



# Universidad Nacional Autónoma de México

CAMPUS IZTACALA

**VALORACION GENOTOXICA DEL CITRATO DE CLOMIFENO  
EN DIFERENTES SISTEMAS DE PRUEBA BACTERIANOS.**

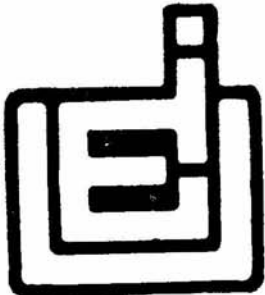
**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A :

**ROCIO FLORES PAZ**

Directora de Tesis: **DRA. C.B. MYRIAM ARRIAGA ALBA**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1994





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

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

A DIOS GRACIAS.  
POR HABERME PERMITIDO REALIZAR  
EL OBJETIVO DESEADO.

Con todo el Amor del mundo  
dedico esta tesis a MIS PADRES,  
por el apoyo y comprensión de siempre  
Mary Paz y Darío Flores.

A mi asesora, Dra. Myriam Arriaga  
agradezco infinitamente su paciencia y  
su amistad.

Con cariño a mis hermanos, Paty y Marco Antonio.

Con especial dedicatoria a mi Tio Victor.

Adrián, gracias por los bellos momentos compartidos.

A mi mejor amigo,  
gracias por tu ternura y fortaleza,  
a ti Victor con todo mi amor.

A mis amigas:  
Renata, Gaby, Ana Laura, Paty, Elizabeth, Claudia y Laura,  
Gracias por su amistad.

Gracias por su buena vibra,  
Roberto, Chela, Nico y Fernando.

Quiero agradecer de manera muy especial a los Maestros: M. en C.  
Sergio Vaca, Biol. Lupita Martínez, Biol. Elias Piedra y M. en C.  
Roberto Velazco, sus valiosos consejos para la presentación de  
este trabajo.

## RESUMEN.

El citrato de clomifeno, es un fármaco que se emplea frecuentemente para inducir ovulación en pacientes con problemas de infertilidad, pero su uso ha sido asociado con abortos, embriotoxicidad en roedores e incluso se han reportado casos de cáncer mamario, existiendo aún muy pocos estudios sobre su actividad genotóxica.

Por lo anterior, en este trabajo se realizaron experimentos con diferentes sistemas de prueba bacterianos como son *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* PolA<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup>, inducción de colicinogenia y fago lambda, para valorar la capacidad del citrato de clomifeno de producir daños en el DNA, que induzcan cadenas unicasenarias y mutaciones puntuales. Los resultados obtenidos mostraron que el citrato de clomifeno no indujo mutaciones por sustitución de bases a nivel A-T y G-C, sin embargo, los metabolitos de este medicamento produjeron mutaciones por corrimiento de formato. El citrato de clomifeno y sus metabolitos inducen mutaciones genoletales en el sistema de cepas de *E. coli* PolA<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup>. En cepas carentes del sistema de reparación por escisión, se logro la inducción del fago lambda y se demostro que los metabolitos del mismo inducen el gen *colE1*<sup>+</sup>, regulado por el sistema SOS.

Estos datos muestran que el citrato de clomifeno, induce daños severos en el DNA, y por lo tanto es aconsejable que su empleo se realice con una evaluación de riesgo-beneficio en cada paciente.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCION.....  | 1  |
| OBJETIVOS.....   | 3  |
| ANTECEDENTES.....  | 4  |
| Relación entre mutación y cáncer.....                                  | 4  |
| Sistemas de reparación.....  | 5  |
| Sistemas de pruebas para detectar diferentes tipos de<br>mutación..... | 8  |
| Sistema de <i>Salmonella typhimurium</i> de Ames.....                  | 9  |
| Sistema de <i>Escherichia coli</i> PolA-/PolA+.....                    | 12 |
| Inducción del fago lambda y colicinogenia.....                         | 13 |
| Citrato de Clomifeno.....  | 14 |
| MATERIAL Y METODO.....   | 17 |
| RESULTADOS.....  | 27 |



|                   |    |
|-------------------|----|
| DISCUSION.....    | 39 |
| CONCLUSIONES..... | 44 |
| ANEXO.....        | 45 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 47 |

## INTRODUCCION

El citrato de clomifeno, es un fármaco que se emplea en el tratamiento de pacientes con problemas de anovulación. Estimula el eje hipófisis - hipotálamo, así como la maduración y actividad endócrina del folículo ovárico, seguido del desarrollo y función del cuerpo lúteo, proporcionando una buena alternativa en el tratamiento de parejas estériles. Sin embargo, su uso ha sido muy discutido debido a que presenta diferentes efectos tóxicos (Yabur et al., 1975).

En efecto, se han reportado casos de abortos y cáncer mamario en algunas pacientes tratadas con citrato de clomifeno (Botton 1977; Toshinobu et al., 1979). Sin embargo, no se conoce con exactitud si estos efectos puedan ser debidos a la terapia con citrato de clomifeno. Por otro lado, se conoce que este medicamento produce mutaciones puntuales en cepas de *Salmonella typhimurium*, las cuales son corregidas si el sistema de reparación por escisión funciona adecuadamente. (Díaz Hernández, 1993) reportándose preferentemente un efecto tóxico en cepas del sistema de Ames, aún en presencia del sistema de reparación "SOS" propenso a error. Consecuentemente, es importante efectuar más a fondo la valoración genotóxica del citrato de clomifeno debido a que se conoce que los compuestos capaces de producir mutaciones puntuales o daños genéticos pueden producir; Abortos, teratogénesis y cáncer. En efecto se sabe que si un compuesto daña al DNA de una célula germinal se puede producir aborto del primer trimestre y teratogénesis, si se daña a una célula somática, puede iniciarse el proceso de carcinogénesis. Actualmente se cuenta con diversos sistemas de prueba que detectan diferentes efectos biológicos finales, que se emplean en las baterías de pruebas genotóxicas, los cuales en una primera etapa emplean sistemas bacterianos que detectan mutaciones puntuales y daños genotóxicos, DNA aislado que detecta daños puntuales, Virus que detectan daños génicos y puntuales, Hongos que detecta mutaciones génicas y puntuales. Posteriormente se recomiendan estudios en células de

mamífero *in vitro* e *in vivo* que evalúan la presencia de mutaciones génicas o de aberraciones cromosómicas en células germinales, la prueba de intercambio de cromátidas hermanas que detecta tanto la inducción del rearreglo del DNA como la alteración de la integridad del cromosoma.

Recientemente, para la valoración genotóxica de fármacos se ha recomendado el empleo de más de una prueba biológica de corta duración que pueda detectar diferentes efectos biológicos, con el fin de lograr así una valoración más predictiva del riesgo de exposición a compuestos carcinogénicos. Por lo cual, en este trabajo, se dará una aportación a la valoración del riesgo genotóxico de exposición al citrato de clomifeno mediante el empleo de diferentes sistemas bacterianos, capaces de detectar diferentes efectos finales, como es el caso de *Escherichia coli* Pol A<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup> que mide daño genoletal y la inducción de el sistema SOS que responde a daños severos al DNA.

## JUSTIFICACION

El clomifeno produce mutaciones puntuales que son reparadas en *Salmonella typhimurium* (Díaz Hernández, 1993), sin embargo, se ha demostrado que este compuesto es muy tóxico en linfocitos (González et al., 1992) y en *Salmonella* (Díaz Hernández, 1993), pero se desconoce si produce un daño letal.

## HIPOTESIS:

El clomifeno puede producir mutaciones génicas en el cromosoma, que pueden ser más fácilmente detectadas en cepas deficientes en los sistemas de reparación, como en *E. coli* Pol A<sup>-</sup>/Pol A<sup>+</sup>, y puede inducir la expresión de genes controlados por el regulón SOS.

## OBJETIVOS:

### OBJETIVO GENERAL:

Empleando diferentes sistemas de prueba bacterianos se desea proporcionar una mejor valoración del riesgo de exposición al citrato de clomifeno.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Estandarizar la técnica de *Escherichia coli* Pol A+/Pol A-, sin y con activación metabólica.
- 2.- Conocer si el citrato de clomifeno produce mutaciones genoletales en *E. coli* Pol A+/Pol A-.
- 3.- Conocer si los metabolitos del citrato de clomifeno producen mutaciones genoletales en *E. coli*.
- 4.- Determinar si el citrato de clomifeno produce mutaciones puntuales detectables, solo cuando existe el sistema de reparación "SOS", propenso a error, empleando cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames.
- 5.- Estudiar la inducción de genes col debido a la activación del sistema SOS, en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.
- 6.- Determinar si el citrato de clomifeno puede desreprimir el regulón SOS induciendo el profago  $\lambda$  en cepas lisogénicas de *E. coli*.

## ANTECEDENTES.

### RELACION ENTRE MUTACION Y CANCER.

Se sabe que los daños al DNA, si no son reparados adecuadamente, pueden producir cáncer, abortos o teratogénesis. En efecto, en la actualidad existe evidencia experimental que vincula la actividad carcinogénica con la mutagénica, debido a que la mayoría de los cánceres humanos están ligados a la exposición de sustancias químicas industriales y ambientales capaces de inducir mutaciones (Ames 1979; Cortinas de Nava et al., 1980). De igual forma, cuando el daño genético se produce en las células germinales puede tener como consecuencia abortos del primer trimestre y un efecto teratogénico. (Trosco, 1986).

El proceso de carcinogénesis es muy complejo, y para explicarlo con fines didácticos, se ha propuesto el modelo de la iniciación - promoción. El cáncer se induce con una mutación heredable en una o varias células que sufren la acción de un carcinógeno, lo que se denomina como proceso de iniciación; así, la(s) célula(s) iniciada encuentra condiciones propicias para que otras sustancias químicas (promotores), como hormonas o factores de crecimiento, promocionen la formación de un tumor que puede ser benigno, es decir las células siguen proliferando y el tumor sigue creciendo pero las células contenidas en él presentan un cierto grado de diferenciación, o maligno, cuando las células comienzan a invadir tejidos adyacentes, lo que se conoce como etapa de progresión, mostrándose bastante indiferenciadas con respecto a las de sus alrededores; en etapas posteriores pueden migrar a otros sitios y producir nuevos focos de proliferación, a este proceso se le llama metástasis (Devoret, 1979).

## SISTEMAS DE REPARACION.

Debido a que existen en la naturaleza numerosos agentes que provocan cambios en el DNA, los sistemas vivos han desarrollado mecanismos correctores que reparan las alteraciones sufridas en su DNA y garantizan la estabilidad de sus moléculas hereditarias. Los principales mecanismos de reparación de daños al DNA que se han descrito son los siguientes:

### FOTORREACTIVACION ENZIMATICA:

Este mecanismo de reparación fué el que se observó inicialmente en *E. coli*, encontrándose que solo se efectúa en presencia de luz blanca. Este funciona eliminando los dímeros de timina originados por la luz UV, por medio de una enzima fotoreactivante que interacciona con los dímeros de timina (T-T), la unión específica de esta enzima con los dímeros de pirimidina se realiza en la obscuridad, pero la enzima precisa la absorción de un fotón de luz visible como fuente de energía para el proceso de separación. Este mecanismo se ha detectado tanto en eucariontes como en procariontes (Sánchez y Jouve 1982).

### REPARACION POR ESCISION:

Es posiblemente el mecanismo de reparación mejor estudiado, tanto en células procariontes como en eucariontes, describiéndose deficiencias de este sistema en células de pacientes con Xeroderma pigmentoso (Saragenttin y Smith, 1985). Este sistema opera de la siguiente manera: en primer lugar elimina los dímeros de pirimidina y restaura otras lesiones del ADN, en un proceso de "corte y rompimiento"; en este proceso intervienen tres enzimas

especiales, determinadas por los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, junto con la polimerasa I del ADN y la ligasa del ADN. Primero las proteínas *uvrA* y *uvrB* se unen al sitio dañado, siendo la proteína *uvrB* la implicada en el reconocimiento del daño en el DNA y la proteína *uvrA* la que realiza el corte endonucleolítico; a continuación, en presencia de la proteína *uvrC*, se realiza una incisión en el extremo 5' de la región dañada, en presencia de la proteína *uvrC*; la polimerasa del ADN se coloca en el lugar de la incisión y añade nucleótidos al extremo 3'. La polimerasa realiza una segunda incisión en la cadena para eliminar la región dañada, la polimerasa continúa digiriendo nucleótidos y reemplazándolos al mismo tiempo por otros nuevos; finalmente la ligasa del ADN termina la reparación, uniendo la cadena en el lugar de la incisión. (Kushner, 1988).

## SISTEMA "SOS"

Cuando las células no han sufrido daño alguno, los genes estructurales del regulón "SOS" se encuentran reprimidos por la proteína LexA, encontrándose niveles basales de los productos de los genes *uvrABC*, para que la célula pueda llevar a cabo esporádicas reparaciones por escisión. Si el ADN sufre daños severos, inducidos tanto por compuestos químicos como por radiaciones, que no puedan ser reparados y originan huecos postreplicativos, se estimula la inducción del regulón SOS. Así, los niveles basales de la proteína RecA presentes en la célula se unen al ADN unicatenario que queda frente a los huecos, estimulándose la actividad proteasa de RecA y destruyendo al represor LexA, eliminando la represión del gen *recA* y de los genes estructurales, que se encuentran bajo el control de *lexA* y *recA* como son; *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *mucC*, *mucD*, los genes *din* (inducibles por daño), así como los genes de inducción de fago lambda. (Neidhart, 1987; Walker, 1987). La proteína LexA es degradada por la proteasa RecA en cuanto se sintetiza, mientras que los genes

estructurales regulados por LexA permanecen activados mientras haya ADN dañado para estimular la actividad proteasa. Cuando la proteína LexA no se destruye y puede cumplir su función represora entonces la célula vuelve a su estado no inducido. La respuesta "SOS" estimula la reparación eficaz del ADN pues aumenta la disponibilidad de enzimas para la reparación por escisión y abre la vía de la reparación post-replicativa. No obstante, dentro de este sistema "SOS" la polimerasa introduce bases en forma errónea, eliminando las lesiones de tipo letal, pero se introducen mutaciones, que cambian la estructura original (Howard, 1982; Kushner, 1988).



## SISTEMAS DE PRUEBAS PARA DETECTAR DIFERENTES TIPOS DE MUTACION.

Los cambios estructurales o numéricos del material genético que se transfieren de una generación a otra, se denominan mutaciones. Estas se deben a modificaciones en la secuencia de las bases nitrogenadas que forman el material genético DNA, las cuales pueden manifestarse como una o varias alteraciones en la secuencia de los aminoácidos que forman las proteínas, modificándose de esta forma su función. Las modificaciones ocurren a través de diversos mecanismos celulares que pueden ser inducidos por agentes ambientales, tanto físicos y químicos como biológicos (radiaciones, algunos productos químicos y virus). Las mutaciones se clasifican en mutaciones génicas, puntuales, alteraciones estructurales y numéricas de los cromosomas. (Dubinin, 1981; Gardner, 1980). Mutación puntual que puede ser por sustitución o corrimiento; mutación génica, cuando el cambio consiste en un daño severo al DNA, como la formación de brechas; y alteración cromosómica, cuando los cromosomas pueden ser afectados tanto en estructura como en número, involucrando a los cromosomas sexuales como a los autosomas.

Los cambios estructurales se derivan de rupturas y rearrreglos cromosómicos que dan lugar a inversiones, duplicaciones, eliminaciones o transferencias de un cromosoma a otro. Las alteraciones en el número de cromosomas se producen durante la mitosis o la meiosis, debido a anomalías en la segregación cromosómica, conocida como el fenómeno de la no disyunción. A través de este fenómeno se adquieren o pierden cromosomas enteros que dan lugar a aberraciones numéricas. (Cortinas de Nava et al., 1980).

Para poder detectar los diversos tipos de mutación, existen pruebas biológicas que consisten en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, como son: Sistemas bacterianos que permiten detectar

mutaciones puntuales, Insectos en que se detectan mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas, Cultivos de células de mamíferos que detectan daños genéticos, Intercambio de cromátides hermanas que permiten detectar alteraciones en la integridad del cromosoma como inducción en el rearreglo del DNA (Cortinas de Nava, 1980).

Entre las pruebas de corta duración, los sistemas microbianos y los celulares son los más usados, ya que tienen la ventaja no sólo de reducir costos, sino por la rapidez con que se obtienen resultados permiten reducir el tiempo de tamizado de compuestos mutagénicos y carcinogénicos y además con este tipo de prueba se puede tener un conocimiento más predictivo del tipo de daño genético que están produciendo los compuestos (Arriaga Alba 1988; Cortinas de Nava 1980; y Brusik, 1988).

#### SISTEMA DE *Salmonella typhimurium* DE AMES.

La prueba de Ames cuenta con diferentes cepas bacterianas construidas a partir de la cepa silvestre LT-2 que pueden ser revertidas a su fenotipo original por la acción de un gran número de compuestos mutagénicos y carcinogénicos que actúan por diferentes mecanismos (Ames et al. 1973) Como son las cepas TA1537 (*hisC3076 uvrB*) y la cepa TA1538 (*hisD3052, rfa, uvrB*), 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 *hisG46* tienen un triplete GGG que codifica para la leucina en lugar del CCC que codifica para prolina en la cepa original, éstas 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 (MacCann et al., 1975 )

Este sistema ha sido mejorado mediante modificadores 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 (*hisD3052*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) con mayor capacidad para detectar mutágenos que actúan por corrimiento de formato que su cepa homóloga TA1538. De igual forma la cepa TA100 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *pkm101*) fué obtenida al introducir el plásmido *pkm101* en la cepa TA1535. Todas estas cepas poseen una deleción en el gen *rfa* que las hace más sensibles al paso de los compuestos por carecer de una lipoproteína de la pared celular. Posteriormente se ha recomendado adicionar a la batería de cepas usadas las cepas TA102 que contiene una mutación en el sitio de pares de bases AT en el gen *hisG48* en contraste con las cepas de *Salmonella hisG46* que detecta mutágenos que actúan en el par de bases GC. Esta cepa detecta una gran variedad de mutágenos oxidativos, incluyendo rayos X, bleomicina, peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos, una variedad de aldehídos incluyendo formaldehídos, glyoxal, ketoxal, glutaldehídos y malondialdehído, un número de psoralenos (en la presencia de luz ultravioleta), mitomicina C y luz UV y la TA97 (*pkm101*) que detecta mutaciones por corrimiento de formato y tiene una mutación en el gen *hisD6610*. (Levin et al., 1982)

Por otro lado las cepas convencionales del sistema de Ames, por poseer una deleción 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 et al. 1989). Así, éstas cepas sólo permiten detectar el efecto de compuestos que producen en el ADN lesiones que no sean correctamente reparadas. Entre las

principales cepas de *Salmonella typhimurium* Uvr+, están la TA1975 que es la homóloga de la cepa TA 1535. La cepa UTH8414 que posee la misma mutación por substitución de bases y el plásmido pkm101 de 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 deleción 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 deleción del gen *uvrB*. Así el empleo del sistema de *Salmonella typhimurium* Uvr-/Uvr+ permite detectar mutaciones que no son debidamente reparadas, además de ser útil para detectar mutaciones letales, cuya falta de reparación induce a la muerte celular, siempre y cuando se realicen en paralelo pruebas de sobrevida (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 DNA 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; Dayank, 1980; Matsumoto y Yoshida 1977; Takie et al. 1975; Preussman R. y Stuart B., 1984).

Por otra parte la ventaja 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 reproductibilidad 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., 1981; MacPhee, 1984; Poll, 1980; Rinkus y Legator, 1979). La sensibilidad y especificidad de la prueba de Ames varía sin embargo, entre los diferentes grupos de compuestos químicos estudiados (McCann y Ames 1976).

#### SISTEMA DE *Escherichia coli*. PolA-/PolA+.

Debido a que con las cepas de *Salmonella* sólo se detectan compuestos electrofílicos, se han incluido otros ensayos a la batería de pruebas, recomendados en conjunción con la prueba de *Salmonella*, como es el caso de la prueba de PolA+/PolA- (Rosenkranz y Poirier, 1979).

Las cepas *E. coli* PolA+ p3478 y PolA- W3110 son capaces de detectar daño genoletal y se ha visto que tienen una alta sensibilidad para detectar como negativos compuestos que no son carcinógenos (D'Alisa et al., 1971; Rosenkranz y Leifer, 1980). Estas cepas son auxótrofas por lo que se requiere de un medio enriquecido con tiamina, timina y caseína hidrolizada. Esta prueba debe realizarse trabajando las dos cepas PolA+ y PolA- en paralelo. La cepa *E. coli* Pol A- es deficiente en DNA-polimerasa I, por lo que al igual que todas las células con deficiencias en mecanismos enzimáticos que intervienen en los sistemas de reparación de daños al DNA, son más sensitivas que su contraparte normal al efecto de los mutágenos químicos, que puedan modificar el DNA. Así, la DNA polimerasa I juega distintos papeles en la vía de reparación y síntesis del DNA, por lo que se ha determinado que este sistema puede ser sensible a la detección de compuestos genoletales.

El ensayo de *E. coli* PolA<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup> fué descrito inicialmente en pruebas de difusión en disco y depende del radio de inhibición de crecimiento en ambas cepas. Sin embargo hay sustancias que por su tamaño o por sus propiedades de solubilidad no se difunden adecuadamente a través del agar y no pueden ser reconocidas por este ensayo, aún cuando posean actividad para modificar el DNA (Rosenkranz y Leifer, 1980). Por otro lado, se ha reportado que la adaptación del homogenado de hígado de rata empleado, en la prueba de *Salmonella typhimurium* de Ames, a la prueba de *E. coli* PolA<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup> no siempre se logra con muy buenos resultados (Espinosa Aguirre et al., 1989).

Por las razones expuestas anteriormente se ha recomendado que el ensayo de genotoxicidad con cepas de *E. coli* polA<sup>+</sup>/polA<sup>-</sup> puede realizarse mediante un método de preincubación en medio líquido, determinándose un rango de índice de sobrevida entre ambas cepas, expuestas a las mismas concentraciones del compuesto, o mediante la determinación de una cinética de crecimiento de las dos cepas en presencia del mutágeno, interpretándose como un resultado positivo la inhibición preferente de la cepa polA<sup>-</sup> sobre la polA<sup>+</sup>. (Rosenkranz y Leifer, 1980; Rosenkranz y Poirier, 1979; Rosenkranz y Rose, 1965).

#### **INDUCCION DEL FAGO LAMBDA y COLICINOGENIA.**

Anteriormente se había encontrado alguna similitud entre la inducción del fago  $\lambda$  y colicinogenia, ya que ambos fenómenos pueden ser inducidos por compuestos químicos como la mitomicina C o agentes físicos que dañan el ADN (Hardy, 1975). En la actualidad se han probado diferentes compuestos que tienen la capacidad de inducir la formación de DNA unicatenario que puede ser la señal que activa la proteína RecA e iniciar así la respuesta SOS (Battista et al., 1990). Especialmente se ha encontrado que los compuestos que inhiben la función de ligación de la subunidad A de las topoisomerasas, la cual también tiene una actividad de corte en el DNA, son inductores de DNA de cadena sencilla.

Para detectar la inducción del Sistema SOS, se ha introducido la prueba de inducción del profago  $\lambda$  en la cepa de *E. coli* WP2s ( $\lambda$ ) (Rossman et al. 1984) Posteriormente Rossman et al., 1984 desarrollaron una prueba para medir daños génicos por mutágenos químicos, mediante la inducción del profago lambda en *E. coli*, con la cual se han probado una serie de compuestos que producen diferentes daños al DNA, tales como metales, nucleotidos oxidados (Shirname-More et al., 1987), partículas de materia llevadas por el aire (Rossman et al., 1985; Boone et al., 1989; Miguel et al., 1990), pesticidas clorinados (Houk y De Marini 1987), pentaclorofenol, el cual produce radicales libres que inducen la apertura de brechas en el DNA (DeMarini et al., 1990) y compuestos clorinados (Demarini et al., 1992).

El fenómeno de colicinogenia solo se ha empleado en estudios epidemiológicos (Arriaga Alba et al., 1994), pero debido a que la inducción del gen de colicina, como es el caso de la colicina E1, está también regulado por el sistema SOS, (Waleh y Johnson, 1985), la inducción de colicinas en cepas eficientes en su sistema de reparación, puede ser una herramienta útil en la valoración de compuestos genotóxicos.

#### CITRATO DE CLOMIFENO

El citrato de clomifeno es usado en medicina humana para inducir ovulación en mujeres anovulatorias y oligovulatorias; y en hombres con oligospermia; sin embargo, se ha observado que en los varones no resulta ser muy confiable ya que aumenta el número de espermatozoides pero no se elevan los niveles séricos de la hormona luteinizante (LH) ni de la foliculo estimulante (FSH), además de no haber un incremento en la calidad del semen (Chiorboli et. al. 1982; Gómez Alzugaray, 1985).

Se ha demostrado que una sola inyección de 10 a 500 mg/Kg de citrato de clomifeno en ratas hembras el primer día de nacidas (Sprague- Dawley) resulta en múltiples anomalías del tracto reproductivo incluyendo ovario cístico, hipoplasia ovárica, hiperplasia oviductual, metaplasia epitelial y tumores uterinos. Con dosis de 500 mg produce estas anomalías en un 80% a 100% y a dosis mas bajas en un 10% a 50% (Clark, 1977).

En algunos bioensayos en roedores se ha reportado que la administración del citrato de clomifeno, en etapas tempranas de la gestación, puede producir trastornos en la implantación, muerte fetal y diversas malformaciones congénitas (Suzuki, 1970). Por otro lado, también se ha reportado que la administración de este medicamento aumenta la osificación en ratones. En ratas adultas puede causar efectos tóxicos que comprometen a casi todos los órganos, como son hígado, bazo, corazón, riñón, útero y ovarios (Hart, 1990).

En estudios epidemiológicos realizados entre grupos de pacientes a quienes se les ha inducido el embarazo con la ayuda de éste medicamento (250 mg/día/ciclo), reportan que la frecuencia de abortos durante el primer trimestre del embarazo fué del 23.9%, en 93 embarazos, en comparación con un grupo control a quienes se les indujo ovulación con gonadotropinas, solo se encontró el 8.9% de abortos entre 270 embarazos (Toshinobu et al., 1979). También ha sido reportado que el tratamiento con (gonadotropina) HMG y citrato de clomifeno 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 el citrato de clomifeno para la inducción de ovocitos provoca aneuploidias *in vitro*.

En un estudio realizado para evaluar el riesgo del uso del citrato de clomifeno, se encontró que en *Salmonella typhimurium* (Ames) puede reaccionar con el DNA, induciendo una mutagénesis química. Empleando cepas con diferente capacidad de reparación



del DNA, se determinó que el citrato de clomifeno activado induce mutaciones por corrimiento del marco de lectura en *S. typhimurium* TA98; estas mutaciones fueron corregidas en cepas de *S. typhimurium* UHT8413 (uvrB+). Sin embargo en *S. typhimurium* TA100, que es capaz de detectar mutaciones por sustitución de bases, no se indujeron mutaciones. El citrato de clomifeno es tóxico en las tres cepas usadas a pesar de que el sistema de reparación "SOS" del plásmido pk101 esta presente en todas las cepas probadas. Los productos metabólicos transformados son menos tóxicos, especialmente en las cepas eficientes en reparación por escisión. Estos resultados muestran que el citrato de clomifeno o sus metabolitos pueden reaccionar con el ADN produciendo un daño genotóxico. (Arriaga Alba, et al. 1992; Diaz Hernandez, 1993).

## MATERIAL Y METODOS.

### CEPAS BACTERIANAS.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla No. 1.

### REACTIVOS.

El citrato de clomifeno CC (Figura 1), fué donado por los Laboratorios *le petite* de México; el 2-amino antraceno (2AA), Etil-N-Nitro-N'-nitrosoguanidina (ENNG), Acido picrolónico, (AP), fueron adquiridos de Sigma Chemical Company; el Cloranfenicol fué adquirido del sector salud.

### MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo de Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), Caldo de soya y tripticasa con extracto de levadura al 0.1% (TSYE), fueron adquiridos de Bioxon, y preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El Agar suave con NaCl al 0.5%, agar al 0.6%; Medio mínimo de Vogel Boner según se describe por Maron y Ames (1983), (Ver anexo). El medio mínimo de HAT, fué preparado según se describe en Rossenkranz, 1980.

TABLA 1.

| CEPA                           | GENOTIPO  | ORIGEN                              | REFERENCIA                              |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| <i>Salmonella typhimurium.</i> |   |                                     |   |
| TA1538                         | <i>hisD3052 rfa uvrB</i>                              | Dr. Ames                            | Maron y<br>Ames, 1983.                  |
| TA98                           | <i>hisD3052 rfa uvrB</i><br><i>pkM101</i>             | Universidad<br>de Berkeley          |   |
| TA97                           | <i>hisD6610 hisD3052</i><br><i>rfa uvrB pkM101</i>    |                                     |   |
| TA102                          | <i>hisG48 rfa uvrB pkM101</i><br>Pq1.                 |                                     |   |
| <i>Escherichia coli.</i>       |   |                                     |   |
| <i>E. coli</i> W3110           | <i>thi<sup>-</sup>thy<sup>-</sup>PolA<sup>+</sup></i> | Dr. Espinosa-<br>Aguirre.           | Espinosa<br>Aguirre<br>et al.,<br>1987. |
| <i>E. coli</i> p3478           | <i>thi<sup>-</sup>thy<sup>-</sup>PolA<sup>-</sup></i> | U. N. A. M.                         |   |
| <i>E. coli</i> V145            | <i>col V<sup>+</sup></i>                              | Dr. Lavoie<br>Universidad<br>Laval. | Trudel et al.<br>1984.                  |
| <i>E. coli</i>                 | <i>hfr180</i>   |                                     |   |
| <i>E. coli</i> WP2(λ)          | <i>Loni Sula, trpE</i><br><i>wra LambB</i>            | Dr. DeMarini<br>Universidad         | DeMarini<br>et al.,<br>1988.            |
| <i>E. coli</i> TH008           | <i>StrR, trp<sup>-</sup></i>                          | de New-York.                        |   |

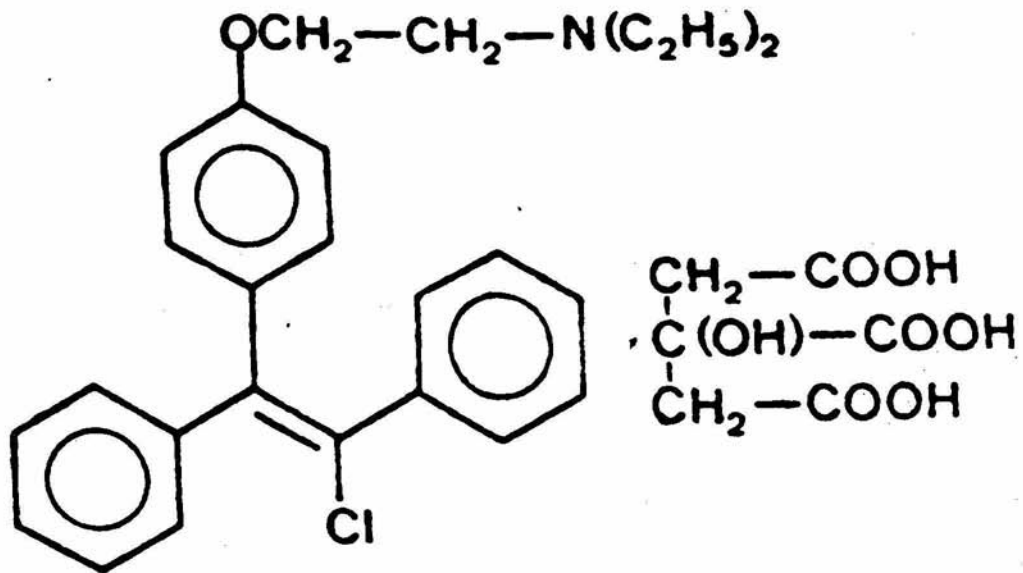


FIGURA 1. CITRATO DE CLOMIFENO

## METODOLOGIA.

### ENSAYO DE MUTAGENESIS EN *Escherichia coli* POL A<sup>-</sup>/POL A<sup>+</sup>

#### METODO DE DIFUSION EN DISCO CON Y SIN S9.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Espinoza-Aguirre et al., (1987):

-Cultivo de 18 horas en medio HA+T, se hace una dilución de 1:1000.

-A 0.1 ml de suspensión bacteriana se le agregan 2 ml de medio HA+T.

-Se distribuye en cajas petri que contengan medio HA+T sólido.

-Se coloca un disco de papel filtro (de 6mm de diámetro) impregnado con 20 µl del compuesto a probar, en el centro del agar.

-Se incuba por 16-24 hrs. a 37 °C, se mide el diametro de inhibición de crecimiento.

-Se considera positivo cuando la inhibición de crecimiento es mayor en la cepa Pol A<sup>-</sup>, con respecto a la cepa Pol A<sup>+</sup>, y negativo cuando la inhibición es igual para ambas cepas.

-Para el ensayo de mutagénesis con fracción S9 es la misma secuencia, solo que se agrega el S9 a la suspensión bacteriana junto con los 2ml de HA+T, antes de distribuir en la caja petri.

-ENSAYO DE SUSPENSION CON S9 Y SIN S9.

Se realizó de acuerdo al método descrito por Espinoza-Aguirre et al., (1987):

-Cultivo de 18 horas en medio HA+T.

-Se hace una dilución con una concentración final de 2000-3000 u.f.c./ml de medio HA+T.

-Se toma 0.1 ml de suspensión de cepa, ( Pol A+ o Pol A-) y 20µl del compuesto a probar y se colocan en tubos estériles, incubándolos durante 2 horas a 37 °C.

-Posteriormente se agregan 2ml de Agar HA+T semisólido a los tubos y se distribuye en cajas petri con medio sólido HA+T.

-Las cajas se incuban a 37 °C por 24-36 hrs. y se cuenta el número de colonias de cada caja.

-Se determina el Índice de Sobrevida (I.S.). Considerando Negativo si el I.S. = 0.96 y Positivo si I.S. < 0.85, el valor entre 0.85-0.96 es dudoso.

Para el ensayo con fracción S9, (a una concentración de 2mg/ml), titulada con el método de Biuret, (Ver anexo). se procede de la misma forma solo que se agrega el S9 a los tubos que contengan los 20 µl del compuesto a probar y la cepa, antes de incubarlos durante 2 hrs.

## ENSAYO DE MUTAGENESIS CON EL METODO DE AMES.

### METODO DE PREINCUBACION.

Los ensayos de mutagénesis con el método de Ames, se realizaron según lo recomendado por Maron y Ames, 1983.

-Se añade 0.1 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa TA1538 a tubos de ensaye con tapon de rosca; se agregan 20 $\mu$ l del compuesto a probar y se mantienen a 4 °C hasta la adición del S9, preparado como se describe en el anexo.

-Se agregan 0.5ml de S9 a cada uno de los tubos; posteriormente se incuban en baño maría con agitación a 90 rpm, durante 60 minutos a 37 °C.

-Se procede a plaqurear en cajas petri que contengan agar mínimo de Vogel-Boner, por triplicado, y se incuban a 37 °C por 48 hrs.

-Se cuenta el número de revertantes con ayuda de un contador de colonias.

### MARCADORES GENETICOS.

a) Requirimiento 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, (Anexo 1). Sólomente 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 determina la

sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Se inocula 0.1ml del cultivo en cajas de Petri con agar (BHI), dejar secar. Colocar un disco de papel filtro estéril en el centro de la caja, agregar 10  $\mu$ l de solución cristal violeta (1 mg/ml). Incubar 24 hrs. a 37 C. Una zona clara de inhibición alrededor del disco indica la presencia de la mutación.

c) Presencia del plasmido. Se verifica comprobando la resistencia de la cepa a la ampicilina y se sigue el mismo procedimiento que para el marcador *rfa*.

d) Sensibilidad a la luz ultravioleta. Colocar en una caja de Petri con agar BHI, el cultivo que se va a probar, por estrias. Se tapa la mitad de la caja con papel aluminio, se irradia con una lámpara germicida de luz U.V. de 15W a una distancia de 33 a 35 cm por 6 seg. La cepa que contenga el marcador *uvrB* no crecera en las zonas radiadas.

e) Frecuencia de reversion espontanea. Colocar 0.1ml del cultivo en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contenga 2ml de agar suave (agar de superficie) complementado con solución de requerimientos mínimos de histidina biotina (Ver Anexo), mezclar el contenido y distribuirlo perfectamente sobre medio mínimo de Vogel-Boner. Dejar solidificar e incubar las cajas a 37 °C por 48h. Se cuentan las revertantes espontáneas.

#### REACCION DE BIURET

La reacción de Biuret se utiliza para la cuantificación de proteínas y se basa en el uso de un reactivo denominado Biuret el cual se prepara de la siguiente manera:

En 4 ml de este reactivo se disuelve 1 ml de la solución problema y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos.



posteriormente se lee la absorbancia a 540 nm. Y se calcula la concentración a partir de una curva de calibración obtenida con el uso de una proteína testigo (albúmina o caseína).

## **PRODUCCION DE COLICINAS EN MEDIO LIQUIDO CON INDUCCION QUIMICA.**

La inducción de colicinas se realizó empleando el método utilizado por Lavoie y Mathieu, 1975.

-Se prepara un cultivo de 18 horas de la cepa productora de colicina V.

-Se toman 5.0ml y se inoculan en 100ml de caldo de soya y tripticasa con Extracto de Levadura al 0.1% (TSBYE).

-Se incuba a 37°C con agitación suave en un baño María.

-Después de 18 horas de incubación se le adicionan 2µg/ml de mitomicina-c y/o de concentraciones de citrato clomifeno entre 200 a 1000µg/ml.

-Se incuba durante 16 horas a 37 °C, con agitación suave.

-Posteriormente el cultivo se centrifuga a 8700 rpm durante 30 minutos a 4°C. se decanta el sobrenadante.

-Se trata con cloroformo al 2% y se vuelve a centrifugar.

-Conservar el sobrenadante congelado a -70 °C para su titulación y estudios posteriores.

-Se prepara en paralelo un cultivo control el cuál no ha sido inducido con ningun mutagéno químico.

**-TITULACION DE LA COLICINA.**

-Inocular 100 $\mu$ l de la cepa sensible en un tubo de agar nutritivo suave y vertirlos en una caja con medio TSYE agar.

-Realizar perforaciones circulares de 2mm de profundidad.

-Inocular en cada pozo 20 $\mu$ l de cada tubo de diluciones 1:2 de la colicina obtenida con los diferentes métodos de Inducción.

-Incubar 24 horas a 37<sup>o</sup>C, y determinar la máxima dilución que presenta halo de inhibición.

## INDUCCION DEL FAGO LAMBDA

El método de inducción del fago lambda se realizó mediante una modificación de la técnica reportada por el Dr. De-Marini, 1990.

- Incubar la cepa WP2( $\lambda$ ) a 37°C durante toda la noche.
- Dejar crecer la cepa a un D.O. de 0.3 a 460nm y diluir 1:10.
- En un tubo eppendorf esteril adicionar 250 $\mu$ l de medio minimo de Vogel Boner, complementado con 20 $\mu$ /ml de triptofano; agregar 50 $\mu$ l del mutágeno estudiado.
- Realizar una serie de diluciones 1:2 de los mutágenos estudiados.
- Inocular cada tubo con 75 $\mu$ l de la dilución 1:10 de la cepa lisogénica y 25 $\mu$ l de mezcla S9 2X.
- Incubar los tubos cubiertos en bolsa de plastico.
- Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa TH008.
- Dejar crecer la cepa a un D.O. de 0.2 en medio minimo de Vogel Boner.
- En un tubo con 5.0ml de medio minimo de Vogel Boner, con triptofano, añadir 50 $\mu$ l de todos los tubos en los que se ha inducido el fago lambda.
- En tubos con 2.5 ml de agar suave MgSO<sub>4</sub> 0.2mM inocular 200 $\mu$ l de la cepa TH008 resistente a estreptomycinina y 100 $\mu$ l de la dilución 10<sup>-2</sup> de fagos  $\lambda$ .
- Vertir el contenido en cajas de Agar nutritivo con 100 $\mu$ g/ml de estreptomycinina.

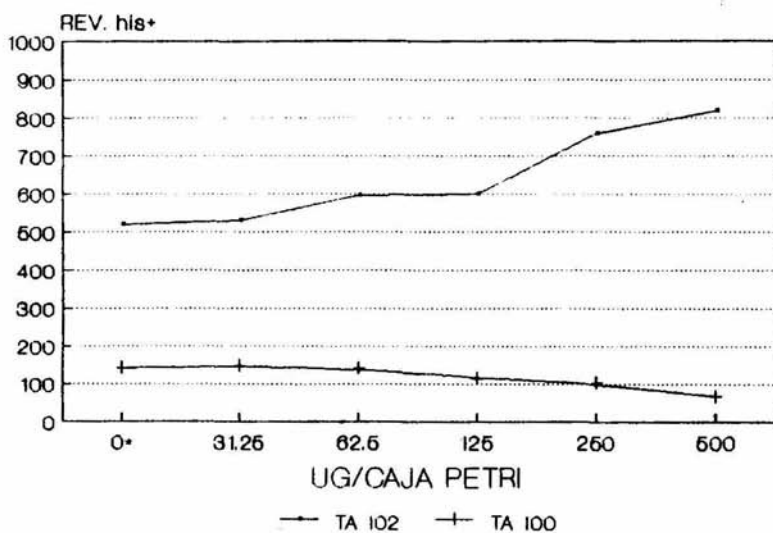
## RESULTADOS

### INDUCCION DE MUTACIONES PUNTUALES EN *S. typhimurium*.

El Citrato de clomifeno no fué capaz de inducir mutaciones por substitución de bases ni en el par AT, empleando la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102, como puede observarse en la figura No. 2; donde se compara con la cepa TA100 que detecta mutaciones en el par GC que fue tomada de Día Hernández,1993.

El Citrato de clomifeno indujo mutaciones por corrimiento de formato en cepas de *Salmonella typhimurium* independientemente de la presencia del plásmido pKm101, observándose que el compuesto fué más tóxico cuando el plásmido no se encuentra presente en las células, como se muestra en la figura No. 3. La inducción de mutaciones por corrimiento de formato, puede observarse en forma más evidente cuando la cepa de *Salmonella typhimurium*, presenta tanto el plásmido pKm101 así como dos puntos sensibles a éste tipo de mutaciones puntuales, como se observa en la figura No. 4.

## MUTAGENESIS DE CITRATO DE CLOMIFENO S. TYPHIMURIUM 102 Y TA100



**Figura No. 2**

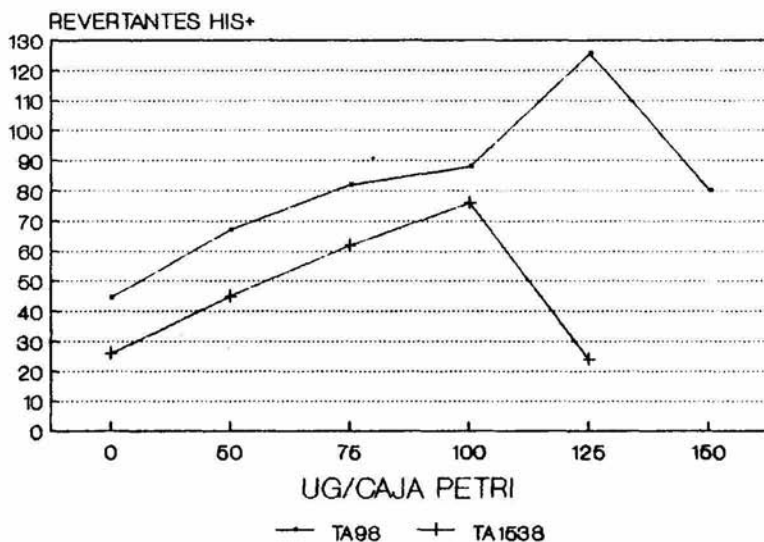
\*  
Efecto del CC en *Salmonella typhimurium* TA100 y TA102  
con el método de preincubación.

Reversión espontánea de TA 100 (120)

Reversión espontánea de TA 102 (523)

\* Tomada de Diaz-Hernández, 1993.

**MUTAGENESIS DE CITRATO DE CLOMIFENO  
EN *S. typhimurium* TA1538 y TA98**



**FIGURA 3**

Efecto mutagénico del CC en cepas de *S. typhimurium* TA1538 y TA98, empleando el método de preincubación en ambos casos.

(R.E.) Reversión espontánea de TA1538 (15.0)

(R.E.) Reversión espontánea de TA98 (49.3)

## MUTAGENESIS DE CITRATO DE CLOMIFENO EN *S. typhimurium* TA97

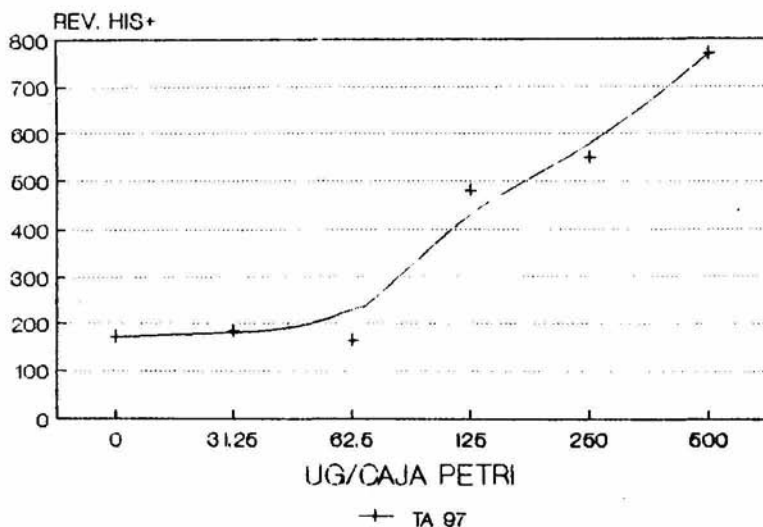


Figura No. 4

Respuesta de la cepa de *Salmonella typhimurium* TA97 a citrato de clomifeno, empleando la técnica de incorporación en tubo.

Reversión espontánea de TA97 (173).

EFFECTO GENOTOXICO DEL CITRATO DE CLOMIFENO EN CEPAS DE  
*Escherichia coli*  $polA^-/polA^+$

En la tabla número 2 se muestran los resultados de la prueba de difusión en disco con y sin S9, utilizando diferentes concentraciones de citrato de clomifeno y otros compuestos. Observándose resultados positivos en todas las dosis estudiadas, cuando no se adicionó la mezcla S9. Cuando ésta fué adicionada no pudo lograrse una prueba positiva.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de Preincubación donde puede observarse que con las dosis de 32, 62 y 125  $\mu g/$ caja, sin S9, da un resultado positivo. Las dosis de 125 y 250, con fracción S9, dan positivos. A dosis mayores de 250 $\mu g/$ caja, en ambos ensayos con S9 y sin S9 no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las dos cepas estudiadas.

Al no encontrarse sobrevida en ninguna de las dos cepas a dosis altas del Citrato de clomifeno, se procedio a realizar una cinetica de crecimiento de ambas cepas en presencia del compuesto. En la figura 6 se presentan los resultados de sobrevida de las cepas  $polA^-/polA^+$  a 100 y 1000 $\mu g/ml$ , observándose que existe una inhibición preferente de la cepa deficiente en polimerasa en forma dependiente de la dosis.



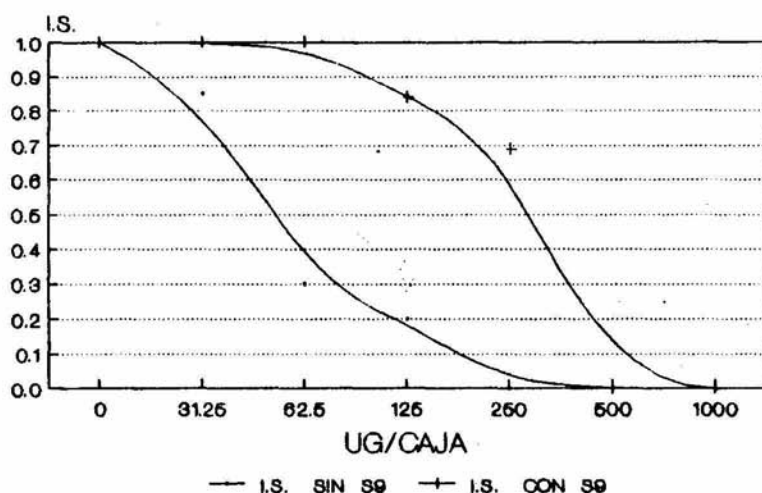
TABLA 2

GENOTOXICIDAD DE CITRATO DE  
CLOMIFENO EN *E. COLI* POLA+/POLA-  
DIFUSION EN DISCO

| COMPUESTO<br>μg/caja | SIN S9         |        | RESULTADO | CON S9         |        | RESULTADO |
|----------------------|----------------|--------|-----------|----------------|--------|-----------|
|                      | Diámetro en mm |        |           | Diámetro en mm |        |           |
|                      | POL A+         | POL A- |           | POL A+         | POL A- |           |
| ENNG                 |                |        |           |                |        |           |
| 20μg                 | 38.0           | 40.0   | P         | 29.5           | 34.5   | P         |
| 2AA                  |                |        |           |                |        |           |
| 100μg                | -              | -      | -         | 0              | 0      | N         |
| Cln                  |                |        |           |                |        |           |
| 100μg                | 27.0           | 27.0   | N         | 13.0           | 13.0   | N         |
| CC                   |                |        |           |                |        |           |
| 31.2                 | 29.5           | 33.0   | P         | -              | -      | -         |
| 62.5                 | 31.0           | 32.0   | P         | -              | -      | -         |
| 125.0                | 25.0           | 31.5   | P         | 0              | 0      | N         |
| 250.0                | 29.5           | 35.0   | P         | 0              | 0      | N         |
| 500.0                | 28.5           | 34.5   | P         | 0              | 0      | N         |
| 1000.0               | 30.0           | 37.0   | P         | 0              | 0      | N         |

P=POSITIVO. N=NEGATIVO. -; No se probó, ENNG Etil-N-Nitro-N-nitrosoguanidina; 2AA 2 Amino antraceno; Cln Cloranfenicol levógiro; CC Citrato de clomifeno.

**GENOTOXICIDAD DE CITRATO DE CLOMIFENO EN  
*E. coli* POL A+/POLA-**



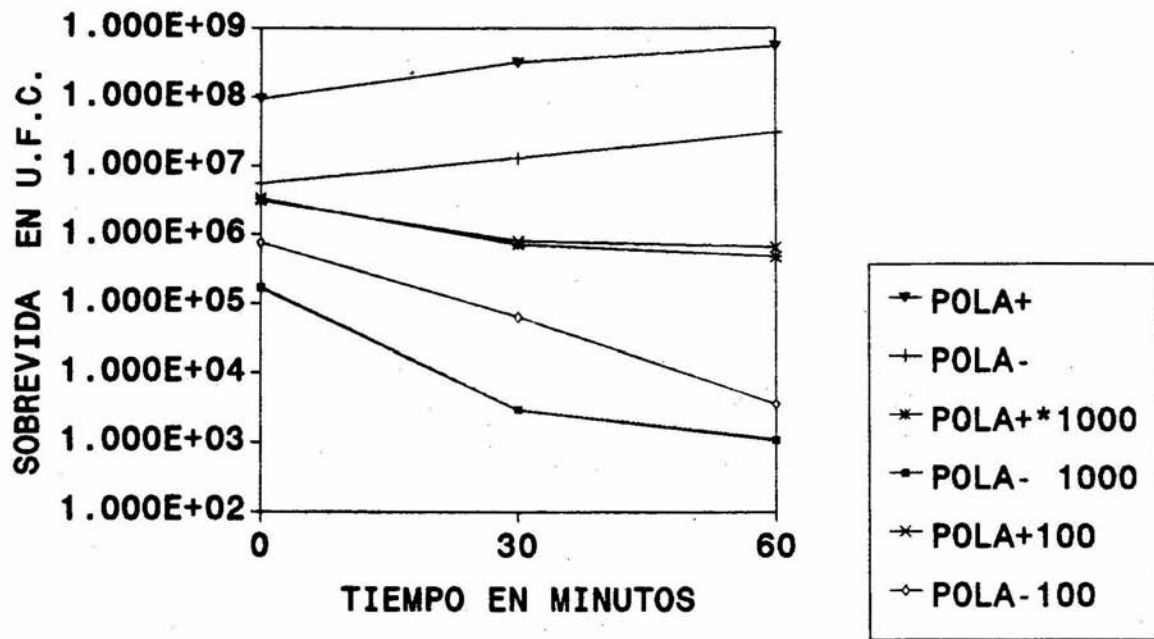
I.S. % S.V. POLA+/POLA-  
cln. (100ug/caja) i.s. 1.39  
ENNG. (20ug/caja) I.S. 0.88

**IS > 0.96 NEGATIVO, < 0.85 POSITIVO**

**Figura No. 5**

Comportamiento de *E. coli* en ensayo de preincubación en medio HAT líquido con y sin activación metabólica.

# SOBREVIDA DE E. coli POLA+/POLA- A CITRATO DE CLOMIFENO



**FIGURA 6**

**\*UG/ML CON S9**

## INDUCCION DEL SISTEMA SOS.

En la Tabla # 3 se presentan los datos que muestran, que el CC o sus metabolitos, inducidos *in vitro* con la mezcla S9, pueden producir inducción del fago lambda, dando como resultado que a dosis menores de 62.5µg de Citrato de Clomifeno, hay inducción del fago para ambos experimentos (con y sin S9).

En la figuras 7a se observa que los metabolitos de CC, inducidos *in vitro* con la fracción S9, sugerida por Maron y Ames (1983), pueden inducir la expresión de colicinogenia. Mientras que en la figura 7b se observa que el compuesto solo, reprimio la expresión del gen de colicina E1.

TABLA 3

INDUCCION DEL FAGO LAMBDA POR MUTAGENOS QUIMICOS EN E. COLI WP2(λ)

| COMPUESTO<br>μg/CAJA | SIN S9 |           | CON S9 |           |
|----------------------|--------|-----------|--------|-----------|
|                      | P. I.  | RESULTADO | P. I.  | RESULTADO |
| NINGUNO              | 0      | N         | 0      | N         |
| DMSO                 |        |           |        |           |
| 10 μl                | 0      | N         | 0      | N         |
| ENNG                 |        |           |        |           |
| 12.5                 | 23.3   | P         | 4.6    | P         |
| 2AA                  |        |           |        |           |
| 50                   | 8.3    | P         | 40.0   | P         |
| CC                   |        |           |        |           |
| 7.8                  | 4.0    | P         | 35.6   | P         |
| 15.6                 | 8.0    | P         | 32.6   | P         |
| 31.25                | 48.3   | P         | 14.6   | P         |
| 62.5                 | 0      | T         | 0      | T         |
| 125                  | 0      | T         | 0      | T         |
| 250                  | 0      | T         | 0      | T         |
| 500                  | 0      | T         | 0      | T         |

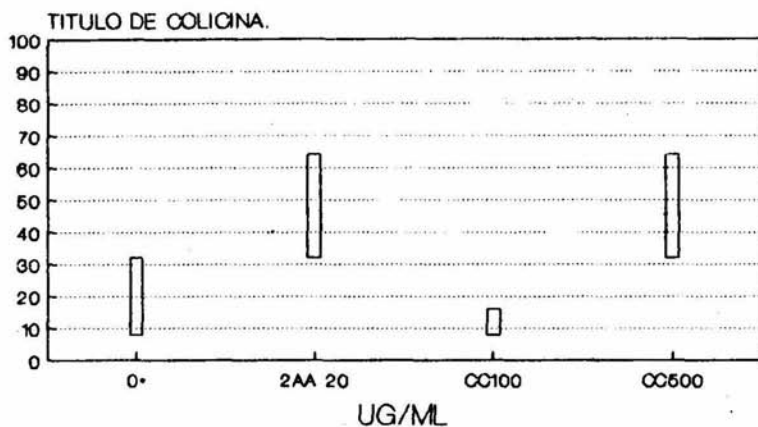
ENNG-Etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, DMSO-Dimetil Sulfóxido, 2AA-2 Amino Antraceno, CC-Citrato de Clomifeno, N-Negativo, P-Positivo, T-Tóxico. P.I. PLACAS INDUCIDAS.

**Figura No. 7**

Respuesta de la inducción de Colicina E<sub>1</sub>, por mutágenos químicos, con activación metabólica (Fig 7a) y sin activación metabólica (Fig. 7b).

\* Varianza entre dos ensayos reproducibles

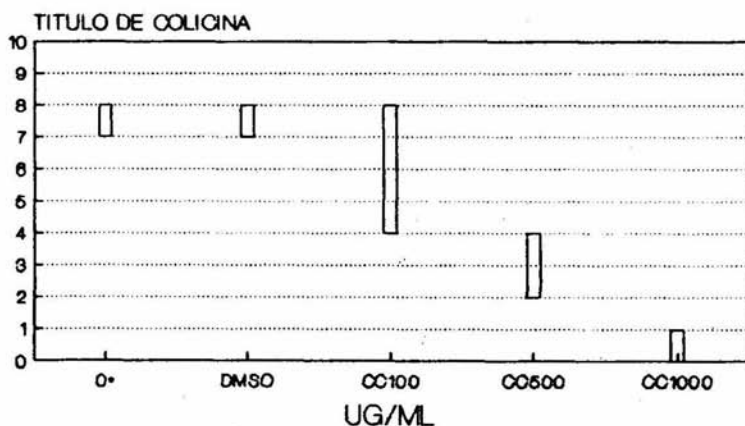
## INDUCCION DE COLICINA E1 CON MUTAGENOS QUIMICOS TRATADOS CON S9



2AA 2 AMINO ANTRACENO • SOLVENTE.  
MITOMICINA C. 2ng/ML. (258-512)  
CC CITRATO DE CLOMIFENO.

FIGURA 7A

## INDUCCION DE COLICINA E1 CON MUTAGENOS QUIMICOS SIN S9



MITOMICINA C. (512.0)  
• E. COLI Col E1  
CC CITRATO DE CLOMIFENO

FIGURA 7B

## DISCUSION

En trabajos anteriores, (Díaz Hernández, 1993) se ha demostrado que el Citrato de clomifeno no induce mutaciones por substitución de bases en *Salmonella typhimurium* TA100; sin embargo, se conoce que esta cepa sólo es capaz de detectar transiciones GC, por lo que en este trabajo se deseó realizar estudios en la cepa *S. typhimurium* TA102, que tiene una mutación hisG48 que la hace mas sensible para detectar compuestos que puedan actuar por transversión en el par AT. (Levin et. al., 1982), observándose que el citrato de clomifeno no fué capaz de inducir ningun tipo de mutaciones por substitución de bases (figura # 2), lo cual puede ser explicado por que en su estructura molecular (figura # 1) no presenta radicales alquilantes (Cortinas de Nava, 1980).

Así mismo, como se reporto anteriormente (Díaz Hernández, 1993; Arriaga Alba, 1992), el citrato de clomifeno produce mutaciones por corrimiento de formato, en la cepa de *S. typhimurium*, que detecta inserción de un GC.

en un rango de dosis muy limitado, entre 100-150ug/caja; observandose especialmente un efecto tóxico, a pesar de que las cepas empleadas tenían el plásmido pKm101 que incrementa la mutagénesis y mejora la sobre vida, empleando la cepa TA1538, en el presente estudio, se observó que el CC induce en efecto mayor toxicidad para *S. typhimurium* cuando no esta el plasmido pKm101, como es de esperarse de acuerdo a lo reportado por Mc. Cann et al., 1975. En este trabajo, con el empleo de la cepa de *S. typhimurium* TA97, que detecta mutaciones por corrimiento de formato en dos puntos diferentes del genoma; hisD6610 e hisC3076 haciendola mas sensible a la detección de compuestos que inducen éste tipo de mutaciones como se puede observar en la Figura No. 4 donde se muestra la curva dosis respuesta de esta cepa a citrato de clomifeno, revertiendo a su fenotipo original por este mecanismo y el número de revertantes aumenta en función de la concentración del compuesto.



Estudios anteriores (Díaz Hernández, 1993), demostraron que el citrato de clomifeno produce un efecto tóxico en las cepas de *Salmonella typhimurium*, especialmente en aquellas que son deficientes en los sistemas de reparación, sugiriendo que el citrato de clomifeno puede producir un daño genotóxico. Teniendo en cuenta que para el procedimiento de valoración de riesgo de medicamentos se ha recomendado que en la primera etapa de estudio se usen diversos sistemas de prueba que midan diferentes efectos biológicos; se ha considerado útil realizar también la valoración del citrato de clomifeno en *Escherichia coli* PolA+/PolA-, que detecta mutaciones genicas, además del sistema de Ames, que detecta especialmente mutaciones puntuales (Brusik, 1988; Sofumi, 1993; Kirkland, 1993). Considerando esto, en el presente trabajo, antes de realizar los ensayos con *Escherichia coli* PolA+/PolA-, se corroboró la eficiencia de la polimerasa I, exponiendo las cepas a la luz UV, observándose que la cepa PolA+ crece después del tratamiento, no así la cepa PolA-, evidenciándose su deficiencia en la reparación.

En una primera etapa se empleó el método de difusión en disco, y los resultados obtenidos de estos experimentos fueron positivos sin activación metabólica, como puede observarse en la Tabla 2, tanto para el control positivo, como para las diferentes dosis del compuesto; sin embargo, para el ensayo en disco, donde se adiciona la fracción S9, no se obtuvo respuesta, esto puede deberse a que el S9 no permita la difusión del compuesto, como se ha señalado previamente por Espinosa-Aguirre et. al., 1987.

Con el fin de conocer la respuesta del citrato de clomifeno después de su activación metabólica *in vitro*, se realizó el ensayo en cepas PolA+/PolA-, empleando la técnica de Rosenkranz modificada, (Rosenkranz, 1979). en la que se emplea el mismo número de u.f.c. en todo el ensayo, encontrando que cuando no se adiciona la fracción S9, los resultados fueron positivos para todas las concentraciones del compuesto; de igual manera que para el método de difusión en disco, cuando se adicionó la fracción S9,

se obtuvo una respuesta positiva a partir de la dosis de 125ug por caja, observándose así que el citrato de clomifeno pudo ser modificado metabólicamente por la reacción *in vitro* (Figura 5).

Fue difícil calcular los índices de sobrevida a dosis mayores del citrato de clomifeno debido al efecto altamente tóxico del compuesto en las dos cepas, por lo que para comprobar la respuesta positiva del citrato de clomifeno en este sistema de prueba se realizaron curvas de sobrevida en ambas cepas, estudiando el efecto genoletal del compuesto en un rango de u.f.c. de  $1 \times 10^3$  -  $1 \times 10^9$ , para poder determinar si efectivamente hay una disminución del crecimiento en la cepa PolA- con respecto a la cepa PolA+, de acuerdo a lo sugerido por Rosenkranz, 1980. Como resultado de este experimento se observó que el número de unidades formadoras de colonias fue disminuyendo de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^3$  a medida que aumentaba el tiempo para ambas cepas, aunque hay una disminución de las u.f.c. de la cepa PolA- con respecto a la cepa PolA+ que no tiene deficiencias en la polimerasa I, por lo cual puede reparar el daño provocado por el compuesto (Figura 6).

Se conoce que un daño severo al DNA puede inducir el sistema SOS, debido a que la formación de DNA unicitenario es capaz de desreprimir a *lexA*, induciéndose la expresión de los genes estructurales del sistema SOS (Kushner, 1988). Debido a que en este trabajo, se observó que el citrato de clomifeno produjo daños genoletales, se deseó conocer si éstos son capaces de inducir a este regulón.

Recientemente De Marini et al., 1990, introdujeron el empleo de la cepa lisogénica *E. coli* WP2( $\lambda$ ), que es capaz de detectar el efecto de numerosos compuestos que inducen daños genoletales, como algunos clorinados orgánicos, agentes alquilantes, nitrosaminas, hidrazinas (Rosenkranz, 1979) etc., los cuales pueden ser inhibidores de las topoisomerasas, dejando el DNA en forma lineal y más expuesto a la acción de los compuestos químicos (De Marini, 1992).

Por otro lado, desde hace mucho tiempo se conoce que la inducción del factor col+ se realiza con mutágenos químicos y físicos que pueden inducir la expresión del sistema SOS, como es la luz UV y la Mitomicina C (Hardy, 1975), habiéndose encontrado posteriormente que los genes de la expresión de colicinas están regulados por el regulón SOS (Gilson, et al., 1987).

En el presente trabajo observamos que el citrato de clomifeno puede ser un inductor del fago lambda, haciendo notar que este sistema de prueba fué muy apropiado para detectar un efecto mutagénico a dosis muy bajas, menores de 35µg/caja, a las cuales ya no fué posible detectar algún efecto mutagénico de este fármaco en otros sistemas de prueba, (Tabla 3). Cabe mencionar que aunque en los ensayos de Inducción del fago lambda se hicieron algunas modificaciones a la técnica descrita por DeMarini, los resultados obtenidos fueron positivos, para los controles positivos utilizados en esta prueba, similar a lo que ha sido reportado con el método original (DeMarini y Parkes, 1992). El empleo de la inducción del factor Col+ por diferentes mutágenos ha sido poco estudiado, no obstante se observa que tanto con 2AA, un carcinógeno conocido, como con el citrato de clomifeno, se duplico la expresión del factor Col+, en presencia de la fracción S9 (Figura 7A). Cuando el compuesto no fué metabolizado (Figura 7B), se observo la inhibición de la expresión del factor Col+, probablemente porque hay un daño en los sitios promotores a -10 y -35, que son reconocidos por la proteína represora lexA, que impide la expresión de los genes estructurales de las colicinas (Waleh y Johnson, 1985).

En este trabajo se demuestra que el citrato de clomifeno es un inductor del regulón SOS, observándose que la respuesta fué mas evidente en la inducción del fago lambda, lo cual puede explicarse a que la cepa empleada tiene un genotipo  $trp^- ubrA^- \lambda$  mientras que la cepa col3 tiene un genotipo  $col E_1, wvrABC^+$ , por lo que el sistema de reparación por escisión puede estar disminuyendo la eficiencia mutagénica del compuesto.

Con los resultados obtenidos en éste trabajo, se demuestra que el citrato de clomifeno es un compuesto que puede inducir daños puntuales y genicos en el DNA. Si bién es difícil extrapolar los datos obtenidos en sistemas bacterianos a lo que pudiera ocurrir in vivo, éstos resultados, aunados a diferentes efectos tóxicos producidos por este medicamento (Schialli, 1986), indican que su empleo debe de ser de acuerdo a cada caso particular, valorando si el beneficio será mayor que el riesgo.

Los diferentes sistemas de prueba utilizados en este trabajo son necesarios para poder precisar, por diferentes efectos biológicos, si existe la probabilidad de que un compuesto produzca daños al DNA; así, el empleo de diferentes ensayos permite una información más confiable sobre los efectos de dicho compuesto, que si solo se utiliza una prueba. Por otro lado, se ha reportado que el uso de ambas pruebas como son *E. coli* PolA+/PolA- y *Salmonella*, evita el paso de falsos positivos y falsos negativos.

## CONCLUSIONES.

- 1.- El citrato de clomifeno no produce mutaciones por substitución de bases.
- 2.- Se verificó la capacidad del citrato de clomifeno para inducir mutaciones por corrimiento de formato, tanto en cepas que detectan inserción de bases como deleción de bases.
- 3.- El citrato de clomifeno produce daños genotóxicos, que son facilmente detectados con el sistema de *E. coli* *polA<sup>-</sup>/polA<sup>+</sup>*.
- 4.- Los daños genotóxicos producidos por el citrato de clomifeno son capaces de inducir el regulón SOS, observandose que este compuesto puede inducir el fago lambda.
- 5.- Los metabolitos de este compuesto son capaces de inducir colicinogenia y la inducción del fago lambda.
- 6.- La inducción de colicinogenia, por este compuesto, deberá ser más evaluada, y se sugiere estudiarla en cepas deficientes en el sistema de reparación por escisión.
- 7.- Los efectos genotóxicos producidos por este compuesto pueden explicar en parte los daños que se han reportado en los pacientes tratados, por lo que se recomienda que cada caso se evalúe individualmente para valorar el riesgo beneficio.
- 8.- El empleo simultáneo de diferentes sistemas de prueba, que detectan diferentes efectos biológicos, es recomendable para conocer con mayor exactitud lo riesgos genotóxicos del empleo de medicamentos.

## ANEXO

### Medio Mínimo de Vogel Boner.

Solución A: 10ml de sales de Vogel Boner en  
90ml de agua destilada.

Solución B: Dextrosa           10.0 g  
Bacto agar           7.5 g  
Agua destilada   400.0 ml

Se esterilizan por separado las 2 soluciones a 121 °C/20 minutos.  
Una vez esterilizadas se mezclan asépticamente y se vierten en  
cajas petri.

Mezcla S9:           Fracción S9-----0.5   ml  
                  Sol. MgCl<sub>2</sub> 0.4M KCL 1.65M---0.02   ml  
                  Glucosa 6 fosfato-----0.0013 g  
                  NADP-----0.0030 g  
                  Amortiguador de fosfatos  
                  0.2M pH7.4-----0.9   ml

Estas cantidades son las que se necesitan por  
mililitro.

### Solución de Histidina Biotina 0.5mM (Requirimientos mínimos)

Histidina-----0.007 g  
Biotina-----0.012 g  
Agua Destilada-----100 ml

Solución de Histidina Biotina 0.1M/0.5mM (para conservación de las cepas).

Histidina-----0.1552 g  
Biotina-----0.0012 g  
Agua destilada-----10.0 ml

Esterilizar por filtración con filtro millipore de 45 $\mu$

#### Medio HA+T

Se preparó según se describe por Davis y Mingioli, (1950), Rosenkranz et al., (1965) y Slater et al., (1971).

K<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub>-----7.0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-----3.0 g  
Na<sub>3</sub>-citrato. 3H<sub>2</sub>O---0.5 g  
MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O-----0.1 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>-----1.0 g  
Glucosa-----1.0%  
Agar -----1.5%  
Timina-----5 $\mu$ g/ml  
Tiamina-----5 $\mu$ g/ml

Solución de Caseína al 1.0%. Adicionar 10ml a un litro de medio de cultivo.

#### REACTIVO DE BIURET.

a) Sulfato Cúprico-----1.5 g  
b) Tartrato de Sodio Potasio-6.0 g  
c) Hidróxido de Sodio (10%)--300 ml  
Agua.

Disolver a y b en 500 ml de agua en un matraz volumétrico de 1 l. posteriormente se agrega en forma constante c y finalmente se afora.

## BIBLIOGRAFIA.

- + Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaka, E. y Lee, F. D., 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (8): 2281-2285.
- + Ames, B. N., McCann, J., y Yamasaka, E., 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with *Salmonella*/ mammalian -microsome Mutagenicity Test. Mutation Res. 31: 347-364.
- + Ames, B. N. 1979. Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and cancer Science. 204. 587-593.
- + Anderson. D., Green, M. H., Matten, I. E. y Gudlay, M. J. 1981. An International Collaborative Study of "Genetic Drift" in *Salmonella typhimurium* strains used in the Ames Test. Mutation Res. 130: 1-10
- + Arriaga Alba, M. 1988, Estudio de la actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* de compuestos N-Nitrosados, derivados de medicamentos antiparasitarios aminados. Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. UNAM.
- + Arriaga Alba, M., Díaz Hernandez, R., y Gonzales Patiño, M. E. 1992. Valoración de Riesgo de Exposición a Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium*. BIOQUIMIA. supp. 16: 128.
- + Arriaga Alba, M., Burgos Navarro, M. C., Espinosa Romero, R. E., Espinosa Delgadillo, J. A. 1994. Frecuencia de Cepas Colicínogénicas en el Hospital Juárez de México. Enf. Infec. Microbiol. (Méx). 14 (1): 51 - 56.



- + Battista, J. R., Donnelly, C. F., Ohta, T. y Walker, G. C. 1990. The SOS response and induced mutagenesis in: Mendelson, M. L. y Albertini, R. J. (Ed), Mutation and the Environmental. Part A; Basic Mechanisms, Wiley-Liss, New York, pp. 169-178.
- + Boone P. M, Rossman T. G. y Daisey J. M. 1989. The genotoxic contribution of wood smoke to indoor respirable suspended particules. Environ. Int. 15: 361-368.
- + Botton, F.M. 1977. Bilateral Breast cancer associated with clomiphene, Lancet ii:1176.
- + Boué, J. C. y Boué, A. 1973. Increased frequency of cromosomal abnormalities in abortions after induce ovulation. Lancet. 679-680.
- + Brusick, D. 1988. Evolution of Testing Strategies for Genetic Toxicology. Mutation Res. 205: (1-4): 69 - 78.
- + Chiorboli, E., López, M. A. 1982. Ouso do clomifeno no factor masculino da esterilidae. J. Bras. Urol. 8 (1): 54-58.
- + Clark, J. H. & Ormack, S. 1977. Clomid or nafoxidine administered to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. Science. 197: 164-165.
- + Cortinas de Nava, C. 1980. Manual de Mutagénesis, Instituto de Invest. Biomédicas. UNAM.
- + Davies, D. B. y Mingioli, S. E. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J. Bacteriol. 60: 17-28.
- + D'Alisa, R. M., Carden 111, G. A., Carr. H. S. y Rosenkranz. H. S. 1971. "Reversion" of DNA Polymerase-Deficient *Escherichia coli* Molec. Gen. Gen. Genetics 110: 23-26.

- + Dayan, J., Crajer, M. C., Bwertozzi, S., Lefrancois, S. 1980. Application of the *Salmonella typhimurium* Microsome Test to the Study of 25 Drugs Belonging to 5 Chemical Series. *Mutation Res.* 77: 301-306.
- + DeMarini, D. M., Brooks, H. G. y Parkes, D. G. 1990. Induction of prophage lambda by chlorophenols. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 1-9.
- + DeMarini, D. M. y Lawrence, B. K. 1992. Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: Role of DNA breaks. *Mutation Res.* 267: 1-17
- + Devoret, R. 1979., Tests bacterianos de sustancias potencialmente carcinogénicas. *Investigación y Ciencia* 36-37: 6-16.
- + Díaz Hernandez, R. 1993. Estudio de Mutaciones Inducidas por Citrato de Clomifeno en *Salmonella typhimurium*. Tesis Profesional. Biología ENEP IZTACALA U. N. A. M.
- + Dubinin, N. P. 1981 *Genética General*, 2 Ed. Editores. Mir, Moscú: tomos I: 479, II: 341
- + Espinosa, J. 1980. Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos ambientales. Instituto de investigaciones Biomédicas. UNAM. 31-49.
- + Espinosa-Aguirre, J. J., Aroumir, C., Meza, M. T., Cienfuegos, E. y Cortinas de Nava, C. 1987. Genotoxicity in *Escherichia coli* PolA<sup>+</sup>/PolA<sup>-</sup>. *Mutation Res.* 188: 111 - 120.
- + Espinosa-Aguirre, J. J., Ramírez, S. y Cortinas Nava. 1989. Influence of the Uvr repair system on the mutagenicity of antiparasitic drugs. *Mutation Res.* 222: 161-166.

- + Gardner, E. J. 1980. Principios de Genética. Traducción en Español de la quinta edición en Inglés. Ed. Limusa, México, D. F. P: 716
- + Gilson L., Mahanty K. K. y Kolter, R. 1987. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export and immunity. J. Bacteriol. 169: (6): 2466 - 2470.
- + Gomez Alzugaray, Mas Díaz, J., Padrón Duran, 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. Vol. 16 Número especial.: 128.
- + Hardy, K. 1975. Colicinogeny and related phenomena. Bacteriol Rev. 39 (4): 464-515.
- + 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 sequencies for mutagenesis in *Salmonella typhimurium* histidine requiring mutants. Environmental. Mutagen. 8: 631-641.
- + Houk, V. S. y DeMarini, D. M. 1987. Induction of prophage lambda by chlorinated pesticides. Mutation Res. 182: 193-201.
- + Howard, F. P. 1982. Reparación inducible del ADN. Investigación y Ciencia. 64: 28-37.

- + Kirkland, D. J. 1993. Genetic toxicology testing requirements: Official and unofficial views from Europe. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 21: 8-14.
- + Kushner, R. S. 1988. DNA repair. In Neidhart, *Salmonella and Escherichia coli*. Celular and Molecular Biology. Ed. A. S. M. Washington, D. C.
- + Lavoie, M. C. y Mathieu, L., L. G. 1975. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant resistant to colicin A. *Can. J. Microbiol.* 21: 1595-1601.
- + Levin, D. E., Hollstein, M., Christman, M. F., Schwiers, E. A. y Ames, B. N. 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with AT base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7445-7449.
- + McCann, J. y Ames, B. N. 1976. The *Salmonella*/microsome mutagenicity test: predictive value for animal carcinogenicity. Reprinted from human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 950-954.
- + 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.
- + MacPhee, D. G. 1984. Do the *Salmonella typhimurium* Tester strains used in mutagenicity assays display plasmid enchaged genetic drift. *Mutation Res.* 127:183-184
- + Maron, D. M. y Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella typhimurium* Mutagenicity test. *Mutation Res.* 113: 173-215.
- + Matsumoto, T., Yoshida, D., Shigenobu, M. 1977. Structural requirements for mutagenetic activities of N-Heterocyclic bases in the *Salmonella* test system. *Agric. Biol. Chem.* 42 (4): 861-866.

- + Miguel, A. G. Daisey, J. M. y Sousa, J. A. 1990. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ. Mol. Mutagen.* 15: 36-43
- + Neidhardt, F. C. 1987. Multigen Systems and Regulons in Neidhardt, F. C. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, ASM. Washington, D.C. pp 1313-12317.
- + Pool, B. L. 1980. Mutagenicity relevance of short term. 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.
- + Rosenkranz, H. S. y Leifer, Z. 1980. Determining the DNA-Modifying activity of chemicals using DNA-Polymerase Deficient *Escherichia coli*. Department of Microbiology, New York Medical College, Valhalla, New York .
- + Rosenkranz, H. S. y Poirier, L. A. 1979. Evaluation of the mutagenicity and DNA-Modifying activity of carcinogens and noncarcinogens in Microbial systems. *Natl. Cancer Inst.* Vol. 62 No. 4 873-891.
- + Rosenkranz, H. S., Rose, H. M. 1965. Phenethyl alcohol I. Effect on macromolecular synthesis of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 89: 1354-1369.

- + Rossman, T. G., Meyer, L. W., Butler, J. P. y Daisey, J. M. 1985. Use of the microscreen assay for airborne particulate organic matter, In Waters M D, Sandhu S. S, Lewtas J, Claxton L, Strauss G, Nesnow S (eds): "Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures. " IV. New York: Plenum, pp 9-23.
- + Rossman, T. G., Molina M., Meye, L. W. 1984. The genetic toxicology of metal compounds: I. Induction of  $\lambda$  prophage in *E. coli* WP2 $\phi$  ( $\lambda$ ) Environmental Mutagen. 6: 59-69.
- + Salles, B. Weinstok, G. M. 1989. Mutation of the promoter and *lexA* binding sites of *ceq*, the gen encoding colicin E<sub>1</sub>. Mol. Gene. Genet. 215 (3): 483 - 489.
- + Sánchez, M. E. y Jouve, N. 1982. Genética. Ed Omega, S. A. . Barcelona. 309-340.
- + 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 role of DNA repair, replication and recombination. Mutation Res. 154: 1 - 27.
- + Schialli 1986. The reproductive toxicity of ovulation induction. Fertil. Steril. 45 (3): 315 - 323.
- + Shirname-More, L, Rossman, T. G., Troll, W, Treebor, G. W. y Frenkel, K. 1987. Genetic effects of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine, a product of ionizing radiation. Mutation Res. 178: 177-186.
- + Slater, M. D. Anderson y H. S. Rosenkranz 1971. Rapid detection of mutagens and carcinogens. Cancer Res. 31: 970-973.
- + Sofumi, T. 1993. Japanese Guidelines for Mutagenicity testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. 21: 2-7.

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

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

+ Toshinobu, T., Seiichiro, F., Noriaki, S. Kihyoel. 1979. Correlation between dosage or duration of clomid therapy and absortion rate. Inst. J. Fertil 24: 193.

+ Troso, J. E. 1986. Role of intracelular comunicacion in modifying the consequences of mutation in somatic cells. In Delvert, M. Hartman, E. y Kada, T. Antimutagens and Anticarcinogens. Basic Life Science. 39: 439 - 457.

+ Waleh, N. S. y Johnson, P. 1985. Structural and functional organization of colicin E1 operon. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 8389 - 8393.

+ Walker, G. C. 1987. The SOS Response of *Escherichia coli* in Neidhardt, F. C. *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. ASM. Washington, D.C. pp 1346-1357.

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