



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11661  
7 8  
2e

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTANDARIZACION DE DOS TECNICAS  
ANALITICAS PARA LA DETERMINACION DE  
MUTAGENOS EMPLEANDO *Salmonella typhimurium*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS  
( MICROBIOLOGIA )**

P R E S E N T A :

**ANA MARIA SANDOVAL VILLASANA**

DIRECTORES DE TESIS: DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE.  
DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA.  
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.



V N A M

CUAUTITLAN IZCALLI.

260719

1998.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

Dedico:

A César Miguel quién con intuición y generosidad me impulsó y apoyó para escribir este trabajo

A mis padres, María y Tiburcio, quienes sembraron la semilla e inquietud constante del conocimiento

A mis hermanos: Carolina, Olimpia, Víctor y José, por estar conmigo en este trabajo, siempre demostrando paciencia y cariño

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a la Institución y personas que contribuyeron para la realización de este trabajo:

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, a través de la Subcoordinación de Impacto Ambiental, por la disposición para el empleo de los recursos técnicos para la realización de las labores experimentales y de gabinete. En especial, al Dr. Felipe Arreguín por impulsar la investigación genética toxicológica.

A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por su amistad sincera, orientación y estímulo constante.

Al Dr. J. Javier Espinosa Aguirre por su apoyo, aportaciones, sugerencias y asesoría sobre la instrumentación de la prueba de Ames y estructuración final de este trabajo.

A los Doctores Abel Ciprian Carrasco y Andrés Romero Rojas y a la M. en C. Clara Inés Álvarez Manrique por su atención en la lectura y sus valiosas sugerencias durante el análisis previo de esta Tesis.

Al M. en C. Eric Gutiérrez López por sus importantes sugerencias para una mejor comprensión del escrito final, así como la oportunidad y confianza en el desarrollo experimental de la instrumentación de las técnicas sin las cuales este trabajo no habría sido realizado.

A la Fís. Mat. Carolina Sandoval Villasana, Ing. César Miguel Hernández y Ql. Norma Ramírez por su apoyo en el desarrollo de la parte estadística.

A mis compañeros Biólogos Alicia Brito Lerdo de Tejada, Alejandro Ordoñez Ferrusco y María Luisa Corona y a los Maestros en Ciencias Pilar Saldaña Fabela, Lydia Márquez Bravo, Antonieta Gómez Balandra, Martha Avilés Flores y Leticia Montellano y al Técnico en Informática Marco Guadarrama por su apoyo y colaboración en el marco de la experiencia de un equipo de trabajo profesional.

## RESUMEN

La producción masiva de más de 70,000 compuestos sintéticos por la industria en el ámbito internacional, los cuales pueden encontrarse como contaminantes en el medio ambiente, ha obligado al desarrollo de técnicas analíticas que permiten identificar cuales de estas sustancias son potencialmente mutagénicas. En este trabajo se instrumentaron dos técnicas analíticas, la de Ames y una modificación a esta denominada microfluctuación, para la detección del impacto causado por compuestos genotóxicos presentes en el agua con base en un sistema biológico análogo: cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*. La prueba de *Salmonella* juega un papel importante en la detección de mutagenicidad pues posee una alta especificidad, distinción entre sustancias conocidas mutagénicas y no mutagénicas, sensibilidad para la detección de los compuestos hasta cantidades del orden de  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y confiabilidad de más del 95 por ciento. Su papel es una base que permite estimar el riesgo genético en la identificación del potencial mutagénico natural (Kier, 1986) con el objeto de poder prevenir sus efectos sobre la población humana al estar en contacto con ellas.

Ambas técnicas se estandarizaron para detectar al compuesto químico difosfato de cloroquina por razones de disponibilidad, manipulación práctica, actividad genotóxica conocida y su detección por la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537, mediante la adición combinada de un cultivo de esta cepa y solución del mutágeno problema. A nivel laboratorio se emplearon varias concentraciones del compuesto químico a probar. Debe notarse que el procedimiento para la prueba de microfluctuación utilizando el equipo Bioscreen C se ha iniciado recientemente, por consiguiente, no se tienen evaluaciones experimentales realizadas por otros laboratorios con este equipo aplicándolo a pruebas de mutagenicidad. Debido a la escasez de datos generados para esta prueba, fue necesario consultar estudios en los que se realizó el procedimiento tradicional para la prueba de microfluctuación y de esta manera mejorar nuestro criterio de procedimiento de comparación, con base en la concordancia y sensibilidad.

Para la prueba de incorporación en placa de Ames se realizaron 14 experimentos. El análisis de cada concentración se realizó por triplicado, haciendo un total de 39 cajas por experimento. Para cada concentración se obtuvo un valor promedio, los cuales variaron de 18 revertantes por placa para  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  y 95 revertantes por placa para  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Y para la prueba de microfluctuación se realizaron nueve experimentos. En el análisis de cada concentración se utilizaron 15 pozos, haciendo un total de 195 pozos por cada experimento realizado, los resultados de densidad óptica obtenidos por concentración de dosis —mínima y máxima— fueron de 0.004 a  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  y 0.051 a  $250 \mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente. En ambas pruebas se incluyeron un control positivo y uno negativo. Y aunque la prueba de microfluctuación resultó relativamente más sensible a ciertas concentraciones que

la prueba de incorporación en placa de Ames; los resultados obtenidos en este estudio comparados con los de la literatura fueron similares.

Conclusión respaldada mediante el análisis estadístico de los datos analíticos generados utilizando el modelo completo de la curva dosis-respuesta para examinar las propiedades del procedimiento y efectuar las comparaciones con los modelos matemáticos obtenidos de acuerdo con los siguientes criterios: (1) la dispersiones de los puntos fueron similares para ambas pruebas; (2) y la exactitud, y sensibilidad de ambas pruebas fue alta.

Con en estos resultados y el análisis estadístico desarrollado se establecieron los criterios para considerar actividad mutagénica cuando un resultado de prueba sea significativo con base en lo siguiente:

1. Prueba de incorporación en placa (Ames): cuando se presenta un incremento doble de revertantes en placas con el compuesto químico a probar con respecto a las placas control del solvente (Maron, 1983).
2. Prueba de microfluctuación: un incremento significativo en el número de pozos con turbidez en el medio que contenía el mutágeno con respecto al número de pozos con turbidez en el testigo negativo (Gilbert, 1980).

El alto rendimiento analítico de ambas pruebas, aunado al hecho de que la prueba de Ames esta probada y validada, permite afirmar que puede realizarse la aplicación de la prueba de microfluctuación a gran escala para evaluar un número grande de muestras ambientales. Y el empleo de estas pruebas en conjunto con otras pruebas de genotoxicidad podría jugar un papel muy importante, particularmente dentro de esquemas de evaluación del riesgo ecotoxicológicos. Es decir, la asociación de la prueba de *Salmonella* con una o más pruebas mejoraría substancialmente la sensibilidad predictiva de esta evaluación.

## LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
1	Bases nitrogenadas del ADN.	9
2	Estructura y Replicación del ADN.	9
3	Esquema de la duplicación semiconservativa del ADN.	10
4	Tipos de mutaciones de puntuales.	11
5	Etapas del daño genético inducido por agentes genotóxicos.	14
6	Procedimiento de evaluación de marcadores genéticos de las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> , (Maron & Ames, 1983).	32
7	Placa maestra de la cepa mutante de <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537.	34
8	Requerimiento de histidina.	36
9	Mutaciones <i>rfa</i> y <i>uvrB</i> .	36
10	Plásmidos factor R pKM101 y pAQ1.	39
11	Reversión espontánea de la cepa <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 dependiente de histidina.	39
12	Método de incorporación en placa de Ames, (Maron & Ames, 1983).	42
13	Estructura química del difosfato de cloroquina.	46
14	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	55
15	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	56
16	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	57

N°	Título	Pág.
17	Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	57
18	Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	59
19	Curva dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 y error estándar en la misma. Prueba de incorporación en placa de Ames.	60
20	Coeficiente de variación de la relación dosis/efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.	60
21	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	65
22	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	66
23	Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	66
24	Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	67
25	Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	69
26	Curva dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537 y error estándar en la misma. Prueba de microfluctuación.	70
27	Coeficiente de variación de la relación dosis/efecto de cloroquina en <i>Salmonella typhimurium</i> TA1537. Prueba de microfluctuación.	70



## LISTA DE TABLAS

N°	Título	Pág.
1	Enfermedades en el hombre causadas por mutaciones en células germinales, así como el número de casos estimados en los Estados Unidos.	6
2	Diccionario de los tripletes del código genético.	12
3	Pruebas de corta duración para la detección de efectos genotóxicos.	17
4	Principales pruebas de mutación reversa.	19
5	Modificaciones a la prueba de Ames.	20
6	Pruebas basadas en la inducción de la respuesta SOS.	23
7	Otras pruebas.	25
8	Características genéticas de las cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> .	30
9	Verificación de marcadores genéticos de <i>Salmonella typhimurium</i> .	40
10	Controles positivos empleados en la prueba (Maron y Ames, 1983).	44
11	Distribución de las diferentes muestras en la microplaca.	49
12	Número de revertantes promedio por placa con el difosfato de cloroquina empleando la prueba de incorporación en placa de Ames.	54
13	Estadísticos empleados para evaluación de la prueba de incorporación en placa de Ames.	61
14	Densidades ópticas promedio después del contacto con el difosfato de cloroquina a diferentes concentraciones.	64
15	Estadísticos empleados para evaluación de la prueba de microfluctuación.	71

# ÍNDICE

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	4
<b>3. ANTECEDENTES</b>	5
3.1 Efectos sobre la salud humana	5
3.1.1 Enfermedades hereditarias	5
3.1.2 Cáncer	6
3.2 Efectos en el medio ambiente	7
3.3 Conceptos básicos sobre el material genético	8
3.3.1 Ácido desoxirribonucleico	8
3.4 Categorías de sustancias mutagénicas	13
3.4.1 Categoría 1	13
3.4.2 Categoría 2	13
3.4.3 Categoría 3	14
3.5 Origen de los bioensayos empleados en la detección de agentes mutagénicos	15
3.5.1 Principales bioensayos con microorganismos	18
3.6 Prueba de Ames	26
3.7 Prueba de microfluctuación	26
3.8 Variantes de la prueba de Ames y microfluctuación	27
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	28
4.1 Cepas mutadas	28
4.2 Características de las cepas mutadas	28
4.2.1 Requerimientos de histidina para su uso en la prueba de mutagenicidad	28
4.2.2 Mutación ( <i>rfa</i> )	29
4.2.3 Mutación ( <i>uvrB</i> )	29
4.2.4 Plásmido factor R, pKM101 y pAQ1	29
4.3 Tasa de reversión espontánea	29
4.4 Procedimiento para la conservación de las cepas mutadas	30
4.4.1 Conservación de las cepas	30
4.4.1.1 Cepas de prueba para almacenamiento	31
4.4.1.1.1 Reproducciones de cultivos	31
4.4.1.2 Reproducción de cultivo a corto plazo y confirmación de genotipos de cepas de prueba	31

4.4.1.2.1 Placa maestra	33
4.4.1.2.2 Requerimiento de histidina	34
4.4.1.2.3 Mutación <i>rfa</i>	35
4.4.1.2.4 Mutación <i>uvrB</i>	35
4.4.1.2.5 Presencia del plásmido factor R pKM101	37
4.4.1.2.6 Presencia del plásmido pAQ1	37
4.4.1.2.7 Reversión espontánea	37
4.5 Procedimiento de la prueba de Ames	40
4.5.1 Agar de superficie	40
4.5.2 Placas de agar	40
4.5.3 Esencia de la prueba de incorporación en placa de Ames	41
4.6 Procedimiento para la prueba de microfluctuación	43
4.6.1 Pasos previos de preparación al día de realizar la prueba	43
4.6.2 Preparación de la muestra y colocación en la placa de prueba	43
4.7 Controles	43
4.7.1 Control negativo	43
4.7.2 Control positivo	43
4.8 Control de toxicidad	44
4.8.1 Control de viabilidad	44
<b>5. INSTRUMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS</b>	<b>46</b>
5.1 Material y condiciones experimentales	46
5.1.1 Agente químico de prueba	46
5.1.2 Control positivo	47
5.1.3 Control negativo	47
5.1.4 Cepa de prueba	47
5.2 Concentraciones de prueba	47
5.3 Prueba de incorporación en placa de Ames	48
5.4 Prueba de microfluctuación	48
5.4.1 Distribución de las muestras en la microplaca	49
<b>6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>50</b>
6.1 Aspectos de mutagenicidad del difosfato de cloroquina (7-chloro-4-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-quinoleina difosfato)	
6.2 Determinación de pruebas de mutagenicidad	50
6.2.1 Prueba de incorporación en placa de Ames	50
6.2.1.1 Criterio para aceptación de resultados	50
6.2.1.2 Interpretación de resultados	50
6.2.2 Prueba de microfluctuación	51
6.2.2.1 Criterio para aceptación de resultados	51
6.2.2.2 Interpretación de los resultados	51
	52
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
7.1 Prueba de incorporación en placa de Ames	53

7.2 Prueba de microfluctuación	63
7.3 Ambas pruebas	72
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los problemas de calidad del agua en el país han superado la contaminación netamente orgánica (como la presencia de bacterias). La contaminación con metales pesados, plaguicidas y otras sustancias obliga al desarrollo de técnicas analíticas que detecten efectos mutagénicos y genotóxicos.

La investigación en los campos de la toxicología ambiental, genética y molecular, ha permitido demostrar la vinculación que existe entre la exposición a xenobióticos o a la radiación ionizante y las mutaciones en el ámbito de células germinales y somáticas, así como la aparición de malformaciones congénitas, esterilidad, o de enfermedades degenerativas y cáncer (Gonsebatt, 1994).

De acuerdo a la publicación "Chemical Abstracts", 10 millones de productos químicos fueron registrados hasta el año de 1984. Aproximadamente 65,725 compuestos distintos están regulados e inventariados por las agencias estadounidenses "Food and Drug Administration" y "Environmental Protection Agency". La mayoría de estas sustancias no han sido estudiada en cuanto a su naturaleza tóxica y mucho menos en su comportamiento mutagénico (Ehling, 1991).

Ello ha impulsado al desarrollo de una serie de sistemas de prueba y de modelos experimentales, que han sido la fuente primaria de información acerca de los efectos en la salud y que se toman en cuenta para las evaluaciones de sustancias tóxicas. La falta de esta información hace que muchos xenobióticos sean identificados sólo a través de desastres ecológicos.

Para identificar los mecanismos de acción de un xenobiótico se requiere de una observación exhaustiva de los organismos afectados, donde la exposición muestre la probabilidad de ocurrencia de un efecto genotóxico, el cual a su vez incrementa el peligro de un padecimiento.

La exposición a sustancias tóxicas produce cambios o alteraciones tempranas en los individuos, estos cambios podrían convertirse en señales o marcadores de prevención del desarrollo de una enfermedad. Estas alteraciones pueden ser evaluadas mediante estrategias adecuadas, y correlacionarse con los efectos observados a largo plazo o en grupos de organismos expuestos en modelos experimentales.

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y de la función que desempeñe en el organismo él (los) tejido (s) afectado (s).

*Por ello, los indicadores o marcadores biológicos son aquellos elementos relacionados con la actividad de los seres vivos, que permiten determinar eventos*

*relacionados con su fisiología de manera cualitativa o cuantitativa.* Consecuentemente, la detección de un xenobiótico en los fluidos o tejidos es una señal de que el organismo tuvo contacto con éste; por lo que constituirá un marcador de exposición. Cuando éste ha causado cambios en los organismos, es posible caracterizarlos cualitativa o cuantitativamente a través de diferentes estrategias.

En síntesis, los marcadores o indicadores biológicos de efecto son las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser reconocidas como un daño potencial o efectivo sobre la salud. Por otro lado, los marcadores biológicos de susceptibilidad son indicadores de una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición a un agente xenobiótico (Gonsebatt, *op. cit.*).

En general, la acción de los agentes xenobióticos está relacionada con su estructura química, por lo que las mutaciones pueden resultar de la acción directa de estos agentes químicos sobre el material genético o sobre componentes celulares ligados a él funcionalmente, por ejemplo, los que participan en la división celular, las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN). El daño así producido a través de la mutagénesis, es uno de los peligros toxicológicos no valorados apropiadamente, a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y sus descendientes. Por consiguiente, es apremiante identificar qué sustancias del medio ambiente son potencialmente mutagénicas, con el objeto de prevenir sus efectos sobre la población humana al estar en contacto con ellas.

Aún cuando los datos epidemiológicos son insustituibles para proveer información directa sobre el efecto en la salud de la población, éstos se obtienen tardíamente. Por lo tanto, es esencial identificar y detectar en el agua aquellas sustancias capaces de inducir mutaciones, existiendo para ello la posibilidad de utilizar bacterias como organismos de ensayo. Esto permite reducir el tiempo de obtención de datos a días en lugar de meses que se requieren cuando se utilizan animales. Con base en lo anterior, el reto de estimar el peligro que representa un compuesto dado para el hombre, requiere de un *sistema biológico* para detectar de manera objetiva la presencia o ausencia de actividad mutagénica de los agentes químicos, en estado natural o mezclados. Las evaluaciones con bacterias han demostrado ser reproducibles, de fácil realización, relativamente sencillas, económicas y de corta duración.

Las características más relevantes de las pruebas de este tipo para la identificación de mutágenos incluyen dos niveles:

1. Mediante el empleo de las pruebas biológicas puede corroborarse si una alteración particular del ADN se traduce en una mutación.

2. La inducción de alteraciones génicas puede determinarse en varias especies bacterianas: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio fischeri* y *Bacillus subtilis*.

Las lesiones en el ADN inician un complejo proceso celular que en células de mamíferos puede conducir con el tiempo a un estado canceroso; los agentes que lesionan el ADN son por lo tanto, mutágenos en potencia.

El ADN es el material hereditario de todas las células vivas, y tanto las lesiones del ADN, como de los procesos celulares que las representan, son notablemente similares en las bacterias y en las células humanas: de manera que los resultados obtenidos con componentes que mostraron ser reactivos con el ADN pueden ser extrapolados a las especies donde el compuesto, puede producir efectos similares. Esta es la justificación teórica que permite sustituir las células de mamíferos por bacterias en la detección de lesiones al ADN. La cual se apoya en resultados experimentales y prácticos: los ensayos bacterianos distinguen entre sustancias mutagénicas y no mutagénicas, ya conocidas, con una confiabilidad de más del 90 por ciento. Así mismo, se han utilizado pruebas con bacterias identificando productos químicos nuevos potencialmente mutagénicos que, posteriormente, han mostrado su naturaleza mutagénica en pruebas con animales (Devoret, 1979).

Las cepas utilizadas en las pruebas poseen una alta especificidad y sensibilidad para la detección de los compuestos, pudiendo detectar cantidades del orden de  $\mu\text{g/mL}$ . Esto permite la detección de una gran cantidad de compuestos mutagénicos, por ejemplo plaguicidas, aminas aromáticas, nitroaromáticas, poliaromáticas, halometanos y compuestos genotóxicos como aflatoxinas y organometales.

## 2. OBJETIVOS

### - General

Instrumentar dos técnicas analíticas para detectar impactos genéticos causados por compuestos genotóxicos presentes en el agua.

### - Particulares.

Instrumentar la prueba analítica de Ames para la detección de mutágenos mediante cepas mutantes de *Salmonella typhimurium*.

Instrumentar la técnica analítica de microfluctuación para la detección de mutágenos a nivel traza en muestras ambientales utilizando las cepas de *Salmonella typhimurium*.

Comparar los resultados analíticos de estas técnicas mediante análisis estadístico, evaluando exactitud y precisión.

Proponer en las evaluaciones de calidad del agua el criterio de genotoxicidad y mutagenicidad, como parámetro de evaluación y prevención.



### 3. ANTECEDENTES

El desarrollo experimentado por la humanidad, principalmente en las tres últimas décadas, propició que la industria produjera masivamente más de 70,000 compuestos sintéticos, que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), pueden encontrarse como contaminantes en el medio ambiente. Estos productos químicos, innegablemente, han sido importantes en el mejoramiento de las condiciones de vida de la población, aunque también se ha puesto de manifiesto que algunos de ellos tienen efectos indeseables, tal como el de inducir cambios que afecten su material genético. Por lo tanto, ha sido necesario investigar procedimientos de pruebas rápidas, simples y de costo-eficiente para un número siempre mayor de agentes químicos y muestras ambientales haciendo de la búsqueda un esfuerzo constante.

Se desconoce el número exacto de sustancias químicas o mezclas complejas a las que el hombre y/o el medio ambiente están expuestos, mientras tanto se cree que están en el orden de millares. Una encuesta realizada en los Estados Unidos estima que cada año son introducidas al mercado aproximadamente de 700 a 3,000 nuevos productos químicos.

#### 3.1 Efectos sobre la salud humana

##### 3.1.1 Enfermedades hereditarias

Los agentes que dañan al ADN son de preocupación particular porque sus efectos en el hombre pueden dar lugar a mutaciones, deformidades, enfermedades degenerativas y/o cánceres. La existencia de estas enfermedades hereditarias se ha ido reconociendo e incluso en Estados Unidos se ha realizado una estimación de las mismas, las cuales han variado de 10 mil a 15 millones por año (Brusick *et al.*, 1992). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de estas enfermedades causadas por mutaciones en células germinales.

*Brusick et al.*, 1992, reportan que estas enfermedades son actualmente incurables, no existen hasta el momento tratamientos o este es mínimo, pudiendo ser transmitidas a sus siguientes generaciones. Aún no ha sido posible asociar directamente el mecanismo que se lleva a cabo para la inducción de estas enfermedades genéticas en el hombre causadas por mutaciones específicas inducidas por radiaciones o agentes químicos. No obstante la existencia comprobada de mutágenos que causan daños en células germinales en especies diferentes a la humana y el actual conocimiento sobre genética, mutagénesis y enfermedades hereditarias, no dejan dudas de la existencia de los riesgos de inducción de estas enfermedades como consecuencia de la exposición del hombre a estos agentes.

**Tabla 1. Enfermedades en el hombre causadas por mutaciones en células germinales, así como el número de casos estimados en los Estados Unidos.**

<i>Enfermedad</i>	<i>Número de casos estimados por año</i>
Dislexia	15,000.000
Arteriosclerosis	6,700.000
Cáncer	5,000.000
Síndrome maniaco-depresivo	2,000.000
Esquizofrenia	1,500.000
Diabetes juvenil	1,000.000
Enfermedad de riñón policístico en adultos	500.000
Enfermedad familiar de Alzheimer	250.000
Esclerosis múltiple	250.000
Síndrome del Cromosoma X-fragil	100.000
Anemia falciforme	65.000

Brusick *et al.*, 1992.

### 3.1.2 Cáncer

Colin en 1980, argumentó que, en lugar de tratar de definir un carcinógeno el cual sigue siendo un dogma, sería más apropiado considerar una definición para un grupo de compuestos que causan toxicidad irreversible, es decir, daños irreparables y permanentes a las células o componentes de ella responsables de transferir la información genética a las futuras células.

Una mutación inducida en una célula somática puede generar efectos adversos desde muerte celular hasta la alteración o pérdida de regulación natural de proliferación celular. Este último puede llevar a la multiplicación descontrolada de células y, por consiguiente, a tumores, cáncer y metástasis. La preocupación principal de la exposición de células somáticas a los mutágenos es la inducción de cáncer.

A pesar de que no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales los carcinógenos inducen el cáncer, se sabe que las mutaciones están claramente involucradas en el proceso. Genes específicos, cuando sufren mutaciones causan cáncer, ya han sido descubiertos y clasificados en dos tipos: los oncogenes y los genes supresores de tumores (anti-oncogenes).

Los oncogenes son formas alteradas de genes normales (llamados proto-oncogenes) que cuando sufren de mutaciones causan descontrol en la división celular y como consecuencia el cáncer.

Como contraste de los oncogenes, están los genes supresores de tumores (son los inhibidores de la proliferación celular), cuando su función es suprimida por una mutación, ocurre también un descontrol en la división celular. Al parecer la mayoría de los tumores son causados por mutaciones en varios genes, incluyendo a los proto-oncogenos y a los genes supresores de tumores. Las mutaciones en las células somáticas están también involucradas en otros problemas de salud como enfermedades cardiovasculares, catarata senil, y ciertas enfermedades del aparato digestivo y envejecimiento, (Brusick *op. cit.*).

### 3.2 Efectos en el medio ambiente

En cuanto a la contaminación ambiental en México, el agravamiento del problema con relación a los ecosistemas acuáticos merece un énfasis particular, considerando la diversidad de las vías a través de las cuales esta contaminación puede ocurrir. Incluye, el lanzamiento de desechos industriales a las aguas residuales, sin un tratamiento previo, y también en las aguas superficiales, el transporte de sustancias tóxicas tales como plaguicidas, herbicidas y fertilizantes empleados en la agricultura o de contaminantes tóxicos cuya disposición no fue hecha de manera individual. Por otro lado, se debe reflexionar también que los problemas subsecuentes causados por los efectos tóxicos en estos ecosistemas no se limitan a los desequilibrios ecológicos provocados en los cuerpos receptores de agua. Se contempla la posibilidad de que ocurran fenómenos de bioacumulación, es decir, la persistencia de contaminantes tóxicos a lo largo de la cadena alimenticia, incluyendo al hombre.

Estudios realizados en plantas y animales nativos en el medio ambiente impactaron por los resultados obtenidos, ya que están expuestos a desechos peligrosos o efluentes industriales, proporcionando una evidencia adicional de efectos genotóxicos. Klekowski y Levin en 1979, estudiaron un río con exceso de contaminación producida por el efluente de una fábrica de papel y pulpa, reportando un aumento significativamente estadístico en mutaciones de los cromosomas de las plantas recolectadas a lo largo del río contaminado cuando este efecto fue comparado con las plantas que crecen en un sitio no contaminado. Estudios en peces de agua dulce y salada mostraron altas incidencias de neoplasmas en especies que se encuentran en canales contaminados con desechos industriales, peces expuestos a la contaminación industrial en el río Rin presentaron daño citogenético (Prein *et al.*, 1978; Alink *et al.*, 1980). Una clara asociación fue demostrada entre la exposición de desechos peligrosos y aberraciones cromosómicas en roedores de campo que se encuentra en estos sitios (Thompson *et al.*, 1988; McBee *et al.*, 1987).

Se sabe que el medio ambiente participa activamente en el aumento de la incidencia de enfermedades hereditarias, sin embargo, el cálculo de tal participación es difícil al tratar de correlacionarlo con el hombre, ya que se debe considerar la escala del tiempo, pues a medida que siguen su curso las generaciones, existirá una variedad de formas diferentes de exposición.

La evidencia de que únicamente el 10% de los agentes químicos hechos por el hombre han sido evaluados adecuadamente en cuanto a su capacidad de causar mutaciones (Brusick *et al.*, 1992) lleva a reflexionar sobre la gran importancia de la existencia de metodologías rápidas y eficientes para probarlos, esto ha originado una extensa cantidad de estudios que se han realizado y que han generando importantes datos científicos. Los progresos en este campo se deben, en gran parte, al desarrollo y uso de bioensayos genéticos de tiempo corto. Su simplicidad y sensibilidad al daño genético, el tiempo, el bajo costo de experimentación y la pequeña cantidad de muestra y material requerido para el análisis, ha permitido la investigación en la toxicología genética con estas pruebas. Los resultados de bioensayos genéticos son importantes para la salud humana debido a que el blanco toxicológico es el ADN, que existe en todas las formas de vida celular. Los resultados obtenidos con compuestos que mostraron ser reactivos con el ADN son extrapolados a las especies donde se producen efectos similares.

### 3.3 Conceptos básicos sobre el material genético

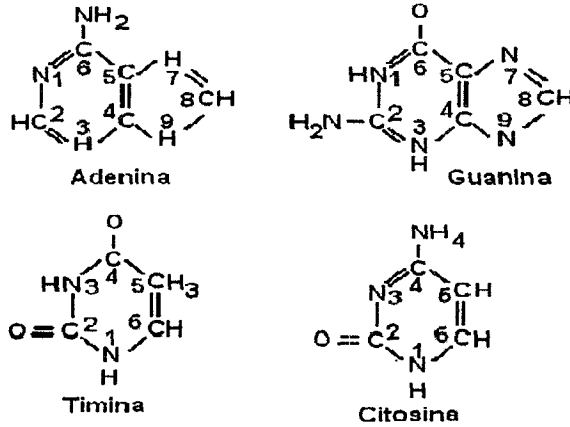
#### 3.3.1 Ácido desoxirribonucleico

La información genética de una célula esta dentro de una molécula de doble hebra denominada ácido desoxirribonucleico (ADN). Las moléculas del ADN, son cadenas de nucleótidos formadas por una base nitrogenada, un azúcar, la desoxirribosa y un fosfato. Las bases nitrogenadas son púricas, como la adenina y la guanina, y pirimidicas, como la citosina y la timina (Figura 1).

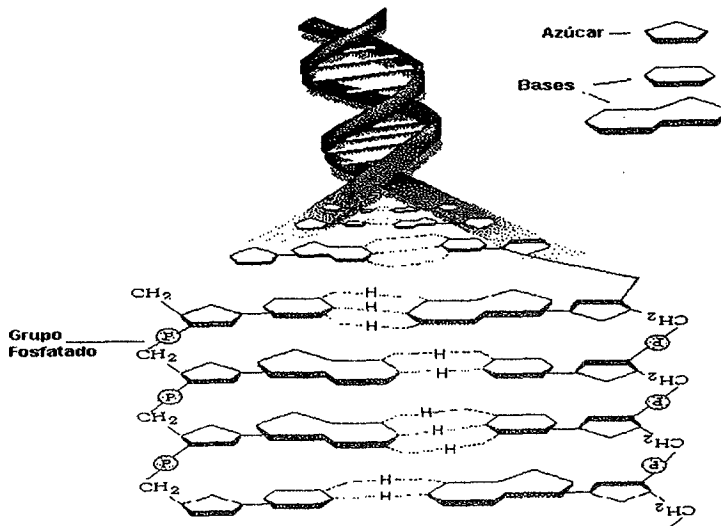
El modelo de la doble hélice describe la conformación de las moléculas del ADN en el espacio. Cada hélice es una cadena de nucleótidos que se mantiene unida a través de puentes fosfodiéster, de tal manera que el grupo fosfato forma un puente entre los grupos OH de dos azúcares adyacentes (Figura 2). Las dos hebras son complementarias, es decir, están orientadas en dirección opuesta, se mantienen unidas entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases nitrogenadas, las cuales se aparean complementariamente. Debido a la estructura química de las moléculas, la adenina sólo puede aparearse con la timina mediante dos puentes de hidrógeno, y la citosina con la guanina con tres puentes de hidrógeno. A diferencia de los enlaces covalentes, los puentes de hidrógeno son relativamente débiles, hecho que es muy importante para las funciones que realiza esta macromolécula esencial (Rodríguez, 1995), pues estos enlaces se pueden hacer y deshacer con relativa facilidad. Esto significa que la información codificada

en la secuencia está duplicada: cada una de las hebras contiene toda la información. Así cuando las cadenas se separan, cada una puede servir para regenerar la cadena opuesta. Este proceso se llama replicación, y explica cómo la molécula de ADN es capaz de transmitir información de padres e hijos (Soberón, 1996).

**Figura 1. Bases nitrogenadas del ADN.**

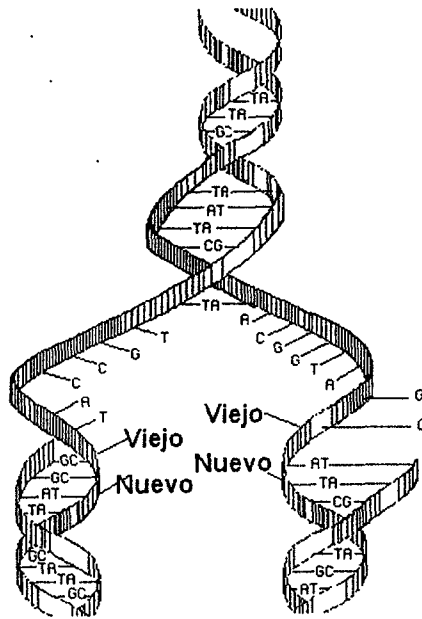


**Figura 2. Estructura y Replicación del ADN.**



Los organismos utilizan una enzima, la ADN polimerasa, para llevar a cabo la duplicación del material genético, usando las propias hebras como molde, a este proceso se le denomina duplicación semiconservativa (Figura 3). El proceso de duplicación como la manutención del ADN dentro de la célula debe ser un proceso libre de errores, para garantizar la información genética de las especies y el adecuado funcionamiento de la célula. Sin embargo, a veces el cambio de un solo aminoácido es suficiente para alterar la función de una proteína. Estos cambios en la estructura de las proteínas son producto de alteraciones o mutaciones en la secuencia de bases de un gen en particular. Si llegan a ocurrir lesiones en la molécula de ADN, tales como rompimiento de la hebra, transferencias, adiciones o deleciones de las bases nitrogenadas, la célula recurrirá a diversos mecanismos de reparación, que restauraran en la medida de lo posible, la molécula original. Cuando este proceso no se efectúa bien, la lesión que se mantiene se denomina mutación.

**Figura 3. Esquema de la duplicación semiconservativa del ADN.**



Las mutaciones son cambios al azar que ocurren en el material genético y que se heredan a la siguiente generación. Existen mutaciones puntuales, o microlesiones que se dan entre los genes, los cuales cambian a una nueva forma alélica,

también hay mutaciones de la estructura, o del número cromosómico denominadas macrolesiones.

Las mutaciones puntuales ocurren en forma natural debido a errores poco frecuentes durante la duplicación del ADN, o a daños espontáneos en la molécula. Los errores ocasionales en el apareamiento de las bases durante la síntesis de ADN ocasionan sustituciones de una base original por otra (Figura 4).

**Figura 4. Tipos de mutaciones de puntuales.**



Molde de ADN

Val  $\longrightarrow$  Thr



Transición  
A T  $\longrightarrow$  C G  
y viceversa

Gli  $\longrightarrow$  Thr



Transversión  
A T  $\longrightarrow$  T A ó  
C G  $\longrightarrow$  G C

Asp  $\longrightarrow$  Thr



Delección  
(el par A = T sufre delección)

Asp  $\longrightarrow$  Leu



Inserción  
(el par G  $\equiv$  C es adicionado)

Ala  $\longrightarrow$  His

Existen otras mutaciones, como las que ocurren por corrimiento del marco de lectura, *mutación frameshift* que se deben a la adición o a la delección de una o más bases nitrogenadas del ADN durante la replicación. La información contenida en los genes es "escrita" en codones de tres bases (tripletes) (Tabla 2). Las mutaciones que alteran los codones que especifican un determinado aminoácido para codones de punto final, son denominados codones sin sentido y pueden ser del tipo ocre (UAA), umbar (UGA) y ámbar (UAG).

**Tabla 2. Diccionario de los tripletes del código genético. El tercer nucleótido de cada codón (en negrita), es menos específico que los dos primeros. La dirección de lectura es 5' → 3'. Ejemplo, pUpUpA = leucina.**

	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UCC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Ocre	UGA	Opal
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Ámbar	UCG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	UGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	UCC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	UGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	UCG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	ACC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	ACG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GCC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GCG	Gly

Lehninger, 1976

Las mutaciones cromosómicas son aquellas donde ocurren cambios en el número o en la estructura de los cromosomas. Estas alteraciones se detectan analizando las células eucariontes bajo el microscopio. En el humano, la falta de un cromosoma, o su presencia en números mayores al diploide, genera diversas



alteraciones frecuentemente asociadas con retraso mental severo, períodos de vida cortos y con esterilidad.

Las mutaciones son procesos que se presentan en frecuencias muy bajas en las poblaciones naturales, sin embargo, los cambios que ocurren en el material genético pueden ser inducidos por agentes físicos o químicos, llamados agentes genotóxicos, que aumentan considerablemente su frecuencia. La inducción del daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en etapas. Inicialmente el agente xenobiótico entra al organismo, es absorbido, se distribuye y atraviesa las membranas. Dentro de la célula, el agente puede tener un comportamiento reactivo por sí mismo (es decir, de acción directa), o puede ser activado por enzimas metabólicas, de esta manera la acción es indirecta, a estos agentes se les denomina promutágenos. Ocurre entonces la interacción con el ADN, la cual puede ser reparada de manera eficiente e ineficiente de tal forma que el daño genético inicial permanecerá o no, esto se expresa en diferentes niveles celulares (Rodríguez *op cit.*) (Figura 5).

### 3.4 Categorías de sustancias mutagénicas

Sustancias que se ha determinado son peligrosas debido a efectos mutagénicos pertenecen a las siguientes categorías:

Categoría 1 sustancias que se conocen son mutagénicas al humano;

Categoría 2 sustancias que deben considerarse como si fueran mutagénicas al humano;

Categoría 3 sustancias que causan preocupación al humano debido a posibles efectos mutagénicos, con respecto a la información disponible no demuestra satisfactoriamente daño genético heredable.

#### 3.4.1 Categoría 1

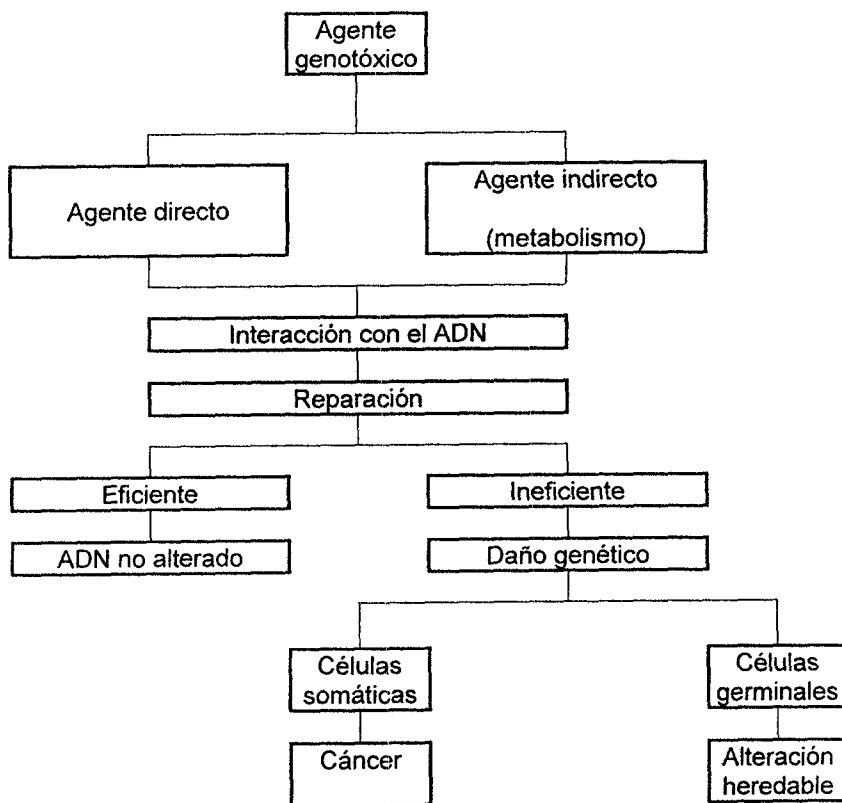
En esta categoría una sustancia es clasificada como tóxica (R46) si hay evidencia suficiente para establecer una asociación causal entre exposición humana y daño genético heredable. Se requieren evidencias positivas de estudios de epidemiología de mutación en el humano. Se ha reconocido que es extremadamente difícil obtener información fidedigna de estudios de incidencia de mutaciones en poblaciones humanas, o posibles incrementos en sus frecuencias.

#### 3.4.2 Categoría 2

Una sustancia en esta categoría es clasificada como nociva si hay evidencia suficiente, principalmente sobre la base de estudios en animales y otra información pertinente, proporcionando una fuerte presunción de exposición al

humano que resulta en el desarrollo de daño genético heredable. Se requieren resultados positivos de pruebas que muestren: (a) efectos mutagénicos; o (b) interacciones celulares relevantes a mutagenicidad, en células germinales de mamíferos *in vivo*; o (c) efectos mutagénicos en células somáticas de mamíferos *in vivo* en combinación con evidencia clara de que la sustancia o metabolitos alcanzan las células germinales

**Figura 5. Etapas del daño genético inducido por agentes genotóxicos (Rodríguez, 1995).**



### 3.4.3 Categoría 3

Incluye sustancias clasificadas como nocivas (R40) si hay evidencia de estudios de mutagenicidad apropiados, que concierne a la exposición humana pudiendo

resultar en el desarrollo de daño genético heredable, cuando hay evidencia insuficiente para poner a la substancia en la Categoría 2. Se requieren resultados positivos en pruebas que muestren: (a) efectos mutagénicos; o (b) otra interacción celular pertinente a mutagenicidad en células somáticas de mamíferos *in vivo*. Este último, puede ser sustentado por resultados positivos de pruebas de mutagenicidad *in vitro*.

### 3.5 Origen de los bioensayos empleados en la detección de agentes mutagénicos

En la actualidad existen más de 200 pruebas de corta duración que utilizan microorganismos, insectos, plantas, y animales y que han sido desarrolladas en un lapso de tiempo de 20 a 25 años para ayudar en la identificación de agentes que poseen un peligro genético a los humanos (DeMarini *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1988). Las pruebas pueden ser separadas en grupos con base al sistema biológico empleado. Los bioensayos con procariontes (bacterias) detectan agentes que inducen mutaciones en el gene y daño principalmente al ADN. Incluyendo en esta categoría a la prueba de mutagenicidad de *Salmonella* o prueba de Ames. Las pruebas con eucariontes (pruebas con hongos, plantas, y cultivos de células de mamíferos) detectan un amplio rango de daño genético, incluyendo mutaciones en los genes, daño y reparación al ADN, daño cromosómico, y aneuploide.

La literatura publicada sobre la genotoxicidad de agentes químicos y mezclas complejas que se encuentran en el medio ambiente permite hacer una compilación y análisis de esta información.

Históricamente, el descubrimiento fue hecho por Auerbach, en 1941, al encontrar que un gas de la semilla de mostaza provocaba mutaciones en *Drosophila melanogaster*, demostrándose primero la mutagénesis química inducida (Auerbach y Robson, 1946; Auerbach, 1973). A pesar de su implicación descubierta en el área de la salud humana, la mayoría de los genetistas entre 1940 y 1950 estaban interesadas en usar las mutaciones indirectas para entender mejor los procesos genéticos y celulares. En los años 60s, surgió la necesidad de controlar las grandes cantidades de productos lanzados al medio ambiente. Dándose inicialmente atención al efecto de las mutaciones en las células germinales, capaces de causar enfermedades hereditarias, en esa época fueron desarrollados, varios ensayos de mutagenicidad *in vivo*. A pesar de la teoría de mutación somática y cáncer que debió haber sido expuesta muchos años antes no había experimentos que asociaran definitivamente a los mutágenos químicos con el proceso de la carcinogénesis.

Esta teoría fue retomada cuando el Dr. Bruce Ames (Ames *et al.*, 1973) y su grupo. Desarrollaron una prueba *in vitro*, de corta duración, que combinada con un sistema de metabolización *in vitro* (Fracción S9, Malling, 1971) mostró una alta correlación entre varios mutágenos y carcinógenos conocidos (McCann *et al.*, 1975; Commoner *et al.*, 1978; McCann y Ames, 1976; Purchase *et al.*, 1978;

Simmon, 1979). Esta prueba es conocida actualmente como la prueba de Ames considerada muy importante en la historia de la genética toxicológica.

Es antes del final de los 70s cuando se demostró la correlación que existe entre diversos agentes químicos, y el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Esta correlación se estableció debido a que la mayoría de los carcinógenos actúa de manera directa o indirecta en el ADN, causando cambios que pueden ser heredables (Rodríguez, 1995).

Durante todos estos años la discusión acerca de que si los ensayos de mutagénesis de corta duración daban una respuesta de alerta temprana para prevenir la carcinogénesis, dio lugar al desarrollo de varias pruebas. En la Tabla 3 se muestran, en forma resumida, algunos de los ensayos más utilizados, no sólo con microorganismos, sino con diferentes sistemas biológicos.

Esta hipótesis no sólo implicó que la prueba de Ames fuera revisada de nuevo, sino que se introdujeron varias cepas nuevas a la misma y se modificó el protocolo original, generándose de esta manera, una cantidad enorme de información sobre la mutagénesis potencial de millares de agentes químicos y de mezclas complejas ambientales.

La prueba de *Salmonella* desarrollada por el Dr. Bruce Ames y sus colaboradores en los 70s (Ames *et al.*, 1973; y corregida por Maron y Ames en 1983), es la prueba de mutagenicidad más citada, ha sido usada en todo el mundo por más de dos décadas para evaluar la genotoxicidad de agentes químicos puros y mezclas complejas ambientales; presenta una gran sensibilidad para la detección de daño al ADN. El efecto sobre el ADN ha sido también valorado usando otro tipo de bacterias y cultivo de fibroblastos humanos, y el daño al cromosoma ha sido evaluado usando hongos, plantas, y cultivos de células de mamífero. Las pruebas *in vivo* de corta duración, son generalmente más complejas y caras que las pruebas *in vitro*.

La prueba de Ames emplea un juego de cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* que requieren de histidina, para detectar mutaciones inducidas por un agente de prueba. Esta es llamada prueba de mutación reversa debido a que las cepas de prueba son mutadas en el operón de la vía de biosíntesis de la histidina y, consecuentemente, no pueden sintetizar la histidina, un aminoácido necesario para su crecimiento, una mutación adicional es requerida para revertir las células a histidina independientes

Para incrementar la susceptibilidad de las cepas de *Salmonella* a los mutágenos, se hicieron varias modificaciones a las cepas originales. Modificaciones que incluyeron la remoción del sistema de reparación por excisión al ADN de la bacteria, resultando en una disminución en la habilidad de la bacteria para corregir el daño al ADN y la pérdida parcial de la estructura de polisacáridos de la pared

celular, permitiendo de esta manera la penetración de grandes moléculas de mutágenos a la célula (algunos como hidrocarburos aromáticos policíclicos). Presentan también la adición de una pieza extra-cromosomal llamada plásmido (pKM101), quien codifica para el sistema SOS propenso a error, y ha sido insertado en algunas de las cepas de prueba. Las cepas que contienen el plásmido reparan incorrectamente ciertos tipos de daño al ADN y existe más probabilidad de expresar una mutación.

**Tabla 3. Pruebas de corta duración para la detección de efectos genotóxicos**

Tipo de Prueba	Pruebas específicas	Organismos y/o otros tipos de células empleadas
Daño primario al ADN en microorganismos	Prueba de reparación de ADN	<i>Escherichia coli</i> pol A <sup>+</sup> /pol A <sup>-</sup> <i>Bacillus subtilis</i> rec <sup>+</sup> /rec <sup>-</sup>
	Cromotest (SOS)	<i>Escherichia coli</i> PQ37
	Inductest	<i>Escherichia coli</i> WP2/TH008
	Prueba de recombinación (mitótica y conversión génica).	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D4 y D7
	Prueba de bioluminiscencia – BLT	<i>Vibrio fischeri</i>
Mutación génica en bacterias o hongos	Prueba de Ames	<i>Salmonella typhimurium</i>
	Prueba de Kado	<i>Salmonella typhimurium</i>
	Prueba de fluctuación	<i>Escherichia coli</i> WP2 o <i>Salmonella typhimurium</i>
	Prueba de mutación directa (hacia adelante)	<i>Salmonella typhimurium</i> TM667
	Prueba de mutación con levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S138 y S211
	Otras pruebas con hongos	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Neurospora crassa</i>
Mutación génica en sistemas superiores	Prueba de timidina – quinasa – TK (mutación directa)	Células de linfoma de ratón L5178y
	Prueba de HGPRT – hipoxantinaguanidina (fosforibosil transferasa) (mutación directa)	Células de ovario de hamster chino (CHO), Células de pulmón de hamster chino (V79) y fibroblastos humanos.
	Prueba de recesivo letal ligado al sexo	<i>Drosophila melanogaster</i>
	Prueba en plantas	<i>Tradescantia paludosa</i> <i>Allium cepa</i> <i>Vicia faba</i>

Environmental Assessment – Short – term tests for carcinogens, mutagens and other genotoxic Agents – EPA – 625/9-79-003

Algunas de las cepas de prueba contiene mutaciones frameshift (adición o delección de nucleótidos dentro de la molécula de ADN) y puede ser revertida solo por agentes que inducen frameshift. Otras cepas contienen mutaciones de sustitución de pares de bases (nucleótidos alterados) y pueden ser revertidos sólo por agentes que inducen sustituciones de pares de bases.

Algunos de los productos químicos que se analizan, necesitan ser metabolizados *in vivo* para que sus derivados presenten actividad mutágena, y son llamados pro-mutágenos o mutágenos indirectos (ejemplo, benzo[a]pireno, aflatoxina B1). Esto fue en principio una deficiencia de las pruebas con procariontes debido a que a la bacteria le faltan enzimas con actividad metabólica presente en los mamíferos. Algunas de estas enzimas activan sustancias transformándolas en compuestos electrofílicos que se unen covalentemente al ADN. Para eliminar esta deficiencia, el metabolismo de mamíferos puede ser imitado *in vitro* por la adición de un homogenado de células de hígado de rata tratado con Aroclor 1254, que induce un aumento de enzimas (CYP) en este órgano. La fracción S9 de hígado es adicionada con pH y cofactores adecuados para que las reacciones de metabolización ocurran, activándose muchos componentes que de otra manera podrían no ser mutagénicos en bioensayos *in vitro*.

### 3.5.1 Principales bioensayos con microorganismos

Son varios los bioensayos bacterianos basados en la mutación reversa, dentro de ellos podemos mencionar la prueba reversa de Ames y varias de sus modificaciones, también han sido desarrolladas basadas en la inducción de la respuesta, así como otras pruebas que emplean bacterias deficientes en reparación, y por último pruebas basadas en la luminiscencia. Todas son descritas brevemente en las Tablas 4, 5, 6, y 7.

El análisis de la información bibliográfica permitió seleccionar dos técnicas para el logro de los objetivos enunciados. La primera de ellas es la prueba de incorporación en placa de Ames y la segunda la prueba de microfluctuación. Ambas técnicas se basan en un sistema biológico análogo que genera información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos o agentes químicos, en estado natural o disueltos en agua.

**Tabla 4. Principales pruebas de mutación reversa**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Prueba de Ames	Cepas: TA1535, TA100, TA1538, TA1537, TA97a, TA98, TA100, TA102 y TA104.	Actualmente es la prueba más empleada y la única validada a gran escala por diversos laboratorios	Maron y Ames, 1983 Barnes <i>et al.</i> , 1982 Isono y Yourno, 1974 Maron y Ames, 1983 Ames <i>et al.</i> , 1975b Levin <i>et al.</i> , 1982a
Método de incorporación en placa (preincubación)		Procedimiento especialmente referido para muestras con compuestos no polares, ejemplo, muestras oleosas.  Genera respuestas significativas reproducibles, es trascendental cuando se evalúan muestras ambientales y se realizan evaluaciones en agentes químicos, siendo esenciales en la gestión de control de estudios de evaluación de calidad ambiental.	Maron y Ames, 1983 CETESB, 1993  Valent, 1990

**Tabla 5. Pruebas modificadas respecto a la prueba de Ames**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Método directo	<i>Salmonella typhimurium</i> (emplea las mismas cepas de la prueba de Ames)	Método aplicable a muestras ambientales líquidas (efluentes industriales y lixiviados) sin concentración previa). Es un instrumento valioso en la evaluación de efluentes industriales mutagénicos, principalmente. Refuerza respuestas negativas o disminuidas después de la extracción con resinas absorbentes	Coriell Institute for Medical Research, 1986. Coelho <i>et al.</i> , 1992

**Tabla 5. Pruebas modificadas respecto a la prueba de Ames (continuación)**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Prueba de Kado (ensayo de microcuspensión)	<i>Salmonella typhimurium</i> (emplea las mismas cepas de la prueba de Ames)	<p>Con base en el mismo principio, que la prueba de Ames, el efecto es similar que en la prueba de preincubación.</p> <p>Se aplica en el análisis de extractos de partículas atmosféricas inhalables (&lt;10 µm), cuya cantidad recolectada es mínima, y útil en muestras ambientales líquidas después de extracción/concentración, cuando se dispone de poca cantidad de muestra.</p> <p>Validada para muestras ambientales, se analizó su sensibilidad a material particulado.</p>	<p>Kado <i>et al.</i>, 1983</p> <p>CETESB, 1991</p> <p>Sato <i>et al.</i>, 1991</p>
Prueba espiral de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> (emplea las mismas cepas de la prueba de Ames)	<p>Método automatizado, elimina la necesidad de diluciones seriadas de la muestra y el uso de múltiples placas. Emplea equipo especial para dosificar la muestra (spiral plater). Las colonias son analizadas por un contador de colonias láser unido a una computadora.</p> <p>Es una prueba validada, y ha sido aplicada para el análisis de muestras ambientales de antimutágenos.</p>	Houk <i>et al.</i> , 1989



**Tabla 5. Pruebas modificadas respecto a la prueba de Ames (continuación)**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Prueba de Ames acoplado a cromatografía de capa fina (TLC/Prueba de <i>Salmonella</i> )	<i>Salmonella typhimurium</i> (emplea las mismas cepas de la prueba de Ames)	<p>Se aplicó un método de fraccionamiento a la muestra denominado cromatografía de capa fina este fue acoplado de manera eficiente a la prueba de Ames.</p> <p>Específico para probar mezclas complejas. Tiene especial aplicación cuando la muestra presenta alta toxicidad, como el caso de algunos residuos sólidos industriales (refinación de aceites combustibles), emisiones atmosféricas de incineradores o otros procesos industriales.</p>	Bjorseth <i>et al.</i> , 1982 Houk y Claxton, 1986 (efectúan modificación).
Prueba de fluctuación	<i>Salmonella typhimurium</i> (emplea las mismas cepas de la prueba de Ames)	<p>Se aplica en la evaluación de mutagenicidad de agua tratada y en procesos de tratamiento en efluentes industriales, puede constituir un ensayo de investigación inicial en el monitoreo de la calidad del agua. La alta sensibilidad de la prueba, permite compararla con la prueba de Ames convencional.</p> <p>Posee la desventaja de que la prueba solo fue validada sin activación metabólica, no detectando promutágenos.</p>	Luria y Delbruck, 1943. Green <i>et al.</i> , 1976 (validación con <i>E. Coli</i> WP2 en tubos). Gatehouse <i>et al.</i> , 1978 (adaptación de cepas de la prueba de Ames a microescala). Valent, 1990.

**Tabla 5. Pruebas modificadas respecto a la prueba de Ames (continuación)**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Prueba de fluctuación	<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> ; WP2 con plásmido pKM101 (CM881) y WP2 <i>uvrA</i> con pKM101 (CM891)	<p>La prueba es recomendada para la evaluación de mutágenos débiles o mezclas complejas que presentan toxicidad</p> <p>Es usada en evaluación de efluentes industriales.</p> <p>Es importante considerar que esta prueba fue validada sin S9; es decir, solo detecta mutágenos directos.</p>	<p>Green <i>et al.</i>, 1976</p> <p>Van Kreijl <i>et al.</i>, 1980 (adaptación a microplaca para análisis de mtras líquidas).</p> <p>Sanchez <i>et al.</i>, 1988</p>
Pruebas de mutación hacia delante	<i>Salmonella typhimurium</i> TM677	<p>Usada en la evaluación de mezclas complejas, y adaptada a microescala. Además una sola cepa puede responder a diferentes tipos de mutágenos, no exigiendo el uso de múltiples cepas como en las pruebas reversas.</p> <p>Empleada en la evaluación de mutagenicidad de muestras de aire. Aunque deben más estudios para mejorar las condiciones de prueba y para aumentar su reproducibilidad.</p>	<p>Skopek <i>et al.</i>, 1978</p> <p>Sato <i>et al.</i>, 1991</p>

**Tabla 6. Pruebas basadas en la inducción de la respuesta SOS**

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Inductest (prueba de inducción de fago)	<i>Escherichia coli</i> WP2 ( $\lambda$ ) lisogénica para un profago lambda	<p>Empleada en la evaluación de genotoxicidad de agentes químicos y de mtras. ambientales líquidas y atmosféricas.</p> <p>Es particularmente importante en la evaluación de genotoxicidad de pesticidas y metales que suministran normalmente respuestas negativas en la prueba de Ames.</p>	<p>Moreu <i>et al.</i>, 1976                      Rossmann <i>et al.</i>, 1985                      (adaptación a microescala)</p> <p>Houk y DeMarini 1987; DeMarini y Brooks 1992</p>
Cromotest (SOS Chromotest)	<i>Escherichia coli</i> PQ37 ( $\beta$ -galactosidasa)	<p>Validada para la evaluación de agentes químicos puros. Aplicada en mtras. atmosféricas, sedimentos, agua bruta y tratada. Tiene algunas ventajas con relación a la prueba de Ames, entre ellas: efectuarse con mtras no esterilizadas previamente, presenta una respuesta rápida (6-8 horas), ciertos compuestos son de preferencia detectados (metales, pesticidas, agentes neoplásicos y agentes inhibidores de la síntesis de ADN).</p>	<p>Quillardet <i>et al.</i>, 1982                      Quillardet <i>et al.</i>, 1985                      CETESB, 1992                      (prueba efectuada en tubos)                      Environmental Bio Detection Products Inc, 1992 (desarrollo la prueba en microplaca)</p>

Tabla 6. Pruebas basadas en la inducción de la respuesta SOS (continuación)

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
		En muestras atmosféricas, se encontró mayor sensibilidad con esta prueba en la detección de genotoxicidad al compararla con la prueba de Ames. La reproducibilidad es buena, sin embargo aún son necesarios algunos estudios sobre su empleo con activación metabólica.	Sato <i>et al.</i> , 1991
UMU - TEST	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535 modificada, presenta una fusión en el operón <i>UMU::lacZ</i> , plásmido multi-copia pSK1002, produce $\beta$ -galactosidasa.	Se comparo <i>UMU-Test</i> , SOS-cromotest y la prueba de Ames (TA98 y TA100). Se concluyo que el <i>UMU-Test</i> y la prueba de Ames presentaron respuestas y sensibilidades similares, en este caso, el SOS fue sensible para la detección de mutágenos directos, pero presento menor sensibilidad en la detección de pro-mutágenos.	Oda <i>et al.</i> , 1985 McDaniels <i>et al.</i> , 1990

Tabla 7. Otras pruebas

Prueba	Organismo empleado	Observaciones	Fuente bibliográfica
Prueba basada en la luminiscencia	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Detecta compuestos a concentraciones que no son detectadas en la prueba de Ames. Se probaron diversos agentes químicos a través de esta prueba que fueron compuestos negativos para la prueba de Ames, (lindano, safrole y orto-toluidina) y demostraron su actividad genotóxica.	Ulitzur, 1982
MUTATOX™	<i>Vibrio fischeri</i> M169	<p>Empleada en el análisis de muestras de sedimento. A pesar de ser una prueba nueva necesita de más estudios de validación, se esta considerando como una prueba de investigación adecuada debido a su sensibilidad, rapidez de respuesta y simplicidad.</p> <p>Ha sido empleada en extractos de aguas de río y sedimento la respuesta depende del método de extracción/concentración empleado</p>	<p>Microbics Corporation (desarrollo del sistema). Elmore y Fitzgerald, 1990 (evaluación con agentes químicos) Johnson <i>et al.</i>, 1992a, 1993 (protocolo de prueba) Kwan <i>et al.</i>, 1990, Johnson <i>et al.</i>, 1992a, 1992b y Ho y Quinn, 1993</p> <p>Dutka <i>et al.</i>, 1991.</p>

Se seleccionaron estas dos pruebas de termino corto con base a los criterios: (1) por las investigaciones que se han realizado con ambos sistemas ratificando su validez, (2) por su utilidad demostrada para evaluar agentes químicos puros y mezclas complejas ambientales, y (3) por su simplicidad y bajo costo relativo. Además de que ambas pruebas se efectúan de manera diferente, la prueba de incorporación en placa de Ames se realiza con una metodología tradicional mientras que la prueba de microfluctuación se realiza mediante un sistema automatizado, esto permitirá evaluar las diferencias en la capacidad de detección entre ambos sistemas.

A continuación se describe la esencia de las dos técnicas analíticas a instrumentar:

### 3.6 Prueba de Ames

Desarrollada por Ames. *et al.*, 1975, esta prueba, también conocida, como prueba de incorporación en placa de Ames ha ganado reconocimiento mundial como una prueba bacteriana de investigación para mutágenos. Emplea varias cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina para su crecimiento en medios carentes de este aminoácido revirtiendo el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de la histidina, y consecuentemente detectar una amplia variedad de mutágenos. Actualmente esta prueba, es la más utilizada a escala mundial, realizándose en alrededor de 2000 laboratorios (Sobels, 1985), debido a la alta especificidad de las cepas de *Salmonella typhimurium* para la detección de los compuestos mutagénicos y a que presentan, además, una alta sensibilidad.

### 3.7 Prueba de microfluctuación

Fue originalmente diseñada por Green *et al.*, (1976), como un procedimiento de prueba en tubo. Es una prueba simple que también usa cepas de *Salmonella typhimurium* para la detección de los compuestos mutagénicos. En la actualidad se realiza en microplacas multipozos para la detección de mutágenos directos comparado favorablemente con el método original para la detección de mutágenos químicos. La prueba probada con microplacas es sensitiva y se ha determinado de gran potencia para algunos compuestos (Gatehouse, 1978, 1979). Esta basada en el mismo fundamento que la prueba de incorporación en placa de Ames, y se ha registrado que la prueba de microfluctuación es más sensitiva que la prueba de incorporación en placa de Ames para ciertos compuestos mutagénicos (Legaul *et al.*, 1994). Este procedimiento ofrece características atractivas, por ejemplo, pueden analizarse muchas muestras (o réplicas) con una cantidad mínima de espacio y materiales (medio, microplacas, pipetas, etcétera). La realización de la misma es casi totalmente automatizada. Obteniéndose resultados en tres días.

### 3.8 Variantes de la prueba de Ames y microfluctuación

El uso de ambas técnicas en la detección de agentes químicos potencialmente mutagénicos al humano presenta dos variantes:

1. Sin activación metabólica
2. Con activación metabólica, se requiere la adición de fracciones homogéneas de hígado de rata directamente sobre la placa de medio mínimo de glucosa. Para incorporar un aspecto importante del metabolismo de mamíferos dentro de las pruebas *in vitro*, debido a que una amplia variedad de premutágenos requieren de este tipo de activación metabólica para su posterior detección como mutágenos.

Estas dos variantes permiten analizar muestras de agua potable, residual, tratada y lixiviados, para detectar mutágenos antes de su uso y/o reuso. En general, en ambas pruebas se busca generar la curva dosis-respuesta, la cual es valiosa en la detección de la concentración mínima efectiva de mutágenos en agentes químicos y muestras ambientales.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La instrumentación de las pruebas de incorporación en placa de Ames y de microfluctuación requirieron del desarrollo de las siguientes actividades:

### 4.1 Cepas mutadas

El desarrollo de las técnicas analíticas: pruebas de incorporación en placa de Ames y de microfluctuación requirió de la donación de cepas mutadas y certificadas. Estas cepas fueron donadas por el laboratorio del Dr. Ames, Departamento de Bioquímica dependiente de la Universidad de Berkeley, California, CA 94720, USA. Las cepas donadas son las siguientes:

*Salmonella typhimurium* TA97a

*Salmonella typhimurium* TA98

*Salmonella typhimurium* TA100

*Salmonella typhimurium* TA102

*Salmonella typhimurium* TA1535

*Salmonella typhimurium* TA1537

*Salmonella typhimurium* TA1538

### 4.2 Características de las cepas mutadas

Todas las cepas de *Salmonella typhimurium*, requirieron una serie de pruebas para evaluar las características genéticas de las mismas con la finalidad de constatar los marcadores genéticos necesarios para la detección de mutágenos en las muestras a analizar (Tabla 8).

Estas cepas mutadas de prueba poseen características específicas de crecimiento, las cuales al cambiar proporcionan información del potencial mutagénico de las muestras analizadas.

#### 4.2.1 Requerimientos de histidina para su uso en la prueba de mutagenicidad

Cada cepa de prueba estándar contiene un tipo diferente de mutación en el operón de la histidina. Además de esta mutación, las cepas contienen otros tipos de mutaciones que incrementan mucho su capacidad para detectar mutágenos.



#### 4.2.2 Mutación (*rfa*)

Esta mutación causa pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubren la superficie de la bacteria, incrementando la permeabilidad y por lo tanto permite la entrada de moléculas grandes, tales como benzo[a]pireno que no es capaz de penetrar la pared de la célula normal (Ames *et al.*, 1973a).

#### 4.2.3 Mutación (*uvrB*)

Produce una supresión de un código en el gen para el sistema ADN de reparación por escisión, incrementando la sensibilidad para la detección de mutágenos (Ames *et al.*, 1973a). Por razones técnicas, la escisión del gen *uvrB* se extiende a través del gen *bio* y como consecuencia, estas bacterias también requieren biotina para su crecimiento. Únicamente la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102 no contiene este tipo de mutación. La *uvrB* se construyó para la detección de mutágenos que requieren un sistema de reparación por escisión intacta.

#### 4.2.4 Plásmido factor R, pKM101 y pAQ1

Las cepas estándar TA97a, TA98, TA100, y TA102 contienen el plásmido factor R pKM101, gen resistente a la ampicilina. La cepa TA102 además del plásmido anteriormente descrito, también contiene el plásmido multicopia factor R pAQ1, el cual lleva la mutación *hisG428*, y posee un gen resistente a tetraciclina. Las cepas con factor-R se revierten con mutágenos que se detectan débilmente (Levin *et al.*, 1982a).

#### 4.3 Tasa de reversión espontánea

La reversión espontánea de cepas de prueba dependientes de histidina se mide rutinariamente en experimentos de mutagenicidad y se expresa como el número de revertantes espontáneos por placa. Las colonias revertantes son claramente visibles sobre la placa de agar.

Cada cepa de prueba revierte espontáneamente con una frecuencia característica (Tabla 8). El número de revertantes espontáneos durante 48 horas de incubación es dependiente del número final de auxotrófos en la placa y el número está en función de la concentración de histidina. El número de revertantes espontáneos por placa es completamente independiente del número inicial de células bacterianas inoculadas, cuyos límites son de  $10^5$  a  $10^8$  células/mL (Green y Muriel, 1976).

Se han contado las bacterias auxotróficas pero se asume que este número varía debido a que la concentración de histidina no es homogéneamente constante. No obstante, hay variabilidad en el número de revertantes espontáneos de un experimento a otro y de una placa a otra, por lo que se requiere hacer por

triplicado placas control de mutación espontánea para cada cepa en una prueba de mutagenicidad. Esto es esencial cuando los compuestos de prueba son mutágenos débiles.

**Tabla 8. Características genéticas de las cepas de *Salmonella typhimurium***

Cepa	Mutación para histidina	Tipo de mutación	Blanco de mutación	Tasa de reversión espontánea	LPS <sup>2</sup>	Reparación	Mutación para biotina	Plásmido
TA1535	HisG46	substitución de pares de base	GC	20-35	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB^3$	bio-	-
TA1537	HisC3076	Frameshift	GC	5-25	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	-
TA1538	HisD3052	Frameshift	GC	15-35	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	-
TA97a	HisD6610	Frameshift	GC	90-180	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	pKM101 (Ap) <sup>4</sup>
TA98	HisD3052	Frameshift	GC	25-75	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	pKM101 (Ap)
TA100	HisG46	substitución de pares de bases	GC	75-225	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	pKM101 (Ap)
TA102	HisG428	substitución de pares de bases	AT	240-320	<i>rfa</i>	+	bio+	pKM101 (Ap) <sup>4</sup> pAQ1 (Tt) <sup>5</sup>
TA104	HisG428	substitución de pares de bases	AT	245-475	<i>rfa</i>	$\Delta uvvB$	bio-	pKM101 (Ap)

1. *his*: mutación responsable de la síntesis de histidina
2. LPS: permeabilidad de la membrana de polisacáridos
3.  $\Delta uvvB$ : delección del gene *uvvB*

4. Ap<sup>r</sup>: ampicilina resistente
5. Tt<sup>r</sup>: tetraciclina resistente

#### 4.4 Procedimiento para la conservación de las cepas mutadas

El procedimiento aquí descrito se inició con la recepción de las cepas mutadas y se procesaron conforme al procedimiento detallado en la Figura 6.

##### 4.4.1 Conservación de las cepas

Las bacterias obtenidas llegaron en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsitas de plástico con agar blando para evitar su desecación. Dichos discos fueron colocados con pinzas estériles, en recipientes con capacidad de 3 a 5 veces mayor con respecto al volumen del cultivo (5 mL de caldo nutritivo), incubándose durante un tiempo aproximado de 18 horas a una temperatura de 37 °C con agitación aproximada de 150 a 170 r.p.m. para evitar la formación de espuma. Así mismo, se aseguró una aireación adecuada (Ames *et al.*, 1975b).

Después de este periodo de incubación el crecimiento de la cepa de prueba en caldo nutritivo debe tener una densidad aproximada de  $2 \times 10^9$  células/mL.

El crecimiento obtenido se divide en dos partes, y de cada una de estas partes se realiza el procedimiento descrito en 4.4.1.1 y 4.4.1.2.

#### 4.4.1.1 Cepas de prueba para almacenamiento

##### 4.4.1.1.1 Reproducciones de cultivos

La preparación de las cepas requirieron de un cultivo fresco de 18 horas al cual se le adicionó dimetilsulfoxido (DMSO) como agente crioprotector.

El crecimiento del cultivo se realizó en caldo nutritivo fresco a una densidad de 1 a  $2 \times 10^9$  bacterias/mL. Por cada 0.9 mL de cultivo, se agrego 0.1 mL de DMSO de calidad espectrofotométrica. Se homogeneizo el cultivo y DMSO en un tubo estéril, frasco o botella, según el número de cultivos permanentes que se prepararon. Se agito suavemente hasta que se disolvió el DMSO y se distribuyo el cultivo asépticamente en criotubos (Nunc) estériles, etiquetados previamente, adicionándoles un volumen de 1.0 mililitro.

El llenado de los tubos siempre se mantuvo cerca del limite de su capacidad (1.5 mL) debido a que al congelarse se genera una expansión. De esta manera, se elimina el espacio de aire en la superficie y ayuda a disminuir el daño oxidativo. Se colocaron los tubos en un recipiente con hielo seco hasta que se congelaron y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a  $-70$  °C.

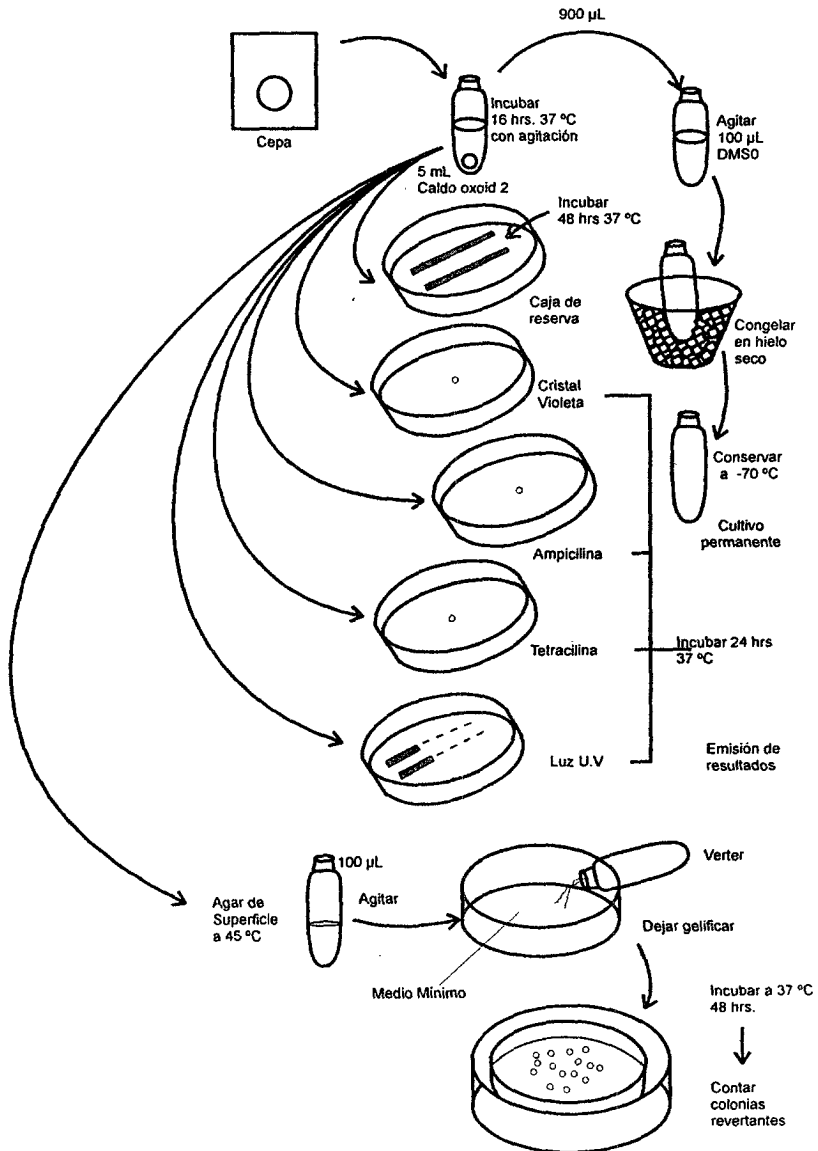
Fue necesario hacer reproducciones múltiples de cada cepa. Cuando se abrieron muchas veces los cultivos permanentes (congelados) para tomar un inóculo bacteriano, se originaron problemas con las cepas de prueba al sacarlos demasiado tiempo del congelador. Como prevención de descongelamiento, los cultivos permanentes se pusieron en un recipiente con hielo seco, regresándose al congelador en cuanto fue posible. Después de que un cultivo permanente fue usado por varios meses o abierto por lo menos 10 veces, se desecho y se abrió otro. Sólo una persona debe tener acceso a estos cultivos; puesto que se debe tomar la precaución de no contaminarlos y de no permitir su descongelamiento bajo ninguna circunstancia.

##### 4.4.1.2. Reproducción de cultivo a corto plazo y confirmación de genotipos de cepas de prueba

Este se realizó con la finalidad de obtener cajas de reserva de la cepa de prueba, de asegurar el estado óptimo de la cepa mutada que se va a utilizar para la realización del análisis y, además en los siguientes casos:

- a) cuando se preparan cultivos para liofilizar,
- b) cuando el número de revertantes en placa, baja espontáneamente fuera de lo normal o
- c) cuando hay una pérdida de sensibilidad a mutágenos estándar.

Figura 6. Procedimiento de evaluación de marcadores genéticos de las cepas de *Salmonella typhimurium*, (Maron & Ames, 1983).



Todos los reactivos, cristalería, cajas de Petri, asas ó palillos, y compresas de algodón fueron utilizados estériles.

Conforme al diagrama esquemático mostrado en la Figura 6, la segunda parte del cultivo de crecimiento de la cepa mutante se utiliza para la realización de cinco pruebas, dentro de las que se incluyen:

#### 4.4.1.2.1 Placa maestra

Los cultivos de las cepas de prueba se deben tener en este tipo de placas para utilizarse como la fuente de bacterias para inocular cultivos de 18 horas. Pueden emplearse durante un periodo de dos meses con la finalidad de evitar problemas de aire en los cultivos congelados cuando éstos se abren frecuentemente. Estas placas contienen agar medio mínimo glucosa enriquecida con histidina y biotina. Aquellas placas que se usen para cepas con factor-R, se les adiciona ampicilina, y para TA102, se agrega ampicilina/tetraciclina. Las mismas deben mantenerse a una temperatura de 4 °C (Figura 7).

Poco antes de terminarse el tiempo de vigencia de esta caja o su contenido (dos meses), se efectuó el siguiente proceso:

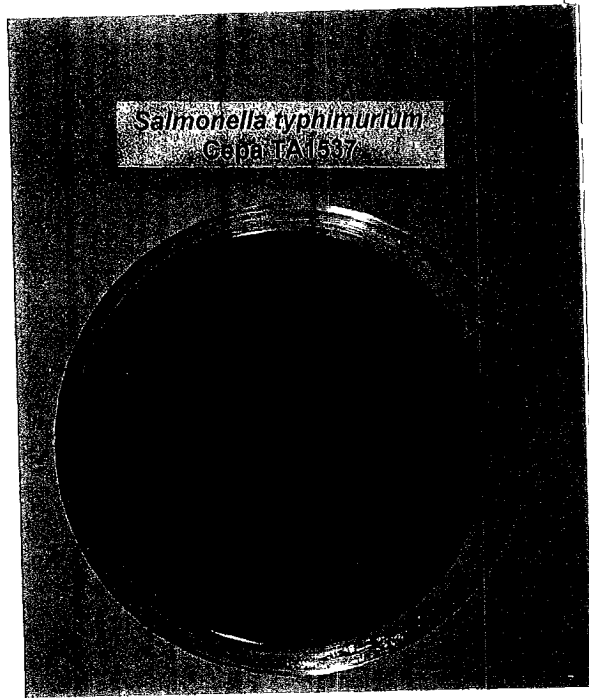
De un vial de la cepa congelada permanentemente, se tomó un inóculo de bacterias raspando de la superficie. El raspado se transfirió a un matraz erlenmeyer el cual contenía 30 mL de caldo nutritivo. Se incubó 16-18 horas a 37 °C. Para asegurar una aireación adecuada, se agitaron los cultivos aproximadamente a 150-170 r.p.m. A partir de este inóculo, se tomo una asada y se estrío en la superficie de una placa con agar nutritivo de manera de obtener colonias aisladas. Se incubó 24 horas a 37 °C.

Las colonias que crecieron de manera aislada se seleccionaron (seleccionando mínimo diez); posteriormente se transfirieron una a una a tubos de ensaye que contenían 5 mL de caldo nutritivo. Se incubó a 37 °C, con agitación 150 a 170 r.p.m. durante 12-16 horas.

Después del periodo de incubación, se inocularon los cultivos en agar nutritivo en forma de estrias gruesas y se incubaron las placas invertidas a 37 °C por 24 horas.

Las placas maestras se sellaron con parafilm y se almacenaron durante dos meses, en refrigeración (4 °C). La placa maestra específicamente de la cepa TA102 podrá almacenarse por dos semanas, como máximo, después de ese periodo, la tasa de reversión espontánea se eleva significativamente, por lo tanto la hace inadecuada para su utilización.

**Figura 7. Placa maestra de la cepa mutante de *Salmonella typhimurium* TA1537.**



#### 4.4.1.2.2 Requerimiento de histidina

El carácter  $his^-$  de las cepas de prueba, se confirma demostrando el requerimiento de histidina para su crecimiento sobre placas de agar selectivos. Se requiere biotina también para todas las cepas estándar (excepto TA102) a causa de la supresión *uvrB* que se extiende a través del gen *bio*. Estos nutrientes se adicionan al agar medio mínimo de glucosa antes de verterlo a las placas de prueba. Las placas control contienen biotina pero no histidina, se guardan en bolsas de plástico y se almacenan a 4 °C por aproximadamente siete días.

Con este objetivo, las placas fueron sembradas por medio de estrías a partir de un cultivo de 16 a 18 horas sobre cajas conteniendo medio mínimo de Vogel Bonner con biotina (control negativo). Se hace lo mismo sobre medio mínimo complementado con histidina/biotina. Se probaron de cinco a seis cultivos en una

misma placa, debidamente identificada, marcando el número correspondiente a cada cultivo probado, número de localización de la cepa y número de la caja de Petri. Se incubaron las placas en forma invertida a 37 °C (por una noche) y se verificó la presencia de crecimiento. El criterio fue que sólo debe haber crecimiento sólo en las cajas complementadas con histidina (Figura 8).

#### 4.4.1.2.3 Mutación *rfa*

Las cepas con carácter de rugoso (*rfa*), se probaron por su sensibilidad, al cristal violeta (Ames *et al.*, 1973). A partir de un cultivo en caldo nutritivo (de una noche) se sembró la superficie de una placa de agar nutritivo con ayuda de un asa, dejándola secar y con una pinza previamente flameada, se colocó en el centro de la placa de agar nutritivo un disco de papel filtro esterilizado de 5 mm de diámetro, embebido con 10 µL de solución de cristal violeta 0.1%.

Las placas invertidas se incubaron a 37 °C por 24 horas y se verificó la presencia de una zona clara de inhibición de crecimiento (Figura 9). De acuerdo con Maron, 1983, todas las cepas de *Salmonella typhimurium* deberán presentar una zona de inhibición de crecimiento no menor de 14 mm de diámetro, esto indica la presencia de la mutación

#### 4.4.1.2.4 Mutación *uvrB*

Cepas con carácter deficiente, deben probarse por su sensibilidad a luz ultravioleta (Ames *op. cit.*, 1973) De la misma manera que la mutación *rfa*, se partió de un cultivo en caldo nutritivo (de una noche) y se sembró en la superficie una placa de agar nutritivo, con ayuda de un asa. Se retiró la tapa de la caja de Petri y se cubrió la mitad con una cartulina o papel aluminio. Posteriormente se irradió la placa con una lámpara germicida de 15 W, a una distancia de unos 33 centímetros. La exposición de las cepas que contienen plásmido pKM101 (TA97a, TA98, TA100 y TA102) fue por ocho segundos; las cepas sin plásmido pKM101 (TA1535, TA1537 y TA1538) fue de seis segundos.

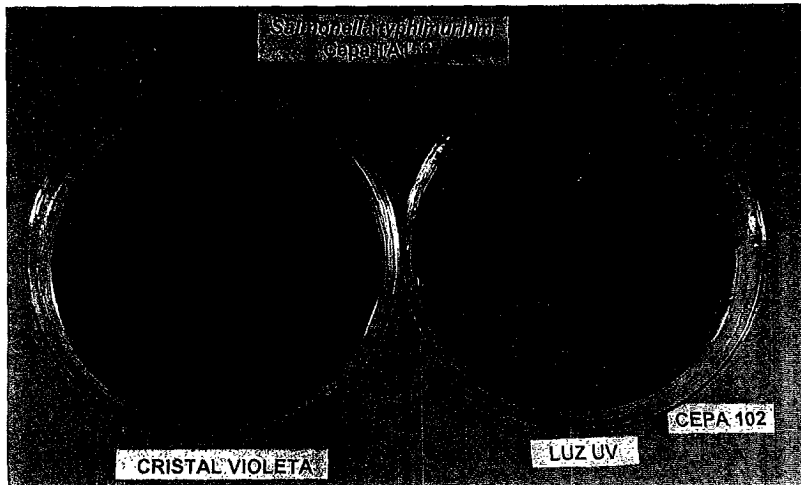
Se incubaron las placas invertidas a 37 °C por 24 horas y se verificó la presencia de crecimiento.

Las cepas con delección *uvrB* crecieron solamente en la mitad de la placa no irradiada. La cepa TA102, que no presenta esa delección, creció en toda la placa (Figura 9).

Figura 8. Requerimiento de histidina. Del lado izquierdo se observa el nulo crecimiento debido a la falta de histidina en el medio. Del lado derecho se observa el crecimiento de las cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina.



Figura 9. Mutaciones *rfa* y *uvrB*. La mutación *rfa* en *Salmonella typhimurium* TA1537 se manifiesta por una zona de inhibición causada por cristal violeta. Del lado derecho no se presenta mutación *uvrB*; en la parte superior se observa un halo de inhibición de esta cepa, esto se debe a que no presenta sistema de reparación por excisión mientras que la cepa TA102 si lo presenta, esto se manifiesta por crecimiento como se muestra en la parte inferior de la caja.





#### 4.4.1.2.5 Presencia del plásmido factor R pKM101

Las cepas con factor R (TA97a, TA98, TA100, y TA102) se probaron rutinariamente mediante la presencia del factor de resistencia a la ampicilina, debido a que el plásmido es algo inestable y puede perderse fácilmente de la bacteria (McCann *et al.*, 1975b). La resistencia a la ampicilina ha sido identificada como un marcador adecuado que permite probar la presencia del factor R y le confiere mayor sensibilidad a la multicepa de *Salmonella* (Langer *et al.*, 1981).

Se inoculó a partir de un caldo nutritivo (de una noche) con un asa de inoculación, sobre la superficie de una placa de agar nutritivo, dejándola secar. Con una pinza previamente flameada, se colocó en el centro de la placa de agar nutritivo un disco de papel filtro esterilizado de 5 mm de diámetro, embebido con 10 µL de solución de ampicilina 8 mg/mL.

Se incubaron las placas invertidas a 37 °C por 24 horas y se verificó la presencia de una zona clara de inhibición de crecimiento. Las cepas resistentes a la ampicilina (TA97a, TA98, TA100 y TA102) no son inhibidas por el antibiótico, debiendo crecer. Las cepas sensibles a la ampicilina (TA1535, TA1537 y TA1538) presentaron un halo claro de inhibición alrededor del disco de ampicilina (Figura 10).

#### 4.4.1.2.6 Presencia del plásmido pAQ1

Se uso como un control para cepas con factor-R a tetraciclina, comprobándose la resistencia de las cepas a la ampicilina/tetraciclina. Para verificar la presencia del plásmido pAQ1 que confiere resistencia a tetraciclina, se procedió como en 4.3.1.2.5, substituyendo la solución de ampicilina por una solución de tetraciclina 8 mg/mL. Como lo menciona Maron (1983) la cepa TA102, es resistente a tetraciclina, no fue inhibida por el antibiótico, todas las demás presentan un halo de inhibición (Figura 10).

#### 4.4.1.2.7 Reversión espontánea

Maron (1983) menciona que se obtienen reversiones espontáneas variables, pero deben ser relativamente constantes dentro del mismo laboratorio. Los siguientes límites se basan en valores históricos: revertantes por placa sin fracción S9 TA97 de 90 a 180 colonias por placa, TA98 30-50, TA100 120-200, TA102 240-320. Los números deben ser ligeramente diferentes en placas con activación metabólica (con fracción S9). Cuando ésta se ve alterada, se procedió a desechar el stock bacteriano en uso y reemplazarlo por otro, el cual también se le verificaron las características propias del sistema.

Las colonias revertantes, prototróficas para la histidina, son fácilmente visibles en las placas de agar medio mínimo en contraste con las colonias auxotróficas, que formarían una fina capa de crecimiento bacteriano (esta observación se realiza con microscopio óptico).

Se fundió una cantidad suficiente de agar de superficie y se mantuvo en baño maría a 45 °C. Se distribuyeron alícuotas de 2 mL en tubos de 13 x 100 mm esterilizados, previamente mantenidos a 45 °C en calor seco.

Manteniendo los tubos en baño seco, se adicionó 0.1 mL del cultivo en caldo nutritivo (de 18 horas). Se agitó por tres segundos en vortex, bajando la velocidad se vertió en la placa con agar medio mínimo.

Se imprimieron movimientos circulares en la placa, de forma que el agar de superficie se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo. Se dejó el agar hasta que solidificó en una superficie plana. Posteriormente se incubó las placas invertidas a 37 °C por 48 horas.

Las colonias revertantes fueron contadas como colonias individuales además de revisar la fina camada de crecimiento. Se calculó el promedio aritmético de las tres placas y de cada caldo de cultivo probado se comparó la tasa de reversión espontánea y la prueba se acepta si esta dentro de los límites presentados anteriormente (Figura 11).

Es conveniente señalar que pueden observarse diferencias en el número de colonias revertantes espontáneas con el tiempo, más no debe haber una variación extrema de un experimento a otro. Un desvío de colonias revertantes que este fuera de las variaciones aceptables, es una indicación de que las características genéticas de las cepas de prueba deben ser verificadas.

Las cepas, que presentaron una tasa de reversión espontánea dentro de los límites normales y todas las características genéticas necesarias fueron congeladas, para mantener un adecuado stock de cultivos permanentes. Las placas maestras nuevas fueron siempre obtenidas a partir de un cultivo stock permanente y nunca a partir de otra placa maestra, debido a la posibilidad de alteraciones en las características genéticas de las cepas y pérdida de plásmidos.

Una vez realizadas todas las pruebas anteriormente descritas para las cepas, se obtuvieron los resultados que se concentran en la Tabla 9.

Figura 10. Plásmidos factor R pKM101 y pAQ1. La cepa *Salmonella typhimurium* TA1537 no presenta este factor debido a la inhibición de crecimiento alrededor del antibiótico ampicilina/tetraciclina.

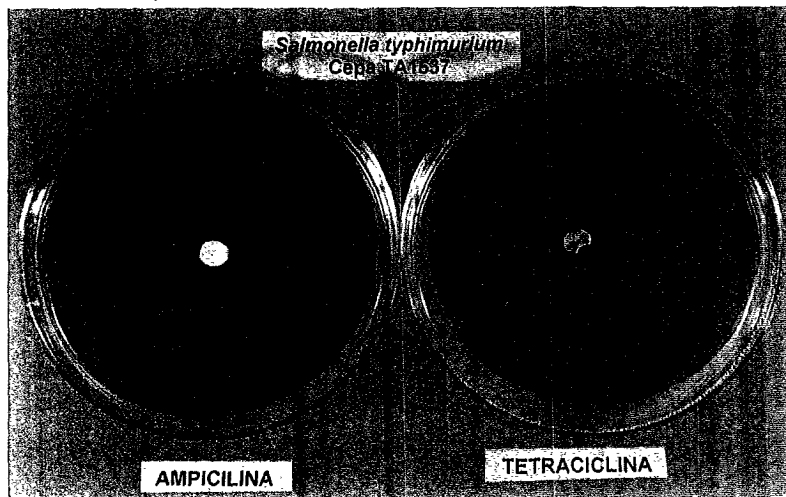
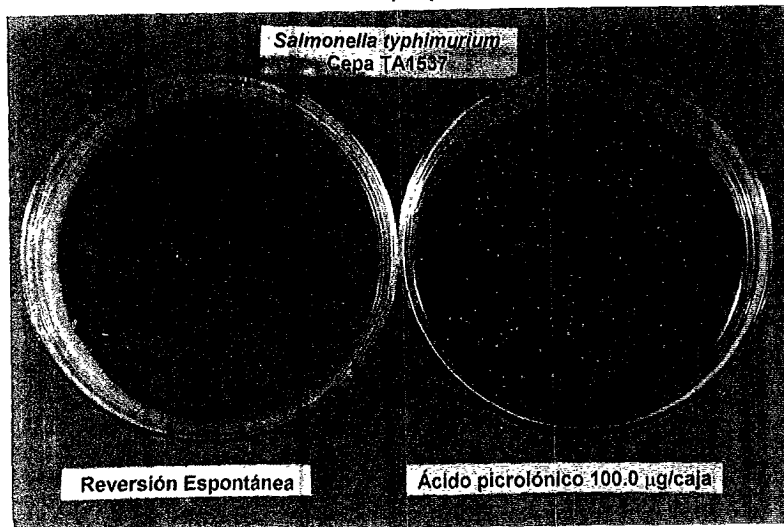


Figura 11. Reversión espontánea de la cepa *Salmonella typhimurium* TA1537 dependiente de histidina. Del lado izquierdo se observa una reversión espontánea, con una frecuencia característica de la cepa. Del lado derecho se observa esta reversión inducida por un agente mutagénico (ácido picrolónico) esta se manifiesta por un incremento en el número de revertantes por placa.



**Tabla 9. Verificación de marcadores genéticos de *Salmonella typhimurium***

CEPA	Resistencia		Mutación		His	His	Promedio de Reversión espontánea
	Ampicilina	Tetraciclina	rfa	uvrB			
TA97a	R	S	S	S	-	+	177
TA98	R	S	S	S	-	+	47
TA100	R	S	S	S	-	+	191
TA102	R	R	S	R	-	+	313
TA1535	S	S	S	S	-	+	32
TA1537	S	S	S	S	-	+	25
TA1538	S	S	S	S	-	+	50

S = sensible R = Resistente += Crecimiento -= No hubo crecimiento

De acuerdo con los datos mostrados, se concluyó que las cepas presentan todas las características genéticas necesarias para emplearlas como cepas estándar en la realización de la prueba de Ames y de microfluctuación. La verificación del buen estado de las cepas adquiridas permitió la realización de cultivos permanentes. Contándose con cultivos a corto plazo y cultivos permanentes de todas las cepas.

#### 4.5 Procedimiento de la prueba de Ames

La realización del análisis de la prueba de Ames o prueba de incorporación en placa de Ames, requirió preparar los siguientes reactivos:

##### 4.5.1 Agar de superficie

El agar de superficie contiene 0.6% de agar y 0.5% NaCl. Se esteriliza y se mantiene almacenado en refrigeración. Se usan tubos de cultivo (13 x 100 mm) con tapa de baquelita con porciones de 2 mL de agar de superficie.

##### 4.5.2 Placas de agar

Las placas para las pruebas de mutagenicidad contienen 30 mL de agar con agar medio mínimo de glucosa. El medio contiene 1.5% de agar Bacto-Difco y 2% glucosa en medio Vogel-Bonner. Se adicionaron 10 mL de una solución estéril de 0.05 mM L-histidina HCl /0.5 mM biotina a 100 mL de agar de superficie y se mezcla con agitación suave. La solución histidina/biotina se esteriliza por filtración o autoclave (Friederich *et al.*, 1982).

Las trazas de histidina en el agar de medio mínimo permiten a la bacteria en la placa sufrir varias divisiones y producir en la superficie de la misma un crecimiento débil que es poco visible (Maron y Ames, 1983), y que por consiguiente deben examinarse bajo un microscopio óptico. Un incremento adicional en la cantidad de histidina en la placa causa un crecimiento pesado en el fondo que enmascara los revertantes. Se requirió de placas desechables de plástico estéril (100 X 15 mm) esterilizadas por radiación gamma.

#### 4.5.3 Esencia de la prueba de incorporación en placa de Ames

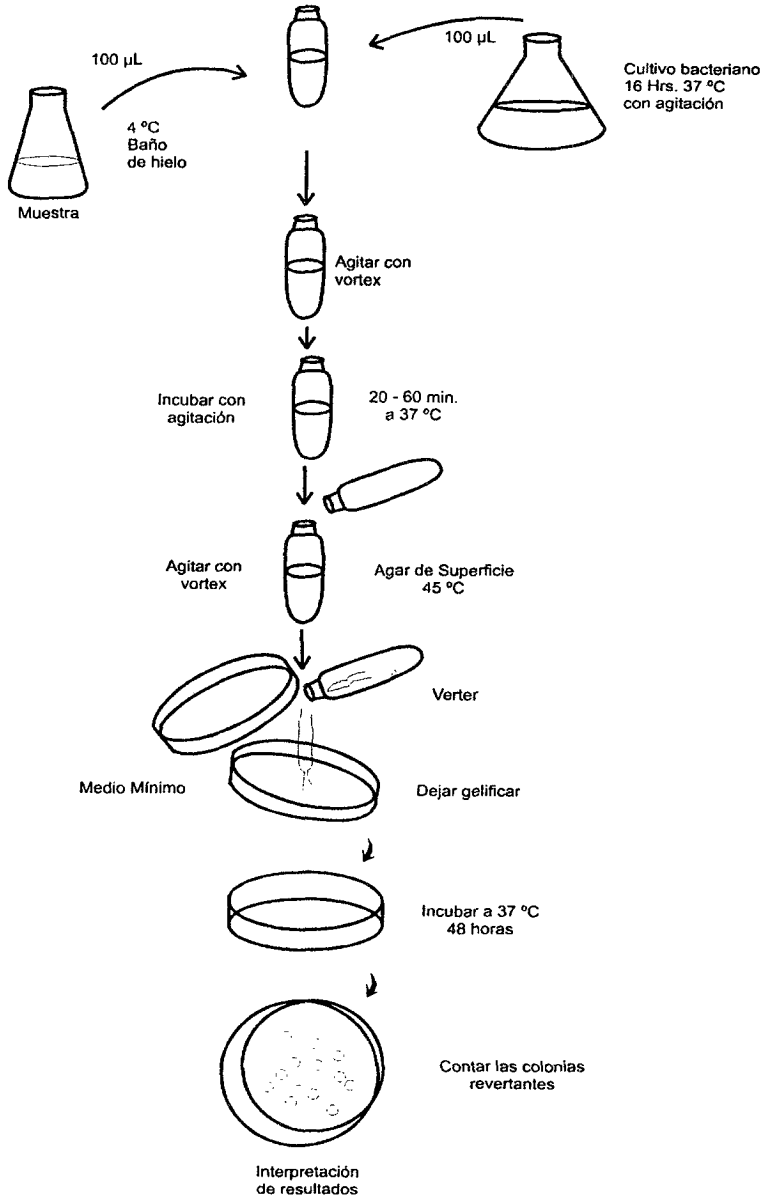
La prueba (Ames *et al.*, 1973a, 1973b, 1975b) consiste en combinar el compuesto a analizar, junto con la cepa de prueba bacteriana y la mezcla S9 en agar de superficie semisólido que se vierte sobre una placa de agar medio mínimo. Se incluyó también en cada prueba, controles positivos y negativos. Después de incubar a 37 °C por 48 horas, las colonias se contaron (Figura 12).

La prueba se efectuó con la siguiente secuencia:

- Se agregó 0.1 mL del compuesto químico a analizar, 0.1 mL de un cultivo de 16 - 18 horas de la cepa de prueba a tubos de cultivo de 13 x 100 mm con tapa de rosca. Posteriormente se adicionó 2 mL de agar de superficie a 45 °C.
- Se mezclaron los componentes de prueba con el agar blando en un vortex por tres segundos a baja velocidad y posteriormente se vació a la placa de agar medio mínimo de glucosa. Al verter la mezcla la distribución no se tomó más de 20 segundos; fue importante realizar una distribución uniforme del agar de superficie en la superficie de la placa, inclinando rápidamente y rotando la placa, se cubrió y se dejó endurecer sobre una superficie. Las placas se dejaron solidificar por varios minutos. Es importante seguir estos límites de tiempo.
- El compuesto a analizar se probó sin mezcla S9, siempre se incluyeron controles positivos y negativos.
- Los controles negativos contienen la bacteria, y solvente (pero ningún químico de prueba). Se requiere establecer el número de colonias que revierten espontáneamente por cada cepa de prueba.
- Los controles positivos contienen mutágenos conocidos y específicos para cada cepa de prueba.

Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 48 horas, las colonias revertantes en las placas de prueba y en la placa control se contaron usando un contador de colonias semiautomático tipo Quebec. La presencia del césped de fondo se confirmó en todas las placas.

**Figura 12. Método de incorporación en placa de Ames, (Maron & Ames, 1983).**



#### 4.6 Procedimiento para la prueba de microfluctuación

Para la realización de esta prueba, se requirió preparar los siguientes reactivos:

Medio Davis Mingoli I, D-glucosa, (5.5 x), D-glucosa (40%), D-biotina (0.1 mg/mL), L-histidina (1 mg/mL),

##### 4.6.1 Pasos previos de preparación al día de realizar la prueba

A partir de una placa maestra de *Salmonella typhimurium* TA1537 se tomó un inóculo y se cultivo en 20 mL de caldo nutritivo Oxoid No. 2. Se incubo a 37 °C durante 16 horas, con agitación a 150-170 rpm. Este cultivo fue requerido para la dilución de la suspensión bacteriana antes de realizar la prueba.

##### 4.6.2 Preparación de la muestra y colocación en la placa de prueba

- Antes de iniciar algún procedimiento, se reviso visualmente el crecimiento de la bacteria del cultivo de una noche ( $1 \text{ a } 2 \times 10^9$  células/mL en fase estacionaria).
- A partir de este cultivo se tomó un inóculo de 0.5 mL y transfirieron a 4.5 mL de caldo nutritivo Oxoid No. 2. Se incubó a 37 °C durante 3.5 horas, con agitación a 210 rpm, obteniendo un cultivo de  $1 \times 10^9$  células/mL en fase logarítmica).
- En matraces erlenmeyer conteniendo un volumen de 20 mL de medio Davis-Mingoli I, fueron inoculados con 100  $\mu$ L de cada una de las concentraciones del difosfato de cloroquina; así mismo se inocularon 200  $\mu$ L de suspensión bacteriana de 3.5 horas. Esto generó finalmente un inóculo de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/mL. Cada tratamiento fue después distribuido con precisión en alicuotas de 200  $\mu$ L en placas multipozos estéril (con tapas) conteniendo 100 pozos.

#### 4.7 Controles

##### 4.7.1 Control negativo

Consisten en un inóculo de la cepa y del propio solvente utilizado para la disolución del químico de prueba, en este caso agua.

##### 4.7.2 Control positivo

De la misma manera se incluyó para confirmar las propiedades de reversión y especificidad de la cepa. Si la sensibilidad de la cepa esta en duda dentro de los valores de reversión cuantitativos, se determinan por la incorporación de

mutágenos conocidos en el agar de superficie y se cuentan las colonias revertantes, (Tabla 10).

**Tabla 10. Controles positivos empleados en la prueba (Maron y Ames, 1983).**

Prueba	Compuesto	Solvente	Concentración por placa	Cepas
Sin activación (-S9)	Metil nitroso guanidina (MNNG)	DMSO	10.0 µg	TA100
	Ácido picrolónico	DMSO	100 µg	TA1537, TA1538, TA98
	Azida de sodio*	Agua destilada	5.0µg	TA1535, TA100
	Mitomicina C	Agua destilada	1.0 µg	TA102
Con activación (+S9)	2-aminofluoreno	DMSO	10.0 µg	TA1537, TA1538, TA98, TA100
	Benzo[a]pireno	DMSO	10.0 µg	TA1537, TA1538, TA98, TA100

DMSO-dimetilsulfoxido

Las soluciones de los compuestos mencionados arriba deben ser manipulados con máximo cuidado de forma de evitar cualquier contacto con el operador.

#### 4.8 Control de toxicidad

La toxicidad de una muestra o sustancia química en la prueba de incorporación en placa de Ames se verifica a través de un análisis rutinario de la presencia "del cespel de fondo" en las cajas de prueba de agar medio mínimo. En los casos de la presencia de toxicidad (este cespel estará ausente o reducido) por lo que se debe de tomar el criterio de reducir las concentraciones de las muestras o sustancias químicas a analizar.

##### 4.8.1 Control de viabilidad

La viabilidad de un cultivo de una noche se evaluó después de una dilución a  $10^{-7}$  y un inóculo de 100 µL fue distribuido con una varilla de vidrio (asa de Drigalski) sobre agar nutritivo. Esta dilución se obtuvo realizando el siguiente procedimiento:

A partir de un cultivo de una noche (16-18 horas) con agitación de 150 a 170 rpm y 37 °C se obtiene una concentración aproximada de  $1 \text{ a } 2 \times 10^9$  células/mL.

Posteriormente se transfirieron, asépticamente, 100 µL del cultivo inicial a un frasco conteniendo  $100 \pm 2$  mL de agua de dilución, preparando así una dilución de 1000 veces. Se homogeneizo el contenido no menos de 25 veces, inclinando el frasco, formando un ángulo de aproximadamente 45 grados. De esta primera



dilución, se transfirió, asépticamente, 100  $\mu$ L de la dilución a un frasco conteniendo 100  $\pm$  2 mL de agua de dilución, y se procedió a homogeneizarlo. A partir de esta última dilución, se transfirió, asépticamente, por duplicado, 100  $\mu$ L a una placa de agar nutritivo.

Con una varilla de vidrio en forma de "L" (asa de Drigalski), debidamente flameada y estriada, se tocó levemente la superficie del agar nutritivo conteniendo él inóculo y se ejecutaron movimientos circulares, hasta que él inóculo quedó uniformemente distribuido en la placa de Petri conteniendo medio de cultivo.

Se incubaron las placas de manera invertida a 37 °C por 24 horas y proceder a su conteo. El cálculo del número de bacterias por mL es hecho multiplicándose por el promedio de los contenidos obtenidos en las dos placas por  $10^7$ . El resultado es expresado en número de bacteria por mL. Ese valor deberá estar entre 0.5 a  $2 \times 10^9$  células por mililitro.

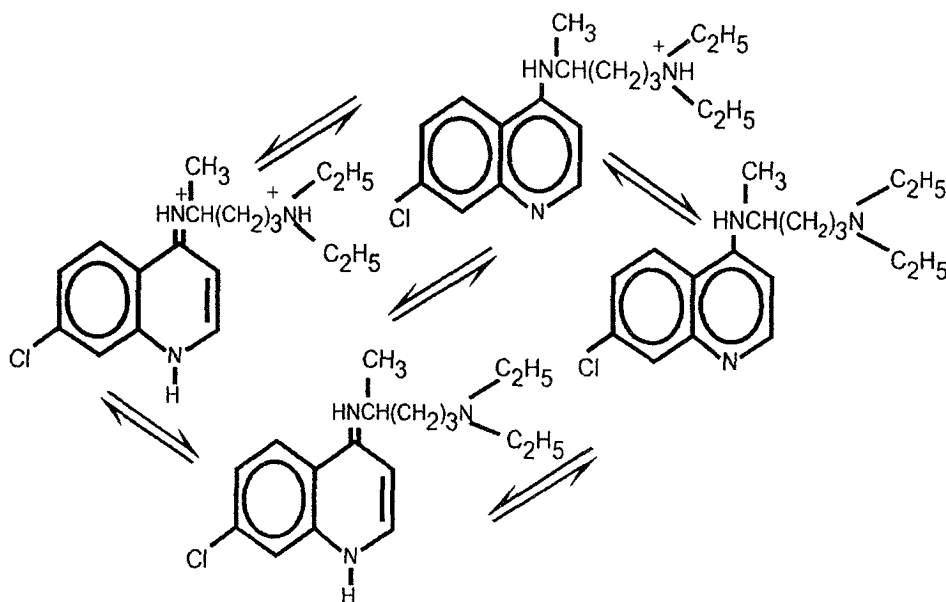
## 5. INSTRUMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS

### 5.1 Material y condiciones experimentales

#### 5.1.1 Agente químico de prueba

Se emplea difosfato de cloroquina (Sigma chemicals; Figura 13), por ser un mutágeno débil de acción directa, detectado por la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537, deficiente en el proceso de reparación por escisión (*uvrB*).

Figura 13. Estructura química del difosfato de cloroquina



Se usa en el tratamiento de malaria e infecciones de amebicidas, el medicamento daña el "cerebro" de los protozoarios, tiene múltiples usos, incluyendo prevención y tratamiento de algunas formas de malaria (*Plasmodium vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, y infecciones de *P. falciparum*).

La cloroquina es un veneno potencialmente letal frecuentemente caracterizado por un deterioro rápido en un paciente evidentemente "sano" cuando es administrado en dosis elevadas.

El mecanismo de efecto tóxico: la cloroquina es una base débil y se concentra lentamente dentro de las células, las concentraciones intracelulares son 60 veces más elevadas que el nivel en sangre. El medicamento tiene la capacidad de cruzar la placenta y se asocia con anomalías fetales (Curry *et al.*, 1996)

Se seleccionó este agente químico por razones de disponibilidad, manipulación práctica y actividad genotóxica conocida. Previamente registrado como genotóxico de acción directa débil en la categoría 2 (Espinosa, 1989), el compuesto se probó sin mezcla S9.

Agua grado reactivo estéril, se usó en la preparación de las soluciones del difosfato de cloroquina. Las soluciones stock y diluciones de trabajo fueron preparadas el mismo día de la realización de la prueba.

#### 5.1.2 Control positivo

Se empleo ácido picrolónico (Sigma chemicals) el cual es un mutágeno de referencia, fue disuelto en dimetilsulfoxido grado espectrofotométrico (DMSO, Sigma chemicals) a una concentración de 100 µg/mL por placa. Las soluciones stock preparadas con DMSO se guardaron a 4 °C durante la duración de la prueba en tubos eppendorf (2 mL), este control fue incorporado en cada prueba.

#### 5.1.3 Control negativo

Se utilizó agua, debido a que fue el solvente en el que disolvió el agente de prueba.

#### 5.1.4 Cepa de prueba

La cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537, se seleccionó para las pruebas de incorporación en placa y de microfluctuación sobre las bases de su sensibilidad y uso para la detección de mutagenicidad utilizando el difosfato de cloroquina. Esta cepa posee mutaciones *rfa*, *uvrB*: la primera permite la penetración de moléculas grandes como benzo[a]pireno a las células, el segundo disminuye la reparación por escisión al ADN. La cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537 revertirá de un estado auxotrófico (*his*<sup>-</sup>) a uno heterotrófico (*his*<sup>+</sup>).

#### 5.2 Concentraciones de prueba

Las concentraciones fueron seleccionadas previamente con base en un estudio realizado por Espinosa *et al.*, (1989), para obtener curvas dosis-respuesta. Se prepararon once diferentes concentraciones del compuesto químico (difosfato de cloroquina) con incrementos de 50 µg/mL, obteniéndose la siguiente escala de concentraciones : 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 µg/mL por placa.

### 5.3 Prueba de incorporación en placa de Ames

Se realizó con base en los procedimientos descritos por Maron y Ames (1983). El protocolo siguiente se apegó a:

- Colocar los tubos de ensayo (13 x 100 mm, con tapa de baquelita), en un número suficiente para realizar las pruebas por triplicado, en baño seco regulando la temperatura a 45 °C.
- Fundir el agar de superficie ("top agar") y mantenerlo a 45 °C.
- Adicionar 100 µL del difosfato de cloroquina en las concentraciones descritas por triplicado a los tubos de ensayo.
- Adicionar 0.1 mL de cultivo (de 16 a 18 horas) de *Salmonella typhimurium* TA1537.
- Agitar el tubo levemente por 3 segundos con ayuda de un vortex a baja velocidad y verter el contenido en una placa de agar medio mínimo conteniendo L-histidina y D-biotina (0.5 mM). Dejar solidificar en superficie plana. Incubar las placas invertidas a 37 °C por 48 horas.

Fueron incluidos controles positivos (100 µg/mL de ácido picrolónico + bacteria) y negativos (agua + bacteria y ausencia del agente de prueba). Todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. El número promedio de colonias desarrolladas (revertantes) en las tres placas sembradas para cada concentración de cloroquina se promediaron y fueron registradas.

Al realizar la lectura de las placas, verificar la presencia "del cesped de fondo" en las placas de prueba, en la frecuencia de reversión espontánea de las placas control (negativo) y la eficiencia del control positivo. El ensayo deberá ser repetido si el "cesped de fondo" estuviera ausente o alterado, o si la tasa de reversión espontánea estuviera fuera de lo esperado o si los controles positivos no tuvieran actividad mutagénica frente a la cepa de prueba.

### 5.4 Prueba de microfluctuación

La mezcla de reacción, medio Davis Mingoli I, se colocó en matraces estériles, uno por cada concentración de sustancia problema. Un volumen de 0.1 mL del cultivo de prueba fue adicionado a estos matraces. A cada matraz se le adicionó 0.2 mL del difosfato de cloroquina (100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 µg/mL). La mezcla de cada uno de los matraces problema se distribuyó en 15 pozos de una microplaca de titulación estéril a razón de 200 µL por pozo. Fueron incluidos controles positivos (0.2 mL de ácido picrolónico a concentración

de 100 µg/mL+ bacteria) y negativos (agua + bacteria y ausencia del agente de prueba). Todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 72 horas. Se realizó una incubación continua de la mezcla, los eventos mutacionales que ocurren son detectados y registrados cada hora: detección de turbidez en el medio (DO, densidad óptica) en cada pozo de la microplaca el empleo del equipo Bioscreen-C. Se espera que la variación entre las replicas de los pozos de cada concentración sean distribuidas de manera homogénea.

#### 5.4.1 Distribución de las muestras en la microplaca (Tabla 11)

1. Blanco del reactivo. Se colocaron 200 µL del diluyente (agua) en los pozos 1-15 de las columnas 1 y 2 sirviendo como control negativo.
2. Se distribuyeron 200 µL de la solución de ácido picrolónico dentro de los pozos 16-30 de las columnas 2 y 3.
3. Se usaron las columnas 4 a 20 para distribuir la mezcla (medio Davis-Mingoli I, bacteria, y las diferentes concentraciones de difosfato de cloroquina) realizando 15 replicas por concentración.

**Tabla 11. Distribución de las diferentes muestras en la microplaca.**

No.	Pozo	Replicas	Muestra	Concentración (µg/mL)
1	1...15	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i>	-
2	16...30	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + ácido picrolónico	100
3	31...45	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	100
4	46...60	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	150
5	61...75	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	200
6	76...90	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	250
7	91...105	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	300
8	106...120	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	350
9	121...135	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	400
10	136...150	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	450
11	151...165	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	500
12	166...180	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	550
13	181...195	15	MDMGI + <i>S. typhimurium</i> + cloroquina difosfato	600

## 6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 Aspectos de mutagenicidad del difosfato de cloroquina (7-chloro-4-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-quinoleína difosfato)

El uso de la cloroquina como solución patrón para la generación de los estándares utilizados en los trabajos analíticos desarrollados en el presente estudio se realizó con base en tres consideraciones: 1) amplio uso de esta sustancia como agente antimalario; 2) capacidad de formar complejos intercalantes con ADN, que actúan como un inhibidor de síntesis y reparación normal de ADN de células humanas y bacterianas (Schüpbach, 1979); y 3) lo contradictorio de los resultados que han sido reportados sobre efectos mutagénicos producidos por la cloroquina, utilizando *Salmonella typhimurium* TA1537; por ejemplo, mientras Schüpbach, *op. cit.* reporto que la cloroquina produce mutación inversa frameshift usando pruebas de fluctuación, Middleton y Wiseman (1981), empleando la prueba de incorporación placa de agar, reportaron que la cloroquina no fue mutagénica. Es probable que la cloroquina sea un mutágeno con riesgo carcinogénico, aunque faltan datos disponibles de carcinogenicidad (Schüpbach, *op. cit.*)

La estandarización de las dos técnicas analíticas seleccionadas, incorporación en placa de Ames y microfluctuación se limitó a evaluar la actividad mutagénica del difosfato de cloroquina (7-chloro-4-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-quinoleína difosfato) empleando la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537.

### 6.2 Determinación de pruebas de mutagenicidad

No obstante, que la prueba de incorporación en placa de Ames es una técnica estandarizada para medir los resultados de la mutación, la estimación de una tasa de mutación requiere conocer el número de células en riesgo de mutar y el número de células mutantes resultantes de la mutación. El análisis cuantitativo de los datos generados por ambas pruebas requiere establecer un criterio consistente para definir los resultados positivos y negativos, y la aceptación de los resultados generados por las pruebas y también para proveer un ámbito de trabajo que permita estimar el efecto mutagénico.

#### 6.2.1 Prueba de incorporación en placa de Ames

##### 6.2.1.1 Criterio para aceptación de resultados

El promedio de revertantes de las tres placas correspondiente al control negativo debe estar dentro de los límites establecidos para la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537, los cuales se muestran en la Tabla 8. Y el valor promedio del número de revertantes obtenidos en las placas del control positivo deberá ser igual o mayor a dos veces la tasa de reversión espontánea para la misma cepa.

### 6.2.1.2 Interpretación de resultados

La aceptación de la prueba se establece por la relación que existe entre el número de revertantes del control negativo — tasa de reversión espontánea esperada en las condiciones de prueba — y el control positivo.

El número promedio de revertantes inducidos (RI) por concentración de las placas problema con respecto al número promedio de revertantes espontáneos (RE) obtenido por las tres placas de control negativo se define como la razón de mutagenicidad (RM) (Bernstein *et al.*, 1982), la cual se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$RM = \frac{RI}{RE} \quad (1)$$

donde:

*RM* : Razón de mutagenicidad

*RI* : revertantes inducidos

*RE* : revertantes espontáneos

En consecuencia, el valor de *RM* permite definir una respuesta como positiva, cuando se cumplen las siguientes consideraciones: el número de revertantes en una o más series de placas por dosis de muestra de prueba es igual o mayor a dos veces el valor de *RM*; y el incremento en la cuenta de revertantes por concentración presente una dependencia en cuanto a la concentración; es decir, al incrementarse la concentración de la muestra de prueba, esta generalmente deberá acompañarse por un incremento en el número de revertantes por placa.

Consecuentemente, la respuesta positiva en la cepa de prueba — con o sin activación metabólica — es suficiente para designar que la muestra analizada es mutagénica.

## 6.2.2 Prueba de microfluctuación.

### 6.2.2.1 Criterio para aceptación de resultados

El control negativo registra la potencia de inducción espontánea, la presencia de una turbidez en estos pozos indica la funcionalidad de *Salmonella typhimurium* en la prueba. La presencia de una turbidez en los 15 pozos usados para el control positivo mayor a la del control negativo, debido a la acción de mutación inducida por el compuesto conocido (ácido picrolónico), indica que *Salmonella typhimurium* funciona apropiadamente.

Consecuentemente, la presencia de mayor turbidez en el control positivo que en el control negativo, nos permite afirmar que los resultados obtenidos son validos.

#### 6.2.2.2 Interpretación de los resultados

En esta prueba bacteriana se realiza una incubación continua de la bacteria con el compuesto, los eventos mutacionales que ocurren son detectados cada hora. La medición de la densidad óptica (DO) de los controles positivo y negativo así como la de la mezcla de reacción se efectúa mediante la cinética de crecimiento de *Salmonella typhimurium*. Esta medición, por fotometría de luz en un sólo tiempo, se registra automáticamente en cada uno de los 200 pozos de la microplaca. La turbidez (DO) de las muestras permite generar la curva de crecimiento, la cual se obtiene en un lapso máximo de tiempo de 72 horas. Se esperaría que la variación entre las replicas de los pozos sean distribuidas de manera homogénea.

Consecuentemente, la DO promedio de los revertantes inducidos (*RI*) en los pozos problema con respecto a la DO promedio de revertantes espontáneos (*RE*) obtenido por las replicas en los pozos utilizados para el control negativo deberá ser mayor.

En consecuencia, este valor permite definir como respuesta positiva si cumple las siguientes consideraciones: el promedio de la DO en los pozos por dosis de muestra de prueba es mayor al valor de la DO promedio en los pozos del control negativo; y el incremento promedio en la DO por replicas de pozo de prueba deberá presentar una dependencia en cuanto a la concentración.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La forma de cualquier curva dosis-respuesta depende del ámbito de las dosis usadas. Para muchos mutágenos en la parte baja de sus dosis se presenta una linealidad, y al incrementar la dosis la curva puede caer y finalmente retroceder debido a los efectos primarios de la toxicidad. Por ello, el análisis estadístico de la prueba de mutagenicidad de *Salmonella* para interpretar la respuesta mutágena de las dosis se efectúa con un modelo matemático de la curva completa de dosis-respuesta o con la parte inicial de la curva. En el presente trabajo se interpretó la respuesta mutágena de la dosis mediante el empleo de la curva completa dosis-respuesta para las pruebas de Incorporación en placa de Ames y microfluctuación.

### 7.1 Prueba de incorporación en placa de Ames

Para esta prueba se realizaron 14 experimentos. En cada uno de estos experimentos se analizaron 11 diferentes concentraciones, la concentración inicial y final fue de 100 y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente, y las concentraciones intermedias a los límites mínimo y máximo se obtuvieron mediante incrementos de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a partir de la concentración mínima. Así mismo, se corrieron controles positivo y negativo. Tanto el análisis de cada concentración, como el de los controles positivo y negativo, se efectuaron por triplicado, lo cual produjo un total de 39 cajas y resultados por experimento. Los valores promedio de cada una de las concentraciones evaluadas (difosfato de cloroquina) y de los testigos positivo (Medio mínimo + *Salmonella typhimurium* TA1537+ ácido picrolónico) y negativo (Medio mínimo + *Salmonella typhimurium* TA1537) requirieron el desarrollo de un análisis cuantitativo a efecto de aceptar o rechazar la validez de cada una de las pruebas realizadas, definir cuales de estos resultados eran positivos o negativos, y consecuentemente, estimar la fortaleza del efecto mutagénico.

Para determinar la validez o rechazo de cada una de las pruebas realizadas, inicialmente se estableció el ámbito de los valores de revertantes por placa -5 a 25- para la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537 conforme a lo establecido en la Tabla 8. De los 14 valores promedio para el control positivo registrados en la Tabla 12, se seleccionó el correspondiente a la prueba número 11: 90 revertantes por placa; posteriormente se estableció el número de veces que este valor excede de 18 (90/5) a 3.6 (90/25) veces el ámbito de valores que limitan la tasa de reversión espontánea de la cepa utilizada, y con base en lo descrito en el apartado 6.2.1.1 de este trabajo aceptar o rechazar las pruebas. En este caso, las 14 pruebas efectuadas se aceptaron como válidas.

El análisis estadístico se inició estableciendo un nivel de significancia del 99% para cuantificar el intervalo de confianza en el cual los datos obtenidos pueden considerarse como reales. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\chi \pm 3.012 \left( \frac{S}{\sqrt{n}} \right) \quad (1)$$

donde:

$\chi$ : valor promedio de X  
 S: desviación estándar de la muestra  
 n: tamaño de la muestra

$\pm 3.012$ : nivel de significancia al 99%

los resultados obtenidos (IC), conjuntamente con los datos correspondientes a la reversión espontánea e inducida, se concentran en la Tabla 12.

**Tabla 12. Número promedio de revertantes por placa con el difosfato de cloroquina y calculo del nivel de significancia del 99 por ciento.**

Dosis	NÚMERO DE PRUEBAS														Prom	IC	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
100	111	126	139	144	139	149	132	150	132	193	90	132	150	135	137		
0	18	16	17	15	20	18	15	17	16	16	17	24	40	41	23		
100	24	24	36	31	51	24	37	18	20	37	29	36	56	53	34	24 <34>	44
150	34	36	44	50	42	30	27	66	31	44	35	58	55	50	43	34 <43>	52
200	28	33	21	31	31	39	20	70	28	48	53	63	64	52	41	27 <41>	55
250	47	63	67	55	78	63	42	43	82	54	45	56	36	46	56	45 <56>	67
300	53	58	61	47	72	72	64	64	50	48	33	85	77	95	63	50 <63>	76
350	32	45	53	47	27	38	79	71	38	55	25	99	91	94	57	36 <57>	78
400	72	74	94	61	39	36	53	51	32	43	21	76	88	71	58	40 <58>	76
450	81	63	90	93	86	77	83	80	82	85	18	46	58	36	70	52 <70>	88
500	48	57	65	66	41	37	39	50	68	77	15	21	25	21	45	29 <45>	64
550	38	49	55	46	0	0	34	42	47	59	0	6	13	9	28	13 <28>	43
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

100 Control positivo: M.M. + *Salmonella typhimurium* + ácido picrolónico

0 Control negativo: M.M. + *Salmonella typhimurium*

IC Intervalo de confianza

18 Valor rechazado por encontrarse fuera del intervalo de confianza

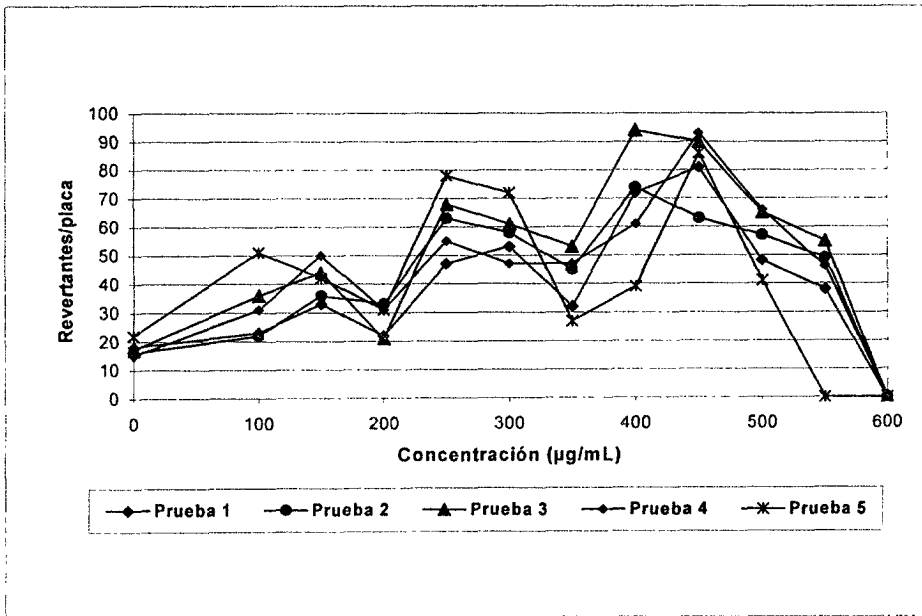
Los resultados de IC obtenidos mediante la aplicación de la ecuación 1, permitió establecer el promedio de aceptación de los resultados generados para cada una de las concentraciones empleadas. En general, se afirma que para las 14 pruebas realizadas, el valor promedio de aceptación de los datos oscila ente el 65 y el 43 por ciento; así mismo, que los más altos porcentajes de aceptación, 65%, se obtiene en las concentraciones inferiores, de 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , del ámbito utilizado; y consecuentemente, los menores porcentajes de aceptación, 43%, se obtuvieron a la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  debido a que en la penúltima y última dosis empleadas la existencia de revertantes por placa fue poca y ninguna respectivamente. Es decir, en los datos se presenta una aproximación claramente

lineal en la parte inicial del ámbito de concentraciones, y conforme se incrementan las dosis se presentan uno o dos saltos cinéticos, a ambos lados de la línea, y finalmente caen debido a los efectos primarios de la toxicidad.

Consecuentemente, de acuerdo con el intervalo de confianza los valores mínimo y máximo de revertantes por placa, del total registrado en la Tabla 12, fueron de 24 a 100  $\mu\text{g/mL}$  y 86 a 450  $\mu\text{g/mL}$  para las pruebas 1 y 5 respectivamente. Así mismo, los valores mínimo y máximo de revertantes por placa y concentración fueron 24 y 37 para 100  $\mu\text{g/mL}$ ; 34 y 50 para 150  $\mu\text{g/mL}$ ; 28 y 53 para 200  $\mu\text{g/mL}$ ; 45 y 63 para 250  $\mu\text{g/mL}$ ; 50 y 72 para 300  $\mu\text{g/mL}$ ; 38 y 79 para 350  $\mu\text{g/mL}$ ; 43 y 74 para 400  $\mu\text{g/mL}$ ; 58 y 86 para 450  $\mu\text{g/mL}$ ; 37 y 57 para 500  $\mu\text{g/mL}$  y de 13 y 38 para 550  $\mu\text{g/mL}$ .

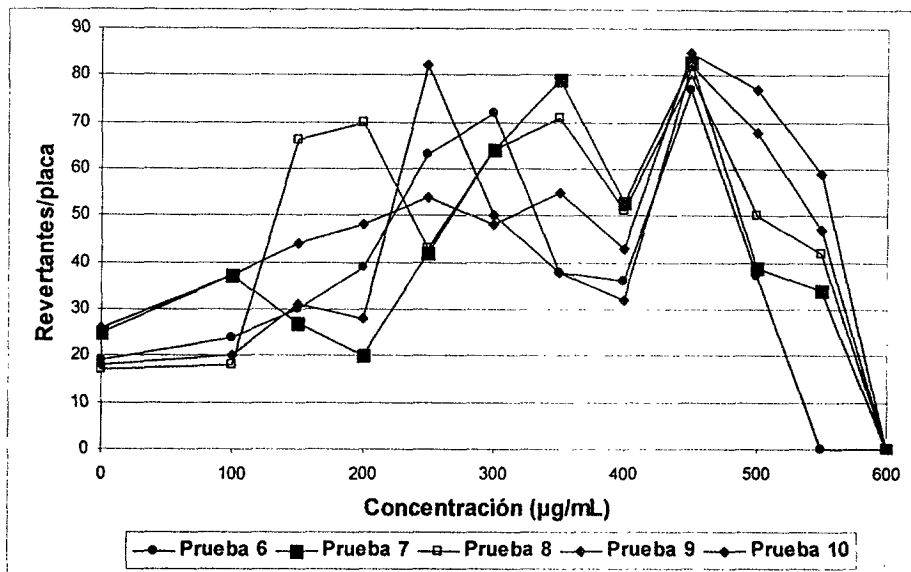
La estimación de la curva de regresión de  $Y$  en  $X$  requiere especificar la forma funcional de la curva:  $Y = a_0 + a_1X$ , regresión lineal ó  $Y = a_0 + a_1X + a_2X^2$ , regresión cuadrática. La forma funcional de esta curva se seleccionó por la observación gráfica de las curvas dosis-respuesta de cada una de las pruebas realizadas para la evaluación de la técnica de incorporación en placa de Ames. Estas gráficas se concentran en las Figuras 14, 15, 16 y 17. En la Figura 14 se muestran las gráficas para los valores correspondientes a las pruebas 1, 2, 3, 4 y 5.

Figura 14. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.



En la Figura 15 muestra los valores correspondientes a las pruebas 6, 7, 8, 9 y 10.

Figura 15. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.



En la Figura 16 se muestra las líneas correspondientes a los valores de las pruebas 11, 12, 13 y 14. Y en la Figura 17 se observa la línea correspondiente al valor promedio de revertantes por placa de las 14 pruebas realizadas y para cada uno de los ámbitos de concentración empleados en la prueba de incorporación en placa de Ames.

Figura 16. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.

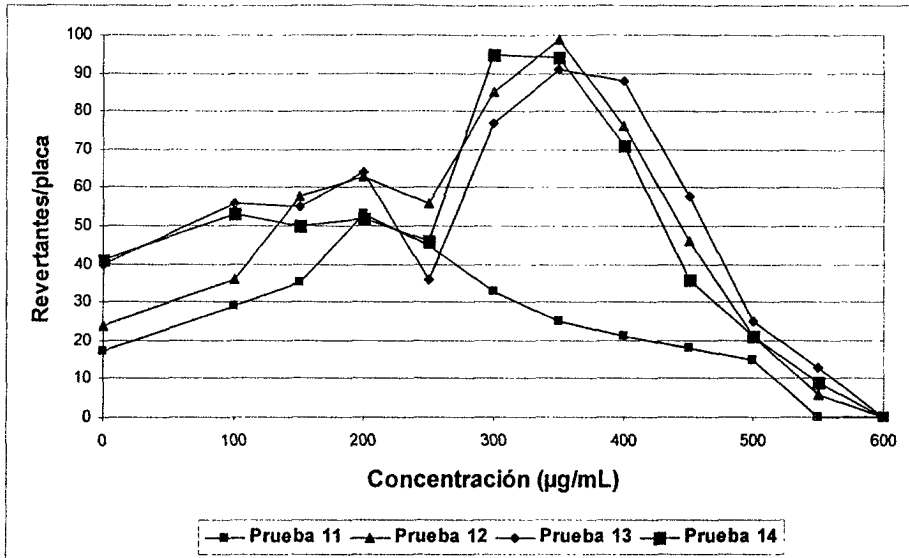
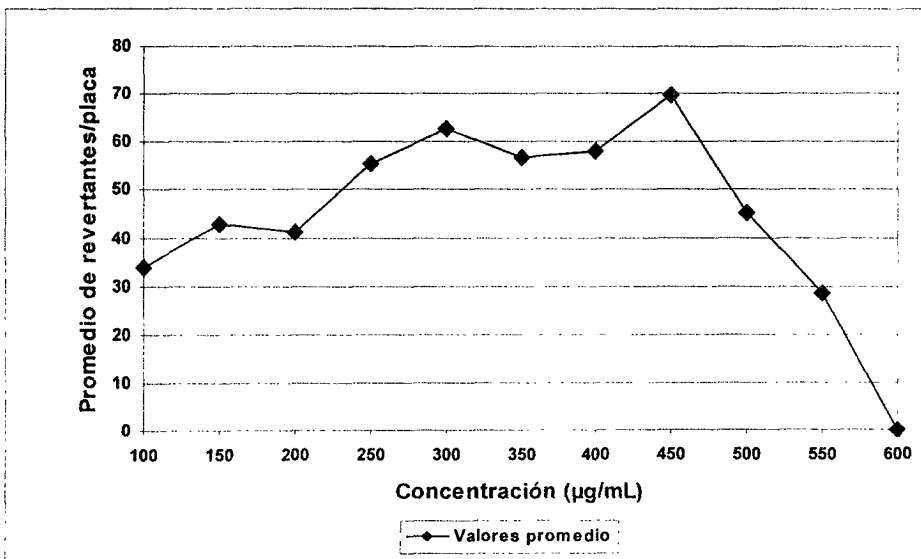


Figura 17. Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.



El análisis visual del total de los puntos correspondientes (Revertantes por placa,  $\mu\text{g/mL}$ ) a las gráficas de cada una de las 14 pruebas (Figuras 14 a 16) muestran una relación claramente no-lineal. Pero también se observa, claramente, a lo largo de las regresiones identificadas en las Figuras 14, 15 y 16 tres zonas:

- a) la primera, que se ubica en el ámbito de las cuatro concentraciones iniciales (100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$ ) de la curva dosis-respuesta corresponde a una línea recta
- b) la segunda, correspondiente a las concentraciones de 300, 350, 400, 450, 500 y 550  $\mu\text{g/mL}$  de la curva dosis-respuesta, se caracteriza por saltos y descensos cinéticos a lo largo de una proyección imaginaria de la parte lineal inicial de cada regresión, y
- c) la tercera, que muestra indiscutiblemente un posible efecto de citotoxicidad en la concentración final de la curva dosis-respuesta: 600  $\mu\text{g/mL}$ .

y el rechazo de las pruebas 9, 12, 13 y 14 debido a que los datos caen fuera del intervalo de confianza, así como los rechazos de la parte lineal de las pruebas 7 y 8, y de la segunda zona correspondiente a las pruebas 3, 4 y 11. Es decir, esta segunda interpretación de los datos presentados gráficamente en las Figuras 14, 15, 16 y 17 reduce nuestro universo de pruebas al 71% (10 pruebas: la número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 11). Consecuentemente los valores promedios se recalcularon y los promedios obtenidos fueron los siguientes: 16, 33, 41, 37, 56, 57, 51, 54, 75, 49 y 32 correspondientes a las concentraciones del control negativo y 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 y 550  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Así mismo, el número de revertantes en la concentración más baja (100  $\mu\text{g/mL}$ ) presentó una respuesta igual o semejante a la de la concentración máxima: 550  $\mu\text{g/mL}$ ; para efectos de discusión se considera esa concentración como máxima debido a que posiblemente el efecto de citotoxicidad provocado por el difosfato de cloroquina fue total a la concentración de 600  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales se manifestaron por una disminución del "césped de fondo" en la placa, y no se detectó efecto de reversión: 0 revertantes por placa. Es decir, a la concentración mínima, 100  $\mu\text{g/mL}$ , el promedio de revertantes por placa fue de 34 y a la dosis máxima, 550  $\mu\text{g/mL}$ , este promedio fue de 28 revertantes por placa (Figura 17). Y a las concentraciones de 150 a 250  $\mu\text{g/mL}$  se obtuvieron de 43, 41 y 56 revertantes promedio por placa respectivamente (Figura 17).

La positividad o negatividad del mutágeno a las dosis especificada se establece conforme a lo descrito en el apartado 6.2.1.2 de este trabajo. Con base en la ecuación matemática 1, de ese numeral, se calcula la razón de mutagenicidad ( $RM$ ) y si el número de revertantes por placa de prueba es igual o mayor a dos veces el valor de  $RM$  la prueba en cuestión puede considerarse positiva. Este

valor (16) se cumple para el total de los valores promedio recalculados, no así para el 100% del universo de los datos correspondientes a las diez pruebas aceptadas como válidas después de aplicar el intervalo de confianza. Es decir, a la concentración inicial (100 µg/mL) el *RM* se cumple únicamente en el 50% de las pruebas y de aproximadamente el 70% del ámbito completo de concentraciones por prueba.

El valor de *RM*, considerando el universo de los datos aceptados, es aleatorio para las primeras tres concentraciones de la curva dosis-respuesta (parte lineal de las gráficas), no así para 250 µg/mL donde el *RM* es igual a 2.46 (56 revertantes por placa; Tabla 12, Figura 17). A esta concentración se obtiene el doble de revertantes por placa al referirlo al control negativo, y es donde se obtiene la potencia mutagénica del difosfato de cloroquina. Es decir, a 250 µg/mL es donde se obtiene la concentración mínima efectiva para tener un efecto mutagénico. Este efecto de mutagenicidad se continuó manifestando en las concentraciones de 300, 350, 400, y 450 con valores de 2.79, 2.52, 2.57 y 3.1, respectivamente. Y es a partir de la concentración de 500 µg/mL que ocurre una disminución del número promedio de revertantes por placa, 49, y un *RM* de 3.0 (Tabla 12, Figura 17), al compararlo con el control negativo. Esto se debe a que empieza a producirse un efecto citotóxico a esta concentración.

La estimación de los parámetros desconocidos — las cantidades  $a_0, a_1$  y  $a_2$  — de la curva cuadrática de regresión  $Y = a_0 + a_1X + a_2X^2$  para la prueba de incorporación en placa de Ames, se efectuó a partir de los datos concentrados en la Tabla 12. Las gráficas y su ajuste, así como las ecuaciones obtenidas, se muestran en las Figuras 18, 19 y 20.

Figura 18. Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.

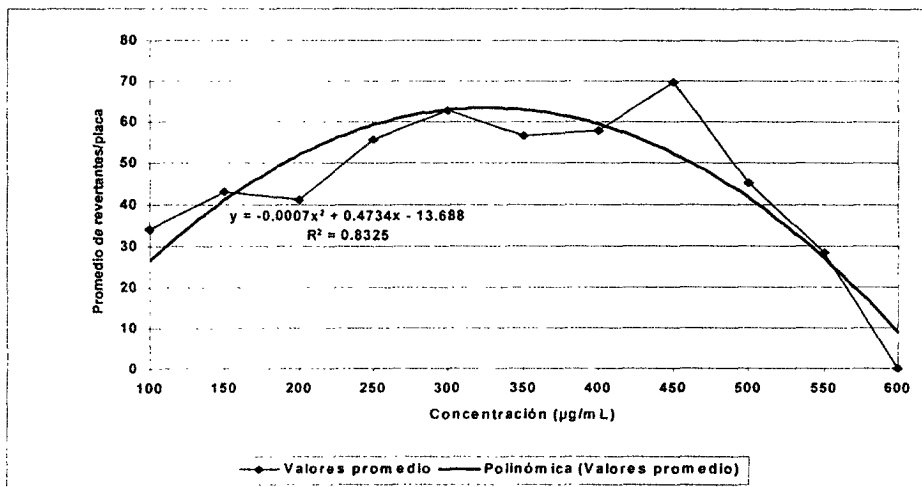


Figura 19. Curva dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurim* TA1537 y error estándar en la misma. Prueba de incorporación en placa de Ames.

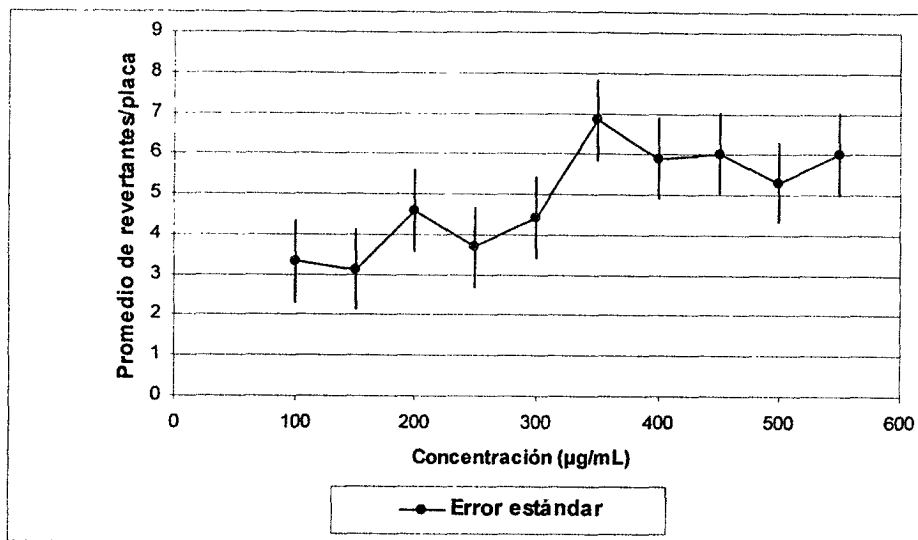
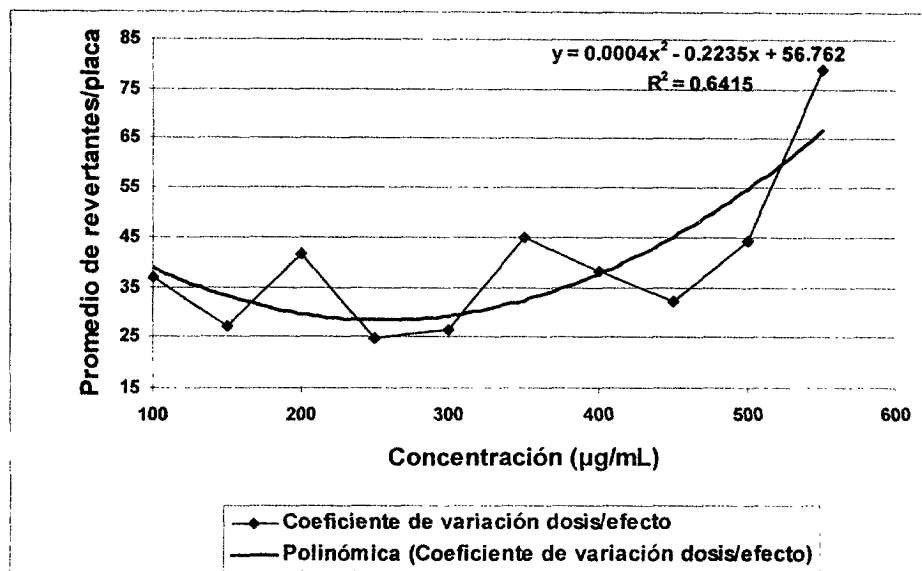


Figura 20. Coeficiente de variación de la relación dosis/efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de incorporación en placa de Ames.





Los valores de los estadísticos: error estándar, coeficiente de variación, relación de dosis/efecto y coeficiente de variación de la relación dosis/efecto, se tabularon en la Tabla 13.

**Tabla 13. Estadísticos empleados para evaluación de la prueba de incorporación en placa de Ames.**

Conc ( $\mu\text{g/mL}$ )	Reversión espontánea (Valores promedio)	Error estándar	Coefficiente de variación	Relación de dosis/efecto	C.V dosis/efecto
100	137.29	6.09	16.61		
0	22.50	2.24	37.22		
100	33.79	3.32	36.81	26.31	38.41
150	42.93	3.13	27.26	40.84	32.24
200	41.07	4.57	41.67	51.71	28.06
250	55.57	3.69	24.81	58.94	25.89
300	62.79	4.41	26.31	62.51	25.71
350	56.71	6.84	45.09	62.44	27.54
400	57.93	5.90	38.12	58.71	31.36
450	69.86	6.03	32.31	51.34	37.19
500	45.00	5.31	44.19	40.31	45.01
550	28.43	6.01	79.06	25.64	54.84
600	0.00	0.00	0.00	7.31	66.66

100 Control positivo: M.M. + *Salmonella typhimurium* + ácido picrolónico

0 Control negativo: M.M. + *Salmonella typhimurium*

Los datos promedio de revertantes por placa mostrados en la Figura 18 proporciona una estimación cruda de los datos promedio de revertantes por placa y su correspondiente dosis de mutágeno. Esta estimación — curva dosis-respuesta — se obtuvo con base en los valores de las 14 pruebas. A partir de estos datos se calcularon el error estándar y el coeficiente de variación

Los valores correspondientes al error estándar para las concentraciones de 100 y 250  $\mu\text{g/mL}$  son de 3.32 y 3.69, respectivamente. Aunque el valor del error estándar calculado para cada una de las concentraciones se incrementa en relación con los incrementos de las dosis empleadas, estos valores son pequeños respecto al valor promedio de la reversión espontánea (Tabla 13, Figura 18), lo cual indica una estabilidad de realización en la prueba de incorporación de placa de Ames.

Así mismo, los valores tabulados en la Tabla 13 para los coeficientes de variación calculados para esta técnica permiten establecer la dispersión existente entre cada concentración. Las concentraciones que presentan menor dispersión son de 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$  y la de mayor dispersión es la de 550  $\mu\text{g/mL}$ . En general, los coeficientes de variación son relativamente grandes respecto al promedio calculado de revertantes/placa.

La no linealidad de la curva observada en las Figuras 17 y 18, así como las tres zonas anteriormente descritas puede ser un efecto combinado de mutagenicidad y toxicidad, al mismo tiempo; los factores que posiblemente están afectando la forma de esta curva dosis-respuesta son: 1) inducción de ADN para la reparación por enzimas, 2) efectos de saturación-solubilidad del compuesto de prueba en el medio de cultivo (Myers *et al.*, 1981), 3) y tiempo de exposición del químico en la caja de Petri o microplaca (Margolin *et al.*, 1981).

Aunque el mecanismo de muerte celular (citotoxicidad) varía para diferentes sustancias; inicialmente puede considerarse, para muchas que la muerte de la célula es consecuencia de daños en el ADN (por rompimiento de doble enlace o enlace cruzado); debido a tal efecto se presentan curvas con uno o dos saltos cinéticos. Lo anterior es plenamente coincidente, con el efecto causado por el difosfato de cloroquina sobre la cepa TA1537. Estos efectos, son difíciles de modelar, a pesar de que autores como Margolin *op. cit.*, y Myers *op. cit.*, han basado sus propios análisis estadísticos de dosis-respuesta de *Salmonella typhimurium* en modelos que incorporan estos factores.

Como alternativa a este problema, se consideró usar una función matemática específica, función polinomial de grado dos, inferida de acuerdo con el tipo de curvas obtenidas mediante la graficación de los datos generados con la prueba de Ames. En la Figura 18 se presenta la línea de ajuste para los valores promedio de revertante por placa de la curva de regresión, la ecuación ( $Y = -0.0007X^2 + 0.4734X - 13.688$ ) y el coeficiente de Pearson ( $R^2 = 0.8325$ ), lo cual la convierte en una función flexible, no específica de ajuste de datos.

En la Tabla 13 se muestran los valores de la relación de dosis/efecto calculados de acuerdo con la aplicación de la ecuación lo cual se refleja en la flexibilidad de la función (Cologne and Breslow, 1994). Con este ajuste, los valores de orden más altos que salen del mismo no son considerados. La interpolación de los promedios (revertantes por placa) tienen una aproximación a esta curva ajustada. Aplicando esta ecuación se establecen los datos que determinan la concentración óptima del efecto mutagénico, el máximo efecto mutagénico se observa en las concentraciones de 250, 300, 350 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con 58.94, 62.51, 62.44 y 58.71 revertantes por placa respectivamente (Figura 18, Tabla 13). El efecto primario de citotoxicidad se empieza a observar á partir de la dosis de concentración de 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A partir de esta función polinomial ajustada se interpoló un nuevo coeficiente de variación. El resultado se observa en la Figura 20, una curva polinomial que comprende las regiones de los valores de dosis, una línea de ajuste, una ecuación ( $Y = 0.0004X^2 + 0.2235X - 56.762$ ) y el valor del coeficiente de Pearson ( $R^2 = 0.6415$ ).

A partir de la función de ajuste se calculó el coeficiente de variación para la relación dosis-efecto (Tabla 13), la Figura 19 muestra una hipérbola inversa, analizándola, el menor coeficiente de variación se obtuvo en las concentraciones de 250 y 300 µg/mL con 25.89 y 25.71, respectivamente.

Consecuentemente, a estas concentraciones se obtuvo el máximo de mutagenicidad y el menor coeficiente de variación para esta relación dosis/efecto. Esto permite inferir que el efecto de mutagenicidad para la prueba de Ames se da entre 250 y 300 µg/mL.

## 7.2 Prueba de microfluctuación

Al igual que la prueba de incorporación en placa de Ames, en la prueba de microfluctuación se analizaron 11 diferentes concentraciones, la concentración inicial y final fue de 100 y 600 µg/mL, respectivamente. Las restantes concentraciones se obtuvieron mediante incrementos de 50 µg/mL a partir de la concentración inicial. También se incluyó un control positivo y un control negativo, el número total de pruebas realizado con la aplicación de esta técnica se limitó a nueve experimentos. Para el análisis de los controles positivo y negativo y de cada concentración se utilizaron 15 pozos, haciendo un total de 195 pozos por cada prueba efectuada. Los 15 pozos utilizados para cada uno de los controles y concentración generaron 15 resultados individuales, mismos que fueron promediados. En la Tabla 14 se muestran el valor promedio de las densidades ópticas del control positivo, del control negativo y de las 11 concentraciones utilizadas por prueba, así como el valor promedio de todas las pruebas por concentración y el intervalo de confianza del 95% para cada una de las concentraciones utilizadas en la evaluación de esta técnica.

La aceptación o rechazo de cada una de las nueve pruebas realizadas con la aplicación de esta técnica — a excepción de la prueba 5 debido a contaminación de la cepa — se efectuó con base en lo descrito en el apartado 6.2.2.2 de este trabajo. Como el valor mínimo de densidad óptica registrado para los controles positivos de las cinco pruebas en que se uso este tipo de control fue de 0.002, el cual excede en la misma cantidad al control negativo cuyo valor fue de 0.0 determinó la validez de las pruebas realizadas. El intervalo de confianza para los datos obtenidos mediante la aplicación de esta técnica se cuantificó estableciendo un nivel de significancia del 95% y aplicando la siguiente ecuación:

$$\chi \pm 2.365 \left( \frac{S}{\bar{x}} \right) \quad (2)$$

donde:

$X$ : valor promedio de  $X$   
 $n$ : tamaño de la muestra

$S$ : desviación estándar de la muestra  
 $\pm 2.365$ : nivel de significancia al 95%

**Tabla 14. Valores promedio de densidad óptica después del contacto con el difosfato de cloroquina a diferentes concentraciones y calculo del nivel de significancia al 95 por ciento.**

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	NÚMERO DE PRUEBAS									Prom.	IC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
100	---	---	---	0.078	0.018	0.116	0.002	0.027	0.026	0.031	---
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	---
100	0.004	0.016	0.026	0.023	0.245	0.040	0.036	0.039	0.012	0.025	-0.064 <0.025> 0.113
150	0.038	0.024	0.031	0.024	0.178	0.043	0.040	0.039	0.025	0.033	-0.020 <0.053> 0.086
200	0.023	0.029	0.035	0.011	0.055	0.039	0.039	0.027	0.028	0.029	-0.033 <0.062> 0.090
250	0.032	0.028	0.032	0.029	-0.003	0.045	0.051	0.038	0.023	0.035	-0.027 <0.062> 0.097
300	0.032	0.031	0.025	0.022	-0.009	0.039	0.042	0.025	0.023	0.030	-0.040 <0.030> 0.100
350	0.032	0.024	0.026	0.016	-0.012	0.029	0.035	0.023	0.019	0.026	-0.016 <0.026> 0.068
400	0.037	0.024	0.028	0.013	-0.010	0.031	0.031	0.019	0.016	0.025	-0.031 <0.025> 0.080
450	0.031	0.024	0.028	0.013	-0.009	0.029	0.028	0.026	0.016	0.024	-0.018 <0.024> 0.067
500	0.032	0.031	0.028	0.014	-0.009	0.025	0.029	0.027	0.012	0.025	-0.025 <0.025> 0.075
550	0.034	0.025	0.027	0.013	-0.007	0.022	0.026	0.034	0.014	0.024	-0.028 <0.024> 0.077
600	0.027	0.031	0.025	0.012	-0.007	0.018	0.021	0.026	0.011	0.021	-0.027 <0.021> 0.069

**100** Control positivo: DMGI + *Salmonella typhimurium* + ácido picrolónico

**0** Control negativo: DMGI + *Salmonella typhimurium*

**IC** Intervalo de confianza

0.245 Valor rechazado por encontrarse fuera del límite de confianza

Los valores inferiores y superiores de los intervalos de confianza obtenidos mediante la aplicación de la ecuación 2, para cada una de las dosis de concentración utilizadas en esta técnica, permitió establecer el promedio de aceptación de los resultados obtenidos. El promedio de aceptación del universo de estos datos fue del 100 por ciento.

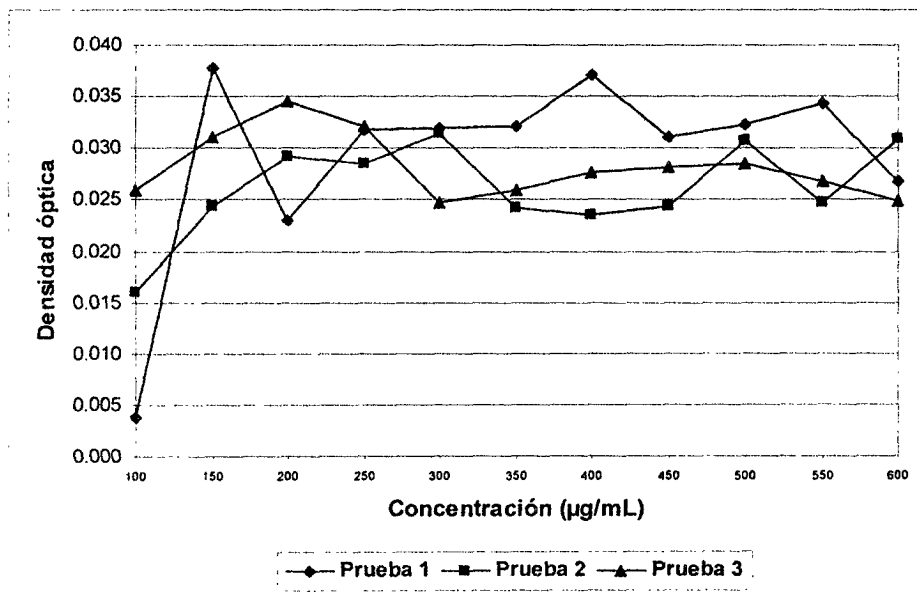
Los únicos valores rechazados corresponden a la prueba número cinco, la cual se descartó con base en los considerandos establecidos líneas arriba de este párrafo. Consecuentemente los valores mínimo y máximo de densidad óptica fueron de 0.004 y 0.040 para 100  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.024 y 0.043 para 150  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.011 y 0.039 para 200  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.023 y 0.051 para 250  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.022 y 0.042 para 300  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.016 y 0.035 para 350  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.013 y 0.037 para 400  $\mu\text{g/mL}$ ; de

0.013 y 0.031 para 450  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.012 a 0.032 para 500  $\mu\text{g/mL}$ ; de 0.013 y 0.034 para 550  $\mu\text{g/mL}$  y de 0.011 y 0.031 para 600  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 14).

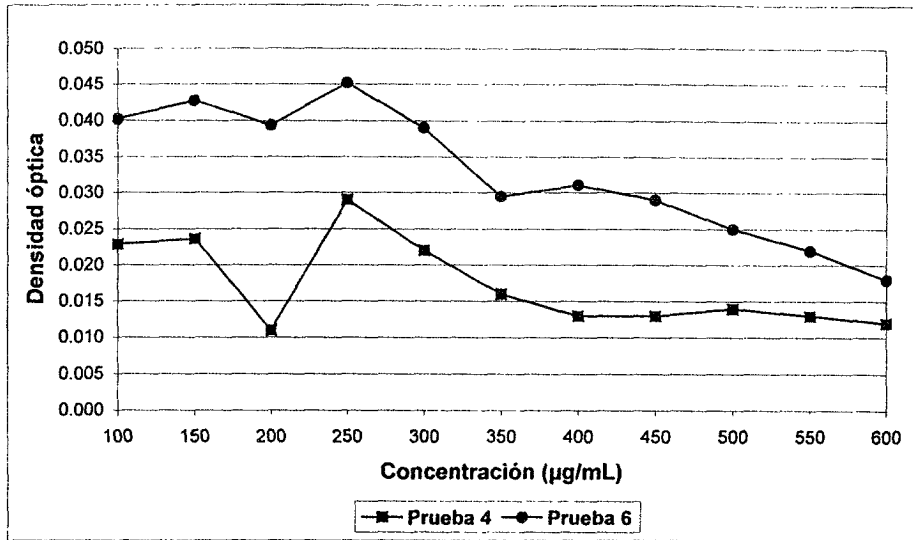
La descripción del tipo de asociación entre la variable  $Y$  (dependiente o respuesta) y las variables  $X_1, X_2, \dots, X_n$  (independientes), se obtuvo mediante la aplicación del modelo de regresión. En este caso, lo que se desea es resumir las tendencias de los datos y encontrar la forma de asociación entre las variables. Es decir, con la estimación de la curva de regresión podremos afirmar que existe asociación entre las variables y cuál es la forma de dicha asociación; todo ello se realizó sólo con la información de los datos observados en las ocho gráficas.

Las gráficas de los valores correspondientes a las pruebas 1, 2 y 3 se muestran en la Figura 21, en la Figura 22 se trazan los correspondientes a las pruebas 4 y 6, y las líneas de las pruebas 7, 8 y 9 se observan en la Figura 23. Así mismo, el valor promedio de estas ocho pruebas se gráfica en la Figura 24.

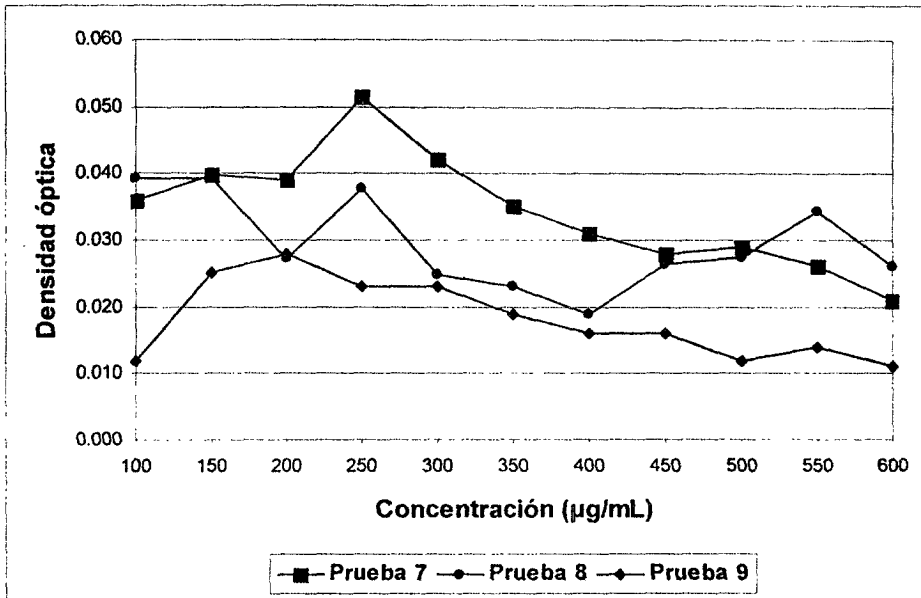
Figura 21. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de microfluctuación.



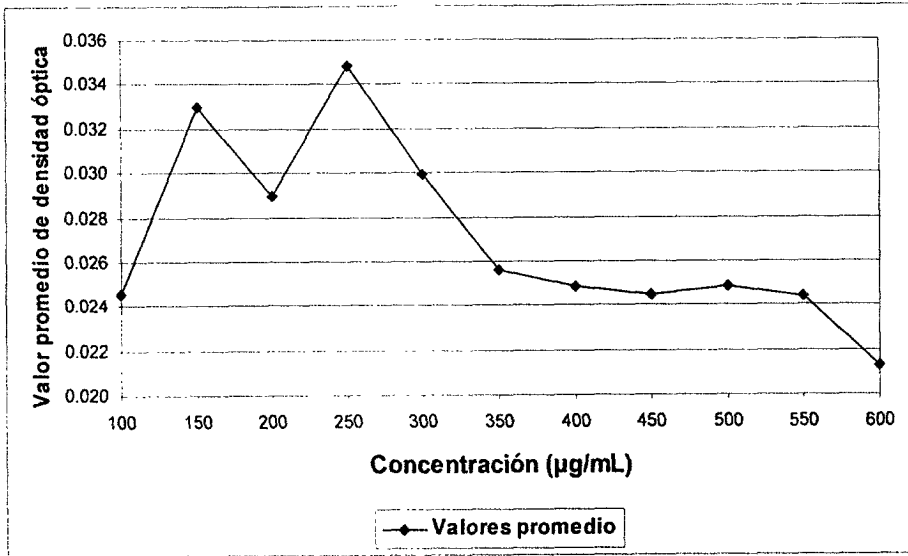
**Figura 22. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de microfluctuación.**



**Figura 23. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de microfluctuación.**



**Figura 24. Curvas dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de microfluctuación.**



Aunque las ocho gráficas distribuidas en las Figuras 21, 22, 23 y 24 no muestran una dependencia funcional rigurosa debido a que la magnitud dependiente (densidad óptica) está expuesta a la acción de factores aleatorios (mutagenicidad y/o citotoxicidad), se observa fácilmente una relación no-línea, y dos zonas claramente delimitadas:

- se presentan dos saltos cinéticos en el ámbito de las cuatro concentraciones iniciales (100, 150, 200 y 250 µg/mL) de la curva dosis-respuesta, y
- la descendente, aunque con algunos saltos cinéticos, en las siete concentraciones restantes (300, 350, 400, 450, 500, 550 y 600 µg/mL) de la curva dosis-respuesta.

El valor de la densidad óptica para el control negativo fue de 0.0 para cada una de las ocho pruebas realizadas. Este valor se reporta en ceros porque el equipo utilizado para la realización de esta prueba resta el valor de la densidad óptica inicial, a 0 horas, del valor de la densidad óptica final, a 72 horas, para cada uno de los 195 pozos de la microplaca; es decir, únicamente se registran en la memoria del equipo los valores totales de la densidad óptica obtenidos después realizada la resta. La validez de la prueba, se estableció, para este caso, de

acuerdo con el valor registrado por control positivo (ácido picrolónico): densidad óptica promedio de 0.031.

El valor promedio de la densidad óptica para la concentración final (0.021, 600 µg/mL) fue menor al valor promedio de la densidad óptica para la concentración inicial (0.025, 100 µg/mL) por cuatro milésimas (0.004) (Tabla 14, Figura 24); consecuentemente, el posible efecto de citotoxicidad provocado por el difosfato de cloroquina no fue claramente observable. Y el valor máximo promedio de densidad óptica (0.051) se observa a la concentración de dosis de 250 µg/mL, datos correspondientes a la de principal actividad mutágena de la curva dosis-respuesta (Tabla 14, Figura 24).

El procedimiento empleado con los datos generados mediante la aplicación de la prueba de incorporación en placa de Ames, es el mismo que se utilizó para la estimación de los parámetros de la ecuación que representa la curva cuadrática de regresión. Los datos de concentración y densidad óptica, concentrados en la Tabla 15 fueron usados para el cálculo del error estándar, el coeficiente de variación y el trazo de las curva dosis-respuesta, su correspondiente línea de ajuste y ecuación  $Y = -6E - 08X^2 + 3E - 05X + 0.0268$ .

Las ecuaciones empleadas para el cálculo de los primeros dos estadísticos fueron las siguientes:

$$S = \sqrt{\frac{n \sum \chi^2 - (\sum \chi)^2}{n(n-1)}} \quad (3)$$

Donde:

- S: desviación estándar
- n: tamaño de la muestra
- χ: valores de la muestra

$$S_{yx} = \left[ \frac{1}{n(n-2)} \left[ n \sum y^2 - (\sum y)^2 - \frac{[n \sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \right] \right] \quad (4)$$

Donde:

- $S_{yx}$ : error estándar xy
- n: tamaño de la muestra
- x: matriz de x
- y: matriz de y



$$C_v = \frac{S}{y} \times 100 \quad (4)$$

Donde:

- $C_v$ : Coeficiente de variación
- $S$ : Desviación estándar
- $y$ : matriz de  $y$

La gráfica, la línea de ajuste y la ecuación utilizada para el cálculo de los valores de la relación dosis/efecto se presentan en la Figura 25. En la Figura 26 se muestran los valores correspondientes a la línea promedio y los errores estándar para cada par de puntos (concentración, densidad óptica). La ecuación empleada para el cálculo del estadístico etiquetado como coeficiente de variación de la relación dosis/efecto, la gráfica obtenida y su correspondiente ecuación de ajuste:  $Y = -6E-08X^2 + 3E-05X + 0.0268$ , se presentan en la Figura 27. Los valores obtenidos mediante la aplicación de las ecuaciones utilizadas se concentran en la Tabla 15.

**Figura 25. Relación de dosis/efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA 1537. Prueba de microfluctuación.**

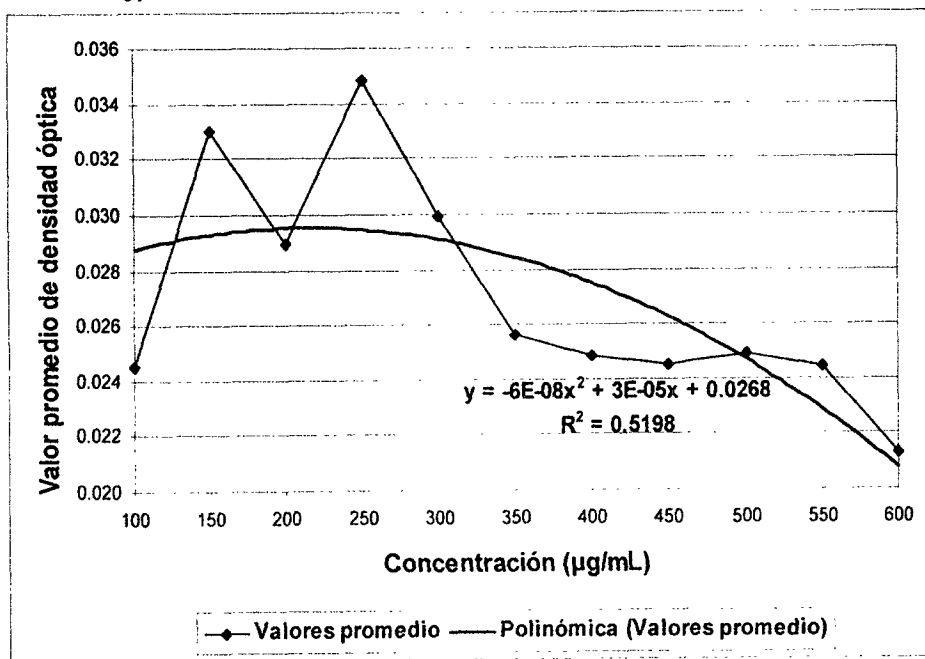


Figura 26. Curva dosis-respuesta del efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537 y error estándar en la misma. Prueba de microfluctuación.

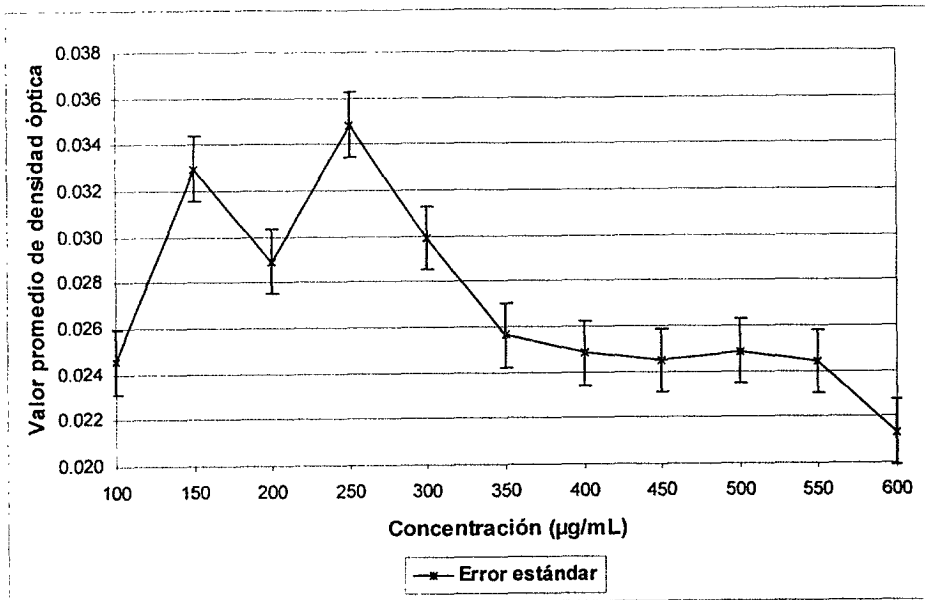
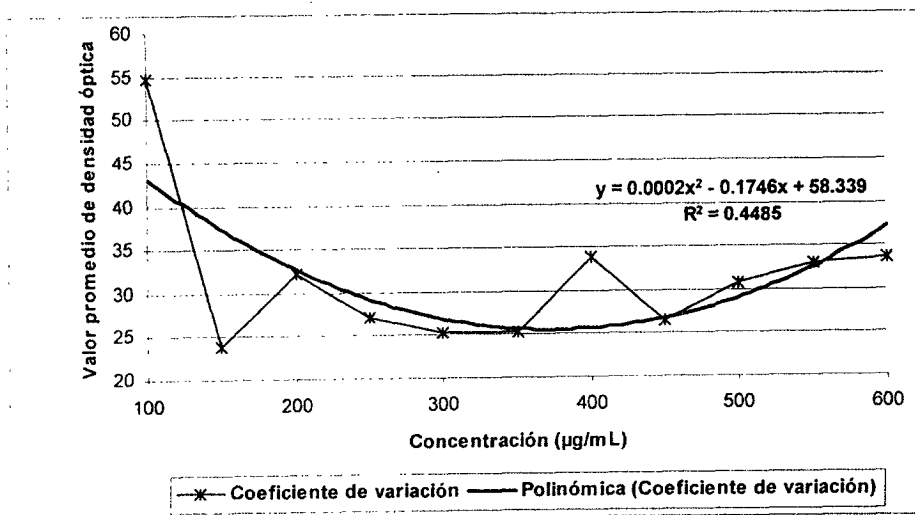


Figura 27. Coeficiente de variación de la relación dosis/efecto del difosfato de cloroquina en *Salmonella typhimurium* TA1537. Prueba de microfluctuación.



**Tabla 15. Estadísticos empleados para evaluación de la prueba de microfluctuación.**

Conc (µg/mL)	Densidad óptica (Valores promedio)	Error Estándar	Coefficiente de variación	Relación de dosis/efecto	C.V. dosis/efecto
100	2.4524E-02	0.0048	54.8070	2.8768E-02	43.2046
150	3.2969E-02	0.0028	23.8866	2.9292E-02	37.3789
200	2.8916E-02	0.0033	32.1681	2.9521E-02	32.7141
250	3.4834E-02	0.0033	27.0933	2.9456E-02	29.2104
300	2.9898E-02	0.0027	25.3639	2.9097E-02	26.8676
350	2.5619E-02	0.0023	25.3340	2.8443E-02	25.6857
400	2.4816E-02	0.0030	33.7352	2.7494E-02	25.6649
450	2.4483E-02	0.0023	26.5780	2.6251E-02	26.8050
500	2.4877E-02	0.0027	30.8091	2.4714E-02	29.1060
550	2.4416E-02	0.0028	32.9383	2.2882E-02	32.5681
600	2.1319E-02	0.0025	33.6829	2.0755E-02	37.1911

Como la realización de esta prueba mediante el empleo del equipo Bioscreen-C es reciente, no se cuentan con datos de evaluaciones experimentales realizadas por otros laboratorios con este mismo tipo de equipo y menos aún en su aplicación para la evaluación de mutagenicidad a compuestos químicos o muestras ambientales. Esto obligó a realizar una amplia consulta bibliográfica de estudios en que se describe el empleo del procedimiento tradicional para la realización de la prueba de microfluctuación a efecto de unificar el criterio de procedimiento de comparación con base en los estadísticos usados, los cuales se definen por una función matemática particular.

La escasa diferencia existente entre el error estándar y la DO promedio permite establecer que esta diferencia es insignificante, aproximadamente 0.0001, y que los valores promedio de DO para el conjunto de dosis de concentraciones utilizadas presentan una excelente estabilidad en su ejecución (Figura 24).

La mayor variabilidad en los valores en relación con el coeficiente de variación se observó en la parte lineal de la curva dosis-respuesta. En las dos concentraciones iniciales, 100 y 150 µg/mL, se registraron los valores máximo y mínimo, cuyos datos son 54.8 y 23.8, respectivamente.

Los valores de la relación dosis/efecto calculados a partir de la ecuación  $Y = -6E - 08X^2 + 3E - 05X + 0.0268$  (Figura 25) presentan las dos zonas descritas anteriormente: una lineal para las dosis de concentración de 100, 150, 200 y 250 µg/mL cuyos correspondientes valores son 0.0287, 0.0299, 0.0295 y 0.0294 y otra descendente, en el ámbito de las concentraciones de 300 a 600 µg/mL y sus correspondientes valores de 0.0290 a 0.0207 (Tabla 15).

### 7.3 Ambas pruebas

El difosfato de cloroquina es un compuesto de acción directa, mutágeno, cuya respuesta genotóxica fue evaluada por las pruebas de Incorporación en placa de Ames y microfluctuación. Aunque fue probado en un ámbito de dosis de alta concentración, los resultados obtenidos muestran una concordancia cualitativa: presencia o ausencia de mutagenicidad. Así mismo, los resultados obtenidos en este estudio comparados con los de la literatura fueron similares. En efecto, Tutikawa *et al.*, (1978) estudiando 25 compuestos antiparasitarios, que incluían pamoato de pirantel, pamoato pyrvinium, difosfato de cloroquina y bifenium hidroxynaftoato no observó daño letal cuando estos compuestos fueron evaluados en la prueba Rec- usando *Bacillus subtilis*, mutante de recombinación deficiente; sin embargo, cada uno de estos medicamentos generó al menos una substancia que daña al ADN cuando fue probada en *Salmonella typhimurium* en presencia del nitrito de sodio en medio acidificado a 37 grados centígrados; Schupbach (1979) , usando la prueba de microfluctuación, encontró que el difosfato de cloroquina produce revertantes en *Salmonella typhimurium* TA1537; Cortinas de Nava *et al.*, (1983), mostró, que empleando la prueba de microfluctuación, el difosfato de cloroquina es mutagénico para TA1537.

Los resultados obtenidos en ambas pruebas permiten inferir lo siguiente:

- a) El difosfato de cloroquina produce resultados positivos en la cepa de *Salmonella typhimurium* TA1537, los cuales se manifiestan más claramente en los datos generados por la técnica de microfluctuación que en la de incorporación en placa de Ames, debido quizá a la forma de exposición de la bacteria y el compuesto químico en el medio de cultivo: líquida en micropozos con realización de 72 lecturas, una cada hora, a efecto de poder seguir la cinética de reacción que está ocurriendo entre el compuesto de prueba y la bacteria mutante, y sólida en caja de Petri con solamente una lectura para cuantificar el número de revertantes en cada caja de Petri. Estos resultados sugieren que las enzimas de reparación por escisión son capaces de actuar en lesiones que ya presentaban una mutación previa, reparaciones que son inducidas por el difosfato de cloroquina y que se manifiestan mediante un aumento en la frecuencia de reversión de *Salmonella typhimurium* TA1537.
- b) La prueba de *Salmonella* no es un medio preciso para medir los ámbitos de la mutación, ya que la estimación de una tasa de mutación requiere conocer el número de células en riesgo de mutar y el número de células mutadas resultantes por el proceso. Por este hecho, es necesario un análisis cuantitativo de los datos de esta prueba para establecer un criterio consistente para definir resultados positivos y negativos, y también para proveer un ámbito de trabajo para estimar la fortaleza del efecto mutagénico. Ello nos permite establecer las bases de comparación para iniciar la interpretación de los datos generados por ambas técnicas y correlacionar los resultados generados:

Pese a que en las gráficas de (revertantes por placa,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de (Densidad óptica,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las Figuras 14 a 16 y Figuras 21 a 24 no muestran una dependencia funcional rigurosa debido a que la magnitud dependiente (revertantes por placa y Densidad óptica) está expuesta a la acción de factores aleatorios (mutagenicidad y/o citotoxicidad), se observa una relación no-lineal, y dos zonas claramente delimitadas: una línea recta en el ámbito de las primeras cuatro concentraciones, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figuras 15 y 24), y saltos cinéticos en el ámbito de las siete concentraciones restantes, con un claro efecto citotóxico en la Ames (0 Revertantes por placa a 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Tabla 12, Figura 15). Estas diferencias observadas pueden ser atribuibles, entre otros factores, a la degradabilidad del compuesto químico en el volumen utilizado, jugando un papel individual o interactivo en este estudio.

Además de las diferencias en los efectos citotóxicos en ambas curvas promedio —especialmente en las concentraciones finales, 550 y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ —, la diferencias de valores en los coeficientes de correlación producto-momento de Pearson ( $R^2$ ), el cual nos indica que cuando una variable se mueve en una dirección, la otra se mueve en la misma dirección y con la misma intensidad, es significativa: 0.8326 (Figura 18) y 0.5198 (Figura 25) para las pruebas de incorporación en placa de Ames y microfluctuación, respectivamente; es decir, el grado de correlación en la primera de estas dos pruebas puede considerarse alto y en la segunda moderado.

- c) Con base en los datos concentrados en las Tablas 12 y 15 se afirma que la capacidad del organismo de prueba para detectar la concentración más baja activa del difosfato de cloroquina para inducir una respuesta mutagénica significativa se presentó, para ambas pruebas, en el ámbito lineal de la curva dosis-respuesta. La concentración mínima activa identificada para la prueba de incorporación en placa de Ames fue de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la prueba de microfluctuación. La prueba de microfluctuación generalmente resultó más sensible sobre todo en el ámbito de las concentraciones de 150 a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  donde la prueba de incorporación en placa de Ames no presentaba aún un efecto mutagénico (Obaseiki-Ebor, 1986). Y que la prueba de microfluctuación, a diferencia de la prueba de Incorporación en placa de Ames, a pesar de la posible generación de un efecto tóxico primario a partir de la concentración de 300 y/o 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  continua detectando efectos en las concentraciones superiores a estas concentraciones.
- d) Las diferencias anteriormente señaladas entre ambas pruebas para la detección de ciertas concentraciones del compuesto se debe a los factores asociados con la lógica experimental del presente estudio. Esto puede deberse a alguna de las siguientes causas:

1. Diferencias en la concentración final debido a la cantidad de medio en que se disolvió;
2. Efectividad diferencial del compuesto en el medio de agar y medio líquido;
3. Combinación con periodos de incubación más cortos (48 horas para Incorporación en placa de Ames y 72 para microfluctuación), y
4. Diferencias en la fase de crecimiento de los cultivos utilizados (cultivo de 16 horas para la prueba de incorporación en placa de Ames y cultivo de 3.5 horas —proveniente de cultivo de 16 horas y en dilución 1:10 — para la prueba de microfluctuación).

## 8. CONCLUSIONES

- La prueba de *Salmonella* juega un papel importante en la detección de mutagenicidad. La flexibilidad y amplia experiencia con esta prueba permiten utilizarla en diversas clases de muestras (mezclas complejas, extractos con solvente orgánicos de productos industriales, agua de consumo y alimentos). Su papel es una base para estimar el riesgo genético en la identificación del potencial mutagénico natural (Kier, 1986).
- La coincidencia de resultados en los dos sistemas probados —pruebas de incorporación en placa de Ames y microfluctuación— son un elemento de gran utilidad para normar criterios sobre el uso de ciertas sustancias, aún cuando no permite predecir el riesgo con precisión. Aunque si bien, la prueba de Ames ha sido probada y validada a través de su uso registrado en una gama de literatura científica con muchas clases de sustancias químicas y mezclas complejas (sólidos, líquidos, gases) con protocolos bien desarrollados, la prueba de microfluctuación es otra alternativa debido a que parte de los mismos principios y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio es confiable y segura con la ventaja de realizar su aplicación a gran escala para evaluar un número grande de muestras ambientales.
- La forma de la curva dosis-respuesta depende del ámbito de las dosis usadas; y para muchos mutágenos las concentraciones de dosis bajas incrementan la linealidad de la curva en su parte inicial, pero al incrementarse la dosis, la curva puede caer y finalmente retroceder debido a los efectos primarios de la toxicidad, fenómeno observado exactamente en el difosfato de cloroquina. Pero como lo señala Margolin *et al.*, (1981) para mutagenesis y toxicidad, otros factores que pueden afectar la forma de la curva dosis-respuesta son: 1) inducción de DNA para la reparación de enzimas, 2) efectos de saturación-solubilidad (Myers *et al.*, 1981), 3) cambios en los ámbitos de concentración de los substratos de la enzima, y 4) tiempo de exposición del químico en el medio de cultivo. El mecanismo exacto subyacente de esta forma, aún no es bien comprendido y probablemente varía para diferentes químicos.
- Aunque la realización de la prueba y el análisis de datos es más práctica en la prueba de microfluctuación respecto a la prueba de Ames (Brusick y Auletta, 1985; Ashby, 1982; Kier, 1986); existe discrepancia en el fundamento del análisis estadístico de la prueba de mutagenicidad de *Salmonella*: un modelo matemático de la curva completa de dosis-respuesta o un modelo matemático solamente de la parte inicial de la curva. El método aquí empleado fue el del modelo completo de la curva dosis-respuesta, utilizándose el mismo para examinar las propiedades del procedimiento y efectuar las comparaciones con los modelos matemáticos presentados en las Figuras 18, 20, 25 y 27. Concluyéndose que el mismo proporciona un método satisfactorio y robusto

para el análisis rutinario de los datos de *Salmonella* de acuerdo con los siguientes criterios: (1) la distribución de los puntos fue homoscedástica; es decir, las dispersiones fueron similares para ambas pruebas (Figuras 18, 20, 25 y 27); (2) la concordancia de nuestros interprocedimientos con lo reportado en literatura reciente; (3) exactitud, y (4) la sensibilidad de ambas pruebas fue alta, aunque la de la prueba de microfluctuación resultó relativamente más sensible a ciertas concentraciones que la prueba de incorporación en placa de Ames.

- Ambas pruebas presentaron un rendimiento analítico alto. La prueba de microfluctuación es un procedimiento práctico, confiable y de bajo costo, representa una utilidad en la investigación de la actividad genotóxica de xenobióticos y muestras ambientales reduce la carga financiera que siempre aumenta en los programas de monitoreo (Brusick, 1987; Organization for Economic Cooperation and Development, 1987; Blaise *et al.*, 1988; Cram, 1989; Blaise 1991) (Legaul *et al.*, 1994). Sin embargo, antes de proceder a ello, y recomendarla como una prueba exploratoria es necesario obtener datos comparativos adicionales con otros químicos e implementar un método (matemático o estadístico) que permita cuantificar el valor de  $RM$ , validando el mismo con relación a la prueba de Ames .
  
- Probablemente, existe un número substancial de mutágenos que no podrán ser identificados con la prueba de *Salmonella*; motivo por el cual no puede recomendarse la prueba de microfluctuación únicamente. El empleo de esta prueba en conjunto con otras pruebas de genotoxicidad pueden jugar un papel muy importante, particularmente dentro de esquemas de evaluación del riesgo ecotoxicológicos. Es decir, la asociación de la prueba de *Salmonella* con una o más pruebas mejoraría substancialmente la sensibilidad predictiva de esta evaluación.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

Alink, G.M.; E.M.H. Frederix-Wolters; M.A. van der Gaag; J.F.F. van der Kerkhoff and C.L.M. Poels. 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutation Research*, 78:369-374.

Ames Bruce N.; Frank D. Lee, and William E. Durston. 1973a. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70: 782-786.

Ames, B. N.; W. Durston; E. Yamasaki and F. Lee. 1973b. Carcinogens are: a simple test system combining liver homogenate for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2281-2285.

Ames Bruce; McCann Joyce and E. Yamasaki. 1975b. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31:347-364.

Auerbach. 1973. History of research on chemical mutagenesis. In: Hollaender, A (ed.). *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection*, vol. 3, NY, Plenum Press, p. 1-19.

Auerbach, C and J.M. Robson. 1946. Chemical production of mutations. *Nature*, 1957:302.

Barnes, W.; E. Tuley and E. Eisenstadt. 1982. Base sequence analysis of his<sup>+</sup> revertants of the hisG46 missense mutation in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 4:297.

Bernstein, L.; J. Kaldor; J. Mc Cann and Micolm C. Pike. 1982. An emperical approach to statistical analysis of mutagenesis data from *Salmonella* test. *Mutation Research*, 97:267-281.

Bjorseth, A; G. Eidsa; J. Gether; L. Landmark and M. Moller. 1982. Detection of mutagens in complex mistures by the *Salmonella* assay applied directly on thin layer chromatography plates. *Science*, 215:87-89.

Brusick, D.J.; H.N.B. Gopalan; E. Heseltine; J. W. Huismans and P.H. M. Lohman. 1992. *Assessing the risk of genetic damage*. Botswana, Gaborne. Hodder y Stoughton. 52 p.

CETESB, São Paulo. 1991. Teste de Kado – Ensaio de microssuspensão com *Salmonella typhimurium* CETESB, São Paulo, 43 p (Norma técnica L5.241).

CETESB, São Paulo. 1992. Cromoteste – Ensaio baseado na indução do sistema de reparo SOS para detecção de substâncias genotóxicas. CETESB, São Paulo, 34 p (Norma técnica L5.300).

CETESB, São Paulo. 1993. Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* – Teste de Ames. CETESB, São Paulo, 40 p (Norma técnica L5.620).

CETESB, São Paulo, 1994. Mutación génica reversa en *Salmonella typhimurium* – Prueba de Ames – Método Directo. (Norma técnica L5.621).

Coelho, M.C.L.S.; C.A. Coimbra; G. Valent; M.I.Z. Sato; P.S. Sanchez and H Targa. 1992. Mutagenicity evaluation of industrial effluents by Ames assay. *Environ. Mol. Mutagen*, 19(S20):11.

Colin Cambell T. 1980. Chemical carcinogens and human risk assessment. *Fed. Proc.*, V.39. 8:2467-2483.

Cologne, B. J. and Breslow. 1994. Nonparametric regression analysis of data from the Ames mutagenicity assay. *Environmental Health Perspective Supplements*, Vol. 102 Suppl. 61-70.

Commonder, B.; P. Madyastha; A. Bronsdon and A.J. Vithayathil. 1978. Environmental mutagens in urban air particulates. *J. Toxicol. and Environ. Health*, 4:59-77.

Coriell Institute for Medical Research. 1986. Ames Salmonella mutagenicity assay protocol. Department of Microbiology, Copewood Stret, Camden, NJ, 081103, USA. 13 p.

Curry SC, Connor DA, Clark RF, Holland D, Carrol L, Raschke R. 1996. The effect of hypertonic sodium bicarbonate on QRS duration in Rats poisoned with chloroquine. *J. Tox. Clin. Tox.*, 34(1):73-76.

DeMarini, D.M.; J.E. Gallgher, V.S. Houck and J.E. Simmons. 1989. Toxicological evaluation of complex industrial wastes: Implications for exposure assessment. *Toxicol. Letters.*, 49:199-214.

DeMarini, D.M. and H.G. Brooks. 1992. Induction of prophage lambda by chlorinated organics: detection of some single species/ single site carcinogens. *Environ. Mol. Mutagen*, 19:98-111.

Devoret Raymond. 1979. Test bacterianos de substancias potencialmente cancerigenas. *Investigación y Ciencia*, 37:6-16.

Dutka, B.J.; K.K. Kwan; S.S. Rao; A. Jurkovic and R. McInnis. 1991. Use of bioassays to evaluate River water and Sediment Quality. *Environ. Toxicol. and Water Quality.*, 6:309-327.

Ehling, U.H. 1991. Genetic risk assesment. Annual Review. Genetic, 25:255-280.

Elmore, E. and M.P. Fitzgerald. 1990. Evaluation of the bioluminescence assays as screens for genotoxic chemicals. In: Mutation and the Environment – Part D. Wiley Liss, N.Y, p. 379-387.

Environmental Bio Detection Products INC. (EBPI). 1992. The SOS-CROMOTES Kit Version 6.0. Intructions 1-20 pag.

Espinosa-Aguirre J.J.; J Ramirez Santos. and C Cortinas de Nava. 1989. Influence of the Uvr repair system on the mutagenicity of antiparasitic drugs. Mutation Research, 222:161-166.

Friederich, U.; H.U. Aeschbacher; J.P. Seiler and F.E. Wurgerler. 1982. The Salmonella/microsome assay; some posible causes for interlaboratory variations. Mutation Research, 103:133-140.

Gatehouse, D. 1978. Detection of mutagenic derivatives of cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a "microtitre" fluctuation test, without microsomal activation. Mutation Research, 53:289-296.

Gatehouse D.G. and G.F. Delow. 1979. The development of a "Microtitre" Fluctuaction tests for the detection of indirect mutagens, and its use in the evaluation of mixed enzyme induction of the liver. Mutation Research, 60:239-252

Gilbert, R.I. 1980. The analysis of fluctuation tests. Mutation Research, 74:283-289

Gonsebatt Bonaparte Maria Eugenia. 1994. Marcadores biológicos de exposición a arsénico inorgánico, Tesis Doctoral en Ciencias, UNAM. Pags. 68.

Green, M.H.L and W.J. Muriel. 1976. Mutagen testing using trp<sup>+</sup> reversion in *Escherichia coli* WP2. Mutation Research, 38:3-32.

Green, M.H.L., W.J. Muriel, and B. A. Bridges. 1976. Use of a simple fluctuation tests to detect low levels of mutagens. Mutation Research, 38:33-42.

Ho, K.T. Y. and J.G. Quinn. 1993. Bioassay-directed fractionation of organic contaminants in an estuarine sediment using the new mutagenic bioassay, MUTATOX<sup>TM</sup>. Environ. Toxicol. and Chem., 12:823-830.

Hofnung, M., and P. Quilladet. 1986. Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. Mutagenesis, 1(5):319-330.

Hollstein, M., McCann, F. Angelosanto and W. Nichols. 1979. Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutation Research, 65: 133-226.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Houk, V.S. and L.D. Claxton. 1986. Complex hazardous wastes for mutagenic activity using a modified version of the TLC/Salmonella assay. *Mutation Research*, 169:81-92.

Houk, V.S. and D.M. DeMarini, 1987. Induction of prophage lambda by chlorinated pesticides. *Mutation Research*, 182:193-201.

Houk, V.; S. Schalkowsky and L.D. Claxton. 1989. Development and validation of the Spiral Salmonella Assay. An automated approach to bacterial mutagenicity testing. *Mutation Research*, 223:49-64.

Houk, V.S. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – A review. *Mutation Research*, 227:91-138.

Isono, K and Y. Yourno. 1974. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71:1612-1617.

Johnson, B.T., et al. 1992a. An evaluation of a genotoxicity assay with liver S9 for activation and luminescent bacteria for detection. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 1:473-480.

Jhonson, B.T. 1992b. Potential genotoxicity of sediments from the Great Lakes. *Environ. Toxicol. and Water Quality*, 7:373-390.

Johnson, B.T.. 1993. Technical Methods Section – Activated MUTATOX™ assay for detection of genotoxic substances. *Environ. Toxicol Water Quality*, 8:103-113.

Kado, N.Y.; D. Langley and E. Eisenstadt. 1983. A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. *Mutation Research*, 121:25-32.

Klekowski, E. and D.E. Levin 1979. Mutagens in a river heavily polluted with paper recycling wastes: Results of field and laboratory mutagen assays. *Environmental Mutagenesis*, 1:209-219

Kwan, K.K.; B.J. Dutka; S.S. Rao and D. Liu. 1990. MUTATOX™ test: a new test for monitoring environmental genotoxic agents. *Environ. Pollution*, 65:323-332.

Langer, P.J., W.G. Shanabruch and G.C. Walker. 1981. Functional organization of plasmid pKM101. *Journal Bacteriology*, 145:1310-1316.

Legaul R and Blaise C. 1994. Comparative Assessment of the SOS Chromotest Kit and the Mutatox Test with the Salmonella Plate incorporation (Ames Test) and Fluctuation Test for Screening Genotoxic Agents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9:45-57

- Levin, D.E.; E. Yamasaki and B.N. Ames. 1982a. A new *Salmonella* tester strain (TA97), for the detection of frameshift mutagens. *Mutation Research*, 94:315-330.
- Luria, S.E. and M. Delbruck. 1943. Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28:491-511.
- Malling, H.V. 1971. Dimethylnitrosamine: Formation of mutagenic compounds by interruption with mouse liver microsomes. *Mutation Research*, 13:425-429.
- Margolin, B.H., N. Kaplan; and E. Zeiger. 1981. Statistical analysis of the Ames *Salmonella*/microsome test. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:3779-3783.
- Maron, D. M. and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113:173-215.
- McBee, K.; J.W. Bickham; K.W. Brown and K.C. Donnelly. 1987. Chromosomal aberrations in native small mammals (*Peromyscus leucopus* and *Sigmodon hispidus*) a petrochemical waste disposal site: I. Standard karyology. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 16:681-688
- McCann. J. and B. N. Ames. 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test, assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 73,950-954.
- McCann. J.; E. Choi; E. Yamasaki and B.N. Ames. 1975a. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test, assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72,5135-5139.
- McCann J.; N.E.Springan; J. Kobori and B.N. Ames. 1975b. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R. Factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72,979-983.
- McDaniels, A.E.; A.L. Reyes; L.J Wymer; C.C. Rankin; and E.N. Stelma JR. 1990. Comparison of the *Salmonella* (Ames) test, UNU-test and SOS chromotest for detecting genotoxins. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16:204-215.
- Middleton, K.R. , and D. Wiseman. 1981. Testing of some antimalarial drugs for mutagenic activity, British Pharmaceutical Conference, Brighton 1981. Science Session 75 p.
- Mix, M.C. 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants. A critical literature review. *Marine Environ. Res*, 20:1-141
- Moreau, P.; A. Baiolone and R. Devoret. 1976. Prophage lambda induction in *E. Coli* k12 envA, uvrB: a highly sensitive test for potential carcinogens. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 73, 3700-3704.

Myers, L. E.; N.H., Sexton; L.I. Southerland, and T.J. Wolff. 1981. Regression analysis of Ames test data. *Environ. Mutagen.* 3:575-586.

Obaseiki-Ebor, E.E. and E.E. Obasi 1986. Aspects of chloroquine mutagenicity. *Mutation Research*, 175:51-59.

Oda, Y.; S. Nakamura; I. Oki; T. Kato and H. Shingawa. 1985. Evaluation of a new system (UMU-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 147:219-229.

Prein, A.E., G.M. Alink and J. H. Koeman. 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the River Rhine. *Sci. Total Environ.* 9:287-291.

Purchase, I.F. H.; E. Longstaff; J. Ashby; J.A. Styes; D. Anderson; P.A. Lefevre and F.R. Westwood. 1978. An evolution of short term tests for detecting organic chemical carcinogens. *Br. J. Cancer.*, 37:873-959.

Quillardet, P.; O. Huisman; R. D'Ari and M. Hoffnung. 1982. SOS-Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79: 5971-5975.

Quillardet P.; C. De Bellecome and M. Hofnung. 1985. The SOS-Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins; validation study with 83 compounds. *Mutation Research*, 147:79-95

Rodríguez A.R. 1995. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. *La ciencia/124 desde México.* 95 pp.

Rosman, T. G.; L. W. Meyer; J.P. Butler; and J. Daisy. 1985. Use of the microscreen for airborne particulate organic matter. In: Waters, M. *et al.*, (eds.) Short term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures. V4. 9-22 p.

Sánchez, P.S.; M. I. Z. Sato; C. M. R. B. Paschoal; M. N. Alves and E. V. Furlan. 1988. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo State, Brasil, using short term microbial assays. *Toxicity Assess.*, 3: 55-80.

Sato, M. I. Z; G. U. Valent; M.C. L. S. Coelho; C. A. Coimbra; C. D. Alonso y P. S. Sanchez. 1991. Microbial assay in the screening of genotoxic air pollutants. *Environ. Mol. Mutagen*, 17 (S19):64-65.

Schüpbach, M.E. 1979. Mutagenicity evaluation of the two antimalarial agents chloroquine and mefloquine using a bacterial fluctuation test. *Mutation Research*, 68:41-49

Simmon, V.F. 1979. In vitro mutagenicity assays of chemicals carinogens and related compounds with *Salmonella typhimurium*. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62:893-899.

Skopek, T.R.; H.L. Liber; J.J. Krolewski and W.G. Tilly. 1978. Quantitative forward mutation assay in *Salmonella typhimurium* using 8-azaguanine resistance as genetic marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 410-414.

Sobels, F.H. 1985. Studies in comparative chemical mutagenesis. *Environmental Mutagenesis*, 7:759-773.

Soberón Mainero, Fco. Xavier. 1996. La ingeniería genética y la nueva biotecnología. *La ciencia/145 desde México*. 175 pp.

Thompson, R.A.; G.D. Schroder and T.H. Connor. 1988. Chromosomal aberrations in the cotton rat, *Sigmodon hispidus*, exposed to hazardous waste. *Environ. Molec. Mutagen.*, 11:359-367.

Tuitakawa, K., N. Shimoi and Y. Yagi, 1978. Mutagenicity of the products generated by a reaction between chloroquine and nitrite. *Mutation Research*, 54: 230.

Ulitzur, S. 1982. Biotechnology focus – A bioluminescence test for genotoxic agents. *Trends in Analytical Chemistry*, V1. 14:329-333.

Valent, G. 1990. Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo, através de Teste de Ames. Tese de Doutorado, Campinas, SP., UNICAMP, 134 p.

Valent, G., M.C.L.S. Coelho, C.A Coimbra, M. I. Z. Sato and P. S. Sanchez, 1993. The application of the Simultest fluctuation assay in the mutagenicity analysis of São Paulo drinking water samples. *Environ. Mol. Mutagen.*, 21 (sup. 22):73.

Valent, G. U.; M. I. Z. Sato; M.C.L.S. Coelho; C.A Coimbra; P. S. Sanchez; M.T. Martins and R. Bonatelli Jr. 1993. Monitorin São Paulo State rivers in Brazil for mutagenic activity using the Ames test. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 8:371-381.

Van Kreijl, C.F.; H.J. Koo; M. DeVries; H.J. Van Kranen and E. De Greef. 1980. Mutagenicity in the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands. *Sci. Total Environ.*, 15:137-147.