explican las mutaciones específicas en el gen marcador de las cuatro cepas mencionadas:

TA97 (TA97a): Esta cepa lleva la mutación hisD6610 (Levin et al., 1982a; Maron y Ames, 1983), la cual está en el gen hisD que codifica para la histidinol deshidrogenasa (Maron y Ames, 1983), consiste en una mutación de corrimiento de estructura (+4) resultando en una corrida de seis citosinas

como "punto caliente" para reversión por mutágenos que muevan la estructura de modo que se restablezca la lectura correcta del gen (Levin et al., 1982a). La cepa tiene un segundo punto caliente de pares alternos -GC-, por lo que también puede revertir por algunos de los mutágenos que reviertan a la cepa TA98 (Maron y Ames, 1983). La mutación de constitutividad his01242, presente también en esta cepa, solo es consecuencia del método de ingeniería genética utilizado para su obtención por Levin et al. (1982a).

TA98: La cepa acarrea la mutación his03052 (Maron y Ames, 1983). Esta es una mutación de corrimiento de estructura (-1) cercana a la secuencia -CGCCCGCG- (Maron y Ames, 1983; Hofnung y Quillardet, 1984; Venitt et al., 1984), la cual sirve como punto caliente para detectar las mutaciones de corrimiento de estructura que puedan restablecer la lectura correcta para la síntesis de histidina (Maron y Ames, 1983).

TA100: La mutación his046 en la cepa TA100, está en el gen

hisG que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de histidina (Ames, 1971; Maron y Ames, 1983). Esta mutación consiste en una sustitución de pares de bases AT-GC, cambiando la leucina (CTC) de la cepa tipo silvestre por prolina (CCC) en la cepa mutante (Maron y Ames, 1983; Hofnung y Quillardet, 1986; Venitt et al., 1986). Esta cepa detecta mutágenos que causan sustitución de pares de bases (Maron y Ames, 1983).

TA102: Esta cepa deriva de otra con la delección his(G)8476 y lleva la mutación hisG428 en el plásmido de multicopia pA01 (Levin et al., 1982b). Esta mutación es un cambio de pares de bases GC-AT dando lugar a la secuencia -TAA- (ocreo) en el gen mutante (Levin et al., 1982b, 1984; Maron y Ames, 1983). Esta cepa detecta principalmente mutágenos oxidativos (Levin et al., 1982b, 1984).

Las cepas tienen un rango de reversión espontánea característico para cada una, el cual se expresa como el número de colonias

revertantes que aparecen de manera espontánea por placa (Maron y Ames, 1983; Kier et al., 1986). Este rango debe ser más o menos constante en un mismo laboratorio y debe revisarse rutinariamente (Maron y Ames, 1983). Los rangos que se citan a continuación se obtuvieron de varias fuentes: TA97 (TA97a), 90-180 (Maron y Ames, 1983); TA98, 15-60; TA100, 75-200 (Kier et al., 1986); TA102, 240-360 (Ames, comunicación personal). Estos son rangos de reversión espontánea sin homogenado de hígado de rata y cofactores (mezcla S9), los rangos pueden variar un poco al añadirse la mezcla (Maron y Ames, 1983). Las colonias revertantes resaltan por su tamaño sobre la capa de colonias autótrofas (visibles solo en el microscopio estereoscópico o como una cierta opacidad en la placa)(Maron y Ames, 1983).

SORBATO POTÁSICO

El sorbato potásico se obtuvo en Almacén de Drogas S. A. en Guadalajara, Jalisco.

RATAS

Las ratas para la preparación de la fracción S9, se adquirieron en el bioterio de la Universidad de Guadalajara y de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de Occidente (UIEO). Eran ratas de la raza Wistar de aproximadamente 200g de peso.

METODOLOGIA

La preparación de las soluciones y medios que se mencionan a continuación se indica en un apéndice separado. La metodología se basa principalmente en Maron y Ames (1983), excepto donde se indica.

Confirmación de genotipos de las cepas de prueba

Los genotipos de las cepas de prueba se deben confirmar (a) inmediatamente después de recibir los cultivos, (b) cuando se prepara una nueva dote de permanentes congelados y placas

maestras, (c) cuando el número de revertantes espontáneas por placa cae fuera del rango normal, o (d) cuando hay una pérdida de sensibilidad a mutágenos generales.

Se utilizan cultivos nocturnos (en caldo nutritivo) frescos para estas pruebas. Todos los reactivos, material de vidrio, cajas de petri, puntas de inoculación, y puntas de algodón se esterilizaron

Requerimiento de histidina: Con palillos cubiertos con algodón en la punta se tomó una muestra del cultivo nocturno de la cepa y se hizo un trazo lineal a través de la placa control-biotina y después, a través de la placa histidina-biotina. Después de incubarse a 37°C durante la noche se observó el crecimiento en la placa histidina-biotina, asegurándose de que no lo hubiera en la placa control.

Mutación rfa: Esta mutación se comprobó añadiendo 0.1ml del cultivo nocturno de la cepa a un tubo de agar superficial (2ml)

fundido y mantenido en un baño a 45°C, se mezcló y vació en una placa de agar nutritivo procurando distribuir el agar superficial de manera uniforme, se dejó sobre una superficie plana hasta que solidificó. Se añadieron entonces 0.01ml de una solución de 1mg/ml de cristal violeta. Después de 12h de incubación a 37°C la aparición de una zona de inhibición alrededor del punto de aplicación indicó la presencia de la mutación rfa que permite a las moléculas grandes tales como el cristal violeta, penetrar y matar a la bacteria.

Mutación uvrB: Se tomó una muestra del cultivo nocturno de la cepa como se describió para la prueba del requerimiento de histidina, se sembró en una placa de agar nutritivo en líneas paralelas, se tapó la mitad de la placa de modo que la mitad de la línea de cada cepa se cubriera. Se irradió la placa con una lámpara germicida de 15w a una distancia de 33cm durante 8s. La cepa TA102 (que no tiene esta mutación), sirvió como control. Se incubó por 12-24h a 37°C. Las cepas con la delección uvrB crecieron solo en la parte sin irradiar de la placa.

Plásmido pKM101: La presencia del plásmido se probó mediante la resistencia a ampicilina que confiere. Las cepas se sembraron en una placa de ampicilina en líneas como se describió anteriormente. La cepa TA1535 (la cual no contiene este plásmido), sirvió como control de la actividad de la ampicilina. Se incubó por 12-24h, después de lo cual solo crecieron las cepas que contienen el plásmido.

Plásmido pAQ1: Este plásmido lleva un gen marcador de resistencia a la tetraciclina, por lo que la cepa TA102 debe probarse también en placas de ampicilina-tetraciclina. La cepa TA97a (con el plásmido pKM101 mas no el pAQ1) sirvió como control de la actividad de la tetraciclina.

Prueba de reversión espontánea

La prueba de reversión espontánea se llevó a cabo de la siguiente manera: Se tomó 0.1ml de un cultivo de 12h en caldo nutritivo de cada cepa reasistada. se vació en 2ml de agar superficial

enriquecido con solución de histidina-biotina, se mezcló y vació en placas de agar mínimo glucosa y se dejó solidificar. Se incubó a 37°C durante 48h procediendo al conteo de revertantes espontáneas tras la confirmación de la presencia de la capa de microcolonias en el estereoscópio.

Almacenamiento de las cepas de prueba

Cuando se recibieron las cepas, se crecieron en caldo nutritivo (Merk), enriquecido con sales Vogel-Bonner E y glucosa en las concentraciones que se utilizan en las placas de agar. Esto se realizó previo al uso del caldo nutritivo Oxoid #2. Se mezclaron con glicerol a un 15% y se almacenaron a -70°C.

Placas maestras: Se fundió un congelado permanente, se aplicó una gota a la superficie de la placa correspondiente para placas maestras, se enfrió y estiró con un asa bacteriológica para el aislamiento de colonias. Se incubó 48h a 37°C. Con un asa bacteriológica estéril, se removieron varias colonias bien

aisladas (por separado), resuspendiéndose cada una en 0.2ml de amortiguador de fosfato salino contenido en un pequeño tubo de cultivo, se impregnó una punta de algodón con la suspensión y se hicieron de 4 a 5 líneas paralelas cruzando la superficie de la placa agar apropiada. Se incubó a 37°C durante una noche.

Las placas maestras así obtenidas se almacenaron a 4°C. Se les sometió a confirmación de genotipos así como a prueba de reversión espontánea eligiéndose las placas con el aislado que presentó las características correctas de la cepa correspondiente para hacer las pruebas de mutagenicidad y los permanentes congelados.

Las placas maestras se descartan después de dos meses o antes si el rango de reversión espontánea sale del rango específico para la cepa. Las placas maestras de TA102 se descartan después de dos semanas porque la reversión espontánea se incrementa como consecuencia de la tetraciclina añadida a la placa para la retención del plásmido pAO1 que parece incrementar su número con

el tiempo. Por este problema Maron y Ames (1983), recomiendan utilizar las copias permanentes congeladas como fuente de inoculación de cultivos líquidos de TA102.

Copias congeladas permanentes: A partir de las placas maestras, se obtuvieron colonias aisladas por la técnica de estriado con asa bacteriológica en placas de ampicilina o ampicilina-tetraciclina de acuerdo a la cepa. Se inoculó con estas un cultivo nocturno para cada cepa. Ya crecido el cultivo (en caldo nutritivo), se mezcló con glicerol a un 15% como crioprotector (Maniatis et al., 1982), congelándose en pequeñas muestras (1ml) a -20oC y posteriormente a -70oC. Estas copias pueden durar aproximadamente tres años sin ningún problema de cambios genéticos ni gran pérdida de viabilidad (Maron y Ames, 1983).

Preparación de la fracción S9

Fracción S9 no inducida: Para obtener la fracción S9, se acostumbra utilizar alguna sustancia que induzca una mayor

concentración de enzimas microsomales en el hígado de las ratas (Maron y Ames, 1983), tal sustancia es generalmente el Aroclor 1254, el cual es un carcinógeno de gran estabilidad y difícil manejo, por ello puede ser de un gran peligro para los trabajadores de laboratorio (Matsushima, 1976; Maron y Ames, 1983). por esto se prefirió no usar esta sustancia y extraer la fracción S9 con la concentración normal de enzimas.

Remoción del hígado de las ratas: Para asegurar una preparación limpia de S9, los hígados se deben remover asépticamente. Se sacrificó a los animales por dislocación cervical poniéndolos después sobre su dorso. Se humedeció la piel con etanol al 70-95%. Se cortó con escalpelo sosteniendo los bordes con pinzas de cirugía evitando así que se contaminara la cavidad abdominal. Se mojó la capa muscular con etanol procediendo al corte de la misma cuidando de no cortar el esófago o los intestinos pues esto resultaría en contaminación del homogenado de hígado.

Preparación de la fracción de hígado homogenado S9: Todos los

pasos se llevaron a cabo en hielo, utilizando material y soluciones frías y estériles. Los hígados recién extraídos se pusieron en recipientes ya pesados con aproximadamente 1ml de KCl 0.15M por g de hígado húmedo (un hígado de rata pesa entre 10-15g). Después de pesar, se lavaron los hígados varias veces en la solución de KCl. Los lavados sucesivos son esenciales para asegurar una preparación estéril y para remover la hemoglobina que puede inhibir la actividad de las enzimas del citocromo P450. Los hígados lavados se transfirieron a un recipiente con tres volúmenes de KCl 0.15M (3ml/g de hígado húmedo), procediendo a cortar con tijeras estériles. Se homogeneizó en homogeneizadoras de vidrio con mano de teflón. El homogenado se centrifugó por 10min a 9000g (6700rpm en rotor 99-34 de Sorval Instruments) y el sobrenadante (la fracción S9), se decantó y almacenó en porciones de 3ml a -70°C.

Prueba de mutagenicidad con preincubación

La técnica utilizada para la prueba de mutagenicidad del sorbato

potásico es la llamada prueba o técnica con preincubación. Esta técnica se eligió por reportarse como más sensible o al menos igual que la técnica general de vaciado directo en placa (Maron y Ames, 1963; Levin et al., 1964), además de que muchas sustancias han resultado positivas solo con el paso de la preincubación (Sugimura, 1982; Ames, comunicación personal).

Las pruebas se realizaron de acuerdo con Maron y Ames (1963), con cultivos frescos (10ml) de las cepas de prueba de 12h con una población de 1-2 E8 células por ml en caldo nutritivo (incubados a 37°C, 250rpm, en tubos de 25X150mm inclinados para asegurar la aereación. La población se calculó en base a que una densidad óptica de 1, a 600nm, equivale aproximadamente a 9 E8 células/ml (Maniatis et al., 1982):).

Soluciones de sorbato potásico: Para la prueba general de mutagenicidad, se recomienda utilizar un amplio rango de concentraciones cubriendo al menos un rango logarítmico (Maron y Ames, 1963; Kier et al., 1966). Las dosis no deben separarse

por más de un factor de cinco (v.g. dos dosis por intervalo logarítmico)(Kier et al., 1986). En caso de encontrarse un resultado positivo o cuestionable, debe confirmarse demostrando una relación dosis respuesta utilizando un rango más estrecho (Maron y Ames, 1983).

Las distintas diluciones de sorbato potásico se prepararon frescas para cada ensayo de la siguiente manera: Se preparó una solución madre de 100mg/ml de sorbato potásico en agua destilada, se esterilizó por filtración a través de una membrana Millipore de 0.45µm. A continuación se prepararon diluciones en agua destilada estéril (por autoclave) a partir de la solución madre con concentraciones de 50, 10, 5, 1 y 0.1mg/ml, para incorporar en 0.1ml 10, 5, 1, 0.5, 0.1 y 0.01mg/placa de sorbato potásico respectivamente.

Prueba sin sistema de activación: La prueba de mutagenicidad del sorbato potásico sin sistema de activación (mezcla S9), se realizó de acuerdo con Maron y Ames (1983), y Levin et al.

(1984), añadiendo en tubos estériles de 13X100mm, 0.5ml de amortiguador fosfato (0.02M, pH 7.4), 0.1ml de la dilución de sorbato potásico correspondiente y 0.1ml de la cepa de prueba. Se mezcló y se incubó a 37°C por 20min a 120rpm. Después de esto se agregaron 2ml de agar superficial enriquecido con solución de histidina-biotina 0.5M, como se indica en la sección de preparación de soluciones y medios, mantenido hasta el momento en un baño a 45°C para evitar que se gelifique. Se vació en la placa correspondiente de agar mínimo glucosa procurando una distribución uniforme sobre la superficie. Se permitió solidificar para invertir las placas e incubar a 37°C durante 48h protegidas de la luz. Después de asegurarse de la presencia de la capa de colonias autótrofas se procedió al conteo de las colonias revertantes.

Prueba con mezcla S9: Esta prueba se llevó a cabo del mismo modo que la anterior, sustituyendo el amortiguador fosfato por 0.5ml de la mezcla S9 preparada fresca y mantenida en hielo hasta el momento de la prueba. La concentración de fracción S9, se basó en

Los resultados de la prueba de actividad de la misma que se describe a continuación.

Prueba de actividad de la fracción S9: La técnica de prueba de actividad de la fracción S9 es básicamente la misma prueba con preincubación descrita anteriormente ya que estas son las condiciones en que se habría de utilizar. Se probaron concentraciones de la fracción S9 de 0.05, 0.10, 0.15 y 0.20ml/0.5ml de mezcla en base a los antecedentes bibliográficos (Maron y Ames, 1983), incluyendo posteriormente la concentración de 0.00ml de fracción S9/0.5ml de mezcla. La sustancia a activar fue la benzidina a razón de 0.05mg/placa de agar mínimo glucosa y la cepa utilizada la TA98 (Ames *et al.*, 1973 (la referencia menciona a la cepa TA1528 que tiene la misma mutación marcadora que la TA98, solo que carece del plásmido pKM101)). La mejor concentración de fracción S9 se eligió en base al número de revertantes/placa con benzidina contra su respectivo control (con agua el solvente de la benzidina en estas pruebas). En esta prueba, al igual que en todas las pruebas de mutagenicidad, se

prepararon tres placas para cada evento (concentración de prueba, controles, etc.).

RESULTADOS

CONFIRMACION DE GENOTIPOS DE LAS CEPAS DE PRUEBA

Después de obtener varias placas maestras de cada cepa, se procedió a esta confirmación cuyos resultados fueron satisfactorios. La tabla 4 contiene los resultados de estas pruebas solamente para las cuatro placas maestras elegidas después de la prueba de reversión espontánea. Estas pruebas, sin embargo, resultaron positivas en todos los casos.

PRUEBA DE REVERSION ESPONTANEA

En esta prueba se observaron algunos reaislados (es decir, en las placas maestras), con tendencia a sobrepasar el rango normal de reversión espontánea reportado en la literatura. De entre las placas cuyo rango estaba dentro de lo esperado se eligieron las cuatro (una por cepa) que se anotan en la tabla 4.

Tabla 4: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CONFIRMACION DE GENOTIPOS Y DE REVERSION ESPONTANEA EN LAS PLACAS ELEGIDAS PARA LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD DEL SORBATO POTASICO

CEPA	MUTACION:			RESISTENCIA:		REVERTANTES OBSERVADAS	REVERTANTES ESPERADAS
	his-	rfa	uvrB	AMP	TET		
TA97a	+	+	+	+	-	155 166 174	90-180*
TA98	+	+	+	+		29 22 34	15-60*
TA100	+	+	+	+		124 136 112	75-200**
TA102	+	+	+	+	+	304 308 275	240-360***

AMP-Resistencia a la ampicilina (plásmido pKM101).

TET-Resistencia a la tetraciclina (plásmido pA01), en esta prueba la cepa TA97a sirvió como control.

La cepa TA102 no acarrea la delección uvrB, el símbolo (+) significa un resultado correcto

*Maron y Ames, 1983.

**Kier *et al.*, 1986.

***Ames, comunicación personal.

PRUEBA DE ACTIVIDAD DE LA FRACCION S9

Se realizaron pruebas de actividad de la fracción S9 en dos preparados de la misma, para la primera se utilizó diclorobenzidina como promutágeno a activar, para la última se utilizó benzidina. La cantidad de promutágeno por placa fue en ambos casos de 0.05mg. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6, en que puede notarse un aumento en el número de colonias

Tabla 5: PROMEDIO DE COLONIAS REVERTANTES POR PLACA EN LA PRUEBA DE ACTIVIDAD DE LA FRACCION S9 CON LA CEPA TA98 Y DICHLOROBENZIDINA COMO PROMUTAGENO

MUESTRA	ml de S9 por placa			
	0.05	0.10	0.15	0.20
CONTROL	34.7	24.0	27.3	24.3
DICHLOROBENZIDINA	72.7	104.3	71.0	72.0

El número de colonias revertantes que aquí se presenta es el resultado del promedio de tres placas para cada evento.

Tabla 6: PROMEDIO DE COLONIAS REVERTANTES POR PLACA EN LA PRUEBA DE ACTIVIDAD DE LA FRACCION S9 CON BENZIDINA COMO PROMUTAGENO CON LA CEPA TA98

MUESTRA	ml de S9 por placa			
	0.00	0.05	0.10	0.15
CONTROL	48.7	37.7	43.7	52.0
BENZIDINA	56.0	243.3	369.7	283.7

El número de colonias revertantes que se presenta es el resultado del promedio de tres placas por evento.

revertantes inducidas por el promutágeno al ser activado por la mezcla S9, con respecto a su respectivo control. El efecto es mayor en el caso de la concentración de 0.1ml de S9 por placa en ambos experimentos, lo que se aprecia mejor en las figuras 1 y 2, en que se grafican los resultados.

PRUEBA DE MUTAGENICIDAD SIN SISTEMA DE ACTIVACION

Los resultados de la prueba de mutagenicidad del sorbato potásico sin mezcla S9 (sistema de activación) se muestran en la tabla 7, en la que puede apreciarse en cuanto al número de colonias revertantes por placa, comparadas con el número en el control (concentración 0), solamente una disminución en el número de colonias revertantes al aumentar la concentración de la sustancia a prueba, lo que se aprecia con mayor grado desde la concentración de 5mg/placa en las cepas TA97a, TA100 y TA102; y en la concentración de 10mg/placa en la cepa TA98.

PRUEBA CON MEZCLA S9

Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 8. Como en

Figura 1

1a PRUEBA DE ACTIVIDAD DE FRACCION S9

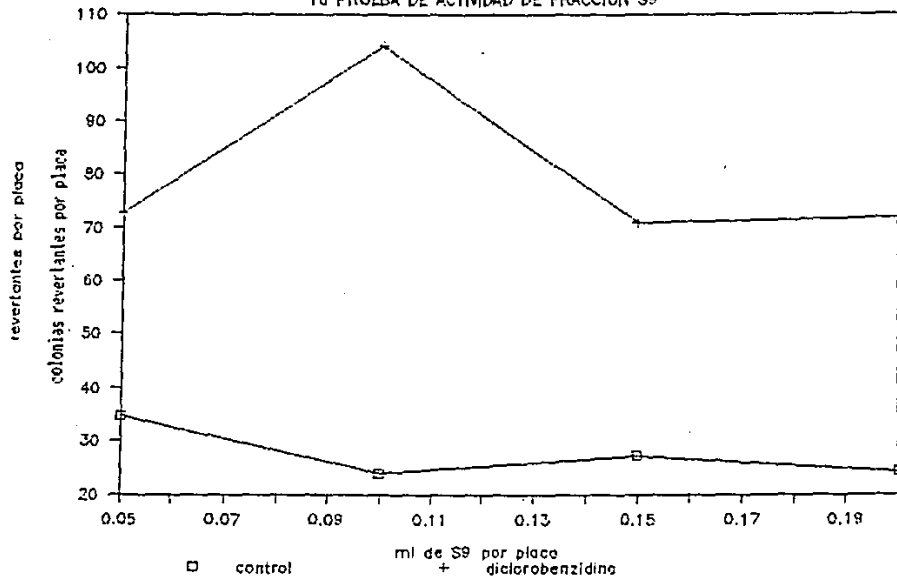


Figura 2

2ª PRUEBA DE ACTIVIDAD DE FRACCION S9

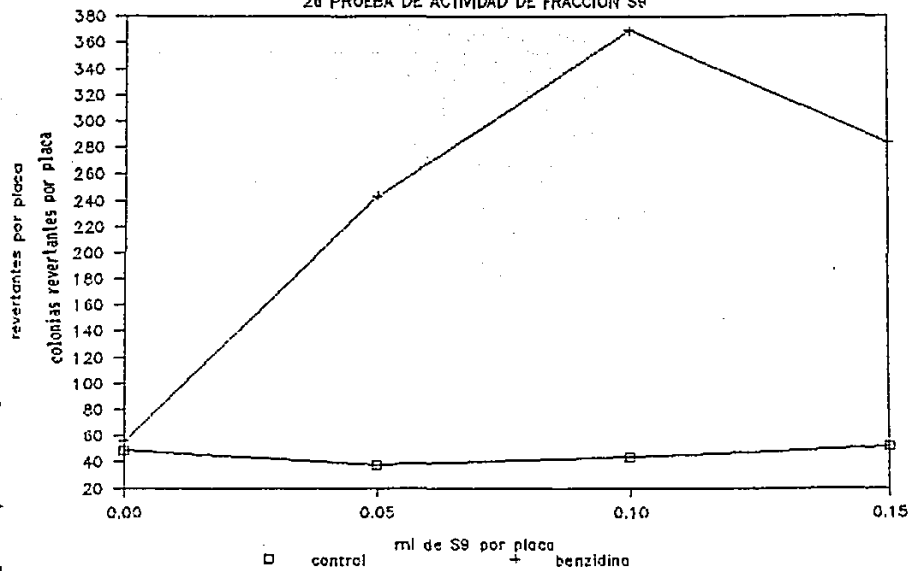


Tabla 7: NUMERO DE COLONIAS REVERTANTES POR PLACA OBTENIDAS EN LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD DEL SORBATO POTASICO (SK) SIN SISTEMA DE ACTIVACION ENZIMATICA

CEPA	CONCENTRACION (mg de SK/placa)						
	0.00	0.01	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
TA97a	124	114	130	124	90	27	0
	109	120	150	123	143	11	0
	99	124	127	118	103	10	0
TA98	27	24	30	22	19	9	9
	30	27	31	19	19	22	14
	28	30	*	27	23	29	12
TA100	94	66	75	76	72	30	24
	78	76	73	77	68	67	30
	97	98	82	86	72	50	41
TA102	266	298	285	189	222	97	14
	293	330	239	122	257	85	3
	252	300	228	193	191	60	19

*La placa presentó deformaciones que dificultaron el conteo.

el caso anterior, se observa que el número de colonias revertantes por placa tiende a disminuir con el aumento en la concentración de la sustancia a prueba, en las concentraciones de 5mg/placa en las cepas TA97a y TA102, con 1mg/placa en la cepa

tabla 8: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD DEL SORBATO POTASICO CON MEZCLA 99 (SISTEMA DE ACTIVACION ENZIMATICA) EN NUMERO DE COLONIAS REVERTANTES POR PLACA

CEPA	CONCENTRACION (mg de SK/placa)						
	0.00	0.01	0.10	0.50	1.00	5.00	10.00
TA97a	188	169	145	137	125	1	0
	160	137	148	126	141	1	2
	164	164	168	137	131	1	0
TA98	35	24	26	25	26	41	50
	20	23	25	25	26	33	52
	31	28	23	27	31	42	50
TA100	88	81	58	60	53	69	26
	78	81	74	78	65	43	27
	91	72	70	75	68	27	30
TA102	204	172	163	320	142	8	6
	205	144	175	204	264	6	4
	222	166	177	320	252	3	0

TA100, más no así en la cepa TA98.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas de confirmación de genotipos, así como en la de reversión espontánea, demuestran que las cepas elegidas para la prueba de mutagenicidad del Sorbato Potásico, mantienen todas sus características genéticas y se encuentran dentro del rango de reversión espontánea reportado en la bibliografía (ver la tabla 4). Con estos resultados fue posible pasar a la prueba primeramente de actividad de la fracción S9 y posteriormente a las de mutagenicidad.

Está reportado que aún no se cuenta con un método estadístico conveniente para estas pruebas de mutagenicidad (Maron y Ames, 1983; Kier et al., 1986), sin embargo, el método más usual es el de considerar que un número doble o triple de colonias revertantes en una o dos de las concentraciones de prueba, con

respecto al control, se considera como un resultado positivo (Kier et al., 1986). Bajo este precepto es que se consideraron los resultados de la prueba de actividad de la mezcla S9, en que la concentración de 0.1ml de fracción S9 por placa se eligió por ser la que resultó en una mayor cantidad de colonias revertantes por placa, contra su respectivo control (ver figuras 1 y 2).

En cuanto a las pruebas de mutagenicidad, se pueden discutir los resultados bajo el mismo precepto. Se menciona en ambos casos, con y sin activación metabólica (mezcla S9), que se presenta un número menor de colonias revertantes por placa con el aumento en la concentración de Sorbato Potásico; de 5mg/placa en las cepas TA97a, TA100 y TA102, y de 10mg/placa en la cepa TA98 en la prueba sin activación metabólica; de 5mg/placa en las cepas TA97a y TA102, de 10mg/placa en la cepa TA100, más no así en la cepa TA98 en las pruebas con mezcla S9. Este resultado se debe a que se alcanzó una concentración de toxicidad de la sustancia a prueba para la bacteria en cada caso, lo que se manifiesta en el menor número de colonias revertantes por placa, aunque no se

observe en la capa de microcolonias auxótrofas (Maron y Ames, 1983). En el caso de la cepa TA98, en la prueba con mezcla S9, no se observa toxicidad, sin embargo, se alcanzó una concentración mayor al mínimo aceptable de acuerdo con Kier et al. (1986), el cual es de 1mg/placa. La mayoría de las sustancias mutagénicas se detectan en concentraciones menores. lo que puede constatarse en la literatura (Ames, et al., 1973, 1975; McCann et al., 1975; Maron y Ames, 1983). En ninguna concentración de prueba se observó un aumento considerable en el número de colonias revertantes por placa, por lo tanto se puede descartar un efecto mutagénico del sorbato potásico sobre cualquier cepa, en las condiciones en que se realizaron las pruebas.

CONCLUSIONES

Despues de observar los datos y discutirlos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- Las placas maestras, obtenidas a partir de colonias aisladas de cada cepa, se encontraron en buen estado genotípico para realizar la prueba de mutagenicidad del Sorbato Potásico.
- 2.- La prueba de actividad de la fracción 59, aseguró la utilización de una concentración de la misma que correspondiera a su mejor actividad, así como aseguró que era eficiente para realizar dicha activación.
- 3.- La prueba de incorporación en placa con preincubación, elegida por su facilidad de manejo y mejores resultados de

acuerdo con la bibliografía, utilizada tanto en la prueba sin activación metabólica o enzimática (labor de la metela S9), como en la prueba con tal activación mostró toxicidad para la mayoría de los casos, no así un número considerablemente mayor de colonias revertantes por placa en cualquier concentración de la sustancia a prueba, por lo que se puede concluir que el Sorbato Potásico no es mutagénico, en las condiciones de prueba a que se sometió, para las cepas del ensayo de mutagenicidad Salmonella/microsomal TA97a, TA98, TA100 y TA102.

- 4.- Quedan de este modo establecidas las técnicas de esta prueba, para realizarse con otras sustancias.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS

La preparación de las soluciones y medios de cultivo se llevó a cabo de acuerdo con Maron y Ames (1963), excepto donde se indica.

Medio Vogel-Bonner E (25X)

Usar Agar mínimo

<u>In ingrediente</u>	<u>Por litro</u>
Agua destilada (45oC)	670 ml
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	5 g
Acido cítrico monohidratado	50 g
Fosfato de potasio dibásico (anhidro) (K ₂ HPO ₄)	250 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	57.76 g
Hidróxido de amonio (NH ₄ OH 28% d25/25=0.9)	58.2 ml

Las sales se añadieron en el orden indicado en un matraz de dos litros mezclando y permitiendo que cada sal se disolviera antes de añadir la siguiente. Los dos últimos ingredientes se mezclaron aparte en un poco de agua, para después añadirse al resto de la

solución, una vez disueltas las sales se aforó a un litro con agua destilada. Hay dos modificaciones al método recomendado por Maron y Ames (1983); Las dos últimas sustancias sustituyen al fosfato de sodio y amonio ($\text{NaNH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 87.5g) original de modo que den la misma concentración de nutrientes ya que la sal sustituida no se pudo adquirir. La otra modificación consiste en que la solución está concentrada 25 veces en lugar de 50 pues esta última tendía a cristalizarse. La preparación de los medios de cultivo se modificó de modo que la concentración de sales resulte la misma que la que se recomienda en la referencia mencionada (esto es concentración 1X). La solución se esterilizó en autoclave a 15lb/20min.

Solución 0.5mM histidina-biotina

Uso: Prueba de mutagenicidad (se añaden 10ml al agar superficial)

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 250ml</u>
D-biotina (PM 247.3)	30.9 mg
L-histidina (FM 155.2)	19.44 mg
Agua destilada	250 ml

La biotina se disolvió calentando el agua a punto de ebullición. Se esterilizó en autoclave a 15lb/20min almacenándose posteriormente a 40C.

Agar superficial

Uso: Prueba de mutagenicidad y de genotipos

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 100ml</u>
Agar agar	0.6 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Se esterilizó en autoclave a 15lb/20min. Se permitió enfriar un poco en un baño a 450C añadiendo después (para la prueba de mutagenicidad) 10ml de solución de histidina-biotina 0.5mM para a continuación hacer la prueba. El almacenaje de porciones de 100ml ya esterilizados como recomiendan Maron y Ames (1983), no fue conveniente por la dificultad para fundir bien el medio para realizar la prueba de mutagenicidad; por lo que se optó por usarlo recién preparado.

Solución de sales 1.65M de KCl + 0.4M de MgCl2

Uso: Mezcla S9 para prueba de mutagenicidad

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 500ml</u>
Cloruro de potasio (KCl)	61.5 g
Cloruro de magnesio (MgCl2.6H2O)	40.7 g
Agua destilada:	aforar a 500 ml

Se esterilizó en autoclave a 15lb/20min y se almacenó en botellas de vidrio a 4°C.

Amortiguador de fosfato de sodio 0.2M pH7.4

Uso: Mezcla S9

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 500ml</u>
0.2M Fosfato monobásico de sodio (NaH2PO4.H2O) (13.8g/500ml)	60 ml
0.2M Fosfato dibásico de sodio (Na2HPO4) (14.2g/500ml)	440 ml

Las cantidades de cada solución son aproximadas, si el pH era muy bajo, se agregó más 0.2M de fosfato dibásico de sodio hasta obtener un pH de 7.4 y viceversa. Se esterilizó en autoclave a 15lb/20min almacenándose después a 4°C.

Solución NADP 0.1M (Nicotin Adenin Dinucleótido Fosfato)

Uso: Mezcla S9

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 5ml</u>
NADP (PM 765.4)	333 mg
Agua destilada estéril	5 ml

No fue necesario esterilizar puesto que la solución se preparó en un medio estéril (Las soluciones de NADP se mantienen estables en refrigeración a -20°C por lo menos seis meses).

Solución glucosa 6 fosfato 1M

Uso: Mezcla S9

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 10ml</u>
Glucosa 6 fosfato (G-6-P)	2.62 g
Agua destilada estéril	10 ml

Al igual que con la solución de NADP, no se necesitó esterilizar.

La solución es estable a -20°C por seis meses.

Mezcla S9 (sobrenadante de homogenado de hígado centrifugado a 9000g + cofactores)

Para prueba de actividad de la fracción S9

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad</u>
Amortiguador fosfato 0.2M	7.00 ml
NADP 0.1M	0.56 ml
G-6-P 1M	0.07 ml
Solución KCl-MgCl2	0.29 ml
-----	-----
TOTAL	7.91 ml

Los ingredientes se añadieron en el orden indicado y se aforó a 8ml con agua destilada estéril. A continuación se repartió en porciones de 2ml (cuatro porciones), a las que se les agregaron la fracción S9 y agua en las porciones de prueba de actividad-concentración que se enumeran abajo:

<u>Ingrediente</u>	<u>Concentración de fracción S9 (ml/placa)</u>			
	<u>0.05</u>	<u>0.10</u>	<u>0.15</u>	<u>0.20</u>
Fracción S9	0.35ml	0.70ml	1.05ml	1.40ml
Agua	1.15ml	0.80ml	0.45ml	0.10ml
-----	-----	-----	-----	-----

Se utilizó agua destilada estéril. Para la segunda prueba en que

ya se esperaba la mejor actividad con 0.10 ml de fracción S9 (es la fracción S9 que se añade en 0.5ml de mezcla S9 a cada placa), se prepararon las concentraciones de 0.05, 0.10 y 0.15ml/placa, añadiendo una cuarta de concentración 0.00ml/placa (1.50ml de agua solamente), la cual inició la curva de actividad (ver resultados).

Para prueba de mutagenicidad

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 50ml</u>
Agua destilada estéril	11.75 ml
Amortiguador fosfato 0.2M	25.0 ml
NADP 0.1M	2.0 ml
G-6-P 1M	0.25 ml
Salas KCl-MgCl ₂	1.0 ml
Fracción S9	10.0 ml (0.1ml/placa)

Los ingredientes se añadieron en el orden indicado de modo que la fracción S9 se disolviera en una solución amortiguada. La solución se preparó fresca y en hielo (lo mismo que para la prueba de actividad). Las soluciones deben estar frías, es por esto que se almacenaron a 4°C. Cualquier sobrante de la fracción S9 o de la mezcla se descartó.

Solución de ampicilina (8mg/ml)

Uso: Placas maestras para las cepas con el plásmido pKM101 y para prueba de resistencia a ampicilina.

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 100ml</u>
Ampicilina trihidratada	0.8 g
Hidróxido de sodio 0.02N	100 ml

Se almacenó a 4°C. No fue necesario esterilizar, se preparó en medio y con solución de hidróxido de sodio estériles.

Solución de tetraciclina (8mg/ml)

Uso: Placas maestras para TA102 y prueba de resistencia a la tetraciclina.

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 10ml</u>
Tetraciclina	0.08 g
Acido clorhídrico 0.02N	10 ml

Se preparó como la solución de ampicilina en un medio estéril y se almacenó posteriormente a -20°C.

Solución cristal violeta (0.1%)

Uso: Comprobación de la mutación rfa

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 100ml</u>
Cristal violeta	0.1 g
Agua destilada estéril	100 ml

Se almacenó a 4°C.

Glucosa 40% (peso/volumen)

Uso: Agar mínimo glucosa y placas maestras

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 500ml</u>
D-glucosa anhidra	200 g
Agua destilada	300 ml

Se calentó el agua para disolver la glucosa, se aforó entonces a 500ml con más agua destilada y se esterilizó en autoclave a 15lb/20min. Se almacenó a temperatura ambiente.

Placas de agar mínimo glucosa

Uso: Prueba de mutagenicidad

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 1 litro</u>
Agar agar	15 g
Agua destilada	910 ml
Sales VB E 25X	40 ml
Glucosa 40%	50 ml

Se agregó el agar al agua destilada y se esterilizó en autoclave a 15lb/20min. Después de enfriarse un poco se agregaron las sales y la glucosa. Se vertieron 20ml en cada caja petri.

Para la cepa TA97a, se redujo la cantidad de glucosa 40% a 10ml como recomienda Ames (comunicación personal), pues las colonias revertantes de esta cepa crecen poco en placas con alta concentración de glucosa.

Placas histidina-biotina

Uso: Prueba de requerimiento de histidina

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 1000ml</u>
Agar agar	15 g
Agua destilada	894 ml
Sales VB E 25X	40 ml
Glucosa 40%	50 ml
Solución de histidina estéril (1.62g/400ml de agua)	10 ml
Solución estéril de biotina 0.5mM	6 ml

Se esterilizaron en autoclave el agar y el agua. Se añadieron después los demás ingredientes, se mezclaron y se vertió el medio en cajas petri.

Placas de ampicilina y ampicilina-tetraciclina

Uso: Placas maestras para las cepas con el plásmido pKM101 y con los plásmidos pKM101 y pAQ1 + Pruebas de resistencia a ampicilina y ampicilina-tetraciclina.

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 1 litro</u>
Agar agar	15 g
Agua destilada	890 ml
Sales VB E 25X	40 ml
Glucosa 40%	50 ml
Solución de histidina estéril (1.62g/400ml de agua)	10 ml
Solución estéril de biotina 0.5mM	6 ml
Solución de ampicilina (8mg/ml)	3.15 ml
Solución de tetraciclina (8mg/ml)	0.25 ml

Se esterilizó el agar con el agua en autoclave a 15lb/20min para después agregar el resto de los ingredientes y vaciar el medio en cajas petri. La solución de tetraciclina solo se agregó a las placas para usarse con la cepa TA102. Las placas se pueden almacenar a 4°C durante cerca de dos meses sin pérdida de actividad de los antibióticos.

Placas de agar nutritivo

Uso: Pruebas de genotipos rfa y uvrB

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 1 litro</u>
Caldo nutritivo Oxoid #2	25 g
Agar agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó en autoclave a 15lb/20min. Después se vació en cajas petri.

Amortiguador fosfato salino y amortiguador fosfato 0.02M pH 7.4

Uso: Resuspensión de colonias aisladas para placas maestras (amortiguador fosfato salino).

Prueba de mutagenicidad con preincubación sin S9 (amortiguador fosfato 0.02M).

<u>Ingrediente</u>	<u>Para 500ml</u>
0.02M Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (1.38g/500ml)	60 ml
0.02M Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) (1.42g/500ml)	440 ml

Los volúmenes de las soluciones son aproximados, si el pH de la mezcla era muy bajo se añadía más 0.02M de fosfato dibásico de sodio y viceversa hasta obtener un pH de 7.4, obteniéndose así la solución amortiguadora de fosfato 0.02M para la prueba de mutagenicidad sin S9. En el caso del amortiguador fosfato salino (0.02M fosfato, 0.15M NaCl), las soluciones de cada fosfato se prepararon en 0.15M de NaCl ajustando el pH después a 7.4 del mismo modo antes descrito. Se esterilizó en autoclave a 15lb/20in.

Caldo nutritivo

Uso: Crecimiento de las cepas para las pruebas de genotipos y de mutagenicidad así como para preparar congelados permanentes a -70°C.

Ingrediente

Para 1 litro

Caldo nutritivo Oxoid #2	25 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó en autoclave. Se utilizó este medio por ser el

recomendado por Maron y Ames (1983), la preparación corresponde a las instrucciones del paquete.

G L O S A R I O

AUXOTROFO: En este caso, bacteria que depende de alguna sustancia o metabolito en el medio para crecer por ser incapaz de sintetizarla.

CARCINOGENO: Factor físico o químico que es capaz de producir tumores.

CARCINOGENICIDAD: Adjetivo que denota la capacidad de producir un cáncer.

CONSTITUTIVIDAD (mutación de): Tipo de mutación en los genes de regulación que permite la transcripción continua de los genes bajo su control.

DELECCION: Traducción que se ha otorgado a la palabra inglesa deletion, que podría traducirse como supresión, lo que no se utiliza por ser esta última palabra la adecuada para suppression, la cual en biología molecular denota un cambio en el ADN que SUPRIME la lectura de un codón. Por esto, algunos autores

traducen deletion como deleción, o como delación, para referirse a una parte del ADN que ha sido eliminada del genoma.

GENOTOXICIDAD: Toxicidad al genoma o ADN; es una palabra bastante general que puede incluir, mutagenicidad, integración viral, etcétera.

MUTAGENO: Factor físico o químico que puede producir un cambio en el ADN (mutación). En este trabajo se utiliza principalmente para aquellos que pueden cambiar una base por otra, o causar por adición o deleción de algún nucleótido, un cambio en la estructura de la lectura de un gen durante la traducción.

MUTAGENICIDAD: Adjetivo que denota la propiedad de algunos factores físicos o químicos de causar mutaciones.

PUNTO CALIENTE: Traducción del término inglés hot spot, utilizado para designar a aquellas regiones del ADN más propensas a la mutagénesis.

REVERSION: En biología molecular denota a la mutación reversa, que de algún modo, restaura el fenotipo original.

TERATOGENICIDAD: "Creación de monstruos", referente a las malformaciones congénitas.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Ames, B.N. (1971) The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. *Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection*. Vol. 1, Hollaender, A., ed., Plenum Press, New York, pp 267-282. Reimpreso en Traul, K.A. (ed) 1985: "Microbial Tests for Mutagenicity/Carcinogenicity". 12, 113-128. Van Nostrand Reinhold Co. Inc. New York.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science: 221, 1256-1263.
- Ames, B.N. (1986) Six common errors relating to environmental pollution. Water, 27(4): 20-22.
- Ames, B.N., H.J. Whitfield, Jr. (1966) Frameshift mutagenesis in Salmonella. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 221-225. Reimpreso en Traul, K.A. (ed) 1985: "Microbial Tests for Mutagenicity/Carcinogenicity". 11, 108-112. Van Nostrand Reinhold Co. Inc. New York.
- Ames, B.N., R. Magaw, L. Swirsky Gold (1987) Ranking possible carcinogenic hazards. Science, 236, 271-280.
- Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki, F.D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens: A simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.

- Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 70, 2281-2285. Reimpresso en Traul, K.A. (ed) 1985: "Microbial Tests for Mutagenicity/Carcinogenicity". 8, 69-73. Van Nostrand Reinhold Co. Inc. New York.
- Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsomes mutagenicity test. Mutation Res., 31, 347-364.
- Arnaise, S., H. Roef, J.P. Buisson, N. Cantat, P. Demarseman, J. Einhom, G. Lamotte, M. Lemelin, P.A. Erimer, S.W. Ferdus, A.W. Hsie, R. Royer, F. Kelly, M. Hofnung (1986) Genotoxic activities of 2-nitronaphthofurans and related molecules. Mutagenesis, 1, 217-229.
- Dziedzic, J.D. ed. (1986) Preservative systems in foods: Antioxidants and antimicrobial agents. Food Technology, 40(9): 91-111.
- Earle, M.D., G. Putt (1984) Sorbates in food. A review. Food Tech. in New Zealand, Sept.: 29-35.
- Freifelder, D. (1983) Molecular Biology: A Comprehensive Introduction to Prokaryotes and Eukaryotes. Jones and Bartlett Publishers Inc. Boston, MA (USA), 979 pp.
- Fréjaville, J.P. (1977) Les Dangers des Produits Domestiques: Guide Pratique. Editions du Seuil, 175 pp.
- Gentile, J.M., M.J. Plewa (1982) Plant dependent mutation assays. En Fleck, R.A., A. Hollaender (eds): "Genetic Toxicology: An Agricultural Perspective". New York: Plenum Press, pp 327-352.
- Gentile, J.M., G.J. Gentile, M.J. Plewa (1986) In vitro activation of chemicals by plants: A comparison of techniques. Mutation Res., 164, 53-56.

- Gentile, J.M., G.J. Gentile, S. Townsend, M.J. Pleva (1985) In vitro enhancement of the mutagenicity of 4-nitro-phenilenediamine by plant S-9. Environ. Mutagen., 7, 73-85.
- Hofnung, M., P. Ouillardet (1984) Use of the terms mutagenicity and genotoxicity. Mutation Res., 132, 141-142.
- Hofnung, M., P. Ouillardet (1986) Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. Mutagenesis, 1, 319-330.
- Kada, T., T. Inoue, K. Morita, M. Namiki (1986) Dietary desmutagens. In Knudsen, Ib (ed): "Genetic Toxicology of the Diet: Proceedings of a Satellite Symposium of the Fourth International Conference on Environmental Mutagens Held in Copenhagen, Denmark, June 19-22, 1985". New York: Alan R. Liss Inc., pp 245-253.
- Kier, L.E., D.J. Brusick, A.E. Auletta, E.S. Vonttalle, M.M. Brown, V.F. Simmon, V. Dunkel, J. McCann, K. Mortelmans, M. Prival, T.K. Rao, V. Ray (1986) The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, 69-240.
- Langer, P.J., W.G. Shanabruch, G.C. Walker (1981) Functional organization of plasmid pKM101. Jour. of bacteriology, 145(3): 1310-1316.
- Lehninger, A.L. (1983) Bioquímica. 2a Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1117 pp.
- Levin, D.E., E. Yamasaki, E.N. Ames (1982a) A new Salmonella tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot spot. Mutation Res., 94, 315-330.

- Levin, D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, E.A. Schueters, B.N. Ames (1982b) A new Salmonella tester strain (TA102) with A.T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Sci., (USA), 79, 7445-7449.
- Levin, D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, B.N. Ames (1984) Detection of oxidative mutagens with a new Salmonella tester strain (TA102). Methods in Enzymology, 105, 249-254.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. Molecular Cloning (A Laboratory Manual). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 545 pp.
- Maron, D.M., B.N. Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res., 113, 173-215.
- Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara, T. Sugimura (1976) A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. En de Serres, F.J., J.R. Fouts, J.R. Bend, R.M. Philpot (eds): "In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing". Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp 85-88.
- McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki, B.N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl Acad. Sci., (USA), 72, 5135-5139.
- Plewa, M.J., D.L. Weaver, L.C. Blair, J.M. Gentile (1983) Activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. Science, 219, 1427-1429.
- Plewa, M.J., J.M. Gentile (1982) The activation of chemicals into mutagens by green plants. En Hollaender, A., F.J. de Serres (eds): "Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection, Vol. VII". New York: Plenum Press, pp 401-420.

- Primo Y, E. (1982) *Química Agrícola III: Alimentos*. Editorial Alhambra, S.A. Madrid, 683 pp.
- Quillardet, P., M. Hofnung (1985) The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Procedures. Mutation Res., 147, 65-78.
- Quillardet, P., C. de Belencombe, M. Hofnung (1985) The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: Validation study with 83 compounds. Mutation Res., 147, 79-95.
- Rice, K.M., M.D. Pierson (1982) Inhibition of Salmonella by sodium nitrite and potassium sorbate in frankfurters. Jour. of Food Sci., 47, 1615-1617.
- Shanabruh, W.G., G.C. Walker (1980) Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in recA+ lexA+-dependent mutagenesis. Molec. Gen. Genet., 179, 289-297.
- Sofos, J.N., F.F. Busta, C.E. Allen (1979) Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: A review. Jour. of Food Protection, 42(9): 739-770.
- Suginura, T. (1982) Mutagens, carcinogens and tumor promoters in our daily food. Cancer, 49 (Mayo 15): 1970-1984.
- Venitt, S., H. Bartsch, G. Becking, R.P.P. Fuchs, M. Hofnung, C. Malaveille, T. Matsushima, M.R. Rajewski, M. Roberfroid, H.S. Rosenkrans (1986) Short-term assays using bacteria. En Montesano, R., H. Bartsch, H. Vainio, J. Wilburn, H. Yamasaki (eds): "Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens a Critical Appraisal". IARC Scientific Publications, No. 83. International Agency for Research on Cancer. Lyon, pp 143-161.
- Walker, G.C., P.P. Robson (1979) Mutagenesis and repair

deficiencies of Escherichia coli umuC mutants are suppressed by the plasmid pKM101. Mol. Gen. Genet., 172, 17-24.