

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO MUTAGENICO
DE DIVERSOS PLAGUICIDAS, UTILIZANDO LA
REVERSION EN EL SISTEMA EUCARIOTICO DE
NEUROSPORA CRASSA.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

CARLOS ALBERTO LEAL MORALES

DIRECTOR DE TESIS: ING. PASCASIO VARGAS CASTELLO

CUAUTITLAN IZCALLI

1981



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Pag
INTRODUCCION	
A. Flageloides	
B. ADN y Mutaciones	
C. Neurospora crassa	
DESARROLLO	
A. Material	
1) Biológicos del Injerto Mutagénico	17
2) Soluciones y Medios de Cultivo	18
3) Compuestos Utilizados	20
B. Método	20
RESULTADOS	26
CONCLUSIONES Y COMENTARIOS	
A. Conclusiones	33
B. Comentarios	
1) Resultados	36
2) Modificaciones al Método	37
3) Perspectivas Futuras	37
BIBLIOGRAFIA	40

INTRODUCCION

1

1

INTRODUCCION

A. Plaguicidas

La agricultura constituye una de las actividades más importantes en la economía Mexicana. En ella se emplea un promedio anual de mil millones de pesos, en plaguicidas, para su protección contra los agentes que atentan a los cultivos (Plagas, Malas Hierbas, Enfermedades, Venenos, etc). (1)

El uso de plaguicidas en la agricultura para el control de plagas y enfermedades es uno de los factores más importantes en el aumento de la producción tanto agrícola como de los mismos plaguicidas. Los métodos de Control Biológico son ya menos eficientes que la protección química de las plantas, por lo que el uso de los plaguicidas se ha hecho una necesidad.

Los plaguicidas que se definen como un compuesto o resaca de sustancias utilizadas en el control de plagas agrícolas, pueden dividirse, dependiendo de sus usos, en los siguientes grupos: Insecticidas, Herbicidas, Fungicidas, Acaricidas, Bactericidas, Fumigantes, Antidotoxígenos y Reguladores del Crecimiento.

Los Insecticidas, los más difundidos, pueden clasificarse a su vez en diferentes grupos según su Mecanismo de Acción, Composición Química y Presentación.

De acuerdo a su Mecanismo de Acción se pueden ordenar como sigue: por Contacto, por Ingestión, Sistémicos, Asfixiantes y Follivores.

Dependiendo del tipo de compuesto activo utilizados, se subdividen en: Clorados, Organofosforados, Carbamatos y Piretroides.

Según su Presentación todos estos compuestos pueden ser formulados, al mezclarse con otros materiales, en un gran número de presentaciones, dependiendo del tipo de aplicación que se desee: Polvos, Granulados, Soluciones, Emulsiones, Aerosoles, etcétera.

Sin embargo, al aumento en la producción anual de plaguicidas le es paralelo un incremento en los datos genéticos de las consecuencias desfavorables de su acción en varios organismos.

La evaluación de la influencia de los factores del medio ambiente en la genética del hombre es una labor extremadamente complicada, sin embargo, actualmente hay suficientes razones para atribuir el aumento en la frecuencia de abortos espontáneos, productos muertos, defectos congénitos y enfermedades hereditarias a la creciente polución del medio ambiente. Estos contaminamientos sobre la actividad genética de los muchos químicos empleados,

en general, y de plaguicidas, en particular, son de gran importancia para decidir respecto del uso de preparaciones disponibles y proponer la investigación de sustancias con fuertes propiedades plaguicidas que no causen daño genético.

El uso de plaguicidas para la protección de plantas (insecticidas y fungicidas) y para el control de hierbas (herbicidas) tienen como objetivos a insectos, microorganismos y plantas, los cuales son seleccionados como los sujetos iniciales para el estudio de mutágenos químicos durante las primeras etapas de la evaluación de la influencia de estas sustancias en la genética del hombre.

La extensión de la evaluación ha sido el resultado de los factores principales: el más importante, el entendimiento del papel de los plaguicidas como mutágenos potenciales en la patología de la herencia humana y segundo, la introducción de nuevos métodos para detectar mutágenos químicos. (2,3,4)

1o- Objetivos plantados en este trabajo son:

Primero. Implementar en México un nuevo sistema para ensayar mutágenos químicos en un organismo Eucariótico, *Neurospora crassa*.

Segundo: Ensayar diversos Plaguicidas, utilizados en el campo Mexicano, para analizar su posible acción mutagénica en el Sistema de Ensayo por Inversión en el organismo Eucariótico de *Neurospora crassa*.

B. ADN y Mutaciones

El ADN, que almacena la información genética, está compuesto por dos cadenas de nucleótidos, las que se encuentran enrolladas formando una doble hélice. La hélice consiste en un azúcar, 2 desoxirribosa, a la cual está unida un grupo fosfato en la posición 3' y 5' y en la posición 1 unida una de las cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) o Citosina (C), Purinas las dos primeras y Pirimidinas las últimas. Estas bases se encuentran en medio de la doble hélice, formando el centro de la molécula, con el azúcar fosfato de costado en la periferia. Las bases se aparean de manera única, por medio de puentes de hidrógeno, A forma normalmente pareja con T y G con C, con lo que cada brazo de la doble hélice se complementa con el otro. Fig. 1

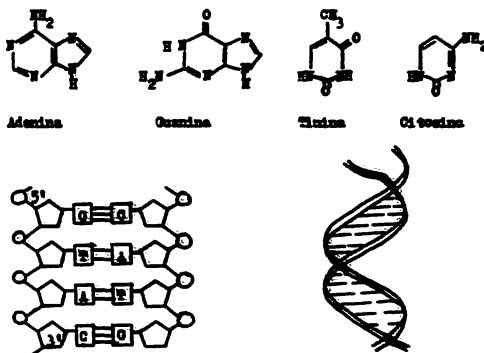


Fig. 1.- Bases del ADN y su representación esquemática.

Para que se preserve y transmita la información genética almacenada en el ADN se definen tres procesos principales: 1) Replicación, la copia del ADN con formación de moléculas hijas idénticas, 2) Transcripción, por el cual el mensaje genético es transcrito en forma de ARN para ser llevado a los ribosomas y 3) Traducción, por el cual el mensaje es traducido y convertido en proteína. Con lo que la secuencia de las bases, a lo largo del ADN, de un

gen determina los aminoácidos que componen la proteína específica para la que éste gen codifica. La traducción se lleva a cabo por medio de tripletes de las cuatro bases, denominados Codones, que llegan a ser 64 combinaciones de 4 en grupos de 3) y siendo solo 20 aminoácidos, se tiene que un aminoácido puede ser codificado por varios codones. Como el ADN es muy largo, debe haber un signo para iniciar la lectura del ARN y otro para terminarla, éstos signos son: codón AUG para iniciar y UAG o UAA para la terminación. (3,5,6)

En la mayoría de los sistemas biológicos existe una cierta posibilidad de error, y el apareamiento de las bases no es absolutamente cierto, pues en ocasiones puede ocurrir un error durante la replicación, por azar o inducción, y a este cambio que puede ser silencioso o macromolecular en el ADN celular se le da el nombre de Mutación.

Los principales tipos de Mutaciones son:

A) Sustitución del Par de Base: Los errores durante la replicación pueden hacer que la Adenina, en lugar de aparearse con la Timina, se aparee con la Citosina o que la Guanine, en lugar de aparearse con la Citosina, se aparee con la Timina, de la misma manera la Timina puede aparearse con la Guanine y la Citosina con la Adenina, en este tipo de errores en el apareamiento una Purina o una Pirimidina se cambia por la otra, a este tipo de mutación se le llama Transición del par de base. Existe otro tipo de errores en el apareamiento en el cual una Purina se cambia por una Pirimidina o una Pirimidina por una Purina, a este tipo de mutación se les llama Transversión del par de base.

Un cambio del par de base puede dar por resultado alguna variación de un aminoácido por otro o formarse de otra forma, a lo que se denomina "Mal Lectura". El efecto de este tipo de mutación sobre la función del polipéptido, depende del sitio en el ADN y del tipo de aminoácido que se cambia. Algunos aminoácidos son neutros y como consecuencia de la sustitución este puede ser reemplazado por otro neutro o uno positivo o negativo, los distintos cambios dan como resultado un cambio en la carga total de la proteína, lo que puede originar un polipéptido con función deteriorada o sin ella.

Varios de los codones para los aminoácidos pueden cambiarse por una mutación de este tipo y producir una terminación prematura en la síntesis de un polipéptido (Triptofano UGG \rightarrow UAG Amber). De las 64 combinaciones triples (tripletes) disponibles, 61 se usan para codificar los 20 aminoácidos esenciales, por lo que existe un alto grado de redundancia para codificar ciertos aminoácidos. Por ejemplo, hay 6 tripletes diferentes para codificar Leucina,

dos de éstos UUA y UUG, por una transición de la última letra del primer triplete por G, aún nos da un triplete para Leucina, este tipo de mutaciones no tiene, por tanto, influencia sobre la función del polipéptido. De los 649 cambios posibles por sustitución del par de bases, 134 (20%) darán como resultado ningún cambio en la secuencia de aminoácidos.

B) Corrimiento de Marco: Hay varios cambios en el ARN que ocurren por pérdida o adición de una o varias bases. Algunos de los codones que sufren una mutación por corrimiento de marco, se traducirán fácilmente en aminoácidos erróneos, que pueden dar como resultado la disminución de la funcionalidad proteica o una proteína sin función. Los codones de terminación pueden transcribirse a codones sin sentido, en el ARN, por este tipo de rotación y terminar por tanto la traducción, o que la mutación modifique al codón normal de terminación y ésta no ocurra hasta que aparezca un codón de terminación original de por la mutación.

C) Supresiones Pequeñas: La resesión de uno o unos cuantos genes se llama Supresiones Pequeñas, las que generalmente no son viables al microscopio óptico. Se han desarrollado varios sistemas de prueba para la detección simultánea de mutaciones punto (sustitución del par de base y corrimiento de marco) y supresiones pequeñas, como los sistemas de "Locus" Específico, que se han desarrollado tanto en ratones como en hombres. (7,8)

D) Anormalidades Cromosómicas: A diferencia de las mutaciones punto y las supresiones pequeñas, esta clase de mutaciones son observables al microscopio óptico. Una parte del genoma puede desaparecer o perderse; Supresión Duplicarse y juntarse al genoma; Duplicación; una parte del genoma puede pegarse a otra translocación, cambiarse con un cromosoma homólogo; Inversión; un cromosoma completo puede ser suprimido; Monosomía, o duplicado; Trisomía.

Los principales efectos producidos por las mutaciones son:

1) Letales: Este efecto de la mutación es aquel que causa la muerte de los heterocigotos, efecto que no se puede comprobar en experimentos de crianza, por lo que es necesario inferir su existencia indirecta. Este efecto se expresa poco tiempo después de la fertilización dando como resultado pérdida de implantación, o expresarse después de la implantación, observándose como manchas negras sobre las paredes intrauterinas. El análisis cromosómico y la ob-

servación de los microondas en los estados tempranos indican que muchos de los efectos letales son causados por anomalías cromosómicas. (9)

2) Semiletales: Este efecto, también en la viabilidad del cigoto, se define como aquel que causa más del 90% pero menos del 100% de muerte, comparado con el tipo común, o silvestre.

3) Subvital: Donde la viabilidad relativa del cigoto es mayor del 10% pero menor del 100%.

4) Fenotípicos: Aquel en el cual se produce un nuevo fenotipo.

Se han establecido siete categorías para clasificar a los Agentes Químicos Mutágenos, de acuerdo con su acción sobre el ADN:

1. Alquilación: Hay varios sitios del ADN que reaccionan con los agentes alquilantes. Sitios como la Guanina, que muestra ser más reactiva, que en su posición E-7 se alquila con mayor frecuencia, sin embargo la posición O-6 es el sitio de alquilación que produce las mutaciones. Por lo que no sorprende encontrar que el par de bases GC muta con mayor frecuencia que el par AT. La alquilación de la Guanina puede llevar a una depurinación y su eventual remoción del ADN, o causar el apareamiento erróneo, con lo que se induce la transición GC → AT. También se ha sugerido que la mutación puede surgir durante la replicación del ADN alquilado, donde los pares de las bases próximas a la base alquilada pueden ser removidos junto con el material adyacente, esta acción puede causar mutación durante el proceso de reparación.

2. Arilación: Los agentes que se clasifican bajo éste mecanismo son principalmente antibióticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos, los que reaccionan con el ADN por medio de enlaces covalentes con grupos reactivos oxidantes o que pueden resultar de los procesos metabólicos. Al parecer es la Guanina la base con la que estos compuestos forman complejos con mayor frecuencia, y como resultado se producen mutaciones por oxidación de uracilo. Como muchos de éstos compuestos son policíclicos, pueden también intercalarse en el ADN.

3. Intercalación: Los compuestos bajo esta clasificación forman complejos con el ADN después de intercalarse en la doble hélice. Esta acción causa, por lo general, una distorsión en la estructura del ADN, provocada por la expansión y desarrollo de la columna de desaminación-fosfato. Esta distorsión sug

de inducir errores en la replicación provocando la inserción o delección del par de base (Corrimiento de Marco). Los cambios estructurales que causan estos compuestos activan las enzimas de reparación, y las mutaciones pueden surgir como un error en el proceso de reparación. Los derivados de Iordina constituyen al mayor número de agentes de este grupo.

4. Análogos de Base: Estos agentes interrumpen la función normal del ADN, unificando la fidelidad de la replicación, causando errores en el apareamiento de las bases que pueden dar como resultado una Transición, como GC por AT o AT por GC. Los análogos de las bases Púricas y Pirimidínicas sustituyen a las bases normales del ADN.

5. Tóxicos de la Metafase: Estos compuestos (agentes C-Mitóticos) interfieren con la formación del huso, por consecuencia, con la segregación de los cromosomas, por la formación de complejos con los componentes proteínicos de los microtúbulos que componen las fibras del huso, siendo capaces de inducir cambios estructurales en los cromosomas, además de cambios en su número.

6. Desaminación: Todos los agentes agrupados en esta clasificación presentan un común: atacar preferencialmente a la Citosina, después a la Guanina y en menor proporción a la Adenina. La Timina no es reactiva con estos agentes por carecer de grupo amino. Las mutaciones inducidas como resultado de una desaminación son Transiciones del tipo AT por TC y viceversa.

7. Inhibición Enzimática: En este grupo se encuentran clasificados los agentes que inhiben las enzimas de biosíntesis de purinas o pirimidinas o inhiben la función de las enzimas de reparación. Estos mecanismos no son probablemente los responsables directos de la inducción de la mutación, pero causan la situación en las que se hace más probable la presentación de la mutación por otro mecanismo. (5,10)

Los Sistemas de Reparación y las Mutaciones:

Las células pro y eucariotas poseen un conjunto de enzimas con las cuales pueden reparar daños espontáneos o inducidos en su ADN. Después de radiaciones con luz ultravioleta \rightarrow forman dímeros entre bases pirimidínicas vecinas en la misma cadena del ADN, este daño es reparado por enzimas fotoreactivas que abren estos enlaces. Otros tipos de daños en el ADN son reparados por otro grupo de enzimas las cuales rompen la parte del ADN dañado junto con 100 nucleótidos, aproximadamente, este proceso, el cual se llama Reparación por

0. *Neurospora crassa*

Neurospora crassa es un organismo bicariote; hongo miembro de la clase de los Ascomycetes, cuya característica principal es la Asca, tipo especial de Esporangio, que encierra a los productos de meiosis, las Ascosporas; y de la subclase de los Pirenomicetes, en los cuales las Ascas están contenidas en un cuerpo con forma de botella llamado Peritecio, el cual tiene un orificio pequeño llamado Ostiolo, a través del cual saldrán las Ascosporas cuando maduran.

Las diferentes especies de *Neurospora* se encuentran en áreas tropicales y subtropicales, creciendo sobre los árboles o restos celulósicos de plantas. En el pasado se reconoció a *Neurospora crassa* como un serio contaminante del pan, de aquí su nombre común "Hongo Rosado del Pan", pero recientemente ha encontrado otro hábitat como un organismo del laboratorio, por su sencilla nutrición y su fácil biogénesis y genética.

Neurospora, un heterotrofo, puede usar como fuente de Carbono: Acetato, Succinato, Glicerol, Glucosa y otros azúcares, oligo y poli azúcares. El Nitrógeno se le puede suministrar como Nitrato, Nitrato, Amonio o aminoácidos. Además de Carbono y Nitrógeno requiere sólo de unas pocas sales, Micro Elementos y una sola Vitamina, para un crecimiento vigoroso, Mixotico.

Es también un hongo Paramorfo, término que designa a un microorganismo en el que los cambios morfológicos se inducen por cambios ambientales, sin presentar alguna alteración genética correspondiente. La Sorbose es la seleccionada como el agente paramorfológico colonial estándar, porque las colonias en éste azúcar no presentan tendencia a formar extensas micelias aéreas y porque en comparación con otros compuestos es mayor su rango efectivo de concentración y la sobrevivencia significativamente mejor. (11,12)

Las células de *Neurospora* contienen: Mitochondrias, Retículo Endoplásmico Rugoso, Núcleo con Membrana Nuclear, Nucleolo, varias Inclusiones como cristales de Ergosterol, Gotas de Aceite y Glucógeno. Las células están empujadas por una doble capa de Membrana Plasmática y una fuerte Pared Celular compuesta principalmente de Quitina, Glucano β 1-3 y β 1-6, un complejo Péptido-Polissacárido y Poligalactosamina. (13,14)

En presencia de Sorbose, *Neurospora* crece con morfología colonial, desde la Condensación, pierde más del 60% de su peso seco y su efecto sobre el metabolismo de la glucosa se refleja en la composición de la Pared Celular, en la cual se reduce el por ciento de β 1-3 glucan polifacero, presentando también

una reducción en el porcentaje de los niveles de incorporación de glucosa a los polisímeros. La alteración en la pared pueden dar como resultado a una pared celular debilitada, Neurospora que tiene una presión interna alta (7 atm) necesita de una pared celular rígida que sea capaz de crecer en forma de largos filamentos; si la pared celular está debilitada, la célula, como resultado de la alta presión interna, podría asumir una forma más esférica y más ramificada, cambios típicos morfológicos inducidos con Sorbose. (15)

El sistema Vegetativo está compuesto de muchos núcleos - filamentos ramificados o Hifas. La hifa está segmentada por una pared incompleta o Septo, el cual tiene Poros, de aproximadamente 5 µ de diámetro. Los poros permiten fluir al citoplasma a lo largo de la hifa, transportando los nutrientes, vitaminas e inclusiones, a cierta distancia, generalmente en dirección del crecimiento. El crecimiento sigue por alargamiento de la punta de la hifa y por el desarrollo de ramificaciones antes de ella. Al sistema de hifas se lo llama Micelio. El micelio crece en la superficie del medio nutritivo y las hifas que crecen sucesivamente evolucionan en hifas conidióferas que sustentan las Esporas Asexuales o Conidias, que al observarse en masa presentan un color característico, medidas variables y pueden contener de 3 a, cuando más, 100 núcleos en ciertas cepas poco comunes.

La conidiación ocurre a través de un proceso de formación de brotes progre- sivos que se sigue de una septación interconidial, para terminar con la separación o desarticulación de los elementos conidiales.

El proceso de conidiación se ve favorecido cuando se detiene el crecimiento vegetativo del hongo, debido a deficiencias nutricionales (falta de carbono y nitrógeno) en donde los metabolitos primarios disminuyen, produciendo un cambio de la fermentación alcohólica en las hifas vegetativas a un estado oxidativo, que es el metabolismo en la conidiogénesis.

Diversos factores afectan el proceso de conidiación, el que más influencia presenta es el oxígeno, con lo que se sugiere que la conidiación es un proceso aeróbico obligado, ya que las mutantes anaeróbicas no pueden conidiar. También se ha estudiado la composición del medio de cultivo, en el que se nota que diversas fuentes de Carbono y Nitrógeno lo favorecen (Sacarosa, Fructosa), mientras que otras (Sorbose, Anidrido) lo limitan. (16, 17, 18)

Neurospora tiene tres tipos distintos de Esporas, 2 asexuales (micro y macroconidias) y 1 Sexual (Acospora). Las macroconidias maduras desarrollan gruesas paredes entre ellas y se separan fácilmente por movimientos ligeros

de aire, forma principal por la que se propaga en la naturaleza. Estas esporas asexuales son multinucleadas, con un promedio molecular de 2.5, y se usan para inocular cultivos vegetativos, y como fertilizante nabeo en crunas se-
niales.

Las Microconidias se forman más tarde en el crecimiento, por un proceso completamente diferente al de la formación de macroconidias. Estas son más pequeñas, casi siempre uninucleadas, con baja viabilidad y en número reducido, comparado con el de las macroconidias, sin embargo, hay variedades que sólo cas de *Neurospora* que solamente producen microconidias y en gran cantidad.

Las Ascosporas se forman al final del proceso sexual, proceso que se lleva a cabo en condiciones desfavorables para el crecimiento vegetativo, y el cual requiere de la participación de las dos células progenitoras, que generalmente se representan como A y a, las cuales no presentan diferencias morfológicas, pudiendo ambas formar la estructura reproductora femenina, Este peritocio. La ascospora es larga, y en el estado latente el genotipo se puede aislar en forma pura. (10)

Los cultivos de *Neurospora* son haploides y morfológicamente hermafroditas; una cepa normal puede producir cualquiera de los dos gametos, los fusos, protegidos por el protoperitocio, se desarrollan en un medio sólido de composición adecuada. (19)

La fusión de los gametos se lleva a cabo esperando las conidias de un tipo sobre la superficie de un cultivo del otro tipo, el cual presenta protoperitocio, que consiste en la Ascogonia, la cual es una hifa multinuclear enrollada y envuelta en un nudo de hifas agregadas. La punta de la ascogonia se extiende como un sistema de brazos de hifas muy cortas, llamadas triocinas, las que se proyectan al aire más allá de las hifas que la cubren. La fertilización se realiza cuando una célula del tipo contrario, que puede ser macro, microconidia o cualquier parte del micelio, se pone en contacto con una parte del triocino, y uno o más núcleos de la célula fertilizante migra hacia abajo de ésta, hacia adentro de la ascogonia, éstas comienzan a crecer y al mismo tiempo el micelio que la envuelve se empieza a desarrollar para formar la pared del peritocio. Después los núcleos se fusionan, y los cromosomas, en ese momento, se encuentran relativamente condensados, y no puede observar con una célula de 14 cromosomas. La fusión nuclear se describe como Diploide, por contener un doble grupo de cromosomas, y éste es, de hecho, el único momento

Las mutaciones hacia adelante por su clasificación en viables, que son aquellas que presentan efectos a simple vista sobre la morfología o color de la cepa silvestre, y bioquímicas, aquellas con efectos sobre la capacidad del organismo para llevar a cabo alguna reacción metabólica definida.

En *Neurospora* se han hecho estudios en mutantes viables como son *Colonia* Temperatura Sensitivas, en las que se aprecian diferencias morfológicas entre ellas y la cepa silvestre, pues al crecerla a 37°C la extensión de la hifa se inhibe, dando como resultado, generalmente, la formación de septos adicionales en la hifa, pero esta inhibición cesa al incubar al microorganismo a 25°C u otras temperaturas de entre 15° y 30°C. (20)

Las diferentes mutantes que difieren del tipo silvestre en la pigmentación, con frecuencia se toman como marcadores genéticos, como la mutante albina de *Neurospora crassa*, con sus omidias y micelio blanco, en contraste con el color naranja de la cepa silvestre.

Las mutantes bioquímicas que han sido más estudiadas son las auxotróficas, las cuales no crecen en un medio que contenga los nutrientes esenciales mínimos para el crecimiento de la cepa silvestre, pero que puede crecer si una o varias sustancias específicas se agregan al medio. La cepa que puede crecer en el medio mínimo se le denomina Prototrofa.

Las categorías de mutantes viables y bioquímicas no deben considerarse como excluyentes. Las mutantes viables deben tener una base bioquímica, y algunas mutantes bioquímicas también son mutantes viables, como en el caso de *F. crassa* con mutación en la región ad-3 o mutante *Adenina-Púrpura*, que tiene un defecto en algún paso en la biosíntesis de adenina el cual da como resultado la dependencia a adenina y la acumulación de un pigmento púrpura, este pigmento es el resultado de la acumulación del precursor de adenina.

Estudios con cepas mutantes de *F. crassa* en la región ad-3 han determinado que el locus no es unitario, sino que se encuentra constituido por dos genes muy cercanos, los que se han designado como ad-3A y ad-3B (21), los que se encuentran separados por material genético, ejerciendo control sucesional en la biosíntesis de adenina (22). La biosíntesis de la adenina, por la mutación del locus ad-3A, se ve impedida por la falta de la Pteridibonil-amimidinuro succino carboximidil sintetas, enzima que es codificada por este locus. (22)

DESARROLLO

MATERIAL Y METODO

A. Material

1) Micélicos del Ensayo Mutagénico:

El presente ensayo mutagénico se realizó con cepas auxotróficas enterocólicas de *Neurospora crassa*, nominadas H-23 y H-24, que derivan de la cepa 74-0311-16A, que tiene como marcadores genéticos la dependencia de Pantotemato, Neurofotofagia Colonial (colonias sensibles a temperatura) y Color Albino Colonial (pan-2, col-1 y al-2 respectivamente).

Las cepas H-23 y H-24 se obtuvieron por mutación hacia adelante con 1-oxi-4-Nitroquinoleína (NQO) y con Aflatoxina B₁ respectivamente; mutación que las afectó en el loci ad-31, impidiéndoles la biosíntesis de Adenina, dependencia que es el cuarto marcador genético de las cepas. (24)

Ambas cepas fueron proporcionadas en cultivos de preservación, cristales de sulfato de sodio, por el Dr. Tsung-mun Ong, del Instituto Nacional de Ciencias de Salud Ambiental (U S A) por conducto del Instituto de Investigaciones Microbiológicas de la U N A E.

2) Soluciones y Medios de Cultivo:

a. Solución de Micro Elementos:

Agua Destilada	1000 ml
Tetraoxato dicálcico 10 H ₂ O	88.4 mg
Cloruro cálcico 2 H ₂ O	536 mg
Cloruro férrico 6H ₂ O	970 mg
Cloruro de manganeso 4 H ₂ O	72 mg
Molibdato de amonio 4 H ₂ O	39.3 mg
Cloruro de zinc	4160 mg

Los compuestos se adicionan al agua en orden, pero el Cloruro férrico debe disolverse previamente en 1 ml de ácido sulfúrico.

Se puede utilizar cualquier solución de elementos traza, siempre que se portan de cada elemento (mg/lit de medio): 0.01 B, 0.2 Cu, 0.2 Fe, 0.02 Mn, 0.02 Mo y 2.0 Zn.

b. Solución Estándar de Nicotina:

Agua Destilada	500 ml
Etanol 95 %	500 ml
Nicotina	100 mg

Esta solución se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C en la oscuridad.

riada, renovándose por lo menos cada 4 meses, o guardándose congelada en tubos para prevenir su descomposición.

c. Solución de Pantotenato.

Agua Destilada	50 ml
Pantotenato de calcio	500 mg

Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C.

d. Solución de Aminoácidos Completos:

Agua Destilada	50 ml
Aminoácidos sulfato	500 mg

Antes de esterilizarla por filtración es necesario solubilizarla completamente, calentando la solución; se guarda a 4°C.

e. Solución de Aminoácidos Individuales:

Agua Destilada Estéril	99 ml
Solución de Aminoácidos Completos	1 ml

Se guarda a 4°C.

f. Solución Estándar de Vitaminas:

Agua Destilada	500 ml
Stanol 95 %	500 ml
Thiamina	10 mg
Riboflavina	5 mg
Nicotinamida	5 mg
Pantotenato de calcio	50 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Nicotinamida	5 mg
Colina HCl	200 mg
Ácido fólico	1 mg
Biocitina	50 mg
Inositol	100 mg

Para prepararla es necesario pesar cantidades exactas de cada vitamina y disolverla en Agua-Stanol (50% v/v), y tomar la alícuota que nos proporcione el requerimiento vitamínico, y al final agregar la solución a 1000 ml. La solución se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C en la oscuridad.

J. Medio Mínimo Fries:

Agua Destilada	1000	ml
Tartrato de amonio	5	g
Nitrato de amonio	1	g
Fosfato de potasio monobásico	1	g
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O	0.5	g
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	0.13	g
Cloruro de sodio	0.1	g
Solución de Micro Elementos	1	ml

Los compuestos se agregan en orden, predisolviendo en agua al Sulfato de magnesio y al cloruro de calcio, para evitar precipitaciones.

h. Medio Basal para Crecimiento Vegetativo:

Agua Destilada	1000	ml
Nitrato de sodio	3	g
Fosfato de potasio monobásico	3	g
Sulfato de Magnesio 7 H ₂ O	0.5	g
Cloruro de calcio 2H ₂ O	0.13	g
Cloruro de sodio	0.1	g
Solución de Micro Elementos	1	ml

Los compuestos se agregan en orden, predisolviendo en agua al sulfato de magnesio y al cloruro de calcio.

Este medio se puede preparar y dejar a temperatura ambiente sin descomposición o contaminación.

i. Medio Basal Westergaard:

Agua Destilada	1000	ml
Nitrato de Potasio	1	g
Fosfato de potasio monobásico	1	g
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O	1	g
Cloruro de calcio 2 H ₂ O	0.13	g
Cloruro de sodio	0.1	g
Solución de Micro Elementos	1	ml

Los compuestos se agregan en orden, predisolviendo en agua al sulfato de magnesio y al cloruro de calcio.

Este medio se puede preparar y dejar a temperatura ambiente sin descomposición o contaminación.

J. Medio de Objetivo para *Milica Del*:

Medio Mínimo Frías	1000 ml
Sorbosa	7.5 g
Fructosa	0.5 g
Glucosa	0.5 g
Agar	15 g

Se esteriliza a 15 lbs de presión por 15 min y se le agrega:

Solución Estándar de Nicotina	1 ml
Solución de Pantoténato	1 ml
Solución de Adenina Completa	2.5 ml

K. Medio para Crecimiento Vegetativo:

Medio Basal para Crecimiento Vegetativo	1000 ml
Nitrato de sodio y potasio	5 g
Sacarosa	10 g
Glicerol	10 ml
Agar	20 g

Se esteriliza a 15 lbs de presión por 15 min y se le agrega:

Solución Estándar de Nicotina	1 ml
Solución de Pantoténato	1 ml
Solución de Adenina Completa	10 ml

L. Medio Revertante Limitante:

Medio Basal Westergaard	1000 ml
Sorbosa	7.5 g
Fructosa	0.5 g
Glucosa	0.5 g
Carminocídeos	0.2 g
Agar	15 g

Se esteriliza a 15 lbs de presión por 15 min y se le agrega:

Solución Estándar de Vitaminas	1 ml
Solución de Pantoténato	0.5 ml
Solución de Adenina Limitante	1 ml

M. Medio Revertante Completo:

Igual al anterior, solo que a éste se le adiciona Solución de Adenina Completa, 2.5 ml/ lit de Medio.

n. Solución Salina Fisiológica:

Agua Destilada 1000 ml
Cloruro de sodio 9.5 g
Se esteriliza a 15 lbs de presión por 15 min.

o. Asortiguador de Fosfatos pH 7 :

Solución 1: 9.1 g de Fosfato de potasio monobásico se disuelven en 1000 ml de agua destilada.

Solución 2: 10 g de Fosfato de sodio dibásico se disuelven en 1000 ml de agua destilada.

Se agregan 600 ml de la Solución 1 con 900 ml de la Solución 2, quedando el pH en 7.

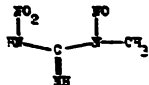
Estas mezclas nutritivas de *E. crassus* crecen adecuadamente en medio sólido inoxidable, para desarrollar los Cultivos Vegetativos, en este trabajo se utilizaron tubos de 18 x 150 mm (sin labios), con tapón de algodón y con aproximadamente 7 ml de medio de cultivo.

En los medios de placa se utilizan 0.05 % de Fructosa y Glucosa con 0.75 % de Sorbosa, con lo que se limita suficientemente al crecimiento en toda la placa, las colonias no desarrollan crecimiento aéreo, facilitando así su conteo y aislamiento. (19)

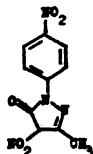
Para los medios de reverdecimiento, se vierten aproximadamente 20 ml del medio en cada caja petri, y por cada una un tubo con 2 o 3 ml de medio, limpiando o completo respectivamente.

3) Componentes Utilizados:

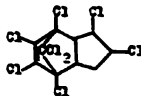
1) Mucosil N-nitro N-nitrosoguanidina (NNO), es un compuesto amarillo, poco soluble en agua, pero su solubilidad aumenta al calentar la solución a 45°C, su peso molecular es de 137 g, es un compuesto mutagénico y carcinogénico, ya que se clasifica como agente mutante del IIR (5,10), se ha empleado en estudios mutagénicos, ya que se sabe produce mutaciones por sustitución del Par de Bases.



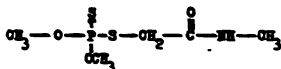
11) Acido Nicotínico, es un compuesto de color amarillo, tiene un peso molecular de 122.07 g, es insoluble en agua, soluble en etanol. Es un compuesto que se ha utilizado como control positivo en sistemas bacterianos que actúan por Corrimiento de Karo (30), al solubilizarlo en etanol las poblaciones control fueron tratadas con Etanol al 5%.



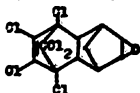
11) Clordano, es un líquido viscoso color ámbar, su densidad es de 1.59 - 1.63 su peso molecular es de 409.6 g, es insoluble en agua, por lo que se disolvió en dietil sulfóxido (DES). Su LD₅₀ = 457 - 490 mg/Kg dosis oral en ratas. Es ampliamente usado como insecticida, es un veneno estomacal, por contacto y fumigante. Es tóxico al hombre, ya sea por ingestión, inhalación o absorción percutánea. Para el ensayo mutagénico se dispuso con el compuesto 100% puro. (31,32)



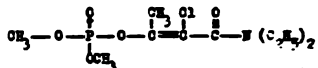
1v) Dinitrato, es un polvo blanco, su peso molecular es de 229.26 g, es poco soluble en agua, por lo que se disolvió en DES. Su LD₅₀ = 250 mg/Kg dosis oral en ratas. Se comumente usado como un insecticida sistémico y por contacto. Es tóxico al hombre pues inhibe la Colinaesterasa. Se dispuso para el ensayo mutagénico con el compuesto 99% puro. (31,32)



v) Aldrin, es un polvo blanco, su peso molecular es de 306.93 g, no es soluble en agua, por lo que se disolvió en DMSO. Su LD₅₀ = 10 - 12 mg/kg en ratas. Se usa como insecticida y es tóxico al hombre dañando los riñones, provocando ataxia y convulsiones seguidas de paro respiratorio. Para el ensayo mutagénico se dispuso con el compuesto 100% puro. (31,32)



vi) Fosfamidón, es un compuesto azul, con un peso molecular de 299.7 g, con una densidad de 1.2132, se disolvió en DMSO. Su LD₅₀ = 16.8 mg/kg en ratas. Es un insecticida sistémico y en humanos es inhibidor de la colinesterasa. Para el ensayo mutagénico se dispuso con el compuesto 99% puro. (31,32)



8. Método

Las cepas M-21 y M-22 tienen cuatro marcadores genéticos: ad-34, ad-2, cat y par-2, de los cuales el más estudiado es el de Aderina (3,6,21,22,23,24,25,26,27), del que se conocen varias propiedades, algunas ya mencionadas: que son útiles para el desarrollo de Ensayos Mutagénicos por Reversión, como son: Estabilidad, lo que se traduce en bajas frecuencias de reversión espontánea; Efecto Visible de la Mutación, simplificando su identificación visual; Configuración de la Reversión, se ha comprobado que compuestos que producen mutaciones hacia adelante en este sistema producen la reversión de la mutación. Solo éste lo utilizamos para plantear un sistema ampliamente usado en bacterias, pero ahora en células eucarióticas. Este nuevo planteamiento presenta ventajas como: Menores frecuencias de reversión espontánea, facilidad de preparar los cultivos vegetativos más antes de realizar el ensayo, ya que los cultivos pueden mantenerse a baja temperatura (4°C) por 3 meses sin disminuir su sobrevivencia ni aumentar su frecuencia de reversión; Fácilmente identificables; además de tratarse de células eucarióticas, presentando una mayor semejanza a las células del hombre. (2,28)

El Ensayo Mutagénico que se describirá, está diseñado para identificar a las revertantes que en él se producen para el loci de ad-34, pero esto no significa que ni algún otro evento mutagénico se produce, éste imposibilita a la célula su desarrollo, ya que el medio de reversión es rico en vitaminas y aminoácidos, lo que facilitará que nuevas mutaciones para alguno de estos organelos que se hubieran producido en el ensayo se puedan desarrollar, quedando restringido el crecimiento, únicamente para las células que no fueron afectadas en su loci ad-34.

Para poder llevar a cabo el Ensayo Mutagénico es necesario partir de los estándares de Conservación de las Cepas (cultivos en Sílica Gel) y de ellos desarrollar las colonias que al pasarlas al medio adecuado formarán los Cultivos Vegetativos, en los que se busca la Conidiación, con el fin de preparar una suspensión celular en donde probar el efecto mutagénico de los diferentes compuestos.

Los cultivos se inician al transferir unos cuantos cristales de sílica gel de los estándares a 5 ml de agua destilada estéril, se agita, y se toman 1, 2 y 3 ml de la suspensión, los que se ponen en 20 ml de Medio de Cultivo para Sílica Gel fundido, los que se vierten a una caja petri, después de que ha

solidificado el medio de cultivo, las placas se incuban a 30°C por 2 días. Las colonias aisladas de esta manera son las precursoras de los Cultivos Vegetativos, que se van ha desarrollar al transferir una de ellas al Medio para Crecimiento Vegetativo, en el cual se efectuará una modificación durante el cultivo de los cultivos se crecen por 2 días en la oscuridad y luego son transferidos a buenas condiciones de luz por 5 días más, todo ello a la temperatura ambiente. De un tubo con el cultivo vegetativo ya desarrollado se pueden transferir colonias o inoculo a otro tubo con medio para cultivo vegetativo, mediante un hisopo humedecido en agua destilada estéril, para evitar que las esporas sean arrastradas por el aire, y así disminuir la contaminación de medios y cultivos. (19)

La Suspensión Conidial se prepara un día antes del ensayo antagónico, la cual se hace adicionando cuidadosamente 5 ml de Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFB) a entre 4 y 6 tubos de cultivo vegetativo, los que se agitan con un hisopo para hacer la suspensión, que se vierte a un cubo con cuatro capas de gasa, para evitar nido y masas conidiales, la suspensión se recoge en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se tapa y se guarda inclinado en refrigeración.

El Ensayo Antagónico se lleva a cabo ajustando primeramente la concentración celular de la suspensión, lo que se hace decantando la solución salina del matraz (disminuyendo así el volumen a centrifugar) las células sedimentadas se resuspenden y se pasan a tubos con tapón de rosca, se centrifugan a 3000 rpm por 5 min, se decanta el sobrenadante, y las células sedimentadas se resuspenden en un total de 35 ml de Acetato de Fosfato pH 7, se toma 0.1 ml de esta suspensión y se ponen en 9.9 ml de agua, se cuenta en el hemocitómetro, y la concentración se ajusta por dilución para tener 10×10^6 cél/ml.

Se preparan las diluciones del compuesto a probar, las cuales deben de ser del orden de los microgramos o milimolar (esta última si se conoce el peso molecular del compuesto).

En tubos con tapón de rosca de 10x100 mm se ponen 0.1 ml de la concentración del compuesto y 2 ml de la suspensión celular; los tubos control sólo llevan el disolvente usado para el compuesto, cada concentración, al igual que el control, se prueba por triplicado, restando por lo menos cuatro concentraciones diferentes.

Los tubos se incuban por 1 hora a 30°C en baño de agua con agitación orbital, después de transcurrido el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionan 2 ml de agua destilada estéril, con el fin de diluir el organismo, después las células se lavan por centrifugación y se resuspenden en 2 ml de solución salina fisiológica estéril.

El ensayo se divide en dos partes: Sobrevivientes y Revertantes.

Sobrevivientes: De un tubo de cada concentración se toma 0.1 ml y se diluye dos veces en 9.9 ml de agua destilada estéril, de la segunda dilución se toma 0.1 ml y se deposita sobre el Medio Revertante Completo de una caja de petri, preincubada 20 min a 37°C, sobre éstas se cuentan 3 ml del mismo medio fundido, se expone sobre la caja y se deja solidificar, para incubarlo a 30°C por 2 días en posición invertida.

Revertantes: Cada tubo se vierte sobre una caja de petri con Medio Revertante Limitante, preincubada 20 min a 37°C, y sobre éstas se cuentan 2 ml del mismo medio fundido, se expone sobre la caja y se deja solidificar, para incubarlo en posición invertida a 30°C por 9 días.

RESULTADOS

RESUMEN

Como ya se ha indicado las mutaciones en cualquier población celular son espontáneas y pueden inducirse. La frecuencia de reversión espontánea para la cepa K-23 es de 1.5 células de cada 10^7 y para K-24 es de 0.5 de cada 10^7 , en su citación para adenina, las que comparadas con los sistemas similares en bacterias son significativamente menores. (26)

Estas dos cepas, K-23 y K-24, son sensitivas a los mutágenos, y reversionan por un grupo específico de compuestos quínicos. La cepa K-23 reversiona de Adenina Dependiente a Adenina Independiente, por agentes que causan mutaciones por sustitución del Par de Base, y la cepa K-24 lo hace por agentes que causan Corriente de Marco (24). Hablando lo anterior se pueden clasificar unos pocos compuestos mutágenos, dependiendo de la cepa a la que hayan afectado.

Como se indicó en el método la prueba se divide en tests Sobrevivientes y Revertantes. Los resultados, que se ilustrarán con un ejemplo, se obtienen de la siguiente manera:

Sobrevivientes. El porcentaje de sobrevivencia se obtiene al contar las colonias de las placas con medio completo, y relacionándolas de la siguiente forma:

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{\text{No. de Colonias contadas en la placa Tratada}}{\text{No. de Colonias contadas en la placa Control}} \times 100$$

Que en el caso del *St. Microdánico* en la cepa K-24 fueron: 67 colonias para la placa control, 44 colonias para la concentración de 31.25 μM , 41 para 62.5 μM , 31 para 125 μM y 20 para 250 μM , el porcentaje de sobrevivencia para la concentración 31.25 μM es:

$$\% \text{ Sobrevivencia} = \frac{44}{67} \times 100 = 65.6$$

(6) Estos valores en la tabla están ordenados al entero mayor, y cuando el entero no entero se siguen los decimales.

Conociendo el porcentaje de sobrevivientes para cada concentración, se calcula el número de células que sobreviven al tratamiento, lo que se expresa de la siguiente manera:

$$\text{Sobrevivientes} = \frac{\% \text{ Sobrevivencia} \times 0.2 \times 10^8 \text{ (Células Tratadas)}}{100}$$

Conjuntos	Concentrac. µM	Sobrevi. %	Sobrevi. 10 ⁶ cél	Revertan. 10 ⁶ cél	Revertan. 10 ⁶ cél Sob	r	n	o	Resultado
N N N O	00	100	0.2	1.66	8				
	912	68	0.136	42.0	309	0.4	317		HAY
	1925	86	0.172	329.0	1913	0.46	1921		DIFERENCIA
	3650	68	0.139	800.6	5887	0.4	5995		SIGNIFICATIVA
	7300	34	0.068	96.7	1422	0.25	1430		
As. Pterolénico	00	100	0.2	0.33	2				
	31.25	80	0.16	0.0	0	0.44	2	-	NO HAY
	62.5	80	0.16	0.66	4	0.44	6	6	DIFERENCIA
	125.0	100	0.2	0.0	0	0.5	2	-	SIGNIFICATIVA
	250.0	80	0.16	0.0	0	0.44	2	-	
Olorfano	00	100	0.2	1.33	7				
	250	88	0.176	2.66	15	0.47	22	15	NO HAY
	500	96	0.192	1.0	5	0.5	12	10	DIFERENCIA
	1000	49	0.098	0.66	7	0.33	14	9	SIGNIFICATIVA
	2000	47	0.094	1.66	18	0.32	25	13	
Dimetato	00	100	0.2	1.66	8				
	62.5	95	0.19	1.0	5	0.48	13	10	NO HAY
	125.0	100	0.2	1.66	8	0.5	16	12	DIFERENCIA
	250.0	100	0.2	1.33	7	0.5	15	12	SIGNIFICATIVA
	500.0	100	0.2	1.0	5	0.5	13	10	
Endrín	00	100	0.2	1.0	5				
	31.25	100	0.2	3.33	17	0.5	22	16	NO HAY
	62.5	88	0.176	1.66	9	0.47	14	11	DIFERENCIA
	125.0	100	0.2	5.0	25	0.5	30	20	SIGNIFICATIVA
	250.0	100	0.2	1.0	5	0.5	10	9	
Fenformidán	00	100	0.2	2.66	13				
	93.75	100	0.2	3.33	17	0.5	30	20	NO HAY
	187.5	86	0.172	3.66	21	0.46	34	21	DIFERENCIA
	375.0	79	0.158	3.66	23	0.44	34	22	SIGNIFICATIVA
	690.0	91	0.182	2.33	13	0.48	26	18	

Tabla 1. Resultados para la cepa K23 (A)

Compuesto	Concentrac. µM	Sobrevi. %	Sobrevi. 10 ⁶ cél	Revertan. 10 ⁶ cél 8o	r	n	o	Resultado
M H H O	00	100	0.2	0.0	0			
	212	100	0.2	0.33	2	0.5	2	NO HAY
	1825	100	0.2	1.0	5	0.5	5	DIFERENCIA
	3690	100	0.2	0.33	2	0.5	2	SIGNIFICATIVA
	7300	100	0.2	0.67	3	0.5	3	
Ao. Picorelénico	00	100	0.2	4.66	23			
	31.25	66	0.132	5.6	42	0.4	65 34	HAY
	62.5	61	0.122	5.3	43	0.38	66 33	DIFERENCIA
	125.0	46	0.092	7.3	79	0.31	102 40	SIGNIFICATIVA
	250.0	30	0.05	3.0	50	0.23	73 24	
Olordano	00	100	0.2	0.33	2			
	250	75	0.15	1.0	7	0.43	9 7	NO HAY
	500	66	0.132	0.66	5	0.4	7 6	DIFERENCIA
	1000	100	0.2	0.33	2	0.5	4 -	SIGNIFICATIVA
	2000	100	0.2	0.33	2	0.5	4 -	
Dinetanto	00	100	0.2	0.66	3			
	62.5	60	0.12	0.33	3	0.38	6 6	NO HAY
	125.0	43	0.086	0.0	0	0.3	3 3	DIFERENCIA
	250.0	100	0.2	0.0	0	0.5	3 -	SIGNIFICATIVA
	500.0	100	0.2	0.33	2	0.5	5 5	
Endrin	00	100	0.2	0.33	2			
	31.25	52	0.104	0.66	6	0.34	8 6	HAY
	62.5	57	0.114	0.66	6	0.34	8 6	DIFERENCIA
	125.0	85	0.17	0.33	2	0.46	4 4	SIGNIFICATIVA
	250.0	74	0.148	1.0	7	0.42	9 7	
Fenfluridón	00	100	0.2	0.33	2			
	93.75	92	0.184	1.0	5	0.48	7 7	NO HAY
	187.5	77	0.154	1.0	6	0.63	8 7	DIFERENCIA
	375.0	57	0.114	1.66	15	0.36	17 10	SIGNIFICATIVA
	650.0	100	0.2	0.66	3	0.5	5 5	

TABLA 2. Sembrados para la copia E-24 (2)

Los sobrevivientes, del ejemplo mencionado anteriormente, son:

$$\text{Sobrevivientes} = \frac{66 \times 0.2 \times 10^8}{100} = 0.132 \times 10^8 \quad (A)$$

En las tablas solo está expresada la fracción, debido a que la potencia de 10 está indicada arriba.

Revertantes. El número de Revertantes se calcula contando las colonias en cada placa de una misma concentración (3 placas por concentración), por lo que se usa un promedio para los subcultivos oficiales.

En el ejemplo del An. Microbiológico, se obtuvieron en cada placa del medio de reversión los siguientes números: 3,7,5 para el control, lo que nos da un promedio de 4,56 colonias revertantes; para 31.25 µM se contaron 4,6,7 lo que hace 5,6 colonias revertantes; para 62.5 se contaron 6,2,6 lo que da 5,3 colonias revertantes; para 125 µM se contaron 6,5,11 lo que hace un promedio de 7,3 colonias revertantes; para la concentración 250 µM se contaron 4,3,7 lo que da 5 colonias revertantes.

El número de Revertantes se corrige por el número de células sobrevivientes al tratamiento, lo que se expresa como:

$$\text{Revertantes} / 10^8 \text{ Sobrevivientes} = \frac{\text{Revertantes}}{\text{Sobrevivientes}}$$

Los valores obtenidos para el ejemplo son: (a)

Control:
$$\text{Revertantes} / 10^8 \text{ Sobrevivientes} = \frac{4.56}{0.2} = 23.3$$
 En las tablas estos números están redondeados al entero mayor.

31.25 µM:
$$\text{Revertantes} / 10^8 \text{ Sobrevivientes} = \frac{5.6}{0.132} = 42.42$$

Para calcular el número Mínimo de Mutantes "n" que se requieren en la población tratada para poder concluir que la frecuencia de mutación es significativamente mayor con respecto a la del control, es necesario calcular los α números "p" y "n" además de fijar el Nivel de Significancia "α".

El parámetro "p" que es la proporción de Supervivencia se calcula como:

$$F = \frac{\text{Sobrevivientes del Tratamiento}}{\text{Sobrevivientes del Control} + \text{Sobrevivientes del Tratamiento}}$$

Para la concentración de 31.25 μM es: (4)

$$F = \frac{0.13 \times 10^6}{0.2 \times 10^6 + 0.13 \times 10^6} = 0.3975$$

En las tablas estos valores están redondeados a dos cifras decimales

"n" es el número total de revertantes, dato que nos interesa compararlo en poblaciones tratadas con la población control, "n" se calcula como:

$$n = \text{Revertantes}/10^8 \text{ Sob. (Control)} + \text{Revertantes}/10^8 \text{ Sob. (Tratadas)}$$

Por lo que "n" para 31.25 μM es: $23 + 42 = 65$

Los valores de "c" se obtienen de las tablas reportadas por Eastman y Bowman (29), en las que se determinan "c" para las combinaciones de "p" en el intervalo $0.01 \leq 0.99$, "n" en el intervalo de 1 a 100 y "a" de 0.01 y 0.05.

En este trabajo en particular tomamos como nivel de significancia 0.05.

En la siguiente hoja se muestra una parte de las tablas de Eastman y Bowman, en donde se puede ver el valor de "c" para $p = 0.4$ y $n = 65$, el cual es de 34. Este número lo que dice es que debe de haber por lo menos 34 revertantes en la población tratada para decir que el tratamiento de estas células con el compuesto indujo revertidos significativos en la población. Y si todos los valores de "c" así obtenidos para un compuesto nos indican aumento significativo, podemos concluir que hay Diferencia Significativa, y por tanto que el compuesto produjo mutación.

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

A. Conclusiones

Al analizar la Tabla 1 de resultados se nota que a pesar de no poder calcular el número mínimo de ratones $^{\circ}0$ (por medio de las tablas) en la población tratada con M.F.F.O., para poder establecer si hay diferencias significativas entre éstas y la población control, la diferencia es obvia, dado que la población control sólo aporta 8 ratones del total, al tenerse $^{\circ}0$ como total para $p = 0.1$, $^{\circ}0$ tiene un valor de 6, valor que es muy inferior al obtenido en la población tratada, 309. Al hacer las subsecuentes comparaciones podemos notar que el valor de $^{\circ}0$ es mucho menor obtenido en las poblaciones tratadas, por lo que se puede concluir que sí hay diferencias significativas entre las poblaciones tratadas y la control, lo que nos lleva a decir que se produjo la reversión de la Estación por una mutación del P. de B. en la cepa E-2) por la M.F.F.O.

Al analizar los demás datos de la Tabla 1 se observa que no hay diferencias significativas en ningún otro compuesto que compone la tabla.

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 indican una diferencia significativa entre las poblaciones tratadas y el control, tanto para el ácido Microléxico como para el insecticida Ebrán, mientras que los otros compuestos probados fueron negativos en esta cepa.

Con los datos de la Tabla 2 descritos anteriormente podemos concluir que el ácido Microléxico usado en sistemas bacterianos por reversión en organismos que se originan por Corrientes de Narco también es efectivo en este sistema de prueba que incluye a un control, y que es útil como control positivo en este ensayo en particular. En lo que respecta al insecticida Ebrán, podemos decir que indujo la reversión de la Estación significativamente y que por tanto lo podemos considerar como un compuesto que produce mutaciones por Corrientes de Narco en este sistema y que debe profundizarse en otros posibles efectos sobre el ADN de los organismos en general y del hombre en particular.

Como conclusión general podemos decir a cerca del sistema de prueba que es reproducible, pues al menos de los experimentos de mutaciones varias veces y se pudieron duplicar resultados que reproducir con confiabilidad que las cepas no están contaminadas entre ellas mismas, pues no se obtuvieron resultados cruzados, éste es, que los controles positivos fueron específicos por un solo tipo de cepa.

Con la realización de este trabajo podemos decir que ahora en México se cuenta con un nuevo sistema para detectar mutágenos químicos en un organismo eucariote, el cual se vale de la reversión de la mutación en el "Locus" de *ad-3A*, que por sus características de bajas frecuencias de reversión espontáneas, facilidad de identificación (mutante color *revertante*), la posible identificación de los agentes mutágenos por su mecanismo de acción sobre el *Locus* como mutágenos por Sustitución del Par de Base (*MS-23*) o Corrimiento de Marco (*MS-24*) y por su especificidad de la reversión, lo proponemos como un sistema que puede usarse rutinariamente en los laboratorios interesados en detectar mutágenos químicos.

B. Comentarios

1) Resultados:

a. Positivos: El único resultado positivo que vale la pena considerar es el que produce el insecticida Deltán, esto que los otros los fueron los compuestos internos de nuestro sistema de prueba.

El Deltán es un compuesto altamente dañino al hombre, pudiendo llegar a causar la muerte, es un compuesto que afecta a una gran variedad de insectos, por lo que su uso está muy difundido en cultivos como algodón, arroz, caña de azúcar, café, cítricos, sorgo, lo que deja ver el alto riesgo de estar en contacto con este compuesto y por tanto que de alguna manera se ve afectado el organismo humano, ya sea por su toxicidad como por su posible mecanismo de acción sobre el DNA.

b. Negativos: Los resultados negativos no significan por fuerza que los organismos probados no sean capaces de producir algún otro tipo de alteración en el genoma. Puede ser que las concentraciones utilizadas en este ensayo en particular no hayan sido las adecuadas, pero no se pudieron probar concentraciones mayores debido a la falta de compuesto. Para estudiar la primera posibilidad se hace necesario proponer los experimentos para otros tipos de ensayos mutagénicos, en donde se estudien las posibles modificaciones metabólicas a otro compuesto potencialmente activo o/ó otros posibles alteraciones del material genético en sistemas como Dominantes Letales, Estudio Citogénico, entre otros. Estos estudios también deben aplicarse al Deltán, pues no se puede descartar la posibilidad de ser activado metabólicamente y ya sea producir un compuesto más activo u otro inactivo, o que pueda llegar a producir otras alteraciones en el genoma.

Ya que la finalidad de todo ensayo mutagénico es la de detectar compuestos químicos que puedan dañar al material genético del hombre, en este sistema, que a pesar de ser en un organismo consociado, se hace difícil la extrapolación directa de los resultados, por lo que hemos de considerar posibles falsos positivos y negativos por los siguientes motivos: Falsos Positivos: 1) Sistemas químicos de activación que pueda poseer el microorganismo, si el mismo sistema no es funcional en humanos; 2) El resultado positivo puede deberse a impurezas del compuesto utilizado en el ensayo mutagénico. Los Falsos Negativos: 1) La toxicidad de ciertos compuestos en el sistema

de prueba, dado que se ha encontrado que la activación bacteriana ocurre a concentraciones superiores a las del nivel crítico; 2) Sistemas artificiales de activación presentes en ambientes y ensayos en el organismo de prueba; 3) Sistema de Recuperación del ADN del organismo de prueba. (33)

2) Modificaciones al Método:

a. Para obtener un mejor rendimiento de los cultivos vegetativos es conveniente crecerlos a temperatura constante. La temperatura óptima del crecimiento vegetativo difiere para las cepas, 25°C para E-23 y 29°C para E-24. Dada la dificultad para tener incubadores a estas temperaturas, sobre todo en días calurosos, el presente estudio se desarrolló a temperatura ambiente, lo que restó eficiencia a la oxidación y por tanto aumentó la dificultad para obtener la cantidad mínima de comida para el ensayo.

b. Dada la importancia de las células sobrevivientes para determinar si la concentración de un compuesto está afectando a la población y con los viejos datos poder corregir el número de revertientes por un número de células sobrevivientes, se consideró conveniente calcular la sobrevivencia como un promedio de tres placas, esto es, hacer una dilución por cada tubo de prueba. Para hacerlo de esta manera se requiere de más material y medio de cultivo, esto último nos lleva a utilizar una mayor cantidad de Sertona, además del cual contamos en cantidades limitadas.

3) Perspectivas Futuras:

a. Otras técnicas con el mismo Sistema de Recuperación:

1) Inducción en Cultivos Vegetativos. Esta técnica se lleva a cabo al introducir el compuesto a probar al medio de cultivo vegetativo antes de que solidifique, al hacerlo, los volúmenes de cultivo se inoculan con 10^6 células, se incuban por 7 o 10 días, al cabo de este tiempo se cosechan los tubos y las células obtenidas se cultivan en los medios de cultivo adecuados para determinar su frecuencia de reversión. (32)

11) Inducción en un Sistema de Activación Metabólica in vitro. Este sistema se realiza de la misma manera que el denominado Sistema de Inducción (26). En este sistema se toma la fracción llamada E-3 (sobrevivientes a

9000g) de homogenados de hígado de rata o hamster, los cuales son irradiados previamente con Arcolox 12% o Fenobarbital. El tratamiento se hace en presencia de oxígeno, algunos cofactores y lo 2 a 4 hr. Las células se recuperan por centrifugación y se analizan para determinar su frecuencia de reversión.

111) Inducción por un Sistema de Activación in vivo, también se lo conoce como Ensayo Mediado por Hésped. En este sistema de inducción las células se inyectan a la rata, ratón o hamster por la vena de la cola, inmediatamente después se inoculan los animales con el compuesto a probar por vía intramuscular. Después de 2 a 16 hr se extrae el hígado, se homogeniza y por centrifugación se obtienen las células, las que se analizan para determinar su frecuencia de reversión. (34)

b. Estudio de Dominantes Letales en Neurospora crassa. Como ya se ha descrito Neurospora crassa tiene un ciclo sexual, el cual empieza con la fertilización por una célula macho, α , la cual puede ser tratada previamente con el compuesto a estudiar, a la célula hembra, Δ , desarrollada en un medio específico de cultivo para su fertilización, lo que llevaría a la formación de 8 Ascósporas contenidas en una Asca, esta última, a su vez contenida en el Cuerpo Fructífero o Peritocio. Las ascas pueden separarse del peritocio y analizarse, pudiéndose calcular el número de ascósporas viables por asca, semejante a como se calcula en los sistemas con levaduras. (8,9,10,22)

c. Nuevas Mutantes. Las cepas con las que trabajamos se pueden modificar genéticamente para sensibilizarlas a la acción de diversos agentes químicos, lo que se puede hacer al tener mutantes en su Sistema de Reparación de ADN.

Por el aumento de antígenos químicos en el medio ambiente se han diseñado diversos sistemas de prueba, uno de los cuales nos ocupa en esta tesis. Parte de estos químicos con capacidad para afectar la genética del hombre son los Flagnocidas, los cuales han proliferado en número y uso, lo que ha hecho que la frecuencia de contacto con este tipo de compuestos aumente, ya que son utilizados principalmente en la agricultura, lo que hace que de una u otra for-

na estén en contacto con el hombre, por lo que creemos necesario probar estos químicos en sistemas para detectar daño genético.

Para disminuir los riesgos de la población proponemos que a las personas que estén en contacto, ya sea en el proceso de fabricación o en la aplicación de estos químicos, se les proteja y se les informe del daño que estos plaguicidas producen, a la vez, diseñar tanto la investigación de nuevos productos plaguicidas sin efectos genéticos, como de legislar su uso, prohibiendo los plaguicidas tóxicos al hombre y disminuyendo su uso para bajar los niveles contaminantes de ellos, lo que puede hacerse al variar los insecticidas usados contra una misma plaga en una determinada región.

BIBLIOGRAFIA

REVIEWS

1. Ondarza, R.W, Los reguladores de las plantas y los insectos (1979) OEA OYE, p. 27-40
2. Kurimya, A.I and M.A. Milinskaya, Pesticides as a mutagenic factor in the environment (1974) Tsitologiya i Genetika, 13:342-373
3. Dybas, R.A, M Rite and V. Gary Flamm, Detecting Mutagens- Correlation between the mutagenicity and carcinogenicity of chemicals (1977) Annual Reports in Medicinal Chemistry, 12:234-248
4. Cortinas de Nava, C, Identificación de agentes mutagénicos (1976) Simpósio Syntax "Genética Humana", p. 70-76
5. Malling, H.J and J.S. Jassow, Action of Mutagenic Agents (1977) Handbook of Teratology, 1:99-132
6. Lehninger, A.L, Micromedica (1972) Ed. Omega, p. 671-682
7. de Serres, F.J and H.J Malling, Measurement of recessive lethal damage over the entire genome and at two specific loci in the ad-3 region of Neurospora crassa with a two component heterokaryon (1971) Environmental Chemical Mutagens; Principles and Methods for their Detection, Vol 2 Plenum Press, N.Y p. 311-342
8. de Serres, F.J and R.S Osterkind, Estimation of the relative frequencies of X-ray induced viable and recessive lethal mutations in the ad-3 region of Neurospora crassa (1962) Genetics, 47:793-796
9. Soares, R.R, Estimating the frequency of induced dominant lethal mutation in mice. II. The evaluation of a new method (1976) The Journal of Heredity, 67:339-343
10. Fincham, R.S and P.R Day, Genetics of Fungi (1971) Blackwell Scientific Publications.
11. de Serres, F.J, E.O Kolmark and R.S Brookman, Factors influencing the survival of Neurospora crassa conidia in Sorbose-Sucrose media (1962) Nature 193:556-557
12. Paton, S.L, L.V Barrett and V.W Cutler, Chemical induction of colonial phenocopies in Neurospora and Syncephalastrum (1949) Science, 102:509-511
13. Rinaldy, D and G.V Gooday, The structure and development of septa in Neurospora crassa (1974) Protoplasma, 82:125-146
14. Rinaldy, D and J.H Burnett, The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi (1970) Journal of General Microbiology, 62:203-218

15. Crooken, B and R.L. Tatum, The effect of Sorbose on metabolism and morphology of *Neurospora* (1968) *Micchin. Biophys. Acta*, 156:1-8
16. Turian, O and D.E. Renschel, Conidiation in *Neurospora* (1972) *Botanical Rev.*, 38:119-154
17. Turian, O, Induction of conidium formation in *Neurospora* by lifting of osmotic repression (1973) *Journal of General Microbiology*, 72:347-350
18. Weber, D.J and W.H. Hess, The fungal spore, form and function (1975) Ed. Wiley Interscience
19. David, R.H and F.J de Serres, Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa* (1970) *Methods in Enzymology*, 17A:79-143
20. Collinge, A.J, M.H. Fletcher and A.F.J. Trivedi, Physiology and cytology of septation and branching in a temperature-sensitive colonial mutant (ost-1) of *Neurospora crassa* (1978) *Trans. Br. mycol. Soc.*, 71 (1):107-120
21. de Serres, F.J, Studies with purple adenine mutants in *Neurospora crassa*. I. Structural and functional complexity in the ad-3 region (1956) *Genetics*, 41:668-676
22. de Serres, F.J, Genetic analysis of the structure of the ad-3 region of *Neurospora crassa* by means of irreparable recessive lethal mutations (1964) *Genetics*, 50:21-30
23. Fisher, G.B, Phosphoribosyl-aminimidazole-succinocarboxamide synthetase from *Neurospora crassa*. I. Partial purification and properties (1969) *Micchin. Biophys. Acta*, 178:380-388
24. Ong, P, Use of the spot, plate and suspension test systems for the detection of the mutagenicity of environmental agents and chemical carcinogens in *Neurospora crassa* (1978) *Mutation Research*, 53:297-306
25. de Serres, F.J, Genetic analysis of the extent and type of functional inactivation in irreparable recessive lethal mutation in the ad-3 region of *Neurospora crassa* (1968) *Genetics*, 52:69-77
26. Brozman, H.S, F.J de Serres and W.E. Barnett, Analysis of ad-3 mutants induced by nitrous acid in a heterozygote of *Neurospora crassa* (1969) *Mutation Research*, 7:307-314
27. Gilco, W.H, F.J de Serres and E. Barbour, Studies with a purple adenine mutant in *Neurospora crassa*. II. Tetrad analyses from a cross of a ad-3A mutant with ad-3B mutant (1957) *Genetics*, 42:608-617
28. Ance, R.H, P.D. Lee and W.E. Dureton, An improved bacterial test system

- the detection and classification of mutagens and carcinogens (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A, 70(3):782-786
29. Kastenbaum, M.A and L.O Brown, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies (1970) Mutation Research, 2:527-549
30. Cortinas de Nava, C, Comunicación Personal
31. The Merck Index (1976) Merck and Co, I N C, U S A Novena Edición.
32. Hill, D, Agricultural insect pests of the tropics and their control (1979) Cambridge University Press.
33. Flann, M.O and N.A Nohlsam, Mitomycin (1978) Advances in modern Toxicology Vol 5, Hemisphere Publishing Corporation.
34. Ong, T, Comunicación Personal