



# Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
IZTACALA

## Estudio de Mutaciones Inducidas en *Salmonella typhimurium*. Por Citrato de Clomifeno

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A  
RENATA DIAZ HERNANDEZ

Director de Tesis:

Dra. en C. B. MYRIAM ARRIAGA ALBA

Los Reyes Iztacala, México

1993



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA  
DIRECCION DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA DEL  
HOSPITAL JJAREZ DE MEXICO.

DEDICO CON CARINO:

A LA MEMORIA DE MI MADRE EN QUIEN TUVE  
UNA AMIGA INCONDICIONAL Y SIEMPRE ESPERO  
LO MEJOR DE MI.

GLORIA HERNANDEZ

A MI PADRE EL QUE A SABIDO SACARME DE  
APUROS Y ALIVIADO MIS TRISTEZAS. GRACIAS  
POR TU CONFIANZA.

JORGE DIAZ

A MIS HERMANOS ALE Y OSCAR QUIENES HAN  
COMPARTIDO CONMIGO SUS ALEGRIAS. GRACIAS  
POR SU APOYO.

CON CARINO A MIS ABUELOS

MODESTO HERNANDEZ F.  
GUADALUPE HERNANDEZ V.

AGRADEZCO A LA DIVISION DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO POR PERMITIRME REALIZAR MI TESIS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

AGRADEZCO A LA DRA. MYRIAM ARRIAGA A. QUE MAS QUE MI DIRECTOR DE TESIS FUE MI COMPANERA Y AMIGA. GRACIAS POR SUS CONSEJOS Y CONFIANZA.

AGRADEZCO AL DR. JAVIER ESPINOSA A. POR SU COLABORACION EN LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO.

AGRADEZCO AL DR. AMES B.N. POR ENVIARME LAS CEPAS DE *Salmonella typhimurim* PARA PODER REALIZAR MI TRABAJO DE TESIS.

AGRADEZCO A LOS PROFESORES IRMA DUEÑAS, MA. EUGENIA HERES, AGUSTIN RUIZ Y SERGIO VACA, LAS APORTACIONES QUE HICIERON PARA QUE MEJORARA LA PRESENTACION DE ESTE TRABAJO.

GRACIAS A LA DRA. MA. ELENA GONZALEZ PATINO ENCARGADA DEL LABORATORIO DE GENETICA DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO POR SU APRECIABLES CONSEJOS EN ESTE TRABAJO.

## I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	17
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	27
DISCUSION	49
CONCLUSIONES	56
APENDICE	58
BIBLIOGRAFIA	62

## INDICE DE GRAFICAS

- Curva de estandarización para utilizar la N-Metil-N-Nitro- Nitrosoguanidina (MNNG), como control positivo para los ensayos sin activación metabólica en *Salmonella typhimurium* TA100 que responde a mutaciones por sustitución de bases.  
(Gráfica 1) 28
- Curva de estandarización para utilizar la ciclofosf- amida (CF) como control positivo para los ensayos de preincubación e incorporación en tubo con activación metabólica en *S. typhimurium* TA100 que revierte por susustitución de bases.  
(Gráfica 2) 29
- Curva de estandarización para utilizar 2 Aminoantraceno (2AA) como control positivo en *S. typhimurium* TA98 que revierte por corrimiento en el marco de lectura, tanto para, los ensayos de incorporación en tubo con activación metabólica como para los de preincubación.  
(Gráfica 3) 30
- Comportamiento de *S. typhimurium* TA100 con Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo con y sin activación metabólica.  
(Gráfica 4) 32
- Ensayo con Citrato de Clomifeno en *S. typhimurium* TA100 con la técnica de preincubación.  
(Gráfica 5) 33

- Respuesta de *S. typhimurium* TA98 con diferentes dosis de Citrato de Clomifeno utilizando la técnica de incorporación en tubo con y sin activación metabólica.  
(Gráfica 6) 35
  
- Respuesta a Citrato de Clomifeno en *S. typhimurium* TA98 usando la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica.  
(Gráfica 7) 36
  
- Efecto mutagénico del Citrato de Clomifeno en la cepa de *S. typhimurium* TA98 con la técnica de preincubación.  
(Gráfica 8) 38
  
- Comparación de la respuesta a Citrato de Clomifeno entre las técnicas de preincubación y de incorporación en tubo con activación metabólica en *S. typhimurium* TA98.  
(Gráfica 9) 39
  
- Estudio sobre el efecto del sistema de reparación de mutaciones inducidas por Citrato de Clomifeno, en cepas de *S. typhimurium* pkm101 ( $UvrB^-/UvrB^+$ ) utilizando la técnica de preincubación.  
(Gráfica 10) 40
  
- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* TA100 utilizando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.  
(Gráfica 11) 42
  
- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* TA100 a diferentes dosis de Citrato de Clomifeno, con la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica.  
(Gráfica 12) 43

- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* TA98 con diferentes dosis de Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.  
(Gráfica 13) 45
- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* TA98 con Citrato de Clomifeno, utilizando la técnica de preincubación.  
(Gráfica 14) 46
- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* UHT8413 con Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.  
(Gráfica 15) 47
- Ensayo de sobrevida en *S. typhimurium* UHT8413 con Citrato de Clomifeno con la técnica de preincubación.  
(Gráfica 16) 48

## RESUMEN

El uso del Citrato de Clomifeno, un medicamento empleado en pacientes femeninos con trastornos de la ovulación y en pacientes masculinos con problemas de oligospermia, se ha asociado a un incremento significativo de abortos y embarazos molares cuando se comparan poblaciones expuestas a este inductor con respecto a otros métodos de tratamiento de las parejas con problemas de esterilidad. Así mismo se ha reportado reabsorción fetal y efectos tóxicos en estudios realizados en animales. El objetivo de este trabajo es conocer si este medicamento es capaz de producir daños en el ADN que puedan propiciar el inicio de una carcinogénesis química. Con dicho fin se valoró la capacidad del compuesto químicamente puro para producir daños en el sistema de cepas *Salmonella typhimurium* uvrB-/uvrB+.

El Citrato de Clomifeno químicamente puro, ni sus metabolitos fueron capaces de inducir mutaciones por sustitución de bases en la cepa TA100. Sin embargo, los metabolitos de este medicamento obtenidos con hígado de rata previamente inducido con Aroclor 1254 fueron capaces de inducir mutaciones por corrimiento de formato en la cepa TA98 aunque estas mutaciones fueron corregidas por la cepa de *S. typhimurium* cuyo sistema de reparación por escisión funciona apropiadamente. El plásmido pKm101 con los genes de reparación SOS, presente en todas las cepas del sistema de Ames empleadas en este trabajo, no mejoró el efecto tóxico producido por este compuesto. La toxicidad de este principio activo fue menos evidente cuando el compuesto era metabolizado con homogenado de hígado de rata, especialmente en la cepa uvrB+ UHT8413.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el Citrato de Clomifeno y sus metabolitos pueden reaccionar con el ADN produciendo daño genotóxico. Sin embargo dicho daño puede ser corregido por sistemas celulares de reparación en una forma dependiente de la dosis. La exposición frecuente a dosis altas de este medicamento en pacientes con problemas de infertilidad deberá ser revalorada.

## INTRODUCCION

En la actualidad la difusión de multiples contaminantes como plaguicidas, herbicidas, desechos industriales y preservativos en alimentos, así como el incremento en el consumo de otros productos químicos, tanto en alimentos, drogas terapéuticas y cosméticos entre otros, constituye un riesgo para la población en general, debido a una continua exposición a estas sustancias. Esto hace necesario identificar aquellos compuestos que pueden ser carcinogénicos, ya que, en los últimos años se ha acumulado evidencia de que la mayoría de los cánceres humanos están ligados a la exposición de sustancias químicas industriales y ambientales capaces de inducir mutaciones; ya sea directamente sobre el material genético, o bien sobre otros componentes celulares ligados a él funcionalmente (Alfred, 1991; Ames, 1979; Cortinas de Nava *et al.*, 1980; Scull, 1991). Por estas razones se considera interesante valorar el riesgo de exposición a Citrato de Clomifeno, un fármaco ampliamente utilizado en pacientes no fértiles con disfunción del eje hipófisis-hipotálamo, debido a que se han asociado a su uso, diversos efectos adversos como son: agrandamiento de los ovarios con aparición de quistes (Yabur *et al.*, 1975), incremento significativo de abortos en pacientes expuestas con respecto a un grupo control (Toshinobu *et al.*, 1979), aumento de embarazos múltiples y molares (Scialli, 1986), así como reportes de casos de cáncer de mama (Bolton, 1977). Otros autores sugieren posibles efectos genotóxicos en los productos de ratas preñadas expuestas a Citrato de Clomifeno durante el primer trimestre de la gestación (Suzuki, 1970 a; Suzuki, 1970 b).

Para la detección de mutágenos y carcinogénos se cuenta con una batería completa de pruebas que van desde la detección de mutaciones puntuales en sistemas bacterianos, hasta el sistema de células somáticas, tanto de animales como de seres humanos. Así dentro de los experimentos con sistemas biológicos no humanos, se

cuenta con el sistema de cepas *Salmonella typhimurium* de Ames (Maron y Ames, 1983), el cual ofrece una alternativa para valorar los efectos del Citrato de Clomifeno a corto plazo, proporcionando información acerca de los mecanismos de mutación que pueda producir este medicamento y así aportar criterios para que este medicamento tenga un uso racional.

## ANTECEDENTES

### RELACION ENTRE CARCINOGENESIS, TERATOGENESIS Y MUTAGENESIS

Se ha reportado, que existe una relación directa causa efecto entre la mutación y la transformación maligna de las células (Carcinogénesis) y de igual forma, cuando el daño al material genético se produce en las células germinales (Teratogénesis) (Schull, 1991; Trosko y Chang, 1974).

En lo que se refiere al proceso de carcinogénesis es muy complejo, y consiste en la proliferación autónoma de las células malignas. La etiología de este padecimiento aún es muy confusa y para poder explicarlo se ha propuesto el modelo de iniciación-promoción, en el cual se han identificado tres etapas: Iniciación, Promoción y Progresión. El proceso de iniciación se refiere a la conversión de una simple célula normal en una célula pre-maligna en forma irreversible, mientras que, la promoción se refiere a la amplificación de una clona y la progresión al desarrollo de un estado invasivo, que avanza hasta dar lugar a la formación de metástasis (Trosko y Chang, 1984; Webster *et al.*, 1991).

La iniciación del proceso de carcinogénesis puede ser producida por diferentes factores que son capaces de fijar una mutación en forma heredable en el ADN, tales como, radiaciones, así como la formación de radicales libres que se llegan a formar tanto en procesos metabólicos normales del organismo como por la exposición a medicamentos, aditivos de alimentos, tabaco y contaminantes industriales (Ames, 1979; Arriaga Alba *et al.*, 1988; Trosko y Chang, 1984).

En cuanto a las alteraciones en el desarrollo de un individuo pueden producirse por la acción de agentes exógenos sobre el ADN (mutagénesis), sobre los procesos de transcripción y traducción del mensaje contenido en él o sobre los procesos que participan en la diferenciación. Así un producto con malformaciones cuyos padres (uno o ambos) estuvieron en contacto con un compuesto teratogénico antes de la concepción, sugiere la ocurrencia de daño genético en los gametos; por otra parte, la teratogénesis en casos extremos, puede conducir a la muerte embrionaria o fetal, originándose un aborto espontáneo (Zimmerman, 1975).

#### MECANISMOS DE REPARACION

El daño producido al ADN no es necesariamente traducido en mutaciones o muerte celular ya que la célula cuenta con diferentes mecanismos de reparación de daño al ADN, entre los cuales cabe mencionar al mecanismo de reparación por escisión, libre de error, el cual se ha encontrado no solo en células procariotas, si no también en células eucariotas (Kimball *et al.*, 1987). Este mecanismo de reparación se lleva a cabo mediante la escisión de nucleótidos requiriéndose varias enzimas, siendo la más importante la endonucleasa Uvr que hace un corte en el extremo 5' de la base dañada mediante la hidrólisis del enlace fosfodiéster, esta enzima esta constituida por tres subunidades que son el producto de los genes UvrA, UvrB y UvrC. La UvrA realiza el reconocimiento primario de la lesión, la UvrB es la responsable del corte endonucleotídico, ambas necesitan de la presencia de la UvrC para actuar (Lindahl, 1982). Una vez escindido el nucleótido

dañado es eliminado junto con otras bases adyacentes por la actividad exonucleolítica 5'-3' de la polimerasa I, posteriormente la polimerasa usa como template la hebra no dañada y los extremos de las cadenas son unidos por la acción de una ligasa (Saragentin y Smith, 1985).

Así el buen funcionamiento de los sistemas de reparación, juega un papel muy importante en las etapas de iniciación de la carcinogénesis, ya que una mutación en el ADN es el resultado de la falta de reparación o de una reparación incorrecta causando una lesión al ADN que puede inducir mutaciones heredables, y además, producir efectos letales que se traducen en muerte celular. El daño producido al ADN puede o no causar alteraciones al fenotipo y puede permanecer en la célula como una lesión que le confiere el carácter premaligno (Elledge y Walker, 1983; Trosko y Chang, 1984).

#### PRUEBAS PARA VALORAR EL RIESGO GENOTÓXICO A CITRATO DE CLOMIFENO

Dentro de los sistemas biológicos que pueden ser usados para valorar el riesgo genotóxico a este fármaco, están aquellas pruebas cuyo propósito es valorar alteraciones genéticas relevantes para la carcinogénesis humana como aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Entre estas pruebas se puede citar el análisis cromosómico de las células de mamífero en cultivo o la determinación de micronúcleos o intercambio de cromátidas hermanas inducidas in vivo en médula ósea o sangre de roedores. Estas pruebas son de gran capacidad predictiva de riesgo ya que se ha visto que tienen una gran sensibilidad (capacidad para detectar como positivo a agentes carcinogénicos); pero debido al alto costo y a la larga duración de los bioensayos animales, se hace imposible su uso rutinario, no así con las pruebas

bacterianas que tienen la ventaja de reducir costos y ser más rápidas y así reducir el tiempo de estudios de tamizado de compuestos mutagénicos y de carcinogénicos. Por otro lado, con el empleo de algunos sistemas bacterianos se puede estudiar el metabolismo del compuesto (Cortinas de Nava et al., 1980; Rosenkianza y Gutter, 1976).

Entre los sistemas de pruebas bacterianas más usadas se encuentran los sistemas de *Bacillus subtilis* RecA-/RecA+ y el de *Escherichia coli* PolA+/PolA-, que miden daño letal al ADN. En cuanto al sistema de *E. coli*, se conoce que tiene alta especificidad y baja sensibilidad, mientras que del otro sistema sólo se conoce que tiene una alta especificidad. No obstante el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* His+ (prueba de Ames), es sin duda el más conocido. Debido a su alto valor predictivo, ya que, se ha establecido que aproximadamente el 90% de los carcinógenos químicos causan mutaciones o daño al ADN en estas bacterias (McCann y Ames, 1976; McCann et al., 1975); además de contar con una extensa gama de opciones para detectar diferentes mecanismos de acción de los agentes potencialmente carcinogénicos (Asshby y Tennat, 1988; McCann et al., 1975; Mohn, 1981).

## PRUEBA DE AMES

La prueba de Ames cuenta con diferentes cepas bacterianas mutantes (auxótrofas, His-) que pueden ser revertidas a su fenotipo original por la acción de un gran número de compuestos mutágenicos y carcinogénicos que actúan por diferentes mecanismos (Ames et al., 1973).

Apartir de la cepa silvestre de *Salmonella typhimurium* LT-2 se construyeron las cepas TA1537 (hisC 3076 UvrB) y la cepa TA1538. La primera contiene la inserción de una citosina en el gen hisC, mientras que la otra una delección de un par GC en el gen hisD. Estas cepas pueden por lo tanto ser revertidas a su fenotipo original His+ por compuestos capaces de inducir mutaciones por corrimiento de formato.

Otro grupo de cepas son las que en el codón 96 del gen hisG 46 tienen un triplete GGG que codifica para la leucina. Estas cepas sólo pueden ser revertidas por mutágenos que actúan a un nivel de sustitución en el par G/C, como es el caso de la cepa TA1535.

Este sistema ha sido mejorado mediante modificaciones adicionales, tales como, la introducción de un plásmido, pkm101 que contiene a los genes umuB y umuC que promueven el mecanismo de reparación propenso a error (McCann et al., 1975; Maron y Ames, 1983; Hartman et al., 1986). Así, ahora el sistema cuenta con las cepas TA98(hisD 3052 pkm101) con mayor capacidad para detectar mutágenos que actúan por corrimiento de formato que su cepa homóloga TA1538. De igual forma la cepa TA100 (hisG 46 pkm101) fue obtenida al introducir el plásmido pkm101 en la cepa TA1535. Todas estas cepas poseen una delección en el gen rfa que las hace más sensibles al paso de los compuestos por carecer de una lipoproteína de la pared celular.

Por otro lado las cepas convencionales del sistema de Ames, por poseer una delección desde el gen bio al galC, incluyendo el gen uvrB en el minuto 18 del cromosoma bacteriano (Sanderson y Hurley, 1987), no son capaces de efectuar correctamente la reparación por escisión. En vista de que los sistemas de reparación son muy importantes en el proceso de iniciación de carcinogénesis, se han incorporado al ensayo cepas homólogas a las ya existentes pero en las cuales se conserva intacto el gen uvrB y el mecanismo de reparación por escisión exento de error funciona adecuadamente (Espinosa, A. et al., 1989).

Por otro lado dichas cepas sólo son capaces de detectar el efecto del compuesto que produce en el ADN lesiones que no son correctamente reparadas. Entre las principales cepas de *Salmonella typhimurium* Uvr+, están la TA1975 que es la homóloga de la cepa TA1535. La cepa UTH8414 que posee la misma mutación por sustitución de bases y el plásmido pkm101 que la cepa TA100. Entre las cepas que detectan compuestos que produzcan corrimiento del marco de lectura se encuentra la cepa TA1977 que al igual que la cepa TA1537 contiene la delección en el gen hisD y la cepa TA1978 que es la homóloga de la cepa TA1538. La cepa UTH8413 es la homóloga de la cepa TA98, pero carece de la delección del gen uvrB. Así el empleo del sistema de *Salmonella typhimurium* Uvr-/Uvr+ permite detectar mutaciones que no son debidamente reparadas, además de poder ser útil para detectar mutaciones letales, cuya falta de reparación induce a la muerte celular, siempre y cuando se realicen en paralelo pruebas de sobrevivida (Ames et al., 1975; Maron y Ames, 1983).

Un problema que tenía el sistema de Ames es que en el mamífero in vivo existen sistemas enzimáticos responsables de la transformación metabólica de los compuestos que acceden al organismo, convirtiendo el producto en metabolitos carcinogénicamente activos que reaccionen con el ADN en caso de haberlos, y que están ausentes en *Salmonella typhimurium*. Por ello

la prueba ha sido complementada mediante fracciones post-mitocondriales (fracción S-9) de homogenados de órganos de roedores, para tratar de suplir la activación metabólica que necesitan algunos compuestos para ser carcinogénicos (Ames et al., 1975; Dayan, et al., 1980; Matsumoto y Yoshida, 1977; Takie et al., 1975; Preussman, R. y Stuar, B., 1984).

Por otra parte las ventajas que ofrece este sistema, es la fácil manipulación, economía y rapidez de ejecución. Así mismo brinda la posibilidad de averiguar si un agente químico es mutagénico y a través de qué mecanismo induce la mutación (Ames, et al., 1973; Ames et al., 1975; Espinosa, 1980). Además, después de varios estudios de grupos de carcinógenos se ha reportado que este sistema de prueba de mutagénesis presenta una alta reproducibilidad de los datos en diferentes experimentos, aceptando también que cuenta con una alta sensibilidad, esto significa que cerca del 90% de los carcinógenos probados son mutagénicos y una alta especificidad ya que cerca del 87% de los compuestos no carcinogénicos probados no son mutagénicos (Anderson et al., 1984; MacPhee, 1984; Poll, 1980; Rinkus y Legator, 1979).

## CITRATO DE CLOMIFENO

### PROPIEDADES FISICAS QUIMICAS Y EXCRECION

El Citrato de Clomifeno (CC) es un polvo blanco o amarillo con olor débil. Su punto de fusión es de  $117^{\circ}\text{C}$ . Es poco soluble en agua, etanol, cloroformo y metanol, es parcialmente soluble en eter dietílico. Es inestable al aire y a la luz (Wade, 1977; Windholz, 1976).

La presentación comercial contiene del 98% al 100% de CC, pudiendo ser separado en dos isómeros uno cis y uno trans, que se han denominado como zuclomifeno y enclomifeno; el isómero trans es el enclomifeno mientras que el zuclomifeno es el isómero cis, el isómero cis posee la actividad anti-estrogénica y el trans es estrogénico (Wade, 1977). Contiene 1% de agua, 0.002% de metales pesados y 30 a 50% del isómero trans (Windholz, 1976).

La droga se absorbe fácilmente en el tracto digestivo cuando se administra por vía oral. Se excreta algo por vía riñon, pero la mayor parte por la bilis al intestino y se elimina en las heces. La eliminación por las heces es alrededor del 50% en 5 días, siendo lenta dicha eliminación debido a la circulación enterohepática de la droga (Wade, 1977).

### USOS DEL CITRATO DE CLOMIFENO.

El Citrato de Clomifeno es usado en medicina humana para inducir ovulación en mujeres anovulatorias y oligoovulatorias. La dosis

usual es de 50mg orales, diarios por 5 días comenzando el quinto día del ciclo menstrual o en cualquier momento en pacientes amenorreicas. Si ocurre la ovulación, se continúa con la misma dosis hasta conseguir la concepción. En caso contrario, el tratamiento se repite con 100mg por día hasta que ocurra la ovulación (Pereira, et al., 1987). Pero en algunos casos la dosis se llega a incrementar dentro de un rango de 250 a 750mg por ciclo, con el fin de lograr la ovulación en pacientes infértiles (Svigos, 1990; Shalev et al., 1989).

Por otra parte el CC se ha utilizado combinado con gonadotropina menopáusica humana (HMG) y gonadotropina coriónica humana (HCG) (Veranes, Arias, et al., 1985), en pacientes anovulatorias y en pacientes normoprolactinéicas en combinación con bromocriptina (Muñoz, Pérez, et al., 1983) además de ser usado en asociación con dexametasona para inducir ovulación en mujeres infértiles con hiperandrogenismo discreto en estado anovulatorio crónico. Incrementándose así la eficacia terapéutica en cada uno de los casos. (Antonini, et al., 1986).

El CC también es usado en hombres con oligospermia, sin embargo este tratamiento no ha resultado ser muy confiable, ya que, con un tratamiento prolongado con CC en pequeñas dosis de 25 mg/día durante 24 días aumenta el número de espermatozoides, pero no se elevan los niveles séricos de la hormona luteinizante (LH) ni la de la foliculo estimulante (FSH), además, no hay incrementos significativos en la calidad del semen (Chiorboli, et al., 1981; 1982; Gómez Alzugaray et al., 1985).

Otro uso que ha tenido el CC ha sido para el diagnóstico del síndrome de ovario residual en pacientes con ovidectomía bilateral, el cual se caracteriza por un dolor abdominal intenso. Al tratar estas pacientes con CC se hiperestimula el tejido residual y este es fácilmente localizable en una laparoscopia (Kaminski, et al., 1980).

Este fármaco también ha sido empleado para el tratamiento local en pacientes con Condiloma acuminado, donde una sola aplicación local de Citrato de Clomifeno bloquea los receptores en piel (Fitz, et al., 1990).

#### INDUCCION DE LA OVULACION Y EMBARAZOS CON CITRATO DE CLOMIFENO

La terapia con CC a una dosis de 100 mg durante cinco días por dos ciclos, induce entre un 70 a un 90% de ovulación en las pacientes tratadas con éste, mientras que los embarazos van de un 30 a un 40%, ya sea en forma combinada o administrando únicamente CC (Scialli, 1986; Veranes Arias et al., 1985; Yabur et al., 1985). Esto sugiere que la exposición del sistema genital femenino al CC puede tener como consecuencia, una disminución en la capacidad para transportar o sostener el embrión temprano (Scialli, 1986; Svigos, 1990); sin embargo otros autores consideran que los abortos se deben a una fase luteal deficiente (Wentz et al., 1990). Así mismo, parece ser, que la inducción de la ovulación con CC incrementa la incidencia de embarazos múltiples, ocurriendo de un 8 a 13% (Dickey et al., 1990; Scialli, 1986).

#### ESTUDIOS DE TOXICIDAD CON CITRATO DE CLOMIFENO

Se ha demostrado que una sola inyección de 10 a 500  $\mu\text{g}$  de CC a ratas hembras en el primer día de nacidas (Sprague-Dawley) resulta en múltiples anormalidades del tracto reproductivo, incluyendo ovarios císticos, hipoplasia ovárica, hiperplasia oviductual, metaplasia epitelial y tumores uterinos. A dosis altas (500  $\mu\text{g}$ ) produce entre 80 a 100% de las anormalidades anteriores y a dosis bajas e intermedias de 10 a 50% (Clark, 1977).

Así algunos bioensayos en roedores muestran que la administración de CC en etapas tempranas de la gestación puede producir trastornos en la implantación, muerte fetal y diversas malformaciones congénitas. Así por ejemplo, se ha reportado que la administración oral a ratas de 0.1 mg/Kg de CC durante la gestación temprana induce un 100% de inhibición de implantación. La administración de 5 a 10 mg/Kg durante la mitad del embarazo incrementa la mortalidad fetal de un 14 a un 20% (Suzuki, 1970 a), mientras que, la administración oral de 15 a 18 mg/Kg inhibe la implantación cuando se da a ratones en los primeros días de gestación, además incrementan las anormalidades morfológicas (Suzuki, 1970 b).

Por otra parte, se ha estudiado que la administración de CC en ratas adultas, puede causar diversos efectos tóxicos, que comprometen a casi todos los órganos, así Hart en 1990 realizó un estudio en ratas hembras, tratadas con CC (60 mg/Kg/día, por cuatro días) con el fin de ver qué órganos afectaba, siguiendo los cambios en peso relativo de algunos órganos. Los cambios afectaron el hígado, bazo, corazón, riñón, útero y ovarios siendo significativos. Concluyendo que el CC puede afectar el peso relativo de algunos de los órganos actuando fundamentalmente a nivel anti-organotrópico.

#### **EFFECTOS SECUNDARIOS AL TRATAMIENTO CON CITRATO DE CLOMIFENO**

Veranes-Arias y colaboradores reportan en 1985, tan sólo 3.5% de abortos durante el primer trimestre de embarazo en tanto que Toshinobu y colaboradores, en 1979 reporta una frecuencia del 23.9% de abortos entre 93 embarazos obtenidos con CC (250 mg/día por ciclo), en tanto que el grupo control, sólo se encontró el 8.9% de abortos entre 270 embarazos; cabe hacer notar que a diferencia de otros estudios en este caso, sí logró asociarse el

Incremento de la frecuencia de abortos al tratamiento con CC. También ha sido reportado que el tratamiento con HMG y CC incrementa la frecuencia de cariotipos anormales, traducidos en abortos espontáneos de un 61 hasta un 80% (Boué, 1973). Aunado al hecho de que al utilizar CC para inducir ovocitos provoca aneuploidias *in vitro* (Delhanty y Panketh, 1990).

Se ha reportado que de 21 pacientes que lograron un embarazo con la administración de CC+HMG, sólo ocurrió un embarazo (1.1%) y seis pacientes que recibieron CC de 250 a 700 mg por ciclo durante 13 meses, desarrollaron un 57% de endometriosis contra un 7% del grupo control, sugiriendo que ésta fuera la causa de que las pacientes continuaran con su problema de infertilidad (Svigos, 1990). Otros reportes sugieren que el CC puede incrementar la incidencia de embarazos molares en mujeres tratadas con este medicamento, produciendo dilatación y fibrolisis del útero (Scialli, 1986).

Bolton en 1977 reporta en pacientes que fueron tratadas con CC (100 mg/día durante cinco días por dos ciclos) el desarrollo de un 69% de tumores de las células granulosas y un 14% de cáncer de mama, mientras que, en el grupo control los tumores de las células granulosas se presentaron en un 5% y el desarrollo de cáncer de mama fue nulo.

Por otro lado, se ha reportado que en mujeres infértiles con una historia de desordenes psíquicos previas al tratamiento con CC, son de alto riesgo, ya que, es frecuente que presenten enfermedades psicopáticas maniaco-depresivas, en las cuales hay pérdidas del conocimiento, anormalidades psicomotrices y alucinaciones. Hasta ahora no se ha descubierto que esto se deba a una causa orgánica, sino al tratamiento con CC (Kapfhammer *et al.*, 1990).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Conocer si el Citrato de Clomifeno es capaz de producir daños en el ADN, con el fin de aportar un criterio más para que este medicamento se emplee en una forma más racional.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Distinguir el tipo de mutaciones que pueda producir el Citrato de Clomifeno en el ADN de *Salmonella typhimurium*.

Estudiar si las mutaciones producidas por el Citrato de Clomifeno pueden ser reparadas usando como sistema de detección el par de cepas bacterianas Uvr<sup>-</sup>/Uvr<sup>+</sup>, deficientes y eficientes en el sistema de reparación por escisión.

## MATERIAL Y METODOS

### CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 (hisG 46 pkm101) y la cepa TA98 (hisD 3052 pkm101) fueron donadas por la Universidad de California; mientras que la cepa *Salmonella typhimurium* UTH8413 (hisD 3052 pkm101 UvrB+) fue donada por la Universidad Nacional Autónoma de México.

### MANTENIMIENTO Y OBTENCION DE LAS CEPAS

Las bacterias obtenidas por conducto de Dr. Ames llegaron en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsitas de plástico con agar blando para evitar la desecación. Lo antes posible se colocaron los discos con pinzas estériles en 5 ml de caldo nutritivo (ver apéndice) e incubaron toda la noche (aproximadamente 16 hrs.) a 37°C con agitación. Los cultivos así obtenidos se sometieron a las pruebas que se describen más adelante para verificar la presencia de los marcadores genéticos, evaluar la frecuencia de reversión espontánea y determinar la sensibilidad a mutágenos conocidos. Se prepararon, además, los cultivos de reserva colocando 0.1 ml de dimetilsulfóxido más 1 ml de la suspensión bacteriana (incubada 16 h.) y se congelaron rápidamente sobre hielo seco para mantenerlos después a -80°C. (Maron y Ames, 1983).

Para evitar congelar y descongelar constantemente los cultivos de reserva se prepararon cajas de Petri con cultivos que se pudieron guardar a 4 °C hasta por 1 a 2 meses. Para ello se tomó con una asa de siembra una muestra del cultivo de reserva y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo, se incubó con agitación por 16 h a 37°C, luego se sembró por medio de estrias en caja Petri con medio mínimo de Vogel-Boner complementado con un exceso de histidina (ver apéndice), además se agregó 0.1 ml de una solución estéril de ampicilina (8 mg/ml). Los cultivos para las pruebas de mutagénesis se obtuvieron tomando con una asa de siembra una muestra de las cajas y sembrando en 5 ml de caldo nutritivo y luego se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación.

#### MARCADORES GENÉTICOS

Con el fin de tener un buen control de calidad del sistema se checaron constantemente los marcadores de las cepas, así como su reversión espontánea y respuesta a mutágenos conocidos. Según lo describe Espinosa en 1980.

a) Requerimiento de histidina. Sembrar por medio de estrias el cultivo de 16 hrs. sobre cajas, conteniendo medio mínimo de Vogel-Boner. Hacer lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina. Solamente debe haber crecimiento en las cajas complementadas con histidina.

b) Sensibilidad al cristal violeta. Para verificar el marcador rfa (modificación de la pared celular), se determinó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Se inoculó 0.1 ml del cultivo en

cajas de Petri con agar infusión cerebro corazón (BHI), y se dejó secar. Se colocó un disco de papel filtro estéril en el centro de la caja; con ayuda de una pipeta automática "Clinipette" se colocaron en 10  $\mu$ l de una solución de cristal violeta (1 mg/ml)

Se Incubó 24 h. a 37°C. Una zona clara de inhibición al rededor del disco indicó la presencia de la mutación.

c) Presencia del plásmido. Se verificó la resistencia de las cepas a la ampicilina, y se siguió el mismo procedimiento que para el marcador rfa.

d) Sensibilidad a la luz ultravioleta. En una caja de Petri con agar BHI, se sembraron los cultivos por medio de estrias. Se tapó la mitad de la caja con papel aluminio y se irradió con una lámpara germicida de luz U.V de 15W a una distancia de 33 a 35 cm. por 6 seg. Las cepas que contienen el marcador UvrB crecieron en las dos zonas, Tanto la que fue radiada como la que no lo fue.

e) Frecuencia de reversión espontánea. Se colocó 0.1 ml del cultivo en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenía 2 ml de agar suave (agar de superficie) a 45 °C, mezcló el contenido con ayuda de un vortéx y se distribuyó perfectamente sobre medio mínimo de Vogel-Boner. Se dejó solidificar e incubaron invertidas a 37 °C por 48 h, y se contaron las revertantes espontáneas.

## OBTENCION DE LA FRACCION S9

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con un peso aproximado de 200 g a las que se les administró por vía intraperitoneal 500 mg/Kg de peso de Aroclor 1254 diluido en aceite de maíz a una concentración de 200 mg/ml . Los animales se mantuvieron tomando agua ad libitum y se les suministró alimento normalmente, el cual se les retiró 12 horas antes de sacrificarlos. El quinto día después de la inyección, las ratas se sacrificaron por decapitación.

El material de disección y de vidrio, así como las soluciones que se usaron en las etapas subsiguientes estaban estériles. Se extrajeron los hígados asépticamente y se colocaron en vasos que contenían 15 ml de solución fría de KCl 0.15 M por gramo de hígado. Se cortaron en pedazos pequeños con ayuda de tijeras y se homogenizaron con ayuda de un aparato Potter-Elvehjem. El homogenizador se centrifugó a 9.000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante (denominado fracción S9) se distribuyó en viales con tapón de rosca a razón de 1 ml. Se congelaron rápidamente sobre hielo seco y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## ENSAYOS DE MUTAGENESIS.

Se utilizaron las cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98, y se procedió de la siguiente manera:

A dos mililitros de agar de superficie (ver apéndice) precalentado a  $45^{\circ}\text{C}$ , se le añadió 100  $\mu\text{l}$  del cultivo de la cepa de 16 h, 10  $\mu\text{l}$  de la solución del compuesto problema (las diferentes dosis del

medicamento) y 0.5 ml de la mezcla S9 (si se trabaja con activación metabólica). El contenido de la mezcla se agitó con ayuda de un vórtex y se distribuyó en cajas de Petri con medio mínimo de Vogel-Boner. Las cajas se rotaron activamente para que se formara una capa homogénea, se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 48 h.

En vista de que a 100 mg de Citrato de Clomifeno se observan efectos adversos en las pacientes tratadas y tomando en cuenta que el peso promedio de la mujer mexicana es de 54 Kg, y sabiendo que el 50% del compuesto es eliminado en las heces, se tiene que por cada Kg de peso corresponde aproximadamente 1 mg de Citrato de Clomifeno equivalente a 1000 µg. Por lo que el rango de dosis a probar fue de 25 a 1000 µg / Caja Petri.

En cada experimento se incluyeron controles positivos para verificar las propiedades de las cepas de prueba que consistió en el empleo de mutágenos conocidos; utilizando los recomendados por Maron y Ames en 1986.

MUTAGENO	CONCENTRACIONES	S9	TA100	TA98
MNNG	10 µg	-	+	-
A. picrolónico	100 µg	-	-	+
2-Aminoantraceno	10 µg	+	-	+
Ciclofosfamida	500 µg	+	+	-

+Incremento mayor al doble de la reversión espontánea.

Además del control positivo, se incluye un control con el solvente, así como las dosis probadas. Solo en el caso de activación metabólica se incluyeron cajas que contenían bacterias y mezcla S9 ya que esta hace variar el número de revertantes espontáneas.

Las soluciones de los mutágenos conocidos como las del Citrato de Clomifeno se prepararon en DMSO (dimetilsulfóxido) . Para cada cepa se hicieron tres experimentos por separado, con y sin activación metabólica, usando tres cajas para cada dilución del medicamento como para cada uno de los controles.

## ENSAYO DE PREINCUBACION

Se procedió de la siguiente manera: se añadió 0.1 ml de un cultivo de toda la noche, de las cepas con las que se hizo el ensayo (TA100 y TA98) en tubos con tapón de rosca, luego se colocaron 10  $\mu$ l de cada dilución del compuesto en los tubos que contenían a la bacteria. se mantuvieron a 4 °C hasta la adición de la mezcla S9.

La mezcla S9 fue previamente preparada, además se calculó la cantidad de NADP y glucosa 6-fosfato que se utilizó así como la cantidad de amortiguador de fosfatos y solución de  $MgCl_2$ -KCl que se requirió para disolver la mezcla S9 ( ver apéndice). La solución resultante se filtro utilizando una unidad Swinex (millipore Corp. Bedford Mass) equipada con una membrana de 0.45 $\mu$  de poro y se mantuvo en hielo durante el experimento.

Se agregó 0.5 ml de S9 por tubo de cultivo, el cual contenía al organismo y el compuesto, los tubos se mantuvieron a 4 °C. Una vez que se terminó con la distribución de la fracción S9, los tubos se incubaron en un baño María con agitación (American Scientific Products BT23) a 90 rpm por 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, los tubos se mantuvieron a 4 °C y se continuó a plaquear.

Cada muestra se distribuyó en tres cajas de agar mínimo de Vogel-Boner y se incubaron invertidas a 37 °C por 48 horas. Después de la incubación, se contó el número de revertantes por placa con ayuda de un cuenta colonias (Fisher Accu-Lite Modelo 133-8002).

El control negativo llevó 100  $\mu$ l del cultivo de 16 horas, 10  $\mu$ l de DMSO y 0.5 ml de la mezcla S9, mientras que el control positivo llevó el mutágeno en lugar del DMSO (el mutágeno que se

utilizó dependió de la cepa con que se trabajó como ya se había indicado anteriormente en la tabla), estos fueron plaqueados como las otras muestras.

#### SISTEMA DE REPARACION

Con el fin de estudiar el efecto del mecanismo de reparación por escisión para el Citrato de Clomifeno, las pruebas de mutagenicidad se hicieron en la cepa *Salmonella typhimurium* (PH8413 en paralelo con la cepa *Salmonella typhimurium* TA98 en la misma forma que se describió para los ensayos de preincubación. Al mismo tiempo se hizo el ensayo de sobrevida para ambas cepas. Al igual que los ensayos anteriores se hicieron tres experimentos por separado para considerar que los resultados fueran válidos.

#### PRUEBAS DE SOBREVIDA

Un cultivo de 18 h. de la bacteria se diluyó en solución salina isotónica hasta una dilución de  $10^{-5}$  células/ml, 0.1 ml de esta dilución se colocó en un tubo de ensaye con tapón de rosca conteniendo 2ml de caldo nutritivo con agar al 0.6% ( ver apéndice ) y se añadió 10  $\mu$ l de la solución problema , se agitó en un vórtex y posteriormente se virió en placas de agar BHI, (ver apéndice) sólo en el caso de las pruebas con activación metabólica se añadió 0.5 ml de la mezcla S9 (ver epéndice). Se dejaron secar las cajas a temperatura ambiente incubándose a 37°C por 24 horas. Se incluyeron como controles la cepa sola y la cepa y DMSO.

Para los ensayos de sobrevivencia con el método de preincubación se hicieron las diluciones como ya se mencionó y se continuó con el mismo procedimiento, que para la mutagénesis, con la diferencia que se plaquéó en agar BHI y se incubaron por 24 h., realizándose, también tres experimentos por separado para los ensayos sin activación metabólica y los de preincubación.

## INTERPRETACION DE RESULTADOS

Para los ensayos de mutagénesis se contó el número de revertantes His+ por placa obtenidas para cada dosis probada del compuesto, para las diferentes técnicas empleadas en ambas cepas *Salmonella typhimurium* (TA100 y TA98); luego se procedió a calcular el promedio para cada concentración, ya que, se utilizaron tres cajas para cada dosis del fármaco, de la misma forma se obtuvieron los promedios para los controles positivos (respuesta mutágenos conocidos) y negativos (reversión espontánea de la cepa), una vez que se obtuvieron los promedios para cada método empleado en el estudio se procedió a realizar un análisis por computadora de los datos obtenidos con el programa Harvard Presentation Graphic versión A.01, el cual permitió obtener gráficas para cada método utilizado. Así un resultado positivo se interpretó como el incremento en el número de revertantes His+ el cual llegara a doblar el valor de la reversión espontánea y mostrara un incremento en el número de mutantes en función de la concentración del compuesto (Maron y Ames, 1983.).

Para el ensayo de reparación se procedió de la misma forma para obtener los promedios y la gráfica, sólo que la interpretación de los resultados varía, puesto que, la presencia de reparación se manifiesta con la disminución de mutantes en función de la concentración del compuesto.

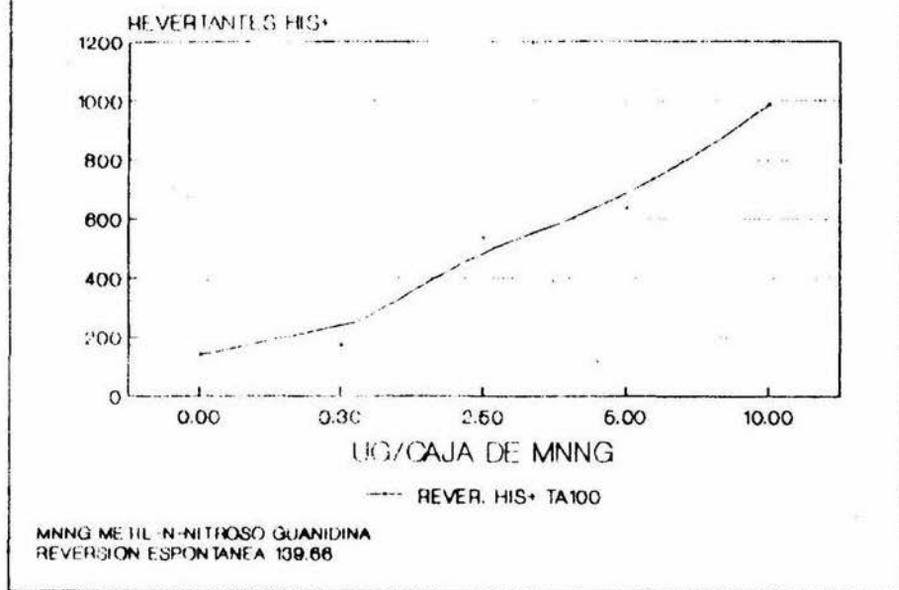
A diferencia de los ensayos de mutagénesis , en los ensayos de sobrevivida lo que se grafica son los promedios de las unidades formadoras de colonias y la interpretación consiste en ver si un compuesto es o no tóxico, así, la disminución en el número de unidades formadoras de colonias en función de la concentración del compuesto, deja de manifiesto la toxicidad del compuesto aún más cuando el incremento en la dosis del fármaco inhibe el desarrollo del crecimiento.

## RESULTADOS

En las primeras tres gráficas se muestran las curvas de estandarización a los diferentes mutágenos, donde se pueden observar las curvas dosis-respuesta de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98, tanto con mutágenos directos, como para aquellos que requieren de activación metabólica, con la técnica de incorporación en tubo.

En la gráfica 1 se puede ver la respuesta de la cepa TA100 a la N-Metil-N'-Nitro-N-nitrosoguanidina con la técnica de incorporación en tubo. En la gráfica 2 se observa la respuesta de la misma cepa a la ciclofosfamida con activación metabólica con la fracción hepática de hígado de rata inducida con Aroclor (S9). (Ver Material y Métodos). En la gráfica 3 se muestra la respuesta a la cepa *S. typhimurium* TA98 al 2-amino-antraceno en presencia de la fracción S9 con activación metabólica.

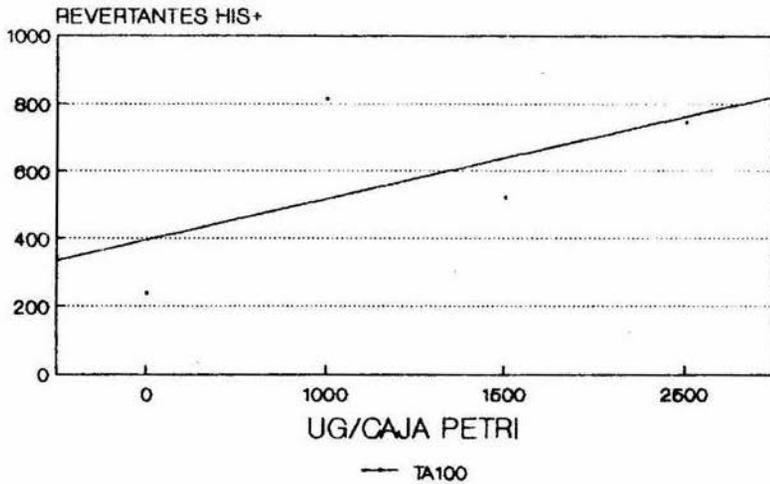
## CURVA DOSIS RESPUESTA DE *S. typhimurium* CON MNNG.



GRAFICA 1.

Curva de estandarización para utilizar la N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG), como control positivo para los ensayos sin activación metabólica con *Salmonella typhimurium* TA100 que responde a mutaciones por sustitución de bases.

## CURVA DOSIS RESPUESTA A CICLOFOSFAMIDA

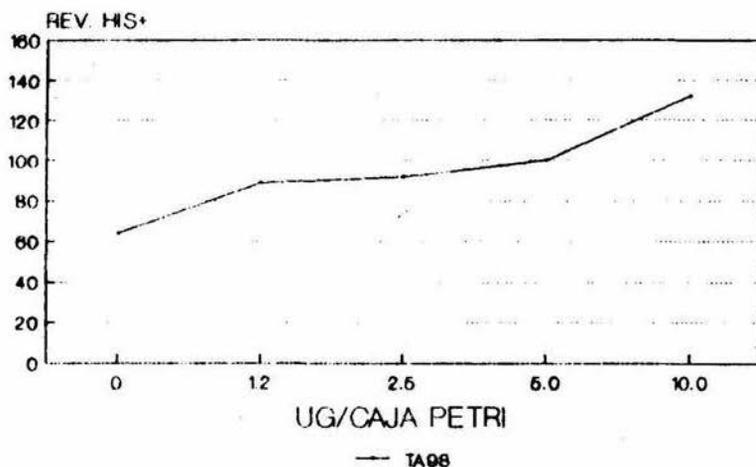


CON S9  
REVERSION ESPONTANEA 225.33

GRAFICA 2

Curva de estandarización para utilizar la ciclofosfamida (CF) como control positivo para los ensayos de preincubación e incorporación en tubo con activación metabólica en *Salmonella typhimurium* TA100 que revierte por sustitución de bases.

## MUTACIONES INDUCIDAS POR DOS AMINO ANTRACENO



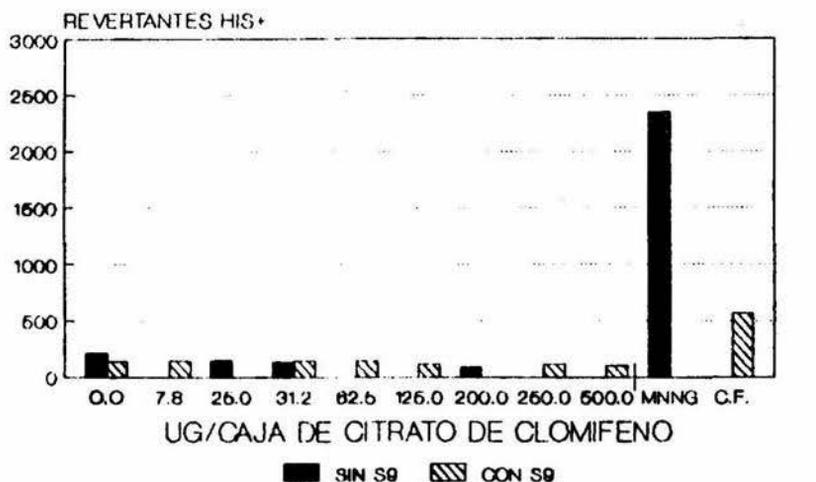
R.E. TA98 66.0  
CON 89

GRAFICA 3

Curva de estandarización para utilizar el 2 aminoantraceno (2 AA) como control positivo en *Salmonella typhimurium* TA98 que revierte por corrimiento en el marco de lectura, tanto para, los ensayos de incorporación en tubo con activación metabólica como para los de preincubación.

Las gráficas 4 y 5 muestran el comportamiento de *Salmonella typhimurium* TA100, representándose en la gráfica No.4 el uso de dos técnicas diferentes, incorporación en tubo con y sin activación metabólica, observándose una respuesta no mutágena para ambas técnicas con las distintas dosis del fármaco, mientras que, en la gráfica No.5 se observa la respuesta al Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA100 con la técnica de preincubación. Sin observarse tampoco ningún aumento de las revertantes His+ con las dosis empleadas.

## RESPUESTA A CITRATO DE CLOMIFENO EN *S. typhimurium* TA100



REVERSION ESPONTANEA 120 SIN S9  
REVERSION ESPONTANEA 108 CON S9  
MNNG(10UG)2346 CF(500UG)562

CONTROLES POSITIVOS

GRAFICA No. 4

Comportamiento de *Salmonella typhimurium* TA100 con Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo con y sin activación metabólica.

Reversión espontánea (sin S9) 120

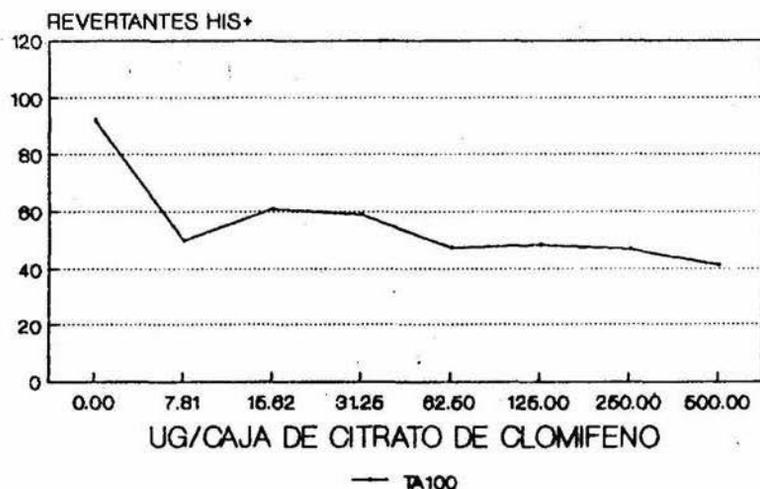
Reversión espontánea (con S9) 108

Controles positivos:

MNNG 10µg/caja Petri (sin S9) 2346 Rev. His+

CF 500µg/caja Petri (con S9) 562 Rev. His+

## RESPUESTA DE *S. typhimurium* TA100 A CITRATO DE CLOMIFENO.



REVERSION ESPONTANEA 72.6  
CICLOFOSFAMIDA (500UG)464.3

GRAFICA No. 5

Ensayo con Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA100 con la técnica de preincubación.

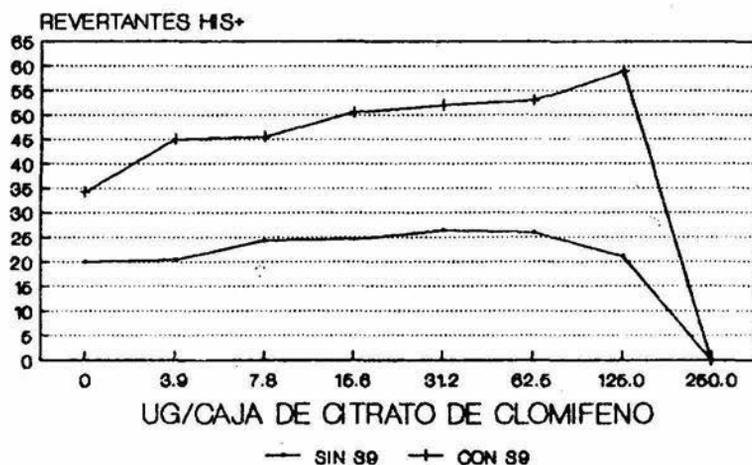
Reversión espontánea 72.6

Control positivo:

CF. (500µg/caja Petri) 454 Rev. His+

La gráfica No.6 corresponde al ensayo realizado con la cepa *Salmonella typhimurium* TA98, en la cual se aprecian diferentes respuestas entre las técnicas de incorporación en tubo con y sin activación metabólica. Así en la técnica sin activación metabólica, se observa un comportamiento más o menos constante en el número de revertantes His+ hasta la dosis de 62.5µg/caja Petri de Citrato de Clomifeno, mientras que, con la técnica de activación metabólica se observa una tendencia ascendente hasta la dosis de 125µg/caja Petri de Citrato de Clomifeno; en la gráfica No.7 sólo se muestra el mismo comportamiento de *S. typhimurium* TA98 con la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica, con el fin de hacer más evidente el aumento en el número de revertantes His+ correspondiente al aumento en la dosis del fármaco, llegando solo este aumento a la dosis de 125µg/caja Petri de Citrato de Clomifeno.

## RESPUESTA DE *S. typhimurium* TA98 A CITRATO DE CLOMIFENO .



REVERSION ESPONTANEA 20.3  
 ACIDO PICROLONICO (100UG) 100.3  
 2-AMINO ANTRACENO (10UG) 165.6

GRAFICA No. 6

Respuesta de *Salmonella typhimurium* TA98 con diferentes dosis de Citrato de Clomifeno, utilizando la técnica de incorporación en tubo con y sin activación metabólica.

Reversión espontánea (sin S9) 20.3 Rev. His+

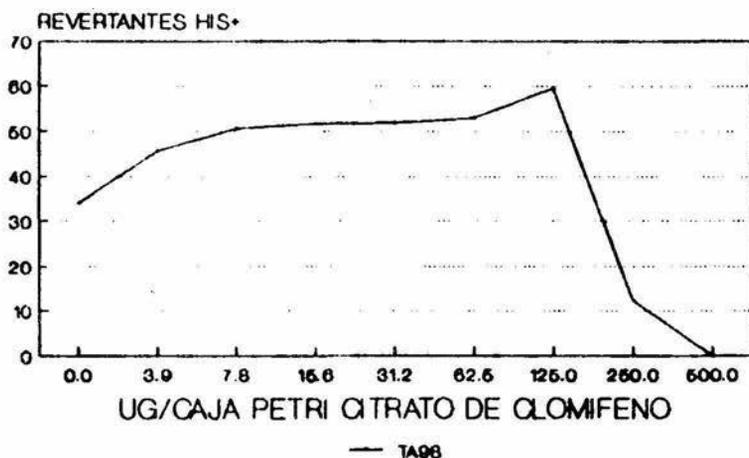
Reversión espontánea (con S9) 32.3 Rev. His+

Controles positivos:

Ac. picrolónico 100µg/caja Petri (sin S9) 100 Rev. His+

2 AA 10µg/caja Petri (con S9) 165 Rev. His+

## RESPUESTA DE *S. typhimurium* TA98 CON CITRATO DE CLOMIFENO



REVERSION ESPONTANEA 34.3  
TECNICA DE INCORPORACION  
2AA 165

GRAFICA No. 7

Respuesta a Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA98 usando la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica.

Reversión espontánea 34.3

Control positivo:

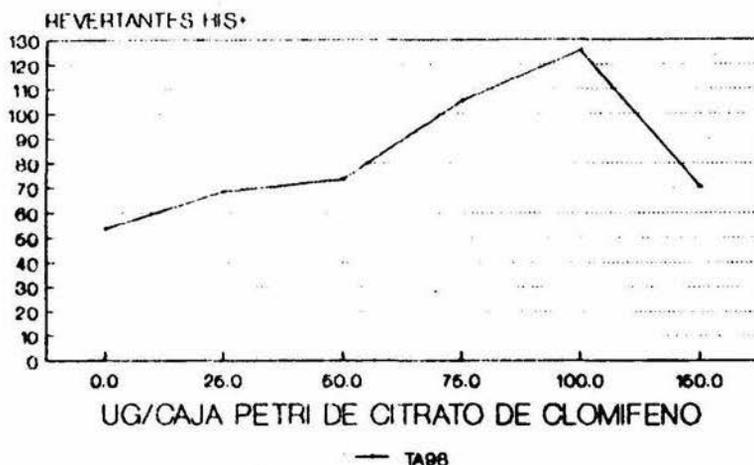
2 AA (10µg/caja Petri) 165 Rev His+

Los datos de la gráfica No.8 demuestran que el Citrato de Clomifeno causa mutaciones por corrimiento de formato en *S. typhimurium* TA98, sólo con la técnica de preincubación.

En la gráfica No.9 se compara la respuesta de *S. typhimurium* TA98 a Citrato de Clomifeno, tanto, con el método de incorporación en tubo como el de preincubación, en donde se manifiesta que con la técnica de preincubación el efecto del Citrato de Clomifeno es capaz de producir mutaciones por corrimiento del marco de lectura en forma más evidente.

Los datos de la gráfica No.10 permiten observar que las mutaciones por corrimiento de formato ocasionadas por el Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA98 son corregidas por el sistema de reparación por escisión, presente en la cepa UHT8413 (UvrB+).

## RESPUESTA MUTAGENICA DE *S. typhimurium* TA98



REVERSION ESPONTANEA 56.3  
TECNICA DE PREINCUBACION  
2AA 563

GRAFICA No. 8

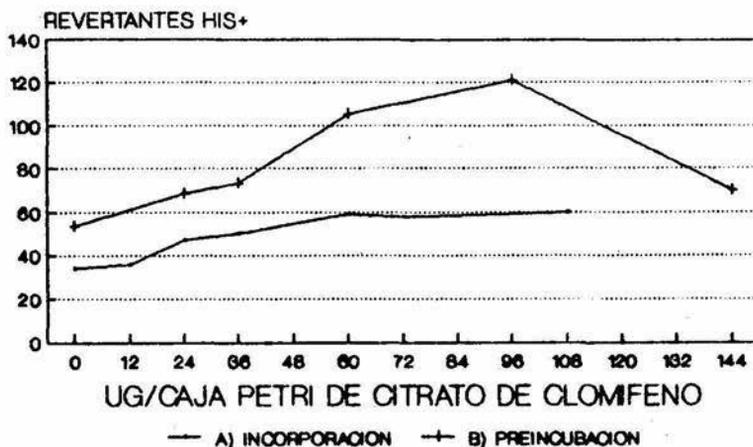
Efecto mutágeno del Citrato de Clomifeno en la cepa *Salmonella typhimurium* TA98, con la técnica de preincubación.

Reversión espontánea. 56.3

Control positivo:

2 AA (10µg/Caja Petri) 563 Rev. His+

## MUTACIONES POR CORRIMIENTO DE FORMATO INDUCIDAS CON CITRATO DE CLOMIFENO EN *S.typhimurium* TA98



A) REVERSION ESPONTANEA 34.3 2AA 108  
B) REVERSION ESPONTANEA 56.8 2AA 568

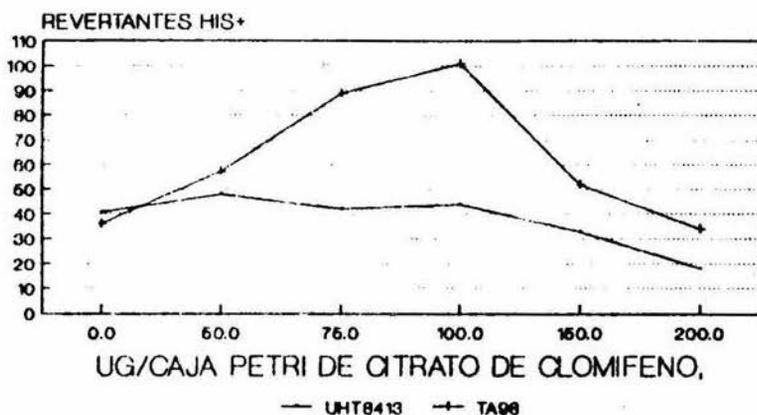
GRAFICA No. 9

Comparación de la respuesta a Citrato de Clomifeno entre las técnicas de preincubación y de incorporación en tubo con activación metabólica en *S. typhimurium* TA98.

Reversión espontánea:

- a) (Ensayo de Incorporación)
- b) (Ensayo con Preincubación)

## RESPUESTA A CITRATO DE CLOMIFENO CEPAS DE *S. typhimurium* pKm101 (uvrB<sup>-</sup>/uvrB<sup>+</sup>)



REVERSION ESPONTANEA  
TA98 36.0    2AA 224.0  
UHT8413 15.3    2AA 103.0

GRAFICA No. 10

Estudio sobre el efecto del sistema de reparación de mutaciones inducidas por Citrato de Clomifeno, en cepas de *Salmonella typhimurium* pkm101 (UvrB<sup>-</sup>/UvrB<sup>+</sup>). Utilizando la técnica de preincubación.

Reversión espontánea UHT8413 15.3

Reversión espontánea TA98 36.0

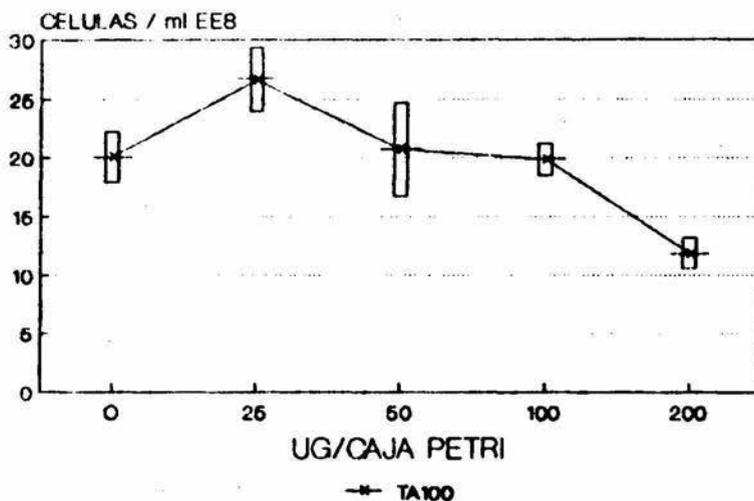
Controles positivos:

2 AA (10 µg/caja Petri) UHT8413 103 Rev. His<sup>+</sup>

2 AA (10 µg/caja Petri) TA98 224 Rev. His<sup>+</sup>

Los ensayos de sobrevivencia para la cepa de *Salmonella typhimurium* TA100 se muestra en la gráfica No. 11 y 12 con la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica y con activación metabólica respectivamente, en donde se puede ver una respuesta descendente en el número de células/ml  $10^{-8}$  conforme aumenta la dosis del fármaco.

### CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. typhimurium* TA100 CON CITRATO DE CLOMIFENO

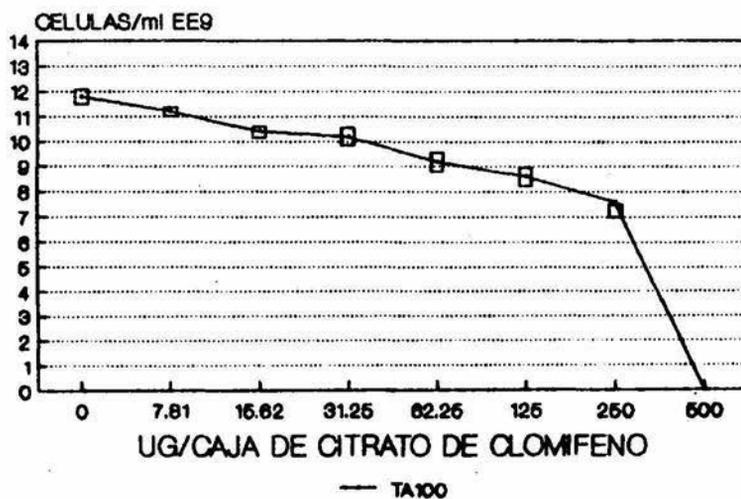


SIN S9  
17.6EEB S 3.06

GRAFICA No. 11

Ensayo de sobrevivencia con Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA100 utilizando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.

## CURVA DE CRECIMIENTO DE *S.typhimurium* TA100 CON CITRATO DE CLOMIFENO



CON 59  
TA100 10.96EE9 8 3.6

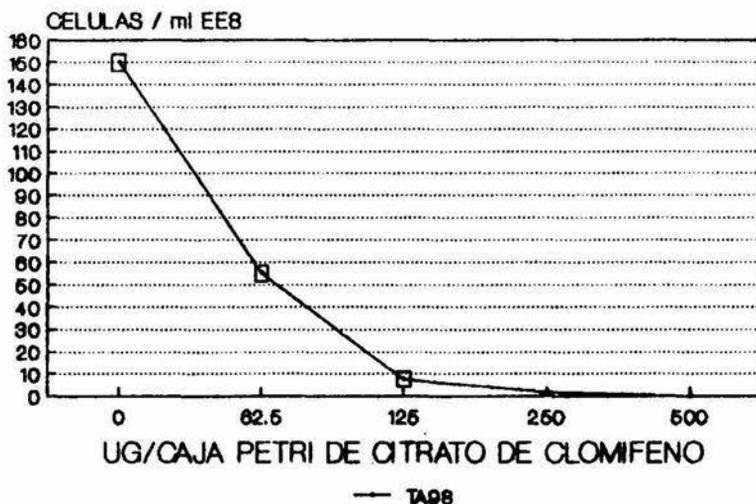
GRAFICA No. 12

Ensayo de sobrevida en *Salmonella typhimurium* TA100 a diferentes dosis de Citrato de Clomifeno, con la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica.

En la gráfica No.13 y 14 se representa los datos obtenidos para la cepa *S. typhimurium* TA98 con la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica y preincubación, en las cuáles se observa una tendencia decreciente para ambas técnicas siendo menos marcado el decremento en el número de células/ml  $10^{-8}$  en la técnica de preincubación en la que el compuesto ha sido activado metabólicamente.

Las curvas de crecimiento obtenidas para *S. typhimurium* UHT8413 se representan en la gráfica No.15 y 16 utilizando el compuesto con y sin activación metabólica. En estas dos gráficas se observa una disminución en el número de células/ml  $10^{-8}$  conforme aumenta la dosis de Citrato de Clomifeno, especialmente cuando la cepa se trata con el compuesto químicamente puro (gráfica No.15).., mientras que, la disminución en el número de células/ml  $10^{-8}$  en la cepa *S. typhimurium* TA98, es menos eviente al activar el medicamento metabólicamente.

### CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. typhimurium* TA98 CON CITRATO DE CLOMIFENO

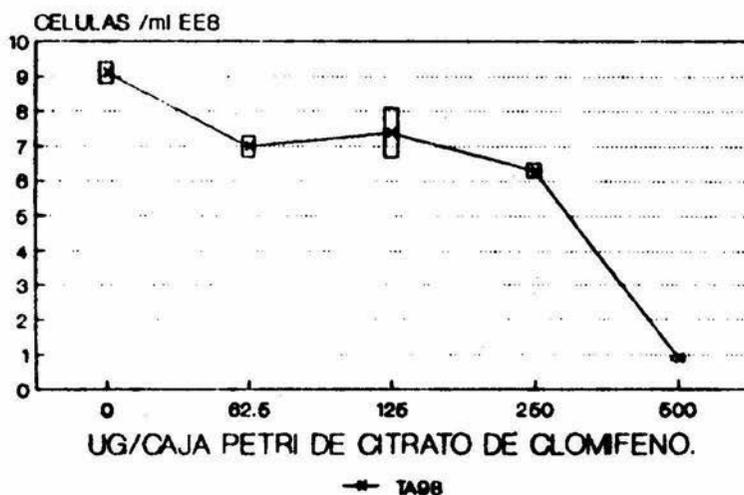


SIN 89  
TA98 1316 EE8 8 8.76

GRAFICA No. 13

Ensayo de sobrevivencia en *S. typhimurium* TA98 con diferentes dosis de Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.

### CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. typhimurium* TA98 CON CITRATO DE CLOMIFENO

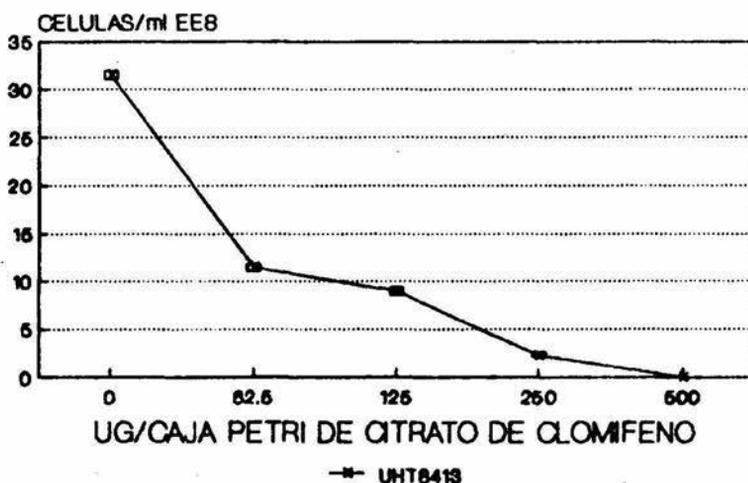


CON 30  
TA98 7.8EEB 8. 2.0

GRAFICA No 14

Ensayo de sobrevivencia en *S. typhimurium* TA98 con Citrato de Clomifeno, utilizando la técnica de preincubación.

## CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. typhimurium* UHT8413 CON CITRATO DE CLOMIFENO

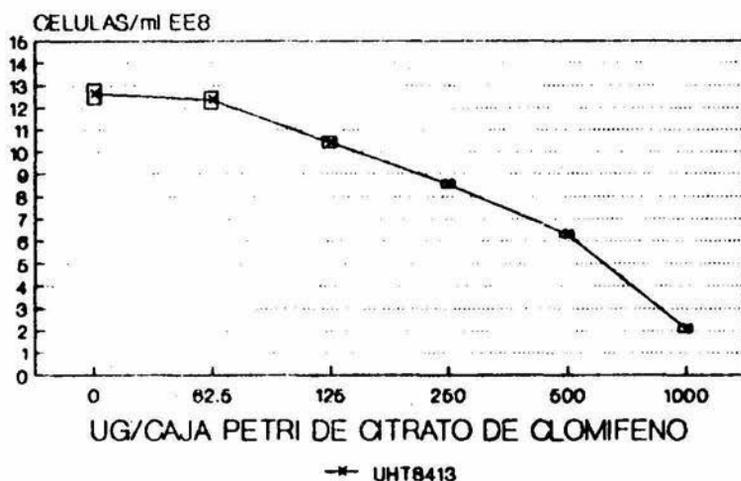


SIN 89  
UHT8413 27.3EE6 S. 3.6  
INCORPORACION EN TUBO

GRAFICA No. 15

Ensayo de sobrevivencia en *S. typhimurium* UHT8413 con Citrato de Clomifeno, usando la técnica de incorporación en tubo sin activación metabólica.

## CURVA DE CRECIMIENTO DE *S. typhimurium* UHT8413 EN CITRATO DE CLOMIFENO



CON S9  
UHT8413 11.68EE8 S 4.6  
TEMOCA DE PREINCUBACION

GRAFICA No. 10

Ensayo de sobrevivencia en *S. typhimurium* UHT8413 con  
Citrate de Clomifeno con la técnica de preincubación.

## DISCUSION

### CURVAS DE ESTANDARIZACION

Los resultados que se muestran en las curvas dosis respuesta presentadas en las primeras gráficas indican que las cepas de *Salmonella typhimurium*, empleadas en este trabajo, estaban respondiendo adecuadamente, ya que se observa una respuesta positiva en los tres ensayos de estandarización, interpretándose así, debido a que se aprecia un aumento en el número de revertantes superando por más de dos veces la frecuencia de reversión espontánea mostrando además, un incremento en función de la concentración del mutágeno. Por otro lado, se cuenta con el antecedente de que cada una de las cepas de *Salmonella typhimurium* contenía los marcadores indicados para cada una de ellas y su reversión espontánea se encontraba dentro del rango sugerido para cada cepa. Así los rangos descritos son: TA100 (120-200), TA98 (30-50) y UTH8413 (0-20). Aumentando ligeramente en el control negativo, cuando se trabaja con activación metabólica (S9) (Maron y Ames, 1983; Espinosa, 1980; Hartman *et al.*, 1980). Teniéndose así la certeza de que los resultados obtenidos para el Citrato de Clomifeno eran confiables, ya que, lo anterior permitió verificar los marcadores genéticos y por ende las propiedades de las cepas de prueba (Ames *et al.*, 1975; Espinosa, 1980, Maron y Ames, 1983).

En la gráfica 1 se observa el efecto de la N-Metil-N'-Nitroso-N-Nitrosogunidina, la cual no necesita de activación metabólica para mostrar su actividad mutágena, en *S. typhimurium* TA100, ya que es un mutágeno directo (Mirvish, 1975; Preussman, R. y Stuart, B., 1984). Por otro lado, la ciclofosfamida (gráfica 2), es un premutágeno, puesto que, requiere ser activado metabólicamente para inducir mutaciones en *S. typhimurium* TA100

(hisG46, pkm101, UvrB<sup>-</sup>). La actividad mutagénica de estos compuestos se debe a su capacidad de alquilar al ADN causando sustituciones de bases, lo cual hace posible sea detectado por *S. typhimurium* TA100 la cual es susceptible a ser revertida por dicho mecanismo (Cortinas de Nava et al., 1980).

En la gráfica 3 se representa el efecto mutagénico del 2 Aminoantraceno en *S. typhimurium* TA98 (hisD 3052 pkm101 UvrB<sup>-</sup>), que al igual que la ciclofosfamida requiere de ser biotransformado para ser mutagénico pero sólo puede ser detectado por cepas de Ames obtenidas mediante el mecanismo de mutaciones por corrimiento en el marco de lectura (Ames et al., 1973), por lo cual solo se hace evidente su actividad mutagénica en *S. typhimurium* TA98, ya que ésta sólo es revertida por compuestos capaces de inducir mutaciones de este tipo. (Dayan, M.C. et al., 1980; Espinosa, 1980; McCann et al., 1975).

Cabe hacer notar que en nuestros ensayos a pesar de sustituir el caldo nutritivo Oxoid No.2 (Inglaterra) descrito por Maron y Ames, 1983 por el caldo nutritivo Bioxon (México), el rango de reversión espontánea de nuestras cepas fué comparable al reportado en la literatura científica. Lo cuál muestra que el empleo del Medio Bioxon, es una alternativa adecuada para realizar un monitoreo apropiado de Mutágenos químicos en laboratorios con pocos recursos económicos.

#### ENSAYOS DE MUTAGENESIS

Debido a que uno de los intereses de probar el Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames) derivó de conocer los cambios moleculares que pudiera causar este fármaco en el operón de la histidina por medio de las mutaciones que pudiera originar. Se seleccionaron dos cepas que fuerán susceptibles de revertir por diferentes mecanismos de mutación, una por

sustitución de bases y otra por desfasamiento de la secuencia nucleotídica; así se eligieron las cepas TA100 y TA98 las cuales revierten a su fenotipo original His<sup>+</sup> por los mecanismos que se mencionaron con anterioridad, además, son las que se recomiendan universalmente para estudiar un compuesto del cual no se conoce nada sobre su modo de acción (MacCan et al., 1975; Maron y Ames, 1983; Hartman et al., 1986).

Los resultados del trabajo muestran que el Citrato de Clomifeno no es capaz de inducir mutaciones por sustitución de bases, ya que no se observa una repuesta positiva en la cepa que es susceptible a ser revertida a su fenotipo original por medio de este mecanismo, con ninguna de las diferentes técnicas empleadas para este propósito, en efecto, las gráficas (4 y 5) obtenidas para la cepa de *S. typhimurium* TA100 no muestran un aumento en el número de revertantes His<sup>+</sup> con respecto a la reversión espontánea, ni al tratar al compuesto con enzimas microsomales, efecto que pudo observarse tanto con la técnica de incorporación en tubo con activación metabólica como con la de preincubación, que aumenta la sensibilidad del método a mutágenos químicos. (Maron y Ames, 1983) Esto puede deberse a que el Citrato de Clomifeno en su fórmula química no posee radicales alquilo, que al reaccionar con el ADN formen aductos y puedan causar sustitución de bases, después del proceso de replicación. (Cortinas de Nava et al., 1980).

Los estudios realizados en la cepa de *S. typhimurium* TA98 nos indican que el Citrato de Clomifeno no es un mutágeno directo, ya que, este no presenta actividad mutagénica al estar en contacto con el ADN en ausencia de enzimas microsomales que propiciarán el metabolismo de esta droga, *in vitro*. Este efecto se pudo observar con la técnica de incorporación en tubo en la gráfica No 6, ya que no se observa un incremento en el número de revertantes His<sup>+</sup> en función de la concentración del compuesto, mientras que, al probar el Citrato de Clomifeno con la técnica de incorporación en tubo

con activación metabólica, da una respuesta dudosa, puesto que aumenta el número de revertantes en una sola dosis probada del compuesto, sin llegarse a apreciar una curva dosis respuesta, como puede verse en las gráficas 6 y 7. Debido a esta razón se probó el fármaco con la técnica modificada de Ames, en ensayos de preincubación con activación metabólica *in vitro*. Así, Los resultados de este trabajo demuestran, que al activar metabólicamente el Citrato de Clomifeno y favorecer por más tiempo el contacto de este con el ADN, presenta actividad mutagénica, presentándose esta por debajo de la dosis terapéutica, como se puede observar en las gráficas 8 y 9 en las cuales se utilizó la técnica de preincubación que permite mantener al ADN expuesto por mas tiempo al compuesto. Esto indica que el Citrato de Clomifeno al igual que otros compuestos requiere de activación metabólica, por lo cual se consideran dentro del grupo de los premutágenos y sólo muestran su capacidad de producir mutaciones con la técnica de preincubación como es el caso de los mutágenos, 2 aminofluoreno o el N,N-Dimetil-4-aminobenceno (Ames, B.N. et al., 1973; Matsumoto y Yoshida, 1977; Takie, Y. et al., 1975).

Los datos demuestran que el Citrato de Clomifeno es capaz de producir mutaciones por corrimiento en el marco de lectura, puesto que la respuesta positiva se registró únicamente para cepa *S. typhimurium* TA98 la cual revierte a su fenotipo original por medio de este mecanismo, este efecto se observó con la técnica de preincubación (gráfica 8 y 9) en la cual se muestra el aumento en el número de revertantes en función de la concentración del compuesto y en donde se puede apreciar la pequeña curva dosis respuesta que este medicamento indujo en la cepa TA98. Las mutaciones producidas por este compuesto pueden deberse a la estructura química que presenta, dado que al no presentar aminas secundarias o terciarias que son altamente reactivas con el ADN que causan mutaciones por sustitución de bases no sea capaz de producir dicho efecto y por tanto la respuesta obtenida para la cepa *S. typhimurium* TA100 fuera negativa (Preussman, R. y Stuart,

B., 1984). No siendo así para la cepa TA98, puesto que, al presentar anillos aromáticos, le den la capacidad de actuar a alguno de sus metabolitos como intercalante y por ende causar mutaciones por corrimiento en el marco de lectura, como está descrito en la literatura para las aminas heterocíclicas, las cuales deben su potencia mutagénica al sistema de anillos aromáticos que presentan en su estructura química; que al igual que el Citrato de Clomifeno después de ser activado metabólicamente puede actuar como intercalante, el cual al estar intercalado entre las bases del ADN al replicarse puede adicionar o deletar pares de bases en la secuencia nucleotídica y así correr el marco de lectura (Ames B.N. et al., 1973; Dayan, M.C. et al.., 1980; Matsumoto, Takei, Y. et al., 1978 ).

#### ENSAYO DE REPARACION

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que las mutaciones producidas por el Citrato de Clomifeno en *S. typhimurium* TA98 son reparadas por el sistema de reparación por escisión presente en la cepa de *S. typhimurium* UTH8413 ( $UvrB^+$   $pkm101$ ) (Gráfica 10), la cual al tener intacto su sistema de reparación por escisión disminuye el número de revertantes, por contar con el complejo enzimático UvrABC intacto, el cual repara la lesiones ocasionadas en el ADN por un compuesto químico (Kimball et al., 1987; Maron y Ames, 1983; Espinosa, A. et al. 1989).

## ENSAYOS DE SOBREVIDA

Los resultados indican que el Citrato de Clomifeno es muy tóxico, ya que, en todas las curvas obtenidas se observa una disminución en el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.)/ml en función de la dosis del fármaco, esto puede deberse a que el Citrato de Clomifeno cause mutaciones letales o bien cause alteraciones de alguna vía metabólica indispensable para la bacteria (Maron y Ames, 1983; Espinosa, A., 1980). En los estudios de sobrevivida realizados con activación metabólica, a pesar de que se mejora la sobrevivida al ser biotransformado este medicamento (Gráfica 14 y 16) no deja de presentar el efecto tóxico del compuesto, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en bioensayos animales, en donde la administración de Citrato de Clomifeno a dosis entre 10 a 500µg tiene efectos tóxicos sobre los órganos de ratas y diversos efectos genotóxicos (Clark, 1985; Hart, 1990; Messinis y Templeton, 1990; Suzuki, 1970a; 1970b). Por otro lado los efectos tóxicos observados en este sistema de prueba, concuerdan con los datos obtenidos en cultivos de linfocitos *in vitro*, en los que se muestra que este medicamento tiene un efecto citotóxico (González Patiffo *et al.*, 1992).

Es posible que la alta toxicidad que presenta este medicamento, sea la causa de los diferentes trastornos que se han observado en las pacientes tratadas con este medicamento, tales como: el desarrollo de endometriosis, trastornos psicomotrices, alucinaciones, disminución en la capacidad para transportar o sostener al embrión (Scialli, 1986; Svigos, 1990; Kapfhammer *et al.*, 1990).

Teniendo en cuenta los resultados de este estudio, en los que se muestra que los metabolitos del Citrato de Clomifeno pueden producir mutaciones por corrimiento de formato, y que estos metabolitos, son tóxicos, tanto para las cepas eficientes como

deficientes en el Sistema de Reparación por Escisión uvrB, y que dicho efecto tóxico no puede ser corregido por el sistema de Reparación SOS, y por otro lado, dado que en la literatura se han reportado numerosos efectos tóxicos así como efectos adversos, ya mencionados, de este medicamento, su empleo deberá realizarse solo después de realizar una evaluación de riesgo-beneficio, en el caso particular de cada paciente que lo requiera.

## CONCLUSIONES

1. El Citrato de Clomifeno no es capaz de producir mutaciones por sustitución de bases en la cepa *S. typhimurium* TA100 empleada en este estudio, debido a la ausencia de agentes alquilantes en su estructura química.
2. Este medicamento es capaz de inducir mutaciones por corrimiento en el marco de lectura en la cepa *S. typhimurium* TA98, dado que presenta anillos aromáticos en su estructura química.
3. Este fármaco no es un mutágeno directo, porque no produce mutaciones en ausencia de enzimas microsomales.
4. El Citrato de Clomifeno es un premutágeno débil, con un rango de actividad mutagénica muy limitado.
5. El Citrato de Clomifeno es un medicamento altamente tóxico, aunque su capacidad tóxica disminuye al ser metabolizado.
6. Las mutaciones letales no son corregidas por el sistema de reparación SOS, propenso a error, presente en las cepas *S. typhimurium* TA100 y TA98 empleadas en este trabajo.
7. Las mutaciones puntuales, ocasionadas por el Citrato de Clomifeno, son debidamente corregidas por el sistema de reparación por escisión.
8. Se deberán realizar estudios para determinar si el efecto tóxico de este medicamento, que se observa en este sistema de prueba se debe a daños genotóxicos o es debido a alteraciones en la célula.

9. Los efectos tóxicos que produce este medicamento, aunados a su capacidad de producir mutaciones por corrimiento de formato deben ser tomados en cuenta para prescribir este fármaco sólo en casos en que el beneficio sea mayor que el riesgo.

## APENDICE

### MEDIOS DE CULTIVO

#### CALDO NUTRITIVO BIOXON (MEXICO)

Disolver 0.8g de medio en 100ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 lb de presión/20 minutos

#### AGAR INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)

Preparar agar infusión cerebro corazón (DIBICO) según las instrucciones del fabricante.

#### AGAR SUAVE DE SUPERFICIE

NaCl	0.5g
Bacto agar	0.6g
Agua destilada	90.0ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 lb de presión/20 minutos. dejar enfriar el agar a 45 °C y añadir 10ml de solución de histidina-biotina (requerimientos). Vertir en tubos a razón de 2ml c/u.

## AGAR BHI PARA LOS ENSAYOS DE SOBREVIDA

BHI	0.5g
Bacto agar	0.6g
Agua destilada	100ml

Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  15 lb de presión/20 minutos, vertir en tubos con 2ml c/u.

## SOLUCION DE SALES DE VOGEL BONER

Solución A. En 800ml de agua destilada se disuelven en el siguiente orden:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10g
Acido cítrico. $\text{H}_2\text{O}$	100g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ anhidro	500g
$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	175g

Aforar a 1000ml y esterilizar con cloroformo al 0.1%. Almacenar en frascos ambar a temperatura ambiente.

## MEDIO MINIMO DE VOGEL BONER

### Solución A

Mezclar 10ml de las sales de Vogel Boner en 90ml de agua destilada.

### Solución B

Dextrosa 10.0g

Bacto agar 7.5g

Agua destilada 400.0ml

Esterilizar por separado las soluciones a 121°C 15 lb de presión/20 minutos. Una vez esterilizadas se mezclan asépticamente y se vierten en cajas Petri.

## SOLUCION DE HISTIDINA BIOTINA (Requerimientos mínimos)

Histidina 0.007g

Biotina 0.012g

Agua destilada 100ml

## PREPARACION DE LA MEZCLA S9

Fracción S9	0.5ml
Sol. de $MgCl_2$ 0.4M KCl 1.65M	0.02ml
Glucosa 6 fosfato	0.0013g
NADP	0.0030g
Amortiguador de fosfatos 0.2M pH7.4	0.9ml

Las cantidades que se presentan son las que se necesitan por mililitro.

## BIBLIOGRAFIA

- Alfred, G.K. 1991. Overview: Genes that predispose to cancer  
*Mutation Res.* 247: 185 - 190.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaka, E. y Lee, F.D. 1973.  
Carcinogens are Mutagens: A simple Tets System Combining Liver  
Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc Nat  
Acad Sci.* 70 (8): 2281-2285.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasak, E. 1975. Methods for Detecting  
Carcinogens and Mutagens with *Salmonella/mammalian-microsome*  
*Mutagenicity Test.* *Mutation Res.* 31: 347 - 364.
- Ames, B.N. 1979 Identifying Enviromental Chemicals Causin  
Mutatipns and Cancer. *Science.* 204.
- Anderson, D., Green, M.H., Matten, I.E. y Gudlay, M.J. 1984. An  
International Collaborative Study of "Genettic Dcift" in  
*Salmonella typhimurium* strains used in the Ames Test. *Mutation  
Res.* 130: 1-10.
- Antonini Filho, Renzo, De Luca, Laurival A, Silveria, Nádia  
Regina, Traiman. 1986. Indução com citrto de clomifene (CC)  
associado a dexametasona (DMX)/Ovulation induction with clomiphene  
citrate associate to dexamethasona. *Reproducfo.* 1: 21-23.
- Arriaga Alba, M., Espinosa, J., y Cortinas de Nava. 1988.  
Mutagenenicity of products Generate by the Reaction Between Save  
Antiparasitic Drugs and Nitrite. *Enviromental and Molecular  
Mutagenesis.* 12: 65-73..
- Asshby, J., Tennant, W. 1988. Chemical Structure, *Salmonella*  
Mutagenicity as Indacators of Genotoxic Carcinogecis Among 22  
Chemical Tested in Rodenents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation. Res.*  
204 (1) 17-19.

- Bolton, F.M. 1977. Bilateral Breast cancer associated with clomiphene. *Lancet*. ii:1176.
- Boué, J.C. & Boué, A. 1973. Increased frequency of cromosomal anomalies in abortions after induce ovulation. *Lancet*. 679-680.
- Clark, J.H. & ormack, S. 1977. Clomid or nafoxidine administered to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Science*. 197: 164-165.
- Chaudhuri, C., Mukherjea, M. Chakraborty, B. 1990. *Int. J. Fertil.* 35 (1): 58 - 64.
- Chiorboli, E., López, M.A. 1981. Ouso do clomifeno no factor masculino da esterilidade. *J. Bras. Urol.* 8 (1): 54 - 58.
- Cortinas de Nava, C., Ostrosky, P. y Galván, S. 1980. Principios de mutagenesis y su relación con carcinogenesis y teratogenesis. Manual de Métodos para la identificación de mutágenos y carcinogenos químicos ambientales. 1-18.
- Dayan, J., Crajer, M.C., Bertozzi, S., Lefrancois, S. 1980. Application of de *Salmonella typhimurium* Microsome Test to the Study of 25 Drugs Belonging to 5 Chemical Series. *Mutation. Res.* 77: 301-306.
- Delhanty, J.D., Penketh, R.J. 1990. *Hum-Repord.* 5 (6): 699-702.
- Dickey, R.P., Olar, T.T., Culore, D.N.1990.. The probability of multiple births when multiple gestational sacs or viable embryos are diagnosed ad trimester ultrasuond. *Reprod.* 5 (7): 880-882.
- Elledge y Walker, G.C.1983. Proteins Required for Ultraviolet and chemical mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 164: 175-192.
- Espinosa, J. 1980. Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 31-49.

-Espinosa, Aguirre, Ramírez Santos y Cortinas de Nava, 1989. Influence of the Uvr repair system on the mutagenicity of antiparasitic drugs. *Mutation Res.* 222: 161-166.

-Fitz, R., Reichel, R., Lubec, G. 1990. Clomiphene citrate ointment in the local treatment of condylomata acuminata. *Klin Wochenschr.* 102 (11): 337 - 340.

-Gómez Alzugaray, Más Díaz, J., Padrón Durán, R. 1985. Tratamiento prolongado de la oligozoospermia idiopática con dosis pequeñas de clomifeno. *Rev. Cuba. Obstet. Ginecol.* 11 (1): 91-96.

- González Patiño, M.E., Arriaga Alba, M., Carpio Pedraza, J.C., 1992. Evaluación de riesgo genotóxico de la exposición a Citrato de Clomifeno, en cultivo de linfocitos. *Bioquímica.* 16 Número especial.: 128.

-Hart, J.E. 1990. Pituitary-related weight change affecting the liver, uterus and adrenal glands of rats treated with hexoestrol and clomiphene in high doses. *Toxicology.* 61 (2): 185 - 194.

-Hartman, P.E. Ames, B.N., Roth, J.R. Barnes, W.M. y Levin, D.E. 1986. Target sequences for mutagenesis in *Salmonella typhimurium* histidine requeirin mutants. *Environmental. Mutagen.* 8: 631 - 641.

-Kaminski, P.F. Scrosky, J.I., Mandell, M.J., Broadstreet, P.R. 1990. Clomiphene citrate stimulation as an adjunct in locating ovarian tissue in ovarian remnant syndrome. *Obstet-Gynecol.* 76: 924-926.

-Kapfhammer, H.P., Wesser, T., Hoff, P. 1990. Psychotic illness during treatment with clomifenl. *Dtsch-Med-Wochenschr.* 115 (24): 936-939.

-Kimball, R.F. 1987. The development of ideas about the effect of DNA repair on the induction an chemicals. *Mutation Res.* 186: 1 - 34.

-Lindahl, R. 1982. DNA repair enzymes. *Ann Rev. Biochem.* 51: 61 - 87.

-McCann, J. y Ames, B.N. 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsom test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.S.A.)*. 72: 5135 - 5139

-McCann, j., Spingarn, M. E., Kobori, J. y Ames, B. N. 1975. Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R. Factors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72 (3): 979 - 983.

-MaPhee, D.G. 1984. Do the *Salmonella typhimurium* Tester strains used in mutagenicity assays display plasmid encharged genetic drift. *Mutation Res.* 127: 183-184.

-Maron, D.M. y Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmollela typhimurium* Mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173-215.

-Matsumoto, T., Yoshida, D., Shigenobu, M. 1987. Structural requirements for mutagenic activities of N-Heterocyclic bases in de *Salmonella* test system. *Agric. Biol. Chem.* 42 (4):861-866.

-Messinis, I.E., Templeton A.A. 1980. Anti-estrogeni effect of clomiphene citrate in oestrogen-treated, hypogonadal women. *Hum-Reprod.* 5 (2):150-152.

-Mirvish, S. S. 1975. Formation of N-nitroso Compounds. Chemistry, Kinetics and *In vivo* Occurrence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 325 - 351.

-Mohn, G.R. 1981. Bacterial systems for carcinogenicity testing. *Mutation Res.* 87: 191 - 210.

- Muñoz Pérez, M., Cortes Velasco, M., Martínez Elizondo, Contreras Soto, J. Forbasch Sánchez, G. 1988. Inducción de ovulación, en pacientes anovulatorias con Citrato de Clomifeno. *Ginecol. Obs. (Mex)*. 56: 256 - 262.
- Pereira Dirceu, H. Wendoca, L., Chimenti, R. Gianfaldoni, A. Paulo, G. 1987. Estudo ecográfico dos ovários em ciclos induzidos pelo Citrato de Clomifeno. *J Bras. Ginecol.* 97 (4):167-170.
- Pool, B.L. 1980. Mutagenicity relevance of short tram. *Test. Oncology*. 37: 266-271.
- Preussman, R. y Stuart, B. W. 1984. *N*-nitroso Carcinogens. *IN* Searle, C E. *Chemical. Carcinogens Monographs*. Washington, D.C. : 643 - 731.
- Rinkus, S.J. y Legator, M.I. 1979. Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* system. *Cancer. Res.* 39: 3289-3318.
- Rosenkianza, H.S. y Gutter, W.T. 1976. Speck: mutagenicity DNA modifying activity a comparasion of two microbial assay. *Mutation. Res.* 41: 61-70.
- Sanderson, K. y Hurley, J.A. 1987. linkage map of *Salmonella typhimurium* in neidhard. F.C. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* . *Celular and molecular biology*. ASM. Vol. 2 pp 877-918.
- Saragentin, N.J. y Smith, K.C. 1985. Spontaneous mutagenesis and recombination. *Mutation Res.* 154: 1 - 27.
- Scialli, 1986. The reproductive toxicity of ovulation induction. *Fertil and Steril.* 45 (3):315-323.
- Scull, W.J. 1991. The segregation of cancer-causing genes in human populations . *Mutation Res.* 247: 191 - 198.

Shoman, Z., Zosmer, A., Insler, V. 1991. Early miscarriages and fetal malformations after induction of ovulation (by clomiphene citrate and/or human menotropins), in vitro fertilization, and gamete intrafallopian transfer. *Fertil. Steril.* 55 (1):1-11.

-Svigos, J.M. 1990. Endometriosis and clomiphene citrate. *Lancet* 335 (8687):475.

-Suzuki, M.R. 1970 a. Effects of cyclofenil and clomiphene, ovulation inducing agent, on mouse and rat fetuses. (*Jpn*). *Oyo. Yakuri.* 4: 1-6.

-Suzuki, M.R. 1970 b. 1970. Effects of oral cyclofenil and clomiphene, ovulation inducing agents, on pregnancy and fetuses in rats. (*Jpn*). *Oyo. Yakuri.* 4: 635 - 644.

-Takie, Y. Masakuni, D. Yuko, S. Taijiro, M. Minako, N. Takashi, S. y Yoshiyuki, H. 1975. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes their derivatives. *Cancer Letters.* 1: 91-96.

-Toshinobu, T., Seichiro, F., Noriaki, S., Kihyoel. 1979. Correlation between dosage or duration of Clomid therapy and abortion rate. *Int. J. Fertil.* 24: 193.

-Trosko, J.E., Chang, Ch. 1984. A possible mechanis link between teratogenesis and carcinogenesis. Inhibited intracellular communication. In *Mutation Cancer and Malformation Plenum Press*: 529 - 541.

-Veranes Arias, Vazquez Sanchez, Pifion Montano. 1985. Resultados obtenidos en la utilización combinada con Citrato de Clomifeno, con gonadotropina menopausica humana y gonadotropina coriónica, en el tratamiento del ciclo anovulatorio. *Rev. Cuba Obstet. Ginecol.* 11 (2): 242 - 246.

-Wade, A. 1977. *Martindale the extra Pharmacopoeia*, 27th ed. London, the Pharmaceutical Press. pp 1392-1394.

-Webster, K.C., Srable, J.H., James, C.D., 1991. Molecular genetics of human cancer predispositions and progression. **Mutation Res.** 247: 199 - 202.

-Wentz, A.C., Kossoy, L.R., Parker, R.A. 1990. **J. Obstet Gynecol.** 162.

-Windholz, M., ed. 1976. **The Merck Index**, 9th. ed., Rahway, NJ, Merck 7 Co., pp. 306.

-Yabur, J.A. Alvarado, M., Serdán, G. García, L., Betancourt, A., Mora, R. Loho Mollejas, A. y Menesses, S. 1985. Inducción de la ovulación con clomifeno. **Rev. Obstet. Ginecol. Venezuela.** 45 (2): 110 - 114.

-Zimmerman, E.F. 1975. Chemical structure and teratogenic mechanism of action. In **methods for detection of enviromental agenst that produce congenital defects**. Ed. Th. H, Shepard, J.R. Miller, M. Marios. pp. 79.