

29.4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

ACREDITACION AL DE GRADO

"EVALUACION DEL RIESGO GENOTOXICO DERIVADO DE LA EXPOSICION
A FARMACOS MEDIANTE EL EMPLEO DE MICROORGANISMOS COMO
SISTEMA DE PRUEBA"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

G.F.B. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



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

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

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. CRISTINA CORTINAS DE NAVA DE QUIEN AGRADEZCO EL IMPULSO Y APOYO QUE SIEMPRE ME HA BRINDADO.

I N D I C E

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCION	1
JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	4
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
USO DE LAS PRUEBAS MICROBIANAS EN LA EVALUACION DEL RIESGO DE CANCER POR	
EXPOSICION A SUSTANCIAS TOXICAS.	6
IMPORTANCIA DEL METABOLISMO.	11
SISTEMAS DE REPARACION CONSTITUTIVOS E INDUCIBLES	15
SISTEMAS DE PRUEBA MICROBIANOS PARA LA LA DETECCION DE AGENTES GENOTOXICOS.	25
<u>Salmonella typhimurium</u>	25
<u>Escherichia coli</u>	30
<u>Bacillus subtilis</u>	31
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	32
MATERIAL Y METODOS	33
Medicamentos estudiados	33
Disolución de los medicamentos	40

Origen de sustancias químicas y cepas de microorganismos	40
Crecimiento y conservación de cepas de microorganismos	41
Obtención de la fracción S9 de hígado de rata	43
Preparación de la mezcla S9	44
Ensayo de mutagénesis en <u>S. typhimurium</u>	44
Ensayos de genoletalidad en <u>E. coli</u>	44
Ensayos de genoletalidad en <u>B. subtilis</u>	50
Ensayo de mutagénesis en <u>S. cerevisiae</u>	52
RESULTADOS	53
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES.	77
BIBLIOGRAFIA	79

INTRODUCCION

En países desarrollados que han resuelto los problemas de enfermedades infecciosas, una de las principales causas de muerte son el cáncer, las malformaciones congénitas y los padecimientos hereditarios.

En lo que respecta al cáncer ahora se sabe que de 80 a 90 % de los casos tienen un origen ambiental (1) lo que ha despertado el interés en identificar los agentes cancerígenos responsables. Al mismo tiempo se ha puesto en evidencia que el cáncer es un proceso en etapas (iniciación, promoción y progresión) en las cuales se han detectado cambios genéticos y epigenéticos que las favorecen (2,3,4). Dos grupos particulares de genes parecen jugar un papel importante en el desarrollo de cáncer, se trata de los llamados oncogenes y los antioncogenes. Los primeros están involucrados en la regulación de los procesos naturales de proliferación y diferenciación celulares y su expresión inoportuna o inadecuada provoca el crecimiento autónomo y descontrolado de las células tumorales, mientras que los segundos se considera que actúan como supresores o reguladores de los oncogenes.

Diversas observaciones muestran que la activación de oncogenes pueda estar asociada con mutaciones puntuales (5,6,7),

rearrreglos cromosómicos (8), amplificación génica (9) o con inserción de promotores (10).

Los estudios en modelos animales sugieren por su parte, que varios agentes químicos son capaces de provocar la activación de oncogenes por mutación puntual. Así, por ejemplo, se ha encontrado en varios tumores inducidos químicamente en roedores; la activación de oncogenes pertenecientes a la familia ras (genes que codifican para proteínas citoplasmáticas estructuralmente relacionadas que se unen a trifosfato de adenosina impidiendo su hidrólisis) cuya mutación resultante concuerda con el patrón de alquilación del carcinógeno empleado (11,12,13).

La activación de oncogenes de la familia ras ha sido detectada además en tumores benignos como papilomas de la piel de ratón, adenomas en hígado y pulmón de ratón, así como en tumores de células basales en rata (14), lo que ha hecho pensar que este fenómeno es un evento temprano en el proceso neoplásico. Mientras que las translocaciones cromosómicas y la amplificación génica parecen estar involucradas en la activación de oncogenes que influyen la progresión tumoral (15).

Existen, asimismo, evidencias de que la inactivación de antioncogenes puede estar mediada por mutaciones y rearrreglos cromosómicos como ocurre en el retinoblastoma (16).

Por otra parte, toda una serie de evidencias indican que agentes identificados como cancerígenos para el humano, son capaces de producir mutaciones (17).

En virtud de lo expuesto, se considera que las pruebas de genotoxicidad (que evalúan la interacción de agentes químicos con el material hereditario de la célula y la producción de alteraciones génicas o cromosómicas) constituyen una herramienta valiosa en la identificación de carcinógenos ambientales (12). En particular, el ensayo bacteriano para la detección de mutaciones puntuales en Salmonella typhimurium ha mostrado ser un excelente recurso para identificar carcinógenos electrofílicos, así como para determinar la influencia de los sistemas de reparación por escisión y de transformación metabólica, en la genotoxicidad de carcinógenos químicos (17,18,19).

En cuanto a las malformaciones congénitas o a los procesos de teratogénesis, aunque pueden ocurrir como resultado de efectos tóxicos que destruyen o afectan grupos celulares, también se ha visto que pueden resultar de daño genético. Habiéndose identificado que agentes mutagénicos son también teratógenos, si bien no todos los teratógenos son mutágenos (20).

Mutaciones génicas y cromosómicas han sido asociadas con más de 4000 padecimientos hereditarios en el humano (21), y aunque no ha logrado involucrarse a mutágenos ambientales en su etiología,

estudios en animales de laboratorio han puesto en evidencia que diversos tipos de compuestos, así como los rayos X son capaces de inducir daño genético heredable (22).

Todo ello resalta la importancia de evaluar el riesgo de las mutaciones y de los agentes mutagénicos para la salud humana.

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Entre los agentes identificados como mutágenos y carcinógenos para el humano, se encuentran varios medicamentos como el clorambucil, la ciclofosfamida, el dietilestilbestrol y la vincristina además de otros (23). Es por ello, que previo a la comercialización de nuevos productos farmacéuticos la Organización Mundial de la Salud ha recomendado el empleo de pruebas de genotoxicidad como parte de su evaluación toxicológica (24). Sin embargo, dado lo reciente de esas pruebas, se consumen actualmente medicamentos que no fueron evaluados genéticamente en forma sistemática antes de salir al mercado; tal es el caso de diversos amibocidas y antihelmináticos. Una revisión de la literatura previa al presente estudio mostro, en efecto, que los medicamentos antiparasitarios incluidos en la tabla I, correspondían a uno de los siguientes grupos de clasificación de acuerdo a los estudios existentes de genotoxicidad.

- a) Sin datos disponibles en los bancos de información consultados.
- b) Resultados inconsistentes reportados ya sea en un mismo o en distintos sistemas de prueba.
- c) Existencia de varios reportes sobre efectos carcinogénicos mutagénicos.

Los antiparasitarios pertenecientes a los dos primeros grupos, se encogieron para su evaluación genotóxica en los sistemas microbianos como primera etapa en la evaluación de riesgos.

OBJETIVO GENERAL

- Contribuir a evaluar los riesgos genotóxicos derivados del consumo de medicamentos antiparasitarios.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Evaluar la genotoxicidad de medicamentos antiparasitarios en sistemas microbianos.
- 2) Estudiar el mecanismo de mutación de los medicamentos genotóxicos.
- 3) Investigar la participación de los sistemas de biotransformación en la actividad genotóxica.
- 4) Evaluar la influencia del mecanismo de reparación por escisión sobre la genotoxicidad de los compuestos.

TABLA I. DROGAS ANTIPARASITARIAS
ASPECTOS ESTUDIADOS EN RELACION A MUTAGENESIS

MEDICAMENTOS	A D N			MUTACIONES GENICAS			ANOMALIAS MITOTICAS	LESIONES CROMOSOMICAS		NO DISYUNCIÓN	MICRO NUCLEOS	DOMINANTES LETALES	TRANSLOCACIONES HEREDABLES
	S I T E S I G	R E P A R A C I O N	L E S I O N E S	R A C T I V A S	H O N G O S	D R O S O P H I L A	CELULAS DE MANIFERO	R A T O N	H U M A N O	H U M A N O	R A T O N	R A T O N	R A T O N
CLOROQUINA	1 A 5	6 A 12	13 A 15	15, 16			17		18,19			20	
DEHIDROEMETINA													
DIODOHIDROXIQUINO- LEINA													
METRONIDAZOL			21 A 23	24 A 36	37	38		39		40	41		
BEFENIO				16									
HEMILRESORCINOL													
MEBENDAZOL				42 A 44				42 A 44	45			45	45
PIPERACINA			46 A 47	40 A 50									
PIRANTEL				16 A 50									
PIRVINIO				16 A 50									
NICLOSAHIDA													
IODOCLOROHIDROXIQUI- NOLEINA													

REFERENCIAS

1. Proc. Nat. Acad. Sci. 54:521, 1965
2. Proc. Nat. Acad. Sci. 55:1511, 1966
3. Clin. Res. 20:572, 1972
4. Mol. Pharmacol. 9:304, 1973
5. Biochem. Pharmacol. 20: 1157, 1971
6. Stud. Biophys. 50:107, 1975
7. Cancer Res. 35:1773, 1975
8. Mol. Gen. Genet. 132:13, 1974
9. Mutat. Res. 25:391, 1974
10. Exp. Cell Res. 74:67, 1972
11. Clin. Res. 17:40, 1969
12. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137:202, 1971
13. EMS NewsL. 5:38, 1971
14. Antimicrob. Agents. Chemother. 3:530, 1970
15. Mutat. Res. 41:61, 1976
16. Mutat. Res. 54:230, 1978
17. Strahlentherapie 139:587, 1970
18. Mutat. Res. 20:135, 1973
19. Bull. Exp. Biol. Med. (USSR) 82:1095, 1976
20. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23:283, 1972
21. Antimicrob. Agents Chemother. 13:19, 1978
22. Mol. Pharmacol. 13:872, 1977
23. J. Antimicrob. Chemother. 3:42, 1977
24. Biochem. Biophys. Res. Comm. 66:520, 1973
25. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72:5135, 1975
26. Science 180:111B, 1975
27. Mutat. Res. 26:483, 1974
28. Cancer Res. 37:629, 1977
29. Mutat. Res. 38:203, 1976
30. J. Nat. Cancer Inst. 56:283, 1976
31. Mutat. Res. 57:97, 1970
32. Antimicrob. Agents. Chemother. 10:476, 1976
33. J. Mod. Chem. 20:158B, 1977
34. Cancer (Philadelphia) 38:1253, 1976
35. Ann. N.Y. Acad. Sci. 269:16, 1975
36. Mutat. Res. 29:240, 1975
37. J. Tox. Env. H. 4:815, 1978
38. Mutat. Res. 53:213, 1978
39. Lancet 2:802, 1976
40. Kapp, R. (Espermatozoides YY) Reportado en el "Workshop on methodology for assessing reproductive hazards in the work place" realizado en Washington en Abril, 1970
41. Mutat. Res. 53:125, 1978
42. Mutat. Res. 21:50, 1970
43. Therapic 31:505, 1976
44. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. 202:517, 1974
45. Mutat. Res. 26:427, 1974
46. Cancer Res. 13:3209, 1973
47. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 14:5, 1973
48. Ann. N.Y. Acad. Sci. 76:475, 1958
49. Cancer Res. 32:1598, 1972
50. Mutat. Res. 48:307, 1977

USO DE LAS PRUEBAS MICROBIANAS EN LA EVALUACION DEL RIESGO DE CANCER POR EXPOSICION A SUSTANCIAS TOXICAS.

Riesgo se define como la probabilidad de que una población expuesta a sustancias tóxicas desarrolle cáncer.

El análisis de riesgos ha surgido como una necesidad para establecer acciones tendientes a prevenir el cáncer de origen ambiental. Dicho análisis se basa en el conocimiento del papel causal de agentes físicos, químicos y biológicos en el cáncer, así como del desarrollo de la enfermedad a través de etapas favorecidas por alteraciones genéticas (iniciación y progresión) o por la proliferación celular (promoción).

Para llevar a cabo el análisis de riesgos se requiere contar con elementos de información cualitativos y cuantitativos. Así, por ejemplo, se necesita saber si un factor ambiental dado constituye un peligro al ser capaz de desencadenar cualquiera de las etapas que contribuyen al proceso de carcinogénesis, lo cual representa una información cualitativa. A la vez, se requiere conocer qué tan potente es ese factor para calcular el número de cánceres que aparecerán en función de la dosis en una población expuesta a dicho factor, aspecto cuantitativo fundamental para decidir la prioridad que se atribuya a su control.

De lo anterior se desprende la importancia de evaluar qué tan

capaces son de producir un efecto relevante para el cáncer factores (por ejemplo medicamentos) a los que pueda verse expuesta la población. Asimismo, se hace evidente el interés en determinar la magnitud de la exposición.

Con respecto al primer punto se percibe la utilidad de valorar la capacidad de los agentes sospechosos como carcinógeno, de inducir alteraciones genéticas capaces de iniciar la transformación maligna o de inducir su progresión. Mientras que, en lo que refiere a la exposición, surge la necesidad de saber cual es la dosis efectiva del agente a nivel del órgano, la célula o la molécula blanco. Para ello, si se trata de agentes químicos, es preciso conocer: si son activos per-se o requieren ser metabolizados para convertirse en moléculas reactivas, su farmacocinética y sus mecanismos de acción. En forma adicional, es preciso saber si las células blanco cuentan con mecanismos de detoxificación o de reparación del daño genético inducido por agentes de riesgo.

Los sistemas microbianos para detectar agentes genotóxicos, en particular *Salmonella typhimurium*, han mostrado ser sumamente valiosos para identificar y contribuir a evaluar los riesgos de cancerígenos ambientales. Prueba de ello es que la mayoría de los carcinógenos electrofílicos (incluyendo los que producen cáncer en el humano), son capaces de inducir mutaciones en bacterias (17).

S. typhimurium, sobre todo, constituye uno de los sistemas de prueba con mayor sensibilidad (capacidad para detectar como mutágenos a agentes carcinógenos) y especificidad (capacidad para detectar como no-mutágenos a agentes no-carcinógenos (17,25). Acoplado a sistemas capaces de realizar la biotransformación de agentes xenobióticos, como es el uso de homogenado de tejidos como hígado, piel, intestino, etc., permite estudiar el comportamiento de los agentes de riesgo bajo la influencia del metabolismo. También permite explorar que ocurre con los agentes sospechosos de ser cancerígenos, dentro del organismo, ya que se puede valorar la actividad mutagénica de los compuestos excretados en la orina de organismos expuestos (por ej. animales de experimentación o seres humanos) (26,27). Es posible, además introducir las bacterias en animales de laboratorio y estudiar los efectos de metabolitos altamente reactivos de vida media corta (26). Desde este punto de vista, constituye un elemento de información para valorar la exposición real a agentes potencialmente cancerígenos.

Se cuenta, asimismo, con cepas capaces o deficientes en reparación de daño genético, por lo que se puede determinar el papel del sistema de reparación respectivo (escisión) en la mutagenicidad de los agentes en estudio (18).

Por haberse construido cepas con lesiones genéticas específicas es posible, a la vez, determinar los mecanismos de

acción de los agentes mutagénicos, lo cual puede eventualmente ser útil para predecir sus efectos en genes relevantes para el cáncer (por ej. oncogenes de la familia ras con sitios críticos de activación) (14).

Así pues, diversos autores han llevado a cabo análisis de las bases de datos sobre carcinógenos estudiados en el sistema de S. typhimurium y han destacado el valor de la prueba como indicador de riesgo es decir, como elemento cualitativo de información (30,31,32,33,34,35,36,37).

Aunado a lo anterior, se ha tratado de atribuir a los resultados emanados de las pruebas bacterianas un valor cuantitativo en la predicción del riesgo de cáncer de sustancias tóxicas. Para ello se han calculado índices de la potencia carcinogénica de los compuestos en bioensayos animales y de su potencia mutagénica en bacterias de S. typhimurium (y otros sistemas de prueba) (38). Se ha visto, a través de dichos análisis, que en el mejor de los casos las pruebas bacterianas predicen la carcinogenicidad de un 60 a 70% de los carcinógenos. Lo cual se entiende si se toma en cuenta que para que el cáncer se desarrolle, no tan sólo se requiere de alteraciones genéticas que inician el proceso sino de otro tipo de alteraciones (por ej. citotoxicidad) que promuevan la proliferación celular. Esto parece corroborarse por la reciente

observación de una predictibilidad superior al 80% cuando a los datos de mutagenicidad en bacterias se suman los de toxicidad inducida por los mismos agentes en diversos sistemas (39).

IMPORTANCIA DEL METABOLISMO.

En la década de los sesentas y principio de la década de los setentas se estableció el hecho de que la mayoría de los carcinógenos ejercen su acción después de ser convertidos metabólicamente en derivados altamente reactivos, principalmente en compuestos electrofílicos (40). Esta conversión es realizada, sobre todo, por una serie de citocromos (10 a 12) denominados conjuntamente P450 por su capacidad de presentar un pico máximo de absorción a 450 nm cuando se conjugan con CO (41). Los citocromos mencionados son oxigenasas de función mixta localizadas principalmente en mitocondrias, aunque también se encuentran en el núcleo. La activación de carcinógenos también se realiza por reducción con DT-diaforasa (quinona reductasa) de compuestos como nitrofuranos, nitroquinolinas, nitroquinonas y nitropolicíclicos (42); reacciones de conjugación con glutatión, por ejemplo, 1,2-dibromoetano y 1,2-dicloroetano (42); hidrólisis con enzimas específicas como la β -glucuronidasa de flora intestinal (42), y por último, reacciones de oxidación vía el sistema de síntesis de prostaglandinas o vía la producción de radicales libres del oxígeno (42). El elevado número y tipo de citocromos P450 identificados en animales de laboratorio (43) y el humano (44,45) puede explicar, cuando menos en parte, las diferencias interindividuales que existen en el metabolismo de compuestos. Estas variaciones en actividad

enzimática de diferentes células y tejidos son del orden de hasta 1000 veces (46,47).

Los estudios bioquímico-epidemiológicos sugieren que la susceptibilidad de padecer cáncer de pulmón puede depender de deficiencias metabólicas innatas. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son metabolizados por enzimas como la aril hidrocarburo hidroxilasa (AHH) hasta compuestos electrofílicos como los epóxidos que presentan una gran reactividad con proteínas, ADN y ARN. En el ratón, la inducción de esta enzima varía en especies singénicas afectando la frecuencia de tumores sólidos y leucemias que se presentan en animales tratados con hidrocarburos policíclicos (48,49).

Los pacientes con cáncer en laringe y pulmón presentan niveles más elevados de AHH que individuos de una población control. Un estudio de casos y controles revela que el 70 % de personas con cáncer de pulmón poseen niveles de actividad elevadas de AHH (50). Korsgaard y col. (51) han encontrado la existencia de tres diferentes fenotipos en un grupo control en Suecia. 49 % tiene una actividad enzimática baja, 42 % actividad intermedia y 9 % posee una actividad elevada. En el grupo con carcinoma de laringe se encuentra un 37 % con altos niveles de AHH, 44 % con niveles intermedio y 20 % con niveles bajos.

Debido al diseño retrospectivo de estos estudios, la elevada actividad de AHH puede, sin embargo, reflejar una susceptibilidad inherente de los individuos que la poseen, o bien ser un subproducto ocasionado por el mismo proceso neoplásico.

Otro ejemplo a resaltar lo constituyen los estudios epidemiológicos de pacientes con cáncer de vejiga que indican una relación con el nivel enzimático de N-acetiltransferasa (NAT) (52). En base a estudios en animales, se ha postulado que esta enzima juega un papel clave en la detoxificación de arilaminas (53) carcinogénicas. Mommsen y col. (54) señalan que el conjunto de resultados reportados en la literatura muestran una mayor incidencia de individuos deficientes en NAT dentro del grupo con cáncer de vejiga que en el grupo control.

Lo expuesto anteriormente nos indica la importancia del metabolismo en la etapa de iniciación del proceso de carcinogénesis, por lo que es importante el contar con parámetros que nos indiquen tanto la exposición a carcinógenos, como diferencias que puedan existir en el metabolismo entre individuos. La caracterización y cuantificación de los procarcinógenos y sus metabolitos constituyen una herramienta para medir exposición. Se pueden tener en efecto, evidencias directas de

exposición a carcinógenos mediante la medición de las sustancias tal y como ingresaron al organismo o de su metabolitos, en fluidos corporales como orina (55,56), leche materna (57,58) líquido seminal (59), suero (60,61), o en tejidos donde se acumulan como la grasa (62,63). Alternativamente se puede probar la presencia de mutágenos en el mismo material biológico como una medida indirecta de la presencia y concentración de carcinógenos (64,65,66), mediante el uso de las pruebas a corto plazo para la identificación de agentes mutagénicos. Por otro lado, dichas pruebas deben contar con sistemas de activación metabólica acoplados, que permitan explorar la incidencia del metabolismo sobre la mutagenicidad de las sustancias que están siendo evaluadas.

SISTEMAS DE REPARACION CONSTITUTIVOS E INDUCIBLES

El ADN está continuamente sometido a la acción de agentes endógenos y exógenos que lo dañan, a la vez que actúan sobre él una gran variedad de enzimas capaces de corregir o reparar las lesiones inducidas por tales agentes, en lo que se conoce como sistemas de reparación.

A la fecha se han identificado dos tipos de sistemas de reparación: constitutivos e inducibles (67). Dichos sistemas están constituidos por una o varias enzimas que actúan conjuntamente en la reconstitución del ADN después de que ha sido afectado por agentes físicos o químicos, dichas enzimas pueden estar presente a concentración constante independientemente del estado metabólico del organismo (sistema de reparación constitutivo) o su concentración puede elevarse cuando el sustrato sobre el que actúa se encuentra presente (sistema de reparación inducible).

Dentro de los sistemas de reparación constitutivos destaca el llamado sistema de reparación por escisión el cual está encargado de eliminar:

- dímeros de pirimidinas generados por la acción de la luz ultravioleta.

- purinas o pirimidinas situadas en cadenas opuestas del ADN y unidas por enlaces covalentes.
- purinas alquiladas (en las que el grupo alquilo es igual o mayor a un etilo).
- aductos (resultado de la unión covalente de bases púricas o pirimidicas con moléculas de mutágenos) de hidrocarburos aromáticos policíclicos como guanina-benzo(a)pireno y guanina-acetilaminofluoreno.

Reparación por Escisión

El estudio de la reparación por escisión en bacterias Escherichia coli sometidas a la luz ultravioleta, ha dado a conocer que se trata de un proceso que se lleva a cabo en etapas, las cuales se describen a continuación.

INCISION Y ESCISION: En esta etapa participan los productos de los genes uvrA, uvrB y uvrC, cuya acción da por resultado la generación de rupturas que involucran aproximadamente a 7 nucleótidos hacia el extremo 5' del dímero y a 3 ó 4 nucleótidos en el extremo 3' del mismo (68). "In vitro", la liberación del oligonucleótido resultante sólo ocurre después de la desnaturalización del complejo ADN-proteína o a través de la

acción de agentes quelantes (EDTA). También la adición simultánea de los productos de los genes *polA* (polimerasa I) y *uvrD* (helicasa II), da por resultado la liberación del fragmento nucleotídico (69).

RESINTESIS: La ADN polimerasa I se encarga de resintetizar la secuencia correcta de bases a partir de nucleótidos trifosfatados, una vez que los pasos anteriores hayan sido realizados.

UNION: El fragmento resintetizado es unido mediante enlaces fosfodiéster a la hebra correspondiente del ADN mediante la participación de una ligasa.

Se ha observado que la adición de la helicasa II, ADN polimerasa I y una ADN ligasa, es suficiente para la reconstitución del ADN cortado; la ligasa del virus T4 puede sustituir a la de E. coli, lo que no sucede con la ADN polimerasa (69).

El sistema de reparación por escisión en células humanas, ha sido puesto en evidencia y caracterizado, a través del estudio del comportamiento de las células de individuos afectados por una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, el xeroderma pigmentosum (XP). Los sujetos afectados por esta enfermedad son muy sensibles a la luz solar y propensos a desarrollar cáncer de

piel, lo que llevó a investigar y descubrir que en realidad son susceptibles a la luz ultravioleta por deficiencias en la capacidad de remover los dímeros de timina (70). A la fecha, se han identificado 8 grupos de complementación genética en el XP por medio de experimentos de fusión de células provenientes de distintos enfermos. Lo anterior ha hecho pensar que cuando menos existen 8 genes involucrados en este proceso de reparación; los grupos de complementación A, B, C, D, y G, parecen ser incapaces de realizar la incisión del ADN para retirar los dímeros, mientras que los de los grupos E, F, y H no son totalmente deficientes en la actividad de remoción de dímeros.

Los fenotipos que se presentan en células de XP comparten similitudes con los identificados en E. coli. Así, por ejemplo, las mutantes de E. coli uvrA, uvrB y uvrC se caracterizan por su incapacidad para llevar a cabo adecuadamente la reacción de incisión-escisión; mientras que las que presentan mutaciones en los genes uvrD o polA, sólo tienen una deficiencia parcial. Los productos de los genes uvrABC pueden realizar la incisión "in vitro", pero para que el mecanismo de reparación in vivo funcione eficientemente se requieren, además, los productos de los genes uvrD y polA. De manera similar, se ha propuesto que en células humanas los productos de algunos genes (A,B,C,D,G) son absolutamente necesarios para llevar a cabo la reparación por escisión en

sistemas de células, en tanto que los productos de los genes E, G, H, son componentes importantes de la maquinaria de reparación in vivo.

Recientemente, se han clonado genes involucrados en la reparación por escisión en humanos y se piensa que algunos de ellos pueden codificar proteínas que interactúan con los cromosomas haciendo accesibles los sitios lesionados del ADN, a la maquinaria de reparación.

Cuando las células entran en la etapa de síntesis de ADN, las lesiones que no han sido removidas bloquean la replicación y pueden provocar mutaciones por acción de sistemas de reparación inducibles "propensos a error" (71,72).

Reparación SOS

En E. coli el sistema de reparación propenso a error corrige lesiones que de otra manera inducirían la muerte de la bacteria, aunque al hacerlo introduce errores; por ello a este sistema se le conoce como "SOS" ya que le permite a las bacterias sobrevivir a expensas de mutar.

Se han identificado por lo menos 17 loci genéticos involucrados en la reparación SOS (73). Estos genes se inducen como resultado de la aparición de lesiones en el ADN, por lo que

se les denomina como genes "din" (damage inducible genes). Dichos genes están bajo el control de los productos de *recA* y *lexA*. *LexA* es el represor de los genes *din* (67). Cuando ocurre daño al ADN se generan productos de degradación (ADN de cadena sencilla, deoxinucleótidos, etc.) que activan a la proteína *recA*, la cual actúa como proteasa inactivando al represor (74,75,76).

La inactivación del producto *Lex* y la disminución de su concentración celular, provoca que el represor unido se disocie del ADN, dejando a los genes *din* accesibles para su transcripción. La reparación efectuada por los productos inducidos causa una reversión en la cascada de eventos, retornando la célula a su estado reprimido inicial. Esto es, la disminución de las lesiones en el ADN da por resultado una reducción de *recA* activado y un aumento en los niveles del represor.

Un ejemplo de genes inducibles son los denominados *umuDC*, (77) los cuales se requieren para la fijación de las mutaciones por lesiones que bloquean la replicación. A estas lesiones se les conoce como "no-instructivas" puesto que impiden el apareamiento normal de bases. A diferencia de la cepa silvestre las mutantes *umuDC* muestran una menor sobrevivencia y no son mutadas cuando se tratan con agentes mutagénicos (78).

Una lesión premutacional provocada por la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) es la formación de la O⁶-metilguanina la

cual ocasiona un apareamiento erróneo durante la replicación (79). Por su parte, una de las lesiones causada por el metilmetanosulfonato (MMS) es la metilación de 3 de una adenina que produce un bloqueo en la replicación (80). La mutagénesis por la MNNG es independiente de los genes umu mientras que la provocada por MMS requiere de las funciones umu.

Además de estas formas de mutagénesis (directa e indirecta), existe otra en la que la lesión en sí no constituye un punto de restricción para la replicación sino que dicho punto es generado por un sistema de reparación. La base modificada 7-metilguanina es otra lesión provocada por MNNG y MMS (81), la cual no bloquee la replicación ni causa errores en el apareamiento, sin embargo, constituye un sustrato adecuado para glicosilasas específicas que escinden selectivamente la base modificada dejando sitios apurínicos que son sitios no-instructivos que pueden ser replicados en células en las que se ha inducido el SOS.

Existen evidencias que apoyan un modelo en el cual los productos de umu alteran la maquinaria de replicación provocando que las lesiones no-instructivas sean utilizadas como patrón (82)

Por último, además de su papel como proteasa de LexA, RecA parece estar involucrada en otras etapas de la mutagénesis por luz uv, ya que las mutantes recA irradiadas, no muestran mutagénesis aunque tengan totalmente inducidos los genes umu (83).

La reactivación Weigle en E. coli es un fenómeno dependiente de recA y lexA y consiste en un aumento en la sobrevivencia y mutagénesis del bacteriófago lambda irradiado con uv cuando la bacteria huésped ha sido irradiada previamente (84). Se han buscado fenómenos análogos en eucariotes como una evidencia de la existencia de reparación inducible SOS.

Varios autores han reportado la reactivación (reparación) de virus en células de roedores, de mono y de humano, observándose una máxima sobrevivencia de los virus cuando las células huésped son pretratadas con luz uv, rayos X, carcinógenos químicos y choque térmico (85,86,87,88). Estos estudios se han realizado principalmente con SV40, poliovirus y virus de Herpes simple (VHS) y los resultados se asemejan a los obtenidos con el fago lambda en E. coli. También se ha encontrado un aumento en la mutagénesis del locus timidina quinasa del virus VHS cuando se irradian las células del huésped (89).

Sin embargo, los estudios con sondas virales tienen varios problemas técnicos que hacen difícil la interpretación de resultados. Por ejemplo, el aumento de mutagénesis de VHS en células irradiadas se observa solamente a una alta multiplicidad de infección mientras que la de SV40 se realiza a una baja multiplicidad de infección (90,91). A su vez, la radiación uv induce recombinación viral que se traduce en un aumento en la mutagénesis independiente de una respuesta SOS inducida (92).

La inducibilidad del fenómeno en células eucariotes, esto es, el requerimiento de síntesis de proteínas de novo, no es muy claro, ya que se ha utilizado cicloheximida como inhibidor y este compuesto tiene una multiplicidad de efectos entre los que se encuentra la inhibición de la síntesis de ADN (93).

Además de la reactivación y mutagénesis de virus en células irradiadas, se han reportado otras funciones inducibles en células de mamífero, como son la síntesis de proteínas y enzimas, amplificación génica, alteraciones en la expresión génica y metabolismo (94,95,96,97).

El plasminógeno es una proteasa inducida por radiación uv, agentes genotóxicos y promotores en fibroblastos de roedores y de humano (98). Aunque su actividad recuerda a la de RecA, no se han encontrado evidencias de funciones análogas en la regulación de la expresión génica.

Otras proteínas que se incrementan como respuesta al daño al ADN son ADN-ligasas, metalotioneína y antígeno H2 (94,95,99). Adicionalmente, se ha detectado por electroforesis la síntesis aumentada de 8 proteínas después del tratamiento de fibroblastos humanos con luz uv, mitomicina C o TPA (acetato de tetradecanoilforbol) (100). Una de estas proteínas llamada "EPIF" (extracellular protein synthesis-inducing factor) es extracelular

y ocasiona la inducción del mismo espectro de proteínas en células no irradiadas.

En conclusión, existen diferentes evidencias que apoyan la existencia de un mecanismo de reparación inducible en células de mamífero, aunque este no parece ser estrictamente similar al observado en E. coli. Las células eucariotes sintetizan proteínas de novo no solamente en respuesta a agentes genotóxicos sino también a promotores y a variaciones de las condiciones de cultivo. La respuesta parece estar mediada por una proteína inducible que afecta células no tratadas, lo cual es diferente de lo que pasa en E. coli y puede reflejar las diferencias fundamentales entre los requerimientos de supervivencia en una población de organismos unicelulares vs organismos multicelulares.

SISTEMAS DE PRUEBA MICROBIANOS PARA LA DETECCIÓN DE AGENTES GENOTOXICOS.

Salmonella typhimurium

Con este sistema desarrollado por Bruce N. Ames en la Universidad de California, se miden mutaciones puntuales en el operon de histidina en bacterias de Salmonella typhimurium. Para ello, se cuenta con una serie de cepas auxótrofas con diferentes tipos de mutación en el citado operon con las cuales se realizan pruebas de reversión.

NATURALEZA Y ESPECIFICIDAD DE LAS CEPAS USADAS.

TA1535.- Esta cepa que contiene la mutación his G46, se obtuvo como una mutante espontánea de la cepa silvestre LT2 ara-9 (101). Revierte por mutágenos que causan sustituciones de base pero no por aquellos que ocasionan corrimientos. Barnes y Tuley (102) mostraron por secuenciación de ADN, que la mutación G46 fue generada por una transición A/T a G/C en el codón 69 de his G, provocando el cambio del aminoácido original leucina por prolina. El patrón de reversión de esta cepa se encuentra en la figura 1, las reversiones intragénicas pueden deberse a transiciones y transversiones (103). También se ha visto que la

CEPA SILVESTRE

Val	Val	Asp	Leu	Gly	Ile	Ile
GTG	GTC	GAT	<u>C</u> TC	GGT	ATT	ATC

Mutación
Espontánea



Transición

his G46

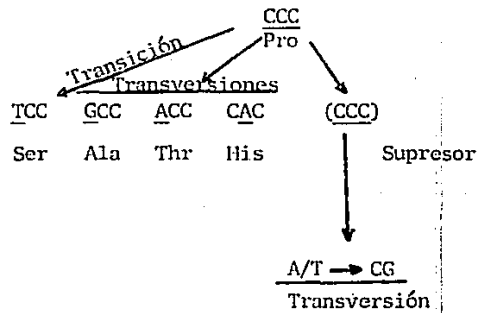


FIG. 1 SECUENCIAS BLANCO INVOLUCRADAS EN LA REVERSION DE LA MUTACION his G46.

mutación G46 pueda revertir por supresores extragénicos casi exclusivamente por transversiones A/T a C/G en un gene que codifica a un tRNA (104).

TA1537.- La mutación his C3076 que tiene esta cepa fue obtenida después del tratamiento de la cepa silvestre (S. typhimurium LT2 ara-9) con ICR 364-OH (105). La secuencia de bases involucrada en esta mutación no se conoce, pero basándose en el patrón de reversión con mutágenos conocidos así como en el estudio de genes supresores de mutaciones por corrimiento, se presume que presenta una adición de un par de bases -G- en el codon -G G G - para dar -G G G G -. Esta mutación es suprimida por el supresor suf B descrito por Riddla y Roth (106) que es un tRNA^{ARG} con un anticodon - G G G G -. Esta cepa revierte con compuestos como 9-aminoacridina, ICR 191 y epóxidos de hidrocarburos policíclicos (107) mientras que con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina la reversión es débil lo que concuerda con este tipo de mutaciones (105).

TA1538.- La mutante por corrimiento -1 his D3052, se deriva también de la cepa de S. typhimurium LT2 ara-9, después de tratarla con ICR 364 OH (105). Los datos de la secuencia de nucleótidos provienen tanto de secuenciación de aminoácidos del polipéptido (108), así como de la secuencia de ADN tipo silvestre y mutantes (103). Existen por lo menos seis clases de revertantes

de las cuales se muestran 3 en la figura 2 ya que los cambios ocurridos en las 3 restantes no han sido determinados aún. El tipo de revertantes que aparecen mas comunmente (parte central de la fig. 2) poseen una delección de dos pares de bases C G G C C G C G C G C G -G C- ó -C G- en una secuencia redundante -G C G C G C G C- cercana a la mutación his D3052. Este tipo de revertantes forman el 100% de las obtenidas después de tratamiento con 2-nitrosofluoreno (NF), nitroquinolina -N-óxido (NQ) e hiantona (HC); cerca de la mitad de las revertantes obtenidas espontáneamente o con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y una pequeña proporción de las inducidas con ICR. Existe ambigüedad en la secuencia de la inserción de 10 pares de bases mostrada en la figura 2 ya que fue deducida por secuenciación de aminoácidos solamente (103).

TA98 y TA100.- La cepa TA98 y la TA100 provienen de la TA1538 y TA1535 respectivamente a las cuales se les introdujo el plásmido pKM101. Este plásmido contiene los genes inducibles muc (mutagenesis by uv and chemicals) A y B que son los equivalentes funcionales de los genes umu D y C (77), que como ya se ha explicado en la sección de reparación, son necesarios para la fijación de mutaciones provocadas por lesiones "no-instructivas".

Los genes mucAB suprimen el fenotipo de las mutantes umuDC y todos ellos están bajo el control de lex además de que comparten una considerable homología en su secuencia de aminoácidos y en el tamaño de sus productos proteínicos

EPA SILVESTRE

Gln Leu Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asp Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ser Ala
 CAA CTG GCG GAA CTG CCG CGC GCG GAC ACC GCC CGG CAG GCC CTG AGC GCC
 ICR364-OH

-1pb

hisD5052

CAA CTG GCG GAA CTG CCG CGC GCG GAC ACC GCC GGC AGG CCC TGA
 Reversión espontánea Nitrosofluoreno, NQO
 Hicantona, MUNG, ICR
 (-CG o -GC) -2pb
 GCG GAC ACC GCC GGC AGG CCC CTG ACC GCC
 Ala Asp Thr Ala Gly Arg Pro Leu Ser Ala
 +1pb ICR, MNNG

Reversión espontánea

+10pb

CTG CCG CGC GGA CAC CGC CGG CAG GCC CTG
 Leu Pro Arg Gly His Arg Arg Gln Ala Leu
 CAA CT AC TC ACT GGC GGA ACT GCC GCG CGC GGA CAC CGC CGG CAG GCC
 T^A_G AG^T_C
 Gln Leu Thr Ser Thr Gly Gly Thr Ala Ala Arg Gly His Arg Arg Gln Ala

FIG. 2 SECUENCIAS BLANCO INVOLUCRADAS EN LA REVERSION DE LA MUTACION hisD5052.

(mucA y UmuD 16,000; MucB y UmuC 47,000). Aunque los pares de genes umu y muc comparten similitudes funcionales, mucA no complementa una mutación umuD o viceversa esto es, cada proteína de 45 Kd requiere de su análoga de 16 Kd para ejercer su actividad.

Algunas especies bacterianas como Salmonella typhimurium carecen de genes umu, cuando se les introduce el plásmido pKM101, su sensibilidad a sufrir mutaciones por luz UV y varios agentes químicos se ve incrementada (109). Adicionalmente, la presencia del plásmido ocasiona un cambio en el patrón mutacional de las cepas. Por ejemplo, los compuestos aromáticos planares como el ICR-191, benzo(a)pireno, dimetil benzo(a)antraceno y aflatoxina B₁, los cuales causan solamente mutaciones por corrimiento en ausencia de pKM101, mutan también por sustitución de bases cuando el plásmido está presente. Otros compuestos que no son mutagénicos en ausencia de mucAB (furilfuramida y esterigmatocisteína), ocasionan sustituciones y corrimientos en presencia de estos genes (67). Esto quiere decir que el manejo de las lesiones premutacionales conduce a mutaciones diferentes que dependen del sistema de reparación que las efectúa.

Adicionalmente a las mutaciones en el operón de histidina y la presencia del plásmido en las cepas TA98 y TA100, las cepas usadas contienen otras mutaciones que las hacen más sensibles a

la acción de mutágenos. Una de ellas es la mutación *uvrB* que ocasiona una deficiencia en el mecanismo de reparación por escisión lo cual incrementa la respuesta mutagénica a varios compuestos (18). Esta mutación resulta como subproducto de la primera de dos etapas empleadas para aumentar la permeabilidad celular (110). La primera etapa consiste en aislar una mutante resistente a clorato (*chlA*) y 2-deoxygalactosa (*galE*) en condiciones anaeróbicas, esto provoca una delación que incluye los genes de *ChlA*, *galE*, *uvrB* y los genes involucrados en la síntesis de biotina. La pérdida de galactosa epimerasa (*galE*) da por resultado una deficiencia en la incorporación de galactosa en la pared celular incrementando la permeabilidad y haciendo que las mutantes sean sensibles al fago C21. En una segunda etapa, a partir de esta población se aíslan mutantes resistentes al fago C21 las cuales son altamente permeables (mutación *rfa*).

Las cepas TA1975, TA1977, TA1978, UTH8414 y UTH8413 tienen características genéticas similares a las cepas TA1505, TA1537, TA1538, TA100 y TA98 respectivamente con excepción de que carecen de la delación en el gene *uvrB* por lo que son eficientes en reparación por escisión (18).

Escherichia coli

Dado que la polimerasa I juega un papel fundamental en varias vías de reparación del ADN (111), cepas de Escherichia coli deficientes en esta enzima ($polA^-$), presentan una inhibición del crecimiento acentuada cuando se exponen a agentes que dañan el ADN (112). Con base en este hallazgo, se diseñó un sistema de prueba para detectar carcinógenos, mediante un método simple que consiste en comparar la inhibición del crecimiento de cepas normales ($polA^+$) y deficientes $polA^-$ en la polimerasa I, en presencia de un agente químico (113).

Aislamiento y características generales de la mutante $polA^-$.

Las mutantes fueron aisladas a partir de la cepa de E. coli w3110 thy^- , la cual fue tratada con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguani-
dina por 30 minutos (114). Se obtuvieron varias colonias a las cuales se midió su actividad de polimerasa hasta encontrar la mutante p3478 la cual presentó de 0.5- 1.0 % de la actividad normal y una mayor sensibilidad a luz u.v. y metilmetanosulfona. La mutante se multiplica a la misma velocidad que la cepa silvestre en medio completo o mínimo a temperaturas de 25° a 42°C ambas son igualmente susceptibles a infección con los fagos T4, T5, T7. Estudios con supresores permitieron identificar que la mutación $polA^-$ era una mutación ambar además de que funciona como una mutación recesiva en diploides parciales $polA^-/polA^+$ (115).

Bacillus subtilis

La reparación por recombinación también juega un papel importante en la conservación de la integridad del ADN cuando éste es alterado por agentes físicos o químicos. Así, las bacterias deficientes en recombinación (Rec^-) son más susceptibles a la acción de agentes genotóxicos que las bacterias silvestres (Rec^+). En base a esto se desarrolló el sistema Rec en Bacillus subtilis mostrándose que gran parte de los agentes químicos positivos en este ensayo eran realmente mutágenos (116).

Aislamiento y características generales de la cepa mutante Rec^- .

Para aislar mutantes deficientes en recombinación de B. subtilis, se trató con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina la cepa H17 ($argA15\ trp-3$) (500 g/ml) a pH 6.0, examinando posteriormente la sensibilidad a radiaciones gamma de las mutantes obtenidas (117). Se obtuvo la mutante M45 ($argA15\ trp-3\ rec-45$) la cual mostró una mayor sensibilidad que la cepa silvestre a radiaciones gamma y ultravioleta así como a los mutágenos mitomicina C y metilmetanosulfonato. Comparada con la cepa H17, la M45 posee una menor capacidad de transformación, transfección con DNA del fago SP02 y transducción con el fago PBS1. Cuando la cepa M45 es lisogenizada con el fago SP02, la luz ultravioleta no induce la activación del profago como sucede con la H17.

Tomando en cuenta las propiedades descritas anteriormente, se concluyó que la cepa M45 era deficiente en recombinación.

Saccharomyces cerevisiae

La cepa XV185-140 es haploide y su genotipo es *ade 2-1 arg 4-17 lys 1-1 trp 5-48 his 1-7 hom 3-10*; *ade 2-1 arg 4-17 lys 1-1 y trp 5-48* correspondientes a mutaciones supresibles de la variedad ocre (118). Existen ocho genes supresores diferentes que suprimen las mutaciones *ade 2-1*, *arg 4-17* y *lys 1-1*, estos son: *sup2*, *sup3*, *sup4*, *sup5*, *sup6*, *sup7*, *sup8* y *sup11*, todos ellos son genes que codifican un tARN para tirosina. La mutación *trp 5-48* es supresible por un número mayor de supresores, aproximadamente 50 que codifican tARN's para diferentes aminoácidos. El marcador *his 1-7* es una mutación de sentido equivocado, la enzima afectada es la ATP fosforribosil transferasa. Este marcador revierte a una frecuencia tres o cuatro veces mayor que el marcador *lys 1-1*. No se han encontrado supresores externos por lo que se piensa que revierte principalmente por mutaciones intragénicas.

El marcador *hom 3-10* es una mutación por corrimiento fuera de fase, la enzima afectada es la aspartoquinasa, su deficiencia produce un requerimiento de treonina y metionina o de homoserina. Tampoco se han encontrado supresores externos de esta mutación.

MATERIAL Y METODOS

Medicamentos Estudiados.

Los fármacos antiparasitarios fueron donados en forma de principio activo por las siguientes compañías localizadas en México, D.F.: pamoato de pirvinio, mebendazol, hidroxinaftoato de bafenio y 4-hexilresorcinol (Laboratorios Columbia); diodohidroxiquinoleína y iodo-clorohidroxiquinoleína (Laboratorios Carnot); niclosamida (Bayer de México); pamoato de pirantel (ICN Farmacéutica); difosfato de cloroquina (Productos Whintrop); y dehidroemetina (Laboratorios Roche).

Las propiedades y usos de cada uno de ellos se describen a continuación. Las fórmulas estructurales se encuentran en la fig. 3.

Dehidroemetina

Este amibicida tiene una acción letal directa sobre E. histolytica siendo más efectivo contra las formas móviles del parásito. In vitro, el compuesto elimina los trofozoitos a concentraciones similares a las encontradas en circulación sistémica después de una dosis terapéutica. Se ha mostrado (119) que la dehidroemetina impide la síntesis de proteínas

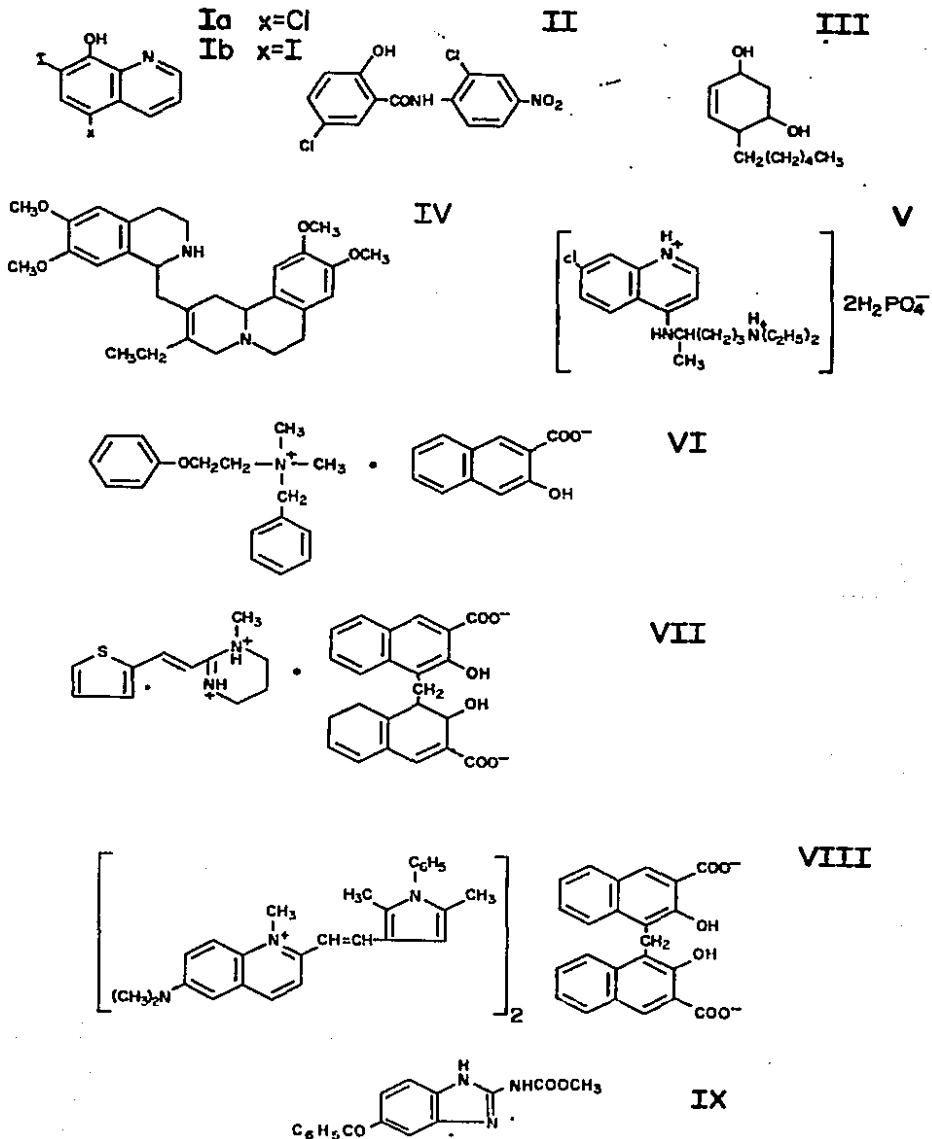


FIG. 3. Estructuras químicas de fármacos antiparasitarios. Ia, iodo-clorohidroxiquinoleína; Ib, diiodohidroxiquinoleína; II, niclosamida; III, 4-hexilresorcinol; IV, dehidroemetina; V, difosfato de cloroquina; VI, hidroxinaftoato de bfenio; VII, pamoato de pirantel; VIII, pamoato de pirvinio; IX, mebendazol.

inhibiendo la translocación del peptidil-tRNA del sitio aceptor al sitio donador del ribosoma en eucariontes (120).

La dehidroemetina es absorbida del sitio de administración parenteral y es excretada o metabolizada muy lentamente. Aunque aparece en la orina de 20 a 40 minutos después de la inyección, el compuesto puede ser encontrado hasta 40 a 60 días después de haberse suspendido el tratamiento.

La dosis recomendada es una inyección intramuscular o subcutánea de 1 a 1.5 mg/kg diaria por 5 días (90 mg/día máximo). Es el fármaco sustituto de la emetina en el tratamiento de los abscesos amebianos, hepatitis amebiana aguda o crónica.

Difosfato de Cloroquina

Aunque la cloroquina fue desarrollada primariamente como un agente contra la malaria, posee otras propiedades farmacológicas. Debido a su efecto antiinflamatorio, se la ha utilizado para el tratamiento de artritis reumatoide, lupus eritematoso, porfiria cutánea y urticaria solar (121). El tratamiento para estos padecimientos en contraste con el usado contra la malaria, requiere de administración de dosis más elevadas por periodos de tiempo prolongados.

Los estudios *in vitro* con trofozoitos de E. histolytica han mostrado que el difosfato de cloroquina posee una actividad

amibicida mayor que la de 8-hidroxiquinoleínas halogenadas pero menor que la de emetina. Este descubrimiento aunado al hecho de que se localiza en el hígado en concentraciones cientos de veces mayores que las observadas en plasma, alentaron su uso en amibiasis hepática (122).

El compuesto es absorbido casi totalmente del tracto gastrointestinal y solamente una pequeña proporción aparece en heces. Aproximadamente el 55% del fármaco se encuentra en el plasma unido a constituyentes no difusibles. La cloroquina se deposita en los tejidos en cantidades considerables, por ejemplo, se puede encontrar de 200 a 700 veces más cloroquina en hígado, bazo, riñón y pulmón que en plasma. La excreción de la sustancia es muy lenta incrementándose por acidificación de la orina.

El tratamiento para amibiasis extraintestinal en adultos, consta de 1 g diario por dos días seguidos por 500 mg diarios por 2 a 3 semanas.

8-hidroxiquinoleína (dihydrodroxiquinoleína y iodoclorohidroxiquinoleína). Aunque el mecanismo de acción de estos fármacos es desconocido, se sabe que actúan sobre formas móviles y quísticas de la amiba. Su acción se circunscribe a nivel del intestino, siendo totalmente ineficaz en el absceso amibiano.

Después de la administración oral, se absorbe una proporción significativa de la dosis aplicada. En el hombre, un cuarto de

la dosis administrada de iodoclorohidroxiquinoleína se recupera en la orina en forma de glucuronido. La diiodohidroxiquinoleína se absorbe en menor cantidad, solamente un tercio de lo que se absorbe la iodoclorohidroxiquinoleína (123).

En amibiasis intestinal, la diiodohidroxiquinoleína se administra oralmente 650 mg tres veces al día por 20 días y la iodoclorohidroxiquinoleína 500 a 750 mg tres veces al día por 10 días. El tratamiento puede ser repetido después de 2 a 3 semanas o después de 8 días respectivamente.

Hexilresorcinol

Presentado originalmente como antiséptico urinario, se encontró posteriormente que paraliza varias especies de gusanos, especialmente Ascaris lumbricoides, Antylostoma duodenale, Isaria saginata, Hymenolepis nana, Trichouris trichiura y Fasciolopsis buskii (124). Muchos de los fármacos nuevos son más eficaces, pero el hexilresorcinol tiene la ventaja de un amplio espectro de actividad y baja toxicidad. Así, se utiliza en casos de infección mixta cuando el empleo de un fármaco más potente actúa contra un solo parásito. Se absorbe cerca del 30 % de una dosis oral. La dosis usual para adultos es de 1 g debiendo darse un catártico salino 2-4 horas después.

Hidroxinaftoato de tefenio

Es un compuesto de amonio cuaternario que se utiliza para el tratamiento de una gran variedad de nemátodos parásitos como son: Necator americanus y Ankylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides y Trichostrogylus orientalis. Carece de eficiencia contra Strongyloides stercoralis y tiene solo moderada actividad frente a Trichuris trichiura (124).

En las primeras 24 hrs. después de la ingestión de una sola dosis terapéutica, no se excreta en la orina más de 0.3%. La dosis única óptima es de 5 g en el adulto.

Formiato de pirvinio

Es un colorante cianínico que posee un nitrógeno cuaternario separado de uno terciario por una cadena resonante de enlaces dobles y sencillos alternados (125).

Las cianinas interfieren en los sistemas enzimáticos respiratorios de los gusanos. Su actividad antihelmíntica está asociada con la inhibición de la respiración en los organismos aerobios y con la interferencia en la absorción de la glucosa exógena en los helmintos intestinales.

Administrado por vía oral, el pirvinio no se absorbe en cantidades apreciables dando un color rojo brillante a las heces.

Para la enterobiasis el fármaco se administra por vía oral una sola dosis equivalente a 5 mg de pirvinio base por kg de peso corporal en el adulto.

Fármaco de pirantel

Este compuesto se usa para el tratamiento de la enterobiasis y la ascariasis, actúa probablemente produciendo bloqueo neuromuscular en los gusanos permitiendo así su expulsión. Se absorbe deficientemente después de la administración oral excretándose apenas de 10-15 % de la dosis por la orina en forma libre o en sus metabolitos (124).

Es el fármaco de elección para la enterobiasis y ascariasis, se administra una sola dosis de 11 mg/kg con dosis máxima de 1 g

Mebendazol

El mebendazol bloquea el transporte normal de los gránulos de secreción de las células intestinales del parásito provocando su necrosis. Estos cambios degenerativos correlacionan con un deterioro primario de los microtubulos citoplasmáticos (126).

El fármaco es eficaz en el tratamiento de ascariasis, enterobiasis y uncinariasis en infestación única o mixta. Se absorbe solo una pequeña parte de la dosis administrada por vía oral y en término de 24 a 48 hrs. puede recuperarse en la orina un 10%. La mayor parte del material excretado por los riñones es el derivado descarboxilado del mebendazol (125).

La vía de administración es oral consistente en 100 mg dos veces al día durante 3 días consecutivos.

Niclosamida

Es el fármaco de elección para el tratamiento de infestaciones por los céstodos T. saginata, T. solium, D. latum y H. nana. Se absorbe deficientemente después de la administración oral (124,125), no se conoce bien su mecanismo de acción pero a altas concentraciones inhibe la respiración y la absorción de glucosa. Los gusanos afectados por la niclosamida se vuelven mas sensibles a la acción de las enzimas proteolíticas digiriéndose los proelótidos y el escólex. Se administra oralmente en una sola dosis de 2 g en el adulto.

Disolución de los Medicamentos

Las soluciones de los fármacos se prepararon el mismo día en que se realizó el experimento, el difosfato de cloroquina y la dehidroemetina se disolvieron en agua y el resto en dimetilsulfóxido.

Origen de Sustancias Químicas y Cepas de Microorganismos.

La glucosa 6-fosfato (G6P), el fosfato del dinucleótido nicotinamida-adenin (NADP), el ácido picrolónico, la goma arábiga, el benzo(a)pireno (B(a)P), el metil-metanosulfonato (MMS), el etil-metanosulfonato (EMS), el cristal violeta, el dimetilsulfóxido (DMSO), la mitomicina C (MitC), la 4-nitroquinoleína-N-óxido (4NQO) y el 2-aminoantraceno (2AA) se obtuvieron de Sigma Chemical (St. Louis, MO); el 2-aminofluoreno (2AF), el 2-acetilamino-fluoreno (2AAF), y la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) de Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis); el púrpura de bromocresol de Merck, México, D.F.; la ciclofosfamida de Schering Co. México, D.F.; el aroclor 1254 de Analabs Inc. Conn.

Las cepas de Salmonella con el prefijo TA fueron donadas por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California en Berkeley. Las cepas UTH fueron donación del Dr. Thomas S. Matney de la

Universidad de Texas en Houston. Las cepas de E. coli W3110 polA⁺ y su derivada p3478 polA⁻ fueron donadas por el Dr. Herbert S. Rosenkranz de la Universidad de Cleveland. Las cepas H17 y M45 de E. subtilis se obtuvieron del Instituto Nacional de Genética de Mishima, Japón y por último la cepa XV1184-14C de S. cerevisiae fue donación del Dr. R.C. Von Borstel de la Universidad de Alberta en Edmonton.

Crecimiento y conservación de las cepas de Microorganismos.

Salmonella typhimurium. - Las cepas se crecieron a 37 °C por 18 h con agitación en caldo nutritivo oxid No. 2 (Oxoid LTD., Basingstoke, Hants., England). A partir de esta suspensión se prepararon varias alícuotas colocando 0.8 ml del cultivo y 0.07 ml de dimetilsulfóxido; se mezcló el contenido y se almacenaron a - 80 °C. Los cultivos para los ensayos de mutagénesis, se obtuvieron descongelando una alícuota y sembrando 25 μ l en caldo nutritivo oxid No. 2, incubándose a 37 °C por 18 h. con agitación.

Escherichia coli. - Cada una de las cepas se creció a 37 °C por 18 h con agitación en medio líquido HA + T (113). A partir de estos cultivos se elaboraron estrias sobre medio HA + T complementado con 1.5 % de Bacto agar, se incubaron a 37 °C por

18 horas y se conservaron en refrigeración. Los cultivos para las pruebas de genoletalidad se obtuvieron sembrando una asada de las estrias en medio líquido HA + T incubando a 37 °C por 18 h.

Para almacenar las cepas de E. coli, se tomaron alicuotas de 1 ml de los cultivos de 18 h y se agregó glicerol (concentración final del 10 %), se mezcló y se almacenó a - 80 °C.

Bacillus subtilis.- Cada una de las cepas se creció a 37 °C por 18 h con agitación en caldo nutritivo oxoid No. 2. Se prepararon estrias sobre el mismo medio adicionado de Bacto agar al 1.5 % incubándose posteriormente a 37 °C por 18 h. Las estrias se conservaron a temperatura de refrigeración y se usaron para obtener los cultivos para los ensayos de genoletalidad sembrando una asada en caldo nutritivo oxoid No. 2 e incubando a 37 °C por 8 h.

Las cepas de B. subtilis se almacenaron a - 80 °C haciendo preparaciones idénticas a las descritas para E. coli. Las esporas fueron obtenidas siguiendo el método descrito por Kada y col. (116).

Saccharomyces cerevisiae.- Las células fueron crecidas en medio líquido YEPD (140) por 48 h con agitación a 30 °C. Posteriormente se realizaron estrias sobre el mismo medio adicionado de Bacto agar al 1.5 % las cuales se almacenaron a 5 °C.

Obtención de la Fracción S9 de Hígado de Rata.

Se trataron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, con un peso aproximado de 200 g, por vía intraperitoneal, con 500 mg/kg de Aroclor 1254, diluido en aceite de maíz a una concentración de 200 mg/ml. Los animales fueron mantenidos, tomando agua y alimento ad libitum hasta 12 horas antes de sacrificarlos. Al quinto día después de la inyección, las ratas se sacrificaron por decapitación, después de aturdirlos con un golpe en la cabeza. Se les extrajeron los hígados asépticamente y se colocaron en vasos previamente pesados que contenían 15 ml de solución fría de KCl 0.15M; de aquí en adelante, el proceso se realizó a 4°C para conservar la actividad enzimática, los hígados se pesaron y colocaron en recipientes con aproximadamente 3 ml de KCl por gramo de hígado. Se cortaron en pedazos pequeños con ayuda de tijeras y se homogeneizaron con un aparato Potter-Elvehjem. El homogenado se centrifugó a 9 000 X g durante 10 min. y el sobrenadante (fracción "S9") se distribuyó en viales con tapón de rosca a razón de 1 ml, congelándose rápidamente sobre hielo seco, para conservarse a -80°C.

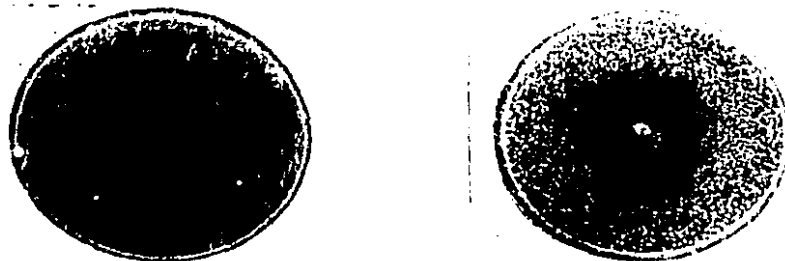
Preparación de la Mezcla S9.

Los componentes de la mezcla S9 por ml. son: 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM, G6P, 4 mM NADP, 100 mM de fosfato de sodio pH 7.4 y 0.1 ml de fracción S9. La mezcla S9 se preparó el mismo día en que se realizó un ensayo de mutagénesis manteniéndose en hielo durante el experimento.

Ensayos de Mutagénesis en S. typhimurium.

Ensayo en placa. - A un tubo con 2 ml. de agar de superficie (0.6 % agar Infco, 0.5 % NaCl, 15.4 g L-histidina, 24.4 g D-biotina), se agregó 0.1 ml de un cultivo de 16 h de la cepa correspondiente, 0.1 ml de la solución del fármaco a probar y 0.5 ml. de la mezcla S9 (en los casos en que fue requerida). Se mezcló el contenido con ayuda de un Vortex (Lab-Line Instruments) y se distribuyó en cajas petri con el medio mínimo E de Vogel-Bonner (127), después de dejar solidificar a temperatura ambiente, se incubó a 37 °C por 48 horas después de las cuales se contó el número de colonias revertantes.

Se tomó como un resultado positivo cuando el número de colonias en las cajas problemas superó por 2 o más veces el número en las cajas controles (bacteria + solvente o bacteria + solvente + mezcla S9 en su caso) (128).



Salmonella typhimurium cepa TA1535. La caja de la izquierda muestra la reversión espontánea de la cepa y en el centro de la caja de la derecha se colocó 10 μg de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina la cual provoca primeramente una inhibición del crecimiento celular y posteriormente la aparición de un gran número de colonias revertantes.

Ensayo de fluctuación. - Se siguió el método descrito por Green y col. (129). Se agregó 0.25 ml de un cultivo de 16 horas de la cepa requerida a 1000 ml de medio mínimo de Davis-Mingioli. La suspensión resultante se distribuyó en alícuotas de 100 ml a las cuales se agregó 1 ml de la solución del compuesto de prueba a diferentes concentraciones o 1 ml de solvente. A continuación, cada alícuota se distribuyó en porciones de 2 ml en tubos con tapón de rosca los cuales fueron incubados a 37 °C por 6 días.

Después de este período, se contaron los tubos en que hubo crecimiento bacteriano en los grupos tratados y controles. Las diferencias significativas entre ambos grupos fueron calculadas por la prueba estadística de χ^2 (129).

Para una significancia de 5% con 1 grado de libertad, χ^2 y 3.8; para 1 % $\chi^2 \geq 6.63$ y para 0.1 % $\chi^2 \geq 10.83$.

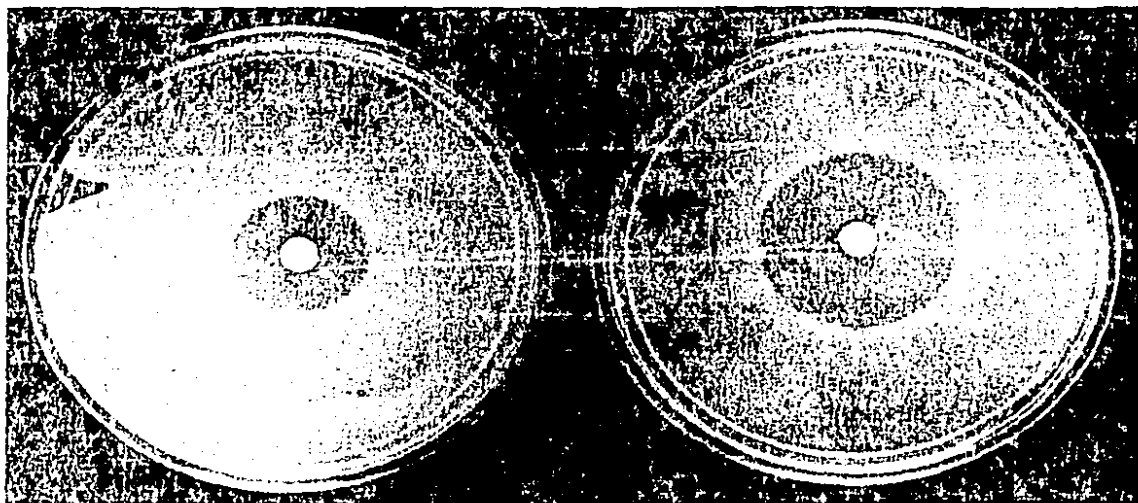
Ensayo con orina de ratones. - Se usaron ratones machos de la cepa CD1 de 14 semanas de edad (25-30 g). Se formaron grupos de 10 ratones los cuales fueron tratados por vía oral con el fármaco de prueba, con el vehículo usado para su disolución o suspensión, o con un compuesto que sirvió como control positivo. La dosis fue de acuerdo al fármaco utilizado, una dosis diaria por cinco días para dehidroemetina y niclosamida y una sola dosis para pantoato de pirvinio. Inmediatamente después de la administración de la última dosis, cada grupo de animales se colocó en cajas metabólicas diseñadas para la recolección de orinas, teniendo libre acceso a comida y agua. Se colectó la orina de 24 horas la cual se esterilizó por filtración a través de millipore y se almacenó a -70 °C.

Los experimentos de mutagénesis con la orina, se realizaron con el ensayo en placa descrito con anterioridad, agregando 0.2 ml de orina en lugar de la solución del fármaco, y 200 U de β -glucuronidasa en lugar de la mezcla S9.

Ensayos de Genoletalidad en E. coli.

Ensayo de difusión en agar. - Las cepas $polA^+$ y $polA^-$ se mantuvieron a 4 °C en medio sólido HA + T (113). Para la realización del ensayo, se usaron cultivos de 18 h de cada cepa crecidas en medio líquido HA + T y diluidas 1:10,000 en el mismo medio. A 2 ml de agar de superficie HA + T mantenido a 45 °C. Se agregó 0.1 ml de la suspensión bacteriana y se distribuyó en cajas petri con medio sólido HA + T. Se preparó una serie de cajas con la cepa $polA^+$ y otra serie con la cepa $polA^-$. En el centro de cada caja se colocó un disco de papel filtro (6 mm de diámetro) impregnado con 20 μ l de una solución del fármaco a probar.

Después de 18-24 h de incubación, se midió el diámetro de inhibición bacteriana alrededor del disco. Se tomó como un resultado positivo cuando hubo una inhibición preferencial de la cepa $polA^-$ con respecto a la $polA^+$, negativo cuando la inhibición fue igual en ambas cepas y "no concluyente" cuando no hubo inhibición.



pola⁺

pola⁻

ENSAYO DE DIFUSION EN AGAR CON LAS CEPAS DE *Escherichia coli* pola⁻ Y pola⁺: LA IMAGEN MUESTRA LOS RESULTADOS QUE SE OBTIENEN CON UN COMPUESTO GENOTOXICO COMO EL ETIL-METANOSULFONATO, EL CUAL INHIBE CON MAYOR INTENSIDAD EL CRECIMIENTO DE LA CEPA DEFICIENTE EN POLIMERASA I (pola⁻).

Ensayo en suspensión líquida. - Los cultivos de 18 h de ambas cepas se diluyeron en medio líquido HA + T hasta tener una concentración de 2000-3000 unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por mililitro. En un tubo de 13 x 100 mm con tapón de rosca se colocaron 0.1 ml de la suspensión microbiana de la cepa pol A⁻ o pol A⁺ y 20 µl de la solución del fármaco a probar o del solvente y se incubó por dos horas a 37 °C con agitación. Posteriormente, se agregó a cada tubo 2 ml. de agar de superficie HA + T y se distribuyó el contenido en cajas petri con medio sólido HA + T. Después de incubar las cajas por 24-36 hrs. a 37 °C, se contó el número de colonias con lo cual se obtuvo el índice de sobrevida (I.S.) que consistió en el cálculo del cociente:

$$\text{I.S.} = \frac{\% \text{ de sobrevida de la cepa pol A}^-}{\% \text{ de sobrevida de la cepa pol A}^+}$$

Un I.S. ≥ 0.96 fue tomado como negativo, de 0.86-0.95 como dudoso, y < 0.85 como positivo de acuerdo a Hyman y col. (130).

Ensayo de microsuspensión. - Para este ensayo se usaron placas de microtitulación con 8 hileras de 12 cavidades cada una haciendo un total de 96 cavidades. A cada cavidad se le agregaron 50 μ l de medio líquido HA + T, seguido de 50 μ l de la solución del fármaco en la primera cavidad de una de las hileras haciendo diluciones sucesivas a lo largo de las 12 cavidades. Se utilizó una hilera por fármaco probado preparándose de este modo dos placas de microtitulación de manera similar. A una de las placas se le agregó 50 μ l de la suspensión de la cepa polA⁻ y a la otra la misma cantidad de la cepa polA⁺. Cuando se probaron los fármacos en presencia de activación metabólica, adicionalmente se agregó a cada cavidad 50 μ l de mezcla S9.

Después de incubar las microplacas a 37 °C por 24 horas, se registró la concentración mínima inhibitoria para cada cepa, la cual se define como la concentración mínima del agente químico capaz de inhibir el crecimiento microbiano.

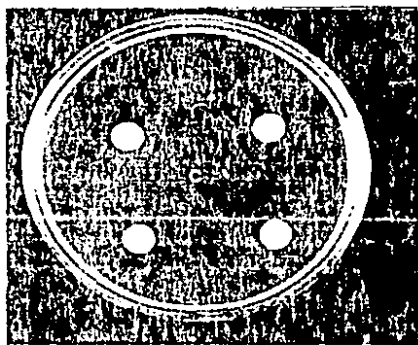
Se tomó como una respuesta positiva, cuando la concentración mínima inhibitoria fue menor (dos cavidades de diferencia) para la cepa polA⁻ que para la polA⁺.

ENSAYOS DE GENOLETALIDAD EN B. subtilis.

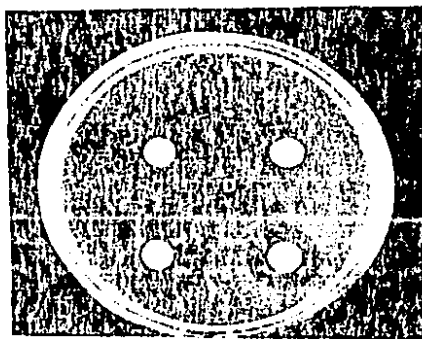
Método por estrias. - Se utilizaron cultivos de las cepas H17 y M45 desarrollados en caldo nutritivo Oxoid No. 2 por 16-18 horas. Se tomó una asada de la cepa M45 y se realizó una estria sobre la superficie de agar nutritivo (caldo nutritivo Oxoid No. 2 complementado con Bacto agar 1.5%). Se realizó una segunda estria con una asada de la cepa H17 de manera que formara un ángulo de aproximadamente 45° con la primera, dejando secar a temperatura ambiente. Se colocó posteriormente un disco de papel filtro con 20 μ l de la solución del fármaco de prueba o el solvente, en el punto de iniciación de las estrias. Las cajas petri así preparadas se colocaron a 4 °C por 18 horas y posteriormente se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Se consideró como un resultado positivo aquel en el que se obtuvo una inhibición en el crecimiento \geq 4 mm de la cepa M45 con respecto a la H17.

Ensayo con esporas. - En una caja petri vacía, se colocó 100 μ l de una suspensión de esporas (3×10^7 esporas/ml de la cepa M45 o H17). A continuación se agregó 10 ml de agar semisólido (caldo nutritivo Oxoid No. 2 + 0.5 % de Bacto agar) mantenido a 45 °C, se mezcló perfectamente con un movimiento rotatorio y se dejó solidificar a temperatura ambiente. En el centro de la caja petri se colocó un disco de papel filtro impregnado con 20 μ l del fármaco problema o el solvente. Tras de mantener las cajas a 4 °C por 18 horas, se incubaron a 37 °C por 24 horas y se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de ambas cepas. Se tomó como resultado positivo cuando hubo una inhibición de la cepa M45 ≥ 4 mm con respecto a la H17.



H17



M45

Bacillus subtilis cepas H17 (Rec⁺) y M45 (Rec⁻). Los discos de la parte superior de la caja contienen los controles dimetilsulfoxido (izquierda) y agua (derecha). Los discos de la parte inferior contienen 0.2 μ g de 4-nitroquinoleína-N-óxido (izquierda) y 0.02 μ g de mitomicina-C (derecha)

ENSAYO DE MUTAGENESIS EN S. cerevisias.

La cepa XV185-14C se conservó en medio completo YEPD sólido a 4 °C. Se obtuvieron cultivos de 48 hr en medio líquido YEPD a partir de los cuales se obtuvo una suspensión celular de 1×10^8 células por ml en amortiguador de fosfatos pH= 7.0.

En tubos con tapón de rosca se agregaron 0.25 ml de la solución del fármaco o del solvente y 9.75 ml de la suspensión celular. Se tomó una alícuota que correspondió a t=0 y el resto se incubó a 29 °C con agitación por 24 horas, al final de las cuales se tomó una segunda alícuota (t=24).

Cada alícuota se lavó con amortiguador de fosfatos pH= 7.0 por centrifugación y se resuspendió en el volumen original. Las muestras sin diluir fueron sembradas en medio sintético selectivo con todos los aminoácidos requeridos con excepción de histidina. Posteriormente cada muestra se diluyó en amortiguador hasta tener aproximadamente 1000-2000 células/ml. y se sembró en medio sólido YEPD para el cálculo de la sobrevivencia.

Se tomó como un resultado positivo cuando la frecuencia de reversión en las cajas con células tratadas con el fármaco fue por lo menos el doble de la frecuencia encontrada en los controles tratados con el solvente.

RESULTADOS

Debido a que el objetivo general del presente trabajo es el contribuir a evaluar los riesgos genotóxicos derivados del consumo de medicamentos antiparasitarios, se expondrán y discutirán los resultados en todos los sistemas microbianos para cada uno de los fármacos estudiados por separado.

NICLOSAMIDA

La tabla I muestra los resultados obtenidos con este antihelmintico en *S. typhimurium*. Se puede observar un efecto mutagénico en las cepas TA1538 y TA98 solamente en presencia de la mezcla S9, en ausencia de ella, el fármaco es extremadamente tóxico. Cuando se emplearon las cepas UTH8413 y TA1978 (parentales Uvr⁺ de las cepas TA98 y TA1538) no se observó actividad mutagénica alguna (Tabla I). En las cepas TA1535, TA1537 y TA100 se obtuvieron resultados negativos en presencia o ausencia de mezcla S9 pero se confirmó la toxicidad del compuesto en ausencia de ella (Tabla II). La orina de ratones tratados con niclosamida presentó actividad mutagénica detectable con la cepa TA1538, dicha actividad se vió incrementada por la adición de β -glucuronidasa (fig. 4), de lo cual se infiere que el (los) metabolito(s) se excreta conjugado con ac. glucurónico.

TABLA I. MUTAGENICIDAD DE NICLOSAMIDA EN *Salmonella typhimurium* *

NICLOSAMIDA (ug/caja)	Uvr ⁺				Uvr ⁻			
	R ⁻		R ⁺		R ⁻		R ⁺	
	TA1978		UTH8413		TA1538		TA98	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	17	24	30	45	23	22	44	53
1	15	34	30	36	21	51	55	70
5	6t	28	20	40	17	115	39	107
10	4t	30	10	35	0t	224	17t	253
25	0t	27	0t	40	0t	381	0t	7t
30	0t	23t	0t	37	0t	0t	0t	0t
50	0t	7t	0t	19t	0t	0t	0t	0t
4NQO **								
0.25	18	-	39	-	95	-	221	-
20	40	-	80	-	0t	-	3t	-
2AA **								
1	-	49	-	29	-	372	-	467
10	-	226	-	195	-	0t	-	0t

* Cada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en 6 cajas en dos experimentos independientes (3 cajas/experimento). "t" indica toxicidad valorada por la reducción en la densidad del crecimiento de colonias microscópicas His en la caja.

** El 4-NQO (4-nitroquinoleína-N-óxido) y el 2AA (2-aminoantraceno) fueron usados como controles positivos en ausencia (-S9) y presencia (+S9) de mezcla S9 respectivamente. Uvr⁺ y Uvr⁻ indican que las cepas son eficientes (+) o deficientes (-) en el mecanismo de reparación por escisión.

R⁺ y R⁻ indican que las cepas poseen (+) o no (-) el plásmido pKM101.

TABLA II. MUTAGENICIDAD DE NICLOSAMIDA EN LAS CEPAS TA1535,
 TA1537 y TA 100 de Salmonella typhimurium.

NICLOSAMIDA ($\mu\text{g}/\text{caja}$)	Revertante His ⁺ /caja *					
	TA1535		TA1537		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	31	19	9	14	243	175
1	36	14	12	13	211	194
5	19t	12	4t	9	183	194
10	2t	11	0t	11	95t	187
25	4t	4t	0t	11	12t	151
50	0t	5t	0t	2t	2t	17t
MNNG**	6199	—	—	—	6744	—
PICROLONICO**	—	—	34	—	—	—
CICLOFOSFAMIDA**	—	534	—	—	—	470°
AMINOFLORENO**	—	—	—	59	—	—

Cada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en 6 cajas en dos experimentos independientes (3 cajas/experimento). "t" indica toxicidad valorada por la reducción en la densidad del crecimiento de colonias microscópicas His⁻ en la caja.

MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) y el ácido picrolónico fueron usados como controles positivos en ausencia (-S9) de mezcla S9. La ciclofosfamida y el 2-amino-intraceno fueron controles positivos en presencia (+S9) de mezcla S9.

NUMERO DE COLONIAS REVERTANTES His⁺/CAJA

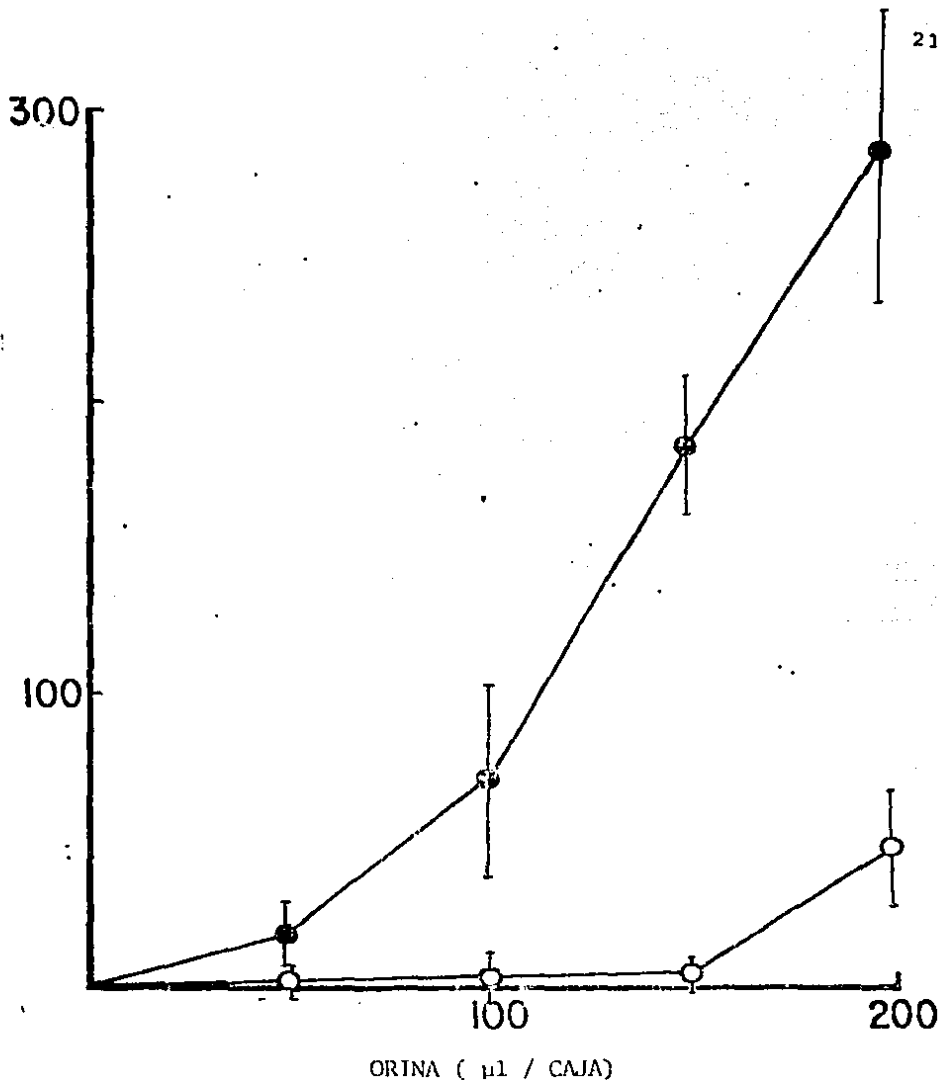


FIG. 4. CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO MUTAGENICO DE LA ORINA DE RATONES TRATADOS CON NICLOSAMIDA (50 mg/kg / 7 DIAS). EL EXPERIMENTO SE LLEVO A CABO EN AUSENCIA (○) O PRESENCIA (●) DE β-glucuronidasa (200 U). EL NUMERO DE COLONIAS REVERTANTES CON LA ORINA DE RATONES TRATADOS CON EL VEHICULO (GOMA ARABIGA 2 % + ETANOL 16 %) FUE: 30 (○) y 53 (●). CEPA TA1558 DE Salmonella typhimurium

Los ensayos de genoletalidad en E. coli fueron: no concluyente en el ensayo de difusión en agar (Tabla III), dudoso en el ensayo de suspensión líquida (Tabla IV) y negativo en el ensayo de microsuspensión (Tabla V). El ensayo Rec con E. subtilis fue negativo con esporas o células vegetativas (Tabla VI).

En la tabla VII se puede observar la dependencia de microsomas hepáticos purificados, NADP y G6P para la mutagénesis de la niclosamida.

PAMOATO DE PIRVINIO

El pirvinio fue mutagénico para las cepas TA98, TA100 y UTH8414 de S. typhimurium y no así para la cepa UTH8-13 (Tabla VIII), en las otras cepas carentes del plásmido pKM101 no se observó mutagenicidad (datos no presentados). La orina de ratones tratados con el fármaco tampoco presentó actividad mutagénica (Tabla IX).

En E. coli, usando cualquiera de los ensayos (difusión en agar, suspensión líquida o microsuspensión), el pirvinio dio resultados positivos (Tablas III, IV y V; Fig. 5).

Contrariamente a lo anterior, el antihelmíntico fue negativo en el ensayo de genoletalidad con E. subtilis (Tabla VI).

TABLA III. GENOLETALIDAD DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS EN EL SISTEMA DE Escherichia coli
pol A⁺/pol A⁻ (DIFUSION EN AGAR)

COMPUESTO	CONCENTRACION POR DISCO (µg)	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO (mm)				DIFERENCIA (mm)		INTERPRETACION
		EXP. 1		EXP. 2		EXP. 1	EXP. 2	
		pol A ⁺	pol A ⁻	pol A ⁺	pol A ⁻			
DIIDOHIDROXIQUINOLEINA	2000	0	0	0	0	0	0	-
IODOCLOROHIDROXIQUINOLEINA	3000	16	14	16	14	-2	-2	-
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	2223	6	10	6	11	4	5	+
DFHIDROEMETINA	3200	9	10	10	12	1	2	-
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO	3000	8	7	7	6	-1	-1	-
4-HEXILRESORCIONOL	3000	16	26	17	28	10	11	+
MEBENDAZOL	600	0	0	0	0	0	0	-
NICLOSAMIDA	500	0	0	0	0	0	0	-
PAMOATO DE PIRANTEL	3138	0	0	0	0	0	0	-
PAMOATO DE PIRVINIO	5000	0	5	0	5	5	5	+
CLORANFENICOL	15	10	10	-	-	0	-	-
EMS	840	0	10	-	-	10	-	+
MNNG	250	20	37	-	-	17	-	+

El cloranfenicol fue usado como control negativo; el EMS (etil-metanosulfonato) y la MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) como controles positivos.

TABLA IV. GENOLETALIDAD DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS EN EL SISTEMA DE *Escherichia coli*
 pol A⁺/pol A⁻ (SUSPENSION LIQUIDA)

COMPUESTO	CONCENTRACION POR TUBO	% SOBREVIDA				INDICE DE SOBREVIDA *	
		EXP. 1		EXP. 2		EXP. 1	EXP. 2
		pol A ⁺	pol A ⁻	pol A ⁺	pol A ⁻		
DMSO	20 µl	100	100	100	100	1.00	1.00
MEBENDAZOL	60 µg	92	96	80.8	95.3	1.04	1.18
NICLOSAMIDA	100 µg	94.6	82.4	95.6	85.4	0.87	0.89
PAMOATO DE PIRANTEL	650 µg	98.9	107.8	96.0	104.4	1.09	1.09
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO	20 µg	34.5	29.4	62.8	55.8	0.85	0.89
CLORANFENICOL	30 µg	80.0	90.8	77.5	78.3	1.13	1.01
EMS	840 µg	94.1	49.8	94.0	58.1	0.53	0.62

* % de sobrevida pol A⁻ / % sobrevida pol A⁺

El cloranfenicol fue usado como control negativo y el EMS (etil-metanosulfonato) como control positivo.
 DMSO (dimetilsulfóxido)

TABLA V. GENOLETALIDAD DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS EN EL SISTEMA DE Escherichia coli
 polA⁺/polA⁻ (MICROSUSPENSION)

COMPUESTO	S9	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (µg/CAVIDAD)				DIFERENCIA EN EL NUMERO DE CAVIDADES		INTERPRETACION	
		EXP. 1		EXP. 2		EXP. 1	EXP. 2	EXP. 1	EXP. 2
		polA ⁺	polA ⁻	polA ⁺	polA ⁻				
DIIDODIHIODROXIQIUNOLEINA	-	31.25	31.25	31.25	31.25	0	0	-	-
	+	125.00	62.50	62.50	31.25	1	1	-	-
IODOCOLOROHIDROXIQIUNOLEINA	-	0.90	0.45	0.94	0.47	1	1	-	-
	+	0.90	0.90	0.94	0.94	0	0	-	-
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	-	174.00	10.98	174.00	0.17	4	10	+	+
	+	174.00	10.98	174.00	0.17	4	10	+	+
DEHIDROEMETINA	-	200.00	200.00	200.00	200.00	0	0	-	-
	+	200.00	200.00	200.00	200.00	0	0	-	-
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO	-	125.00	125.00	125.00	125.00	0	0	-	-
	+	125.00	125.00	125.00	62.50	0	1	-	-
4-HEXILRESORCINOL	-	5.00	10.00	5.00	10.00	1	1	-	-
	+	10.00	10.00	10.00	10.00	0	0	-	-
MEBENDAZOL	-	75.00	75.00	75.00	75.00	0	0	-	-
	+	75.00	37.50	75.00	75.00	1	0	-	-
NICLOSAMIDA	-	62.50	31.25	31.25	31.25	1	0	-	-
	+	62.50	31.25	62.50	31.25	1	1	-	-
PAMOATO DE PIRANTEL	-	196.00	196.00	196.00	196.00	0	0	-	-
	+	392.00	392.00	392.00	392.00	0	0	-	-
PAMOATO DE PIRVINIO	-	156.00	5.00	156.00	5.00	5	5	+	+
	+	156.00	20.00	156.00	20.00	3	3	+	+
CLORANFENICOL	-	0.13	0.15	0.13	0.13	0	0	-	-
MNNG	-	1.50	0.09	0.75	0.05	4	4	+	+
CICLOFOSFAMIDA	-	895.00	447.50	895.00	895.00	1	0	-	-
	+	112.00	14.00	224.00	14.00	3	4	+	+

El Clorfenicol fue usado como control negativo, la MNNG y Ciclofosfamida como controles positivos en ausencia y presencia de mezcla S9 respectivamente.

TABLA VI. GENOLETALIDAD DE FARMACOS ANTIPARASITARIOS EN EL SISTEMA DE B. Subtilis.

FARMACO	CONCENTRACION POR DISCO (µg)	METODO POR ESTRIAS ZONA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO (mm)				METODO CON ESPORAS DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO (mm)			
		H17	M45	DIFERENCIA (mm)		H17	M45	DIFERENCIA (mm)	
DIPOHIDROXIQUINOLEINA	400	0	0	0	(-)*	3	4	1	(-)
OCLOROHIDROXIQUINOLEINA	600	0	0	0	(-)	7	7	0	(-)
OSFATO DE CLOROQUINA	6000	0	1	1	(-)	44	42	2	(-)
HIDROEMETINA	640	0	0	0	(-)	5	7	2	(-)
PROXINAFTOATO DE BEFENIO	400	0	0	0	(-)	1	1	0	(-)
HEXILRESORCINOL	600	10	12	2	(-)	23	24	1	(-)
BENZAZOL	120	0	0	0	(-)	0	0	0	(-)
LOSAMIDA	100	12	13	1	(-)	22	24	2	(-)
ATO DE PIRANTEL	104	—	—	—	—	0	0	0	—
	159	—	—	—	—	0	0	0	—
	175	—	—	—	—	0	1	1	—
	208	—	—	—	—	0	3	3	—
	222	—	—	—	—	0	5	5	(+)
ATO DE PIRVINIO	1000	2	3	1	(-)	11	11	0	(-)
OMICINA C**	0.2	11	22	11	(+)	14	25	11	(+)

Interpretación del resultado como positivo (+) o negativo (-).

La mitomicina C fue usada como control positivo.

TABLA VII. INFLUENCIA DE GLUCOSA-6-FOSFATO, NADP Y MICROSOMAS HEPATICOS SOBRE LA MUTAGENICIDAD DE NICLOSAMIDA

Contenido/2ml agar de superficie	Revertantes His ⁺ de <i>Salmonella typhimurium</i> TA1538*
DMSO(100µl) + KCl 0.15M + G-6-F + NADP	22
NICLOSAMIDA (5 g) + KCl 0.15M + G-6-F + NADP	2t
NICLOSAMIDA (5 g) + FRACCION S9 + AMORTIGUADOR pH = 7.4	17
NICLOSAMIDA (5 g) + FRACCION S9 + G-6-F + NADP	25i
NICLOSAMIDA (5 g) + MICROSOMAS** + AMORTIGUADOR pH = 7.4	15t
NICLOSAMIDA (5 g) + MICROSOMAS + G-6-F + NADP	192
NICLOSAMIDA (5 g) + SOBRENADANTE DE MICROSOMAS** + AMORTIGUADOR pH = 7.4	3t
NICLOSAMIDA (5 g) + SOBRENADANTE DE MICROSOMAS + G-6-F + NADP	3t
NICLOSAMIDA (5 g) + SOBRENADANTE DE MICROSOMAS + MICROSOMAS + AMOR TIGUADOR pH = 7.4	16
NICLOSAMIDA (5 g) + SOBRENADANTE DE MICROSOMAS + MICROSOMAS + G-6-F + NADP.	171

* Cada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en 6 cajas en dos experimentos independientes (ensayo en placa, 3 placas/experimento). "t" indica toxicidad valorada por la reducción en la densidad del crecimiento de colonias microscópicas His⁺ en la caja.

* Las microsomas y el sobrenadante de microsomas se obtuvieron centrifugando la fracción S9 a 105,000 x g por hora a 4°C. La pastilla microsomal se resuspendieron en KCl 0.15M y el sobrenadante se usó directamente.

TABLA VIII. MUTAGENICIDAD DE PAMOATO DE PIRVINIO EN Salmonella
Typhimurium*.

PAMOATO DE PIRVINIO ($\mu\text{g}/\text{caja}$)	Uvr ⁺ R ⁺		Uvr ⁻ R ⁺	
	UTH8413	UTH8414	TA100	TA98
0	14	12	227	43
0.5	19	11	348	70
1.0	18	23	757	147
1.5	17	38	962	173
2.0	20	64	1335	177
2.5	21	78	1414	166
5.0	20	110	1138	72
7.5	17	142	639t	57t
10.0	10	93t	415t	19t
15.0	9t	2t	—	—
20.0	0t	0t	—	—
4NQO**				
0.25	10	14	1304	315
20	90	784	0t	0t

* Cada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en 6 cajas en dos experimentos independientes (3 cajas/experimento). "t" indica toxicidad valorada por la reducción en la densidad del crecimiento de colonias microscópicas His en la caja.

** El 4-NQO (4-nitroquinolefina-N-óxido) fue usado como control positivo. Uvr⁺ y Uvr⁻ indican que las cepas son eficientes (+) o deficientes (-) en el mecanismo de reparación por escisión.

R⁺ y R⁻ indican que las cepas poseen (+) o no (-) el plásmido pKM101.

TABLA IX. ACTIVIDAD MUTAGENICA EN ORINA DE RATONES TRATADOS CON
 PAMOATO DE PIRVINIO. ENSAYO EN PLACA CON Salmonella
typhimurium.

Tratamiento	Revertantes His ⁺ /caja ^a	
	cepa TA100 + orina (100 μ l)	cepa TA100 + orina (100 μ l) + β -glucuronidasa (200 U)
Solución de azúcar (85%) ^b	228	296
Pamoato de pirvinio (0.75 mg/kg)	231	250
(7.5 mg/kg)	216	224
(75.0 mg/kg)	252	251
Ciclofosfamida ^c (80 mg/kg)	840	934

^a Cada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en 6 cajas en dos experimentos independientes (3 cajas/experimento).

^b La solución de azúcar al 85% se usó como vehículo para el pamoato de pirvinio y la ciclofosfamida.

^c La ciclofosfamida fue el control positivo, su mutagenicidad depende de transformación metabólica.

TABLA X. - MUTAGENICIDAD DE LOTES DE PAMOATO DE PIRVINIO DE
 DIFERENTE GRADO DE PUREZA EN Saccharomyces cere-
visiae y Salmonella typhimurium.

Muestra de Pamoato de Pirvinio	Revertantes His ⁺ de <u>S. cerevisiae</u> x 10 ⁷ sobrevivientes		Revertantes His ⁺ de <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u>	
	0 Hrs.	24 hrs.	TA98	TA100
-	35.20	36.19	-	-
DMSO	33.09	37.17	32.6	188.6
Estandar U.S.P	37.78	62.49	128.53	582.3
1A	44.23	69.31	93.6	530.6
2B	58.44	2322.22	105.3	447.6
3C	33.19	65.15	101.6	439.2
4D	45.37	49.72	105.0	457.0
5E	41.24	193.32	102.1	434.5
6F	33.91	2857.02	121.6	639.6
3	37.51	81.50	141.3	631.6
14	30.80	103.32	172.16	601.2

La concentración de pamoato de pirvinio en los experimentos con S. cerevisiae fue de 500 µg/ml de suspensión celular. Los experimentos con S. typhimurium se realizaron en el ensayo en placa a una concentración de 7.5 µg/caja para la cepa TA98 y de 1.5 µg/caja para la cepa TA 100.

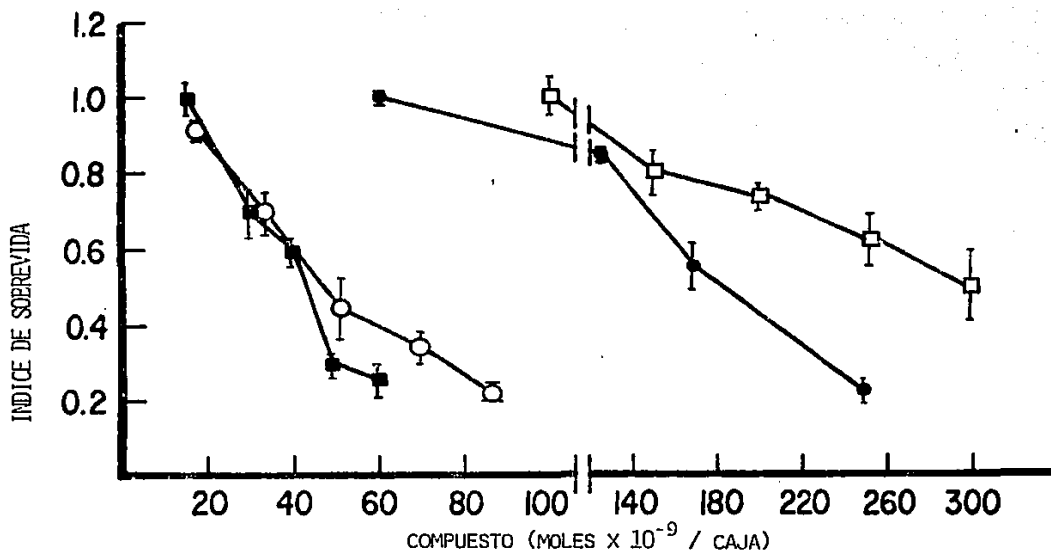


FIG. 5. INHIBICION PREFERENCIAL DE LA CEPA POLA⁻ POR LOS COMPUESTOS ANTIPARASITARIOS: 4-HEXYLRESORCINOL (■); DEHYDROEMETINA (●); DIIDOHIDROXIQUEINOLEINA (□) Y PAMOATO DE PIRVINIO (○) EN EL ENSAYO DE SUSPENSION LIQUIDA. CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE RESULTADOS OBTENIDO EN 2 EXPERIMENTOS REALIZADOS INDIVIDUALMENTE (3 CAJAS/CEPA/EXPT.), INDICE DE SOBREVIVENCIA = % SOBREVIVENCIA POLA⁻ / % SOBREVIVENCIA POLA⁺.

Por otro lado, el pirvinio fue mutagénico en la cepa XV185-14C de S. cerevisiae y, como puede observarse en la tabla X, la potencia mutagénica varió de acuerdo al lote de pirvinio evaluado encontrándose una mayor mutagenicidad en los lotes 2B y 6F. Las cepas TA98 y TA100 de S. typhimurium carecieron de la sensibilidad suficiente para detectar estas variaciones en la frecuencia de mutación detectadas en el ensayo con Saccharomyces.

Dado estos resultados procedimos a valorar la presencia de impurezas o contaminantes en los distintos lotes del fármaco (que pudieran explicar las variaciones en la mutagenicidad observadas), utilizando cromatografía líquida de alta presión. Los resultados se encuentran en la Tabla XI, los picos A y H se encuentran en todas las muestras analizadas siendo el primero identificado como ácido pámico ya que se conto con el estándar correspondiente. Las muestras 2B y 6F con mayor mutagenicidad en S. cerevisiae mostraron un mayor número de picos además de tener los picos I y G que no se presentaron en ninguna de las muestras restantes.

DIFOSFATO DE CLOROQUINA

La mutagenicidad de este fármaco fue puesta en evidencia usando el método de microfluctuación en la cepa TA1537 de S.

TABLA XI. RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA
 PRESION CON DIVERSOS LOTES DE PAMOATO DE
 PIRVINIO.

LOTES DE PAMOATO DE PIRVINIO	TIEMPOS DE RETENCION (MINUTOS) DE LAS DIFERENTES FRACCIONES (PICOS) ENCONTRADAS EN LOS LOTES																									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X		
ESTANDAR U.S.P.	11.2							16.38																		
1 A	11.20			13.34 14.80				16.79		17.79										26.09		29.15	42.47	43.04		
2 B	11.10		12.63	13.43 14.46				16.66	17.10			18.06		18.86	19.20		20.53	21.10							42.57	43.10
3 C	11.05							16.68				18.13		19.13	19.63	20.08	20.08					27.94	29.15		42.58	
4 D	10.80	11.66						16.66																	42.43	
5 E	11.24			13.29 14.49				16.69		17.79					19.49					25.24	27.34				42.42	42.92
6 F	11.21			13.06 14.70				16.48	17.08	17.58	17.81		18.26	18.63				21.74	22.81			27.87	29.77	42.10	42.71	
N 3	11.15					15.05	15.60	16.50																	42.21	
M 14	11.20			13.40				16.80					18.40								27.15		29.15		42.79	

typhimurium (Tabla XII). Conforme aumenta la concentración de cloroquina, el número de cavidades con crecimiento bacteriano se vió incrementada también hasta una concentración de 350 µg/ml después de la cual el compuesto fue tóxico.

Por otro lado, la mutagenicidad del fármaco no fue evidente cuando se usó la cepa TA1977 encontrándose un número de cavidades con crecimiento microbiano igual al control hasta 350 µg/ml y posteriormente al igual que con la cepa TA1537, hubo toxicidad.

Los resultados con E. coli también fueron positivos en los 3 ensayos usados (Fig. 6, Tablas III y V).

Los datos obtenidos con B. subtilis son negativos puesto que la cloroquina inhibe por igual el crecimiento de las cepas H17 y H49.

DEHIDROEMETINA

La dehidroemetina mostró actividad mutagénica marginal en la cepa TA98 de S. typhimurium solamente en presencia de mezcla S9, dicha mutagenicidad no se presentó en la cepa UTH8413 (Fig. 7). La orina de ratones tratados con dehidroemetina no mostró actividad mutagénica detectable que indicara la presencia de metabolitos activos (Tabla XIII).

TABLA XII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE MICROFLUCTUACION CON Salmonella typhimurium
Y DIFOSFATO DE CLOROQUINA

DIFOSFATO DE CLOROQUINA ($\mu\text{g/ml}$)	Número de cavidades de un total de 96 en que hubo crecimiento bacteriano							
	TA1537				TA1977			
	EXP. 1	Significancia estadística *	EXP. 2	Significancia estadística *	EXP. 1	Significancia estadística *	EXP. 2	Significancia estadística *
0	4	N.S.	6	N.S.	6	N.S.	2	N.S.
100	7	N.S.	4	N.S.	2	N.S.	2	N.S.
150	14	P<0.05	14	N.S.	2	N.S.	3	N.S.
200	22	P<0.001	43	P<0.001	3	N.S.	4	N.S.
250	42	P<0.001	46	P<0.001	9	N.S.	6	N.S.
300	47	P<0.001	64	P<0.001	2	N.S.	6	N.S.
350	74	P<0.001	79	P<0.001	4	N.S.	5	N.S.
400	1	N.S.	16	P<0.05	2	N.S.	0	N.S.
450	4	N.S.	-	-	1	N.S.	0	-
500	0	-	-	-	0	-	0	-
550	0	-	-	-	0	-	0	-
600	0	-	-	-	0	-	0	-
9-AMINOACRIDINA**								
1.0	96	P<0.001	82	P<0.001	96	P<0.001	81	P<0.001
QUINACRINA **								
2.5	96	P<0.001	87	P<0.001	71	P<0.001	82	P<0.001

* La significancia estadística entre las microplacas con el compuesto de prueba y los controles negativos se obtuvo por medio de la prueba de χ^2 . N.S. = No significativo.

** La 9-aminoacridina y la quinacrina fueron utilizados como controles positivos.

TABLA XIII. ACTIVIDAD MUTAGENICA EN ORINA DE RATONES TRATADOS CON DEHIDROEMETINA. ENSAYO EN PLACA CON Salmonella typhimurium.

Tratamiento	Revertantes lis ⁺ / caja ^a	
	cepa TA98 + orina (100 - 1)	cepa TA98 + orina (100 - 1) + -glucuronidasa (200 U)
Agua ^b	34	38
Dehidroemetina (0.1 mg/kg)	30	33
(1.0 mg/kg)	23	48
(10.0 mg/Kg)	29	44
2-Acetilaminofluoreno ^c (20.0 mg/kg)	87	386

^aCada valor numérico es la media del número de colonias revertantes encontradas en seis cajas en dos experimentos independientes (3 cajas/experimento).

^bEl agua fué el solvente usado para la dehidroemetina y el 2-acetilaminofluoreno.

^cEl 2-acetilaminofluoreno fué el control positivo, su mutagenicidad depende de transformación metabólica.

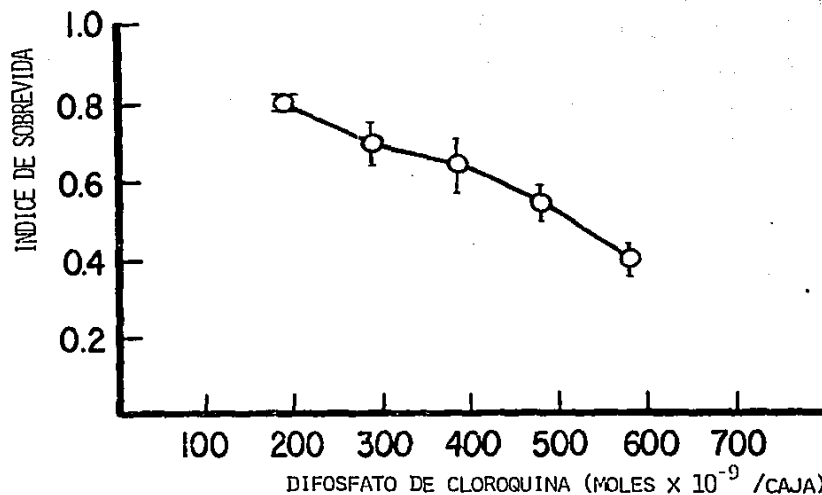


FIG. 6. INHIBICION PREFERENCIAL DE LA CEPA POLA⁻ POR EL COMPUESTO PARASITARIO; DIFOSFATO DE CLOROQUINA EN EL ENSAYO DE SUSPENSION LIQUIDA, CADA PUNTO REPRESENTA EL PROMEDIO DE RESULTADO OBTENIDO EN DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS INDIVIDUALMENTE (3 CAJAS/CEPA/EXPT.) INDICE DE SOBREVIDA = % SOBREVIDA POLA⁻ / % SOBREVIDA POLA⁺.

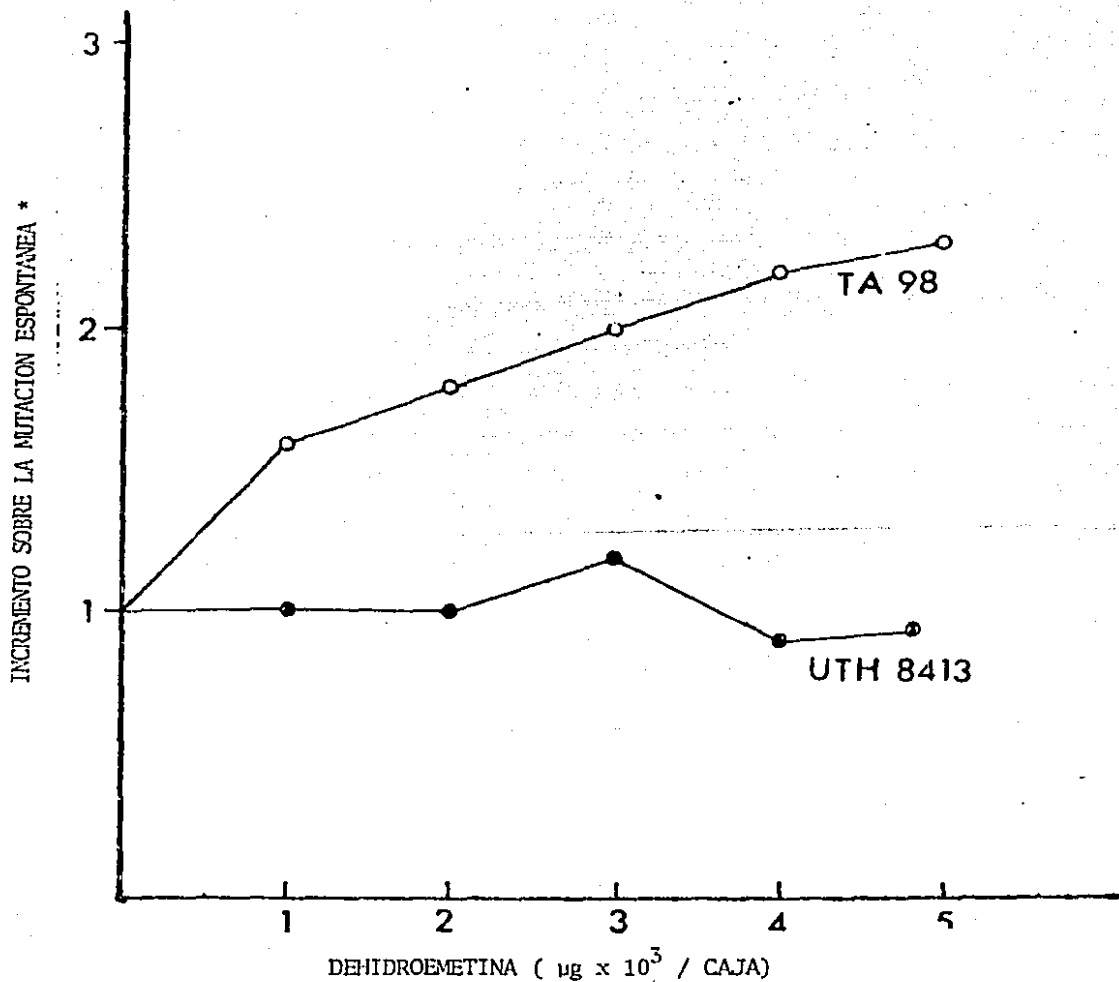


FIG. 7. EFECTO MUTAGENICO DE DEHIDROEMETINA EN LAS CEPAS TA98 (uvrB) y UTH8413 (Uvr⁺) DE *Salmonella typhimurium*. *NO. DE REVERTANTES EN CAJAS CON -- DEHIDROEMETINA/NO. DE REVERTANTES EN CAJAS CONTROLES (AGUA).

En E. coli la dehidroemetina fue genoletal como se muestra en la figura 2, al aumentar su concentración disminuyó el índice de sobrevivencia de las cepas. El efecto de la mezcla S9 sobre la genoletalidad del compuesto no fue evaluado debido a que el ensayo en suspensión líquida no pudo ser estandarizado con el uso del sistema de activación metabólica. Al igual que para los anteriores fármacos, los resultados con B. subtilis fueron considerados negativos (Tabla VI).

DIODOHIDROXIQUINOLEINA

Los datos obtenidos con las cepas de Salmonella no indican actividad mutagénica, sin embargo, esta sustancia fue positiva en el ensayo de suspensión líquida en E. coli (Fig. 5).

IDOCLOROHIDROXIQUINOLEINA

El efecto del fármaco en las cepas polA⁺ y polA⁻ de E. coli fue inesperado ya que hubo una inhibición del crecimiento mayor de la cepa polA⁺ con respecto de la polA⁻ (Tabla XIV).

Con el objeto de discriminar entre el efecto de la mutación en el gene polA de cualquier otro efecto ocasionado por alguna

TABLA XIV. RESULTADOS DE LA IODOCLOROHIDROXIQUINOLEINA EN EL ENSAYO DE SUSPENSION
 LIQUIDA EN Escherichia coli

IODOCLOROHIDROXIQUINOLEINA CONCENTRACION (µg/TUBO)	% SOBREVIDA				INDICE DE SOBREVIDA *	
	EXP. 1		EXP. 2		EXP. 1	EXP. 2
	pol A ⁺	pol A ⁻	pol A ⁺	pol A ⁻		
DMSO (20 µl)	100	100	100	100	1.00	1.00
5	16.01	38.95	19.13	33.76	2.43	1.76
10	6.36	22.93	8.38	17.20	3.60	2.05
15	3.07	15.20	2.73	11.89	4.95	4.35
20	2.19	13.20	1.64	12.10	6.02	7.37
30	1.10	1.87	1.09	2.33	1.70	2.13
CLORANFENICOL	93	110	78	84	1.18	1.07
ENS	44	25	62	40	0.56	0.64

* % sobrevida pol A⁻ / % sobrevida pol A⁺

El cloranfenicol fue usado como control negativo y el EMS (etil-metanosulfonato) como control positivo.

modificación genética adicional que conllevan las cepas polA^r aislamos varias "revertantes" de la cepa polA^r resistentes al MMS las cuales mostraron también una mayor resistencia a la MNNG. Los datos obtenidos con las revertantes polA^r indican que la resistencia a la iodoclorohidroxiquinoleína no se pierde lo cual sugiere que el fenómeno es independiente de la presencia de la actividad de polimerasa I (Fig. 8).

La iodoclorohidroxiquinoleína no mostro actividad mutagénica en ninguna de las cepas de S. typhimurium y tampoco fue genotóxico en S. subtilis (Tabla VI).

HEXILHESORCINOL

Al igual que la diodoclorohidroxiquinoleína, este antihelmintico fue genotóxico solamente en el ensayo de E. coli tanto con el método de difusión en agar (Tabla III) como con el de suspensión líquida (Fig. 5).

RAMBATO DE PIRANTEL

El compuesto fue negativo en S. typhimurium y E. coli resultando positivo solamente en S. subtilis (Tabla VI).

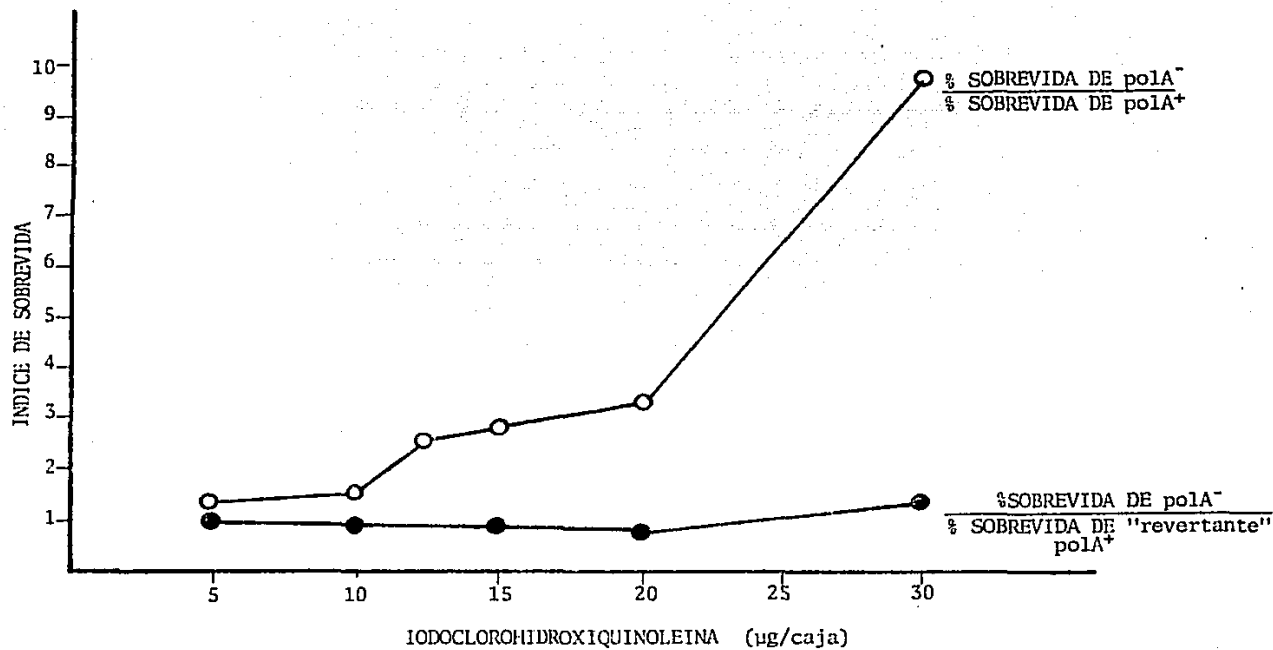


FIG. 8. INHIBICION PREFERENCIAL DE LA CEPA polA⁺ POR EL COMPUESTO ANTIPARASITARIO IODOCLOROHIDROXIQUINOLEINA EN EL ENSAYO DE SUSPENSION LIQUIDA.

MEBENDAZOL, HIDROKINAFUATO DE BEFENIO.

Ambos fármacos no presentaron actividad genética en ninguno de los sistemas bacterianos usados en este estudio (Tabla III, IV, V y VI).

DISCUSION

El presente estudio constituye una parte de un proyecto general que se lleva a cabo en nuestro laboratorio para la evaluación del riesgo genotóxico que representa el consumo de medicamentos antiparasitarios. Dicha evaluación se realiza utilizando diferentes sistemas de prueba, por lo que, los resultados aquí presentados, se interpretarán a la luz de observaciones en otros sistemas, indicando en que medida los hallazgos en las pruebas microbianas plantearon hipótesis e influyeron en el diseño de estudios posteriores.

NICLOSAMIDA

Los datos del presente estudio permitieron identificar a la niclosamida como un agente capaz de producir mutaciones en la cepa TA1538 y TA98 de *S. typhimurium* por lo que se infiere que induce corrimiento del formato de bases original (Tabla I). A la vez, se encontró que las lesiones inducidas en el ADN parecen ser reparadas por el mecanismo de reparación por escisión ya que en las cepas Uvr⁻ (Tabla I) se recuperó un número inferior de revertantes que en la Uvr⁺.

Asimismo, fue evidente que el medicamento no es activo como tal sino que requiere ser metabolizado para ejercer su actividad

mutagénica. De acuerdo a su estructura química (Fig. 3), se sospecha que la unión amida es susceptible de hidrólisis por amidasas no específicas que se encuentran tanto en la fracción soluble como en microsomas de células de mucosa intestinal, hígado plasma sanguíneo, etc. Los productos de dicha hidrólisis, el ácido 5-clorosalisílico y la 2-cloro-p-nitroanilina, poseen radicales capaces de reaccionar con ácido glucurónico y, posteriormente, excretarse en la orina. De estas dos moléculas, la segunda puede ser considerada con actividad mutagénica puesto que contiene los grupos $C_6H_5-NO_2$, $C_6H_5-NH_2$ y C_6H_5-Cl que se encuentran frecuentemente en sustancias con actividad mutagénica y carcinogénica (131). La necesidad de activación metabólica para ejercer un efecto genético, también se constató en estudios realizados en nuestro laboratorio en linfocitos humanos en cultivo (132).

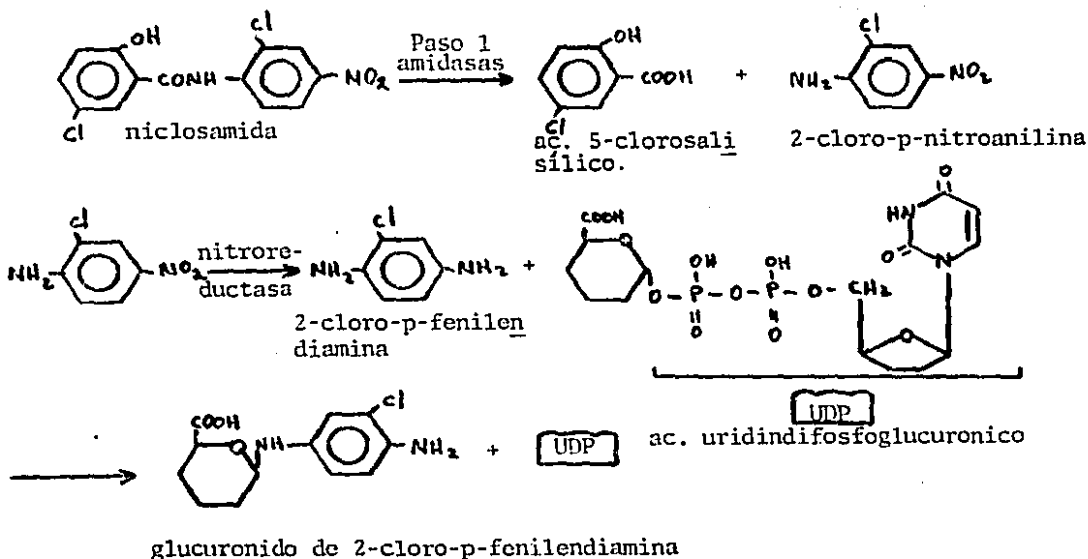
La administración oral de niclosamida a ratones permitió detectar que se excreta en la orina un conjugado con ácido glucurónico mutagénico para la cepa TA1538 (Fig. 4) por lo cual se cree que el compuesto se absorbe y se metaboliza a un compuesto activo que después es conjugado y excretado. Esto contradice lo mencionado por Rollo en el sentido de que este fármaco prácticamente no se absorbe, (125) pero es reforzado por las evidencias que indican que:

- en ratones, la administración oral incrementa las anomalías en la morfología del espermatozoide (133).

- en pacientes humanos, se encuentra una elevación en la frecuencia de rompimientos cromatídicos en linfocitos de sangre periférica después del tratamiento con niclosamida (132).

Estos resultados en ratones y pacientes humanos muestran una variabilidad en la susceptibilidad individual a los efectos genotóxicos del fármaco, lo que pudiera reflejar, entre otros, diferencias en la capacidad de metabolizar o de reparar las lesiones genéticas inducidas por el medicamento.

Otro dato que obtuvimos con respecto al metabolismo de la niclosamida fue la dependencia de un sistema generador de NADPH, así como de la presencia de microsomas hepáticos para hacer evidente su genotoxicidad (Tabla VII), esto, aunado con la mutagenicidad encontrada en orina de ratones tratados, nos llevan a sugerir el siguiente esquema de metabolismo:



El primer paso sería la hidrólisis del enlace amido -CONH- para generar la 2-cloro-p-nitroanilina la cual sufre una reducción por nitroreductasas que requieren NADPH y están presentes en microsomas hepáticos (134). El producto sería la 2-cloro-p-fenilendiamina clasificada como mutagénica en *Salmonella* (131).

La niclosamida también ha mostrado tener un efecto clastogénico en médula ósea de ratón cuando se administra intraperitonealmente (135) y no así cuando se da en forma oral. La diferencia puede ser debida a que oralmente, la concentración de metabolitos que se alcanzan en la médula no es suficiente para evidenciar un efecto genético.

Los datos obtenidos por nuestro grupo en *Aspergillus nidulans* muestran la capacidad del compuesto para inducir recombinación mitótica y no disyunción, anomalías consideradas relevantes en la activación de oncogenes, la inactivación de anti-oncogenes y el origen de padecimientos genéticos.

De hecho El - Mofly y col (136) han encontrado linfosarcomas en sapos expuestos a niclosamida por periodos de tiempo prolongados. Los resultados obtenidos con niclosamida en *E. coli* y *B. subtilis* fueron negativos posiblemente debido a que no se utilizó la mezcla de activación S9 en estos ensayos. Tutikawa y col. encontraron la misma respuesta negativa en *B. subtilis* (137).

Tomando en cuenta la variedad de efectos genéticos que se han detectado con la niclosamida creemos que el compuesto es potencialmente carcinogénico para el humano, a pesar de caer en la clasificación de menor riesgo propuesta por Inman y Matney (18) basada en la capacidad que tiene *S. typhimurium* de reparar las lesiones premutagénicas ocasionadas por el antihelmintico.

PAMQATO DE PIRVINIO

La mutagenicidad del pirvinio exclusiva para las cepas de *S. typhimurium* que poseen el plásmido pKM101 señala la intervención del sistema de reparación SOS en la actividad genética del compuesto (Tabla VIII). Dicho sistema genera por lo menos dos tipos de lesiones, una que es reparada por el mecanismo de reparación por escisión como lo muestra la ausencia de mutagenicidad en la cepa UTH8413, y otro que no se repara en las cepas TA100 (Uvr⁻) y UTH8414 (Uvr⁻) (Tabla VIII).

La ausencia de actividad mutagenica en la orina de animales tratados con el medicamento concuerda con los resultados obtenidos por de la Iglesia y col. (138) en un experimento similar al nuestro además de su pobre absorción a nivel sistémico que se ha reportado con anterioridad (125).

En E. coli el fármaco resulto genotóxico (Tablas III, IV y V; Fig. 2) lo cual confirma su mutagenicidad en Salmonella y sugiere que el compuesto puede unirse al ADN provocando la muerte celular si la lesión no es reparada mediante un mecanismo dependiente de ADN polimerasa I.

Los primeros datos sobre la genotoxicidad del pirvinio se encuentran en los reportes de MacPhee y Podger (139) y Tutikawa y col (137). El primero encontró que un preparado farmacéutico que contenía pirvinio fue mutagénico en S. typhimurium solamente en presencia de mezcla de activación S9 y el segundo encontró una respuesta negativa en el ensayo de genotoxicidad de E. subtilis lo que concuerda con nuestros hallazgos en este microorganismo (Tabla VI).

Posteriormente los resultados obtenidos por Hennig y col (140) al probar varios lotes del medicamento indicaron que algunos lotes presentaban mutagenicidad en presencia y ausencia de S9 y otros solamente en presencia de la mezcla de activación. Los resultados en la cepa XV185-140 de S. cerevisiae también indicaron la mutagenicidad del pirvinio en ausencia de activación metabólica aunque se sabe que esta levadura posee citocromo P-450 durante su fase logarítmica de crecimiento (141).

Estos resultados sugerían la presencia de impurezas con actividad mutagénica en algunos lotes del pirvinio utilizado en los estudios mencionados.

Los datos obtenidos por nosotros sobre la pureza de varias muestras de pirvinio valorada por cromatografía líquida de alta presión (Tabla XI) y los datos de mutagénesis en S. cerevisiae (Tabla X), indican que existen varias impurezas en los lotes usados, particularmente en el 2 B y el 6 F los que presentaron una mayor mutagenicidad en S. cerevisiae. Queda por caracterizar la mutagenicidad de cada uno de los picos e identificar cual de ellos corresponde a la molécula de pirvinio para saber en que medida tales impurezas contribuyen a la mutagenicidad de las muestras.

Estos resultados abren la posibilidad de usar las pruebas a corto plazo para la detección de mutágeno, como pruebas de control de calidad en la industria farmacéutica o de alimentos puesto que se han identificado la presencia de impurezas mutagénicas en otros productos destinados al consumo humano (142).

Aunque no queda duda de la genotoxicidad de esta molécula, consideramos que el riesgo que representa no es grande, comparado al de niclosamida, limitándose solamente a las células del tracto gastrointestinal de aquellos individuos con problemas de estreñimiento en los que el compuesto no es evacuado rápidamente.

DIFOSFATO DE CLOROQUINA

La cloroquina fue reportada como negativa en las cepas TA1535 y TA1538 de S. typhimurium (143) usando el ensayo estandar de plateo, sin embargo, Schupbach (144) mostro posteriormente la mutagenicidad de este anticida en la cepa TA1537 en el ensayo de fluctuación. Los resultados obtenidos en este estudio (Tabla XII), confirman los hallazgos de estos autores mostrando que el difosfato de cloroquina provoca mutaciones de tipo "frameshift" en ausencia de activación metabólica solamente cuando se utiliza el ensayo de fluctuación.

Por otro lado al igual que los datos de Rosenkranz y col. (143), nuestros resultados señalan que este compuesto provoca una inhibición preferencial del crecimiento de la cepa polA⁻ de E. coli (Tablas III y V; Fig 6), sin embargo, los datos obtenidos en E. subtilis no apoyan los de E. coli ya que la cloroquina inhibe por igual a las cepas H17 y M45 (Tabla VI).

Aunque no se conoce con certeza el mecanismo por medio del cual este compuesto provoca mutaciones "frameshift", existen datos que predicen su efecto genético. Al igual que otros intercalantes simples como 9-aminoacridina e ICR-191, la cloroquina se une al ADN intercálándose entre sus bases (145), preferencialmente en secuencias ricas en purinas, como la que se encuentra

presente en el sitio de la mutación de la cepa TA1537. Lo anterior concuerda con el modelo de Schreiber y Danna (146) el cual propone que las mutaciones "frameshift" son el resultado de la interacción de residuos de guanina con moléculas intercalantes.

Por su parte Young y col. (147) proponen que la 9-aminoacridina se intercala en el ADN en regiones ricas en G de una de las hebras, pudiendo formar un puente de hidrógeno a través del grupo amino situado en la posición 9 del anillo de acridina con el grupo carbonilo de la citosina opuesta, provocando así un mal apareamiento de bases. Una reparación subsiguiente, conducirá a la pérdida de la guanina no apareada y por lo tanto, a la formación de una mutación "frameshift" - 1. Similarmente a la 9-aminoacridina, la cloroquina posee un grupo amino exocíclico que cuenta a su vez con un hidrógeno susceptible de formar un puente con la citosina, provocando el mismo tipo de mutación.

Los resultados de la tabla XII muestran evidencias de que el daño ocasionado por cloroquina es reparado puesto que no ocasionó un incremento de revertantes en la cepa TA1972 con respecto al control, lo cual no concuerda con los resultados de MacPhee en E. coli (148). Utilizando varias cepas eficientes y deficientes en su capacidad de reparación, este autor encuentra un efecto mutagénico similar en todas ellas concluyendo que el daño causado

por cloroquina no es reparable. La diferencia en los resultados puede ser consecuencia de la presencia de los genes mucAB en S. coli los cuales están ausentes en S. typhimurium (67).

Tomando en cuenta su actividad mutagénica en Salmonella, se probó la capacidad de cloroquina para producir aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos en cultivo, encontrándose una respuesta positiva (149).

Aunque los datos de carcinogénesis en rata no son suficientes para dictaminar la carcinogenicidad de la cloroquina (150), el riesgo que representa el compuesto es alto sobre todo para pacientes con terapias prolongadas.

DEHIDROEMETINA

La dehidroemetina al igual que la niclosamida provoca mutaciones en la cepa TA98 en presencia de la mezcla S9, sin embargo lo hace debilmente (Fig. 7). La administración oral del medicamento a ratones no permitió por su parte identificar actividad mutagénica en las orinas (Tabla XIII), aunque por su lenta excreción (122) es posible que la concentración de metabolitos mutagénicos que se excreta a las 24 hrs. no sea suficiente para ser detectada por el ensayo. La baja mutagenicidad observada en

la cepa TA98 no pudo ser reproducida en la cepa homóloga UTH8413 UVr⁺ lo cual sugiere que el daño provocado es igualmente reconocido y reparado por el mecanismo de escisión.

Los datos obtenidos en E. coli sugieren que el compuesto tiene la capacidad de lesionar el ADN provocando muerte celular si no se repara (Fig 5). Se ha observado también un efecto clastogénico de la dehidroemetina en linfocitos humanos en cultivo aunque a dosis cercanas a las que ejercen efectos tóxicos que inhiben la división celular (149).

Dada su elevada cardiotoxicidad (122) este medicamento es de uso restringido y parece representar un mayor riesgo por sus efectos tóxicos que por su capacidad mutagénica.

DIODOHIDROXIQUINOLEINA

En un trabajo anterior, Bignami y col. (151) mencionan que la diodohidroxiquinoleina produce mala segregación cromosómica en Aspergillus nidulans además de mutaciones génicas en bacterias. Los datos de mutagénesis en Salmonella no confirman esta segunda observación aunque la capacidad del antibiótico para interactuar con el ADN se mostró en los experimentos con E. coli (Fig. 5).

Existen compuestos, como es la propia cloroquina, que se han reportado como genotóxicos en E. coli, pero no mutagénicos en S. typhimurium cuando se utiliza el ensayo de difusión en agar. El núcleo de este compuesto al igual que la cloroquina, es una quinolina aunque no posee un grupo amino exocíclico con hidrógenos susceptibles de formar puentes con citocinas opuestas, por lo que es poco probable que provoque mutaciones frameshift por intercalación. Los hechos que soportan esta hipótesis son que la quinoleína es negativa en la cepa TA1537 de *Salmonella* y sin embargo, la 4-aminoquinolina y la 8-aminoquinolina son positivas, mostrando la importancia que tiene el grupo amino exocíclico para la inducción de mutaciones frameshift (147).

IODOCLOROHIDROXISQUINOLEINA

La resistencia a este compuesto mostrada por la cepa polA⁻ de E. coli en comparación con la polA⁺ Tabla XIV pueda ser dependiente de la presencia de actividad de polimerasa I o estar ligado a mutaciones adicionales resultantes del procedimiento para aislar la cepa polA⁻.

La cepa deficiente en polimerasa I es muy sensible a la acción de compuestos que reaccionan con el ADN como el NMS, EMS, y la mitomicina C entre otros. Cuando se realiza el ensayo de

difusión en agar con estos compuestos, frecuentemente se obtienen colonias resistentes derivadas de la cepa $polA^-$, las cuales poseen propiedades esencialmente similares a las de la cepa $polA^+$ por lo que D'Alisa y col. (152) sugieren que son revertantes o pseudorevertantes con mutaciones supresoras que han recuperado su actividad de polimerasa.

El experimento con este tipo de revertantes $polA^+$, aisladas a partir de la cepa $polA^-$ (Fig. 3), nos indicó que la resistencia a la iodoclorohidroxiquinoleína se conservó por lo que este efecto fue independiente del carácter pol de la cepa.

Los datos generados en los 3 sistemas bacterianos no indican que exista riesgo desde el punto de vista genotóxico en el consumo de este fármaco, aunque por su similitud con la diiodohidroxiquinoleína es probable que provoque mala segregación cromosómica.

HEXILRESORCINOL, PAMOATO DE PIRANTEL.

El hexilresorcinol fue genotétal en el ensayo de suspensión líquida en *E. coli* y el pamoato de pirantel lo fue en el ensayo con esporas de *B. subtilis*. No encontramos en la literatura ningún otro reporte acerca de la genotoxicidad del hexilresorci-

no por lo que en base a los datos en los sistemas bacterianos podríamos considerarlo como de bajo riesgo.

Con lo que respecta al pamoato de pirantel además de que resultó genotóxico en el ensayo de *S. subtilis* (Tabla VI), se ha reportado que produce mutaciones "frameshift", conversión génica y aneuploidia en las cepas XV185-14C y D5 de *Saccharomyces cerevisiae* (153). El pirantel es un derivado pirimidínico con un sustituyente heterocíclico muy grande (Fig. 3) por lo que no es probable que actúe como un análogo de bases, sin embargo podría actuar como un intercalante gracias a que posee un centro cationico en el nitrógeno heterocíclico metilado. Esta capacidad de actuar como intercalante puede explicar su mutagenicidad en *S. cerevisiae* y predice un resultado positivo también en la cepa TA1537 de *Salmonella* en un experimento de fluctuación.

HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO Y MEBENDAZOL.

Los dos compuestos fueron negativos en los sistemas bacterianos usados por lo que pueden ser clasificados como agentes de bajo riesgo, sin embargo existen datos acerca de la capacidad del Mebendazol para causar mala segregación cromosómica (154), lo que coincide con su propiedad de interferir con la polimerización de microtúbulos (126).

CONCLUSIONES

La capacidad de predicción de cancer de los sistemas bacterianos ha sido estudiada extensamente con el sistema de S. typhimurium. Esto ha sido posible gracias a la gran cantidad de datos obtenidos en dicho sistema donde se han probado cerca de 20,000 sustancias y es considerado como un excelente recurso para identificar carcinógenos electrofílicos.

Se han hecho varios estudios para determinar la predictibilidad de los resultados en Salmonella, de ellos el publicado recientemente por Ashby y col. (17) plantea hechos interesantes. Estos autores presentaron un análisis de la relación entre genotoxicidad y carcinogenicidad de 222 compuestos estudiados por el Programa Nacional de Toxicología de E.U.A. y encuentran que el 73 % de los compuestos que fueron carcinogénicos en rata y ratón induciendo el desarrollo de tumores en uno o más órganos o tejidos, fueron positivos en la prueba de Salmonella lo que significa una alta sensibilidad del sistema. Además, el 74 % de estas sustancias contenían en su molécula uno o más centros electrofílicos potencialmente reactivos con el ADN.

Es interesante observar que de los fármacos estudiados por nosotros con una respuesta positiva en Salmonella, tres de ellos poseen centros electrofílicos en su molécula, a saber: el grupo

nitro aromático de la niclosamida, el grupo alquilamino aromático de la cloroquina y el grupo dimetilamino aromático del pirvinio. La elevada correlación mutagénesis-carcinogénesis que presentan este tipo de moléculas, señalan que el consumo de estos medicamentos implican un riesgo alto.

La dehidroemetina por su parte, no contiene centros electrofilicos y aunque presenta genotoxicidad en S. typhimurium, E. coli y linfocitos humanos in vitro, el riesgo en su consumo deriva principalmente de su cardiotoxicidad.

El sistema de Salmonella también nos permitió explorar el metabolismo de la niclosamida lo que nos llevó a proponer una vía hipotética de su transformación metabólica (ver discusión). En el caso del pamoato de pirvinio, quedó de manifiesto que aquellos lotes con un mayor número de impurezas presentaron una mutagenicidad más elevada en Saccharomyces cerevisiae lo que nos lleva a proponer el uso de las pruebas de genotoxicidad a corto plazo como un instrumento en el control de calidad de productos para el consumo humano.

Con lo que respecta a los resultados en E. coli y B. subtilis, hasta no contar con una base de datos que permita establecer con claridad su sensibilidad y especificidad, no podemos valorar el peso que tengan los resultados obtenidos en la

evaluación del riesgo cualitativo de cáncer. Aunado a esto, los resultados obtenidos en E. coli con la iodoclorhidroxiquinoleína señalan los problemas que se pueden tener para su interpretación.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, no se puede recomendar que se retiren del mercado compuestos como la niclosamida, el pirvinio y la cloroquina que son los que representan un riesgo genotóxico alto, ya que el beneficio que se obtiene en el tratamiento de las poblaciones afectadas con los diferentes parásitos es obvio. Sin embargo, lo que se puede hacer es tratar de restringir el uso indiscriminado que se realiza ya sea por automedicación o por prescripción médica basada solamente en la sintomatología la cual no sea confirmada con los análisis de laboratorio respectivos.

Es importante también el estudiar las posibles interacciones sinérgicas y antagonismos que puedan tener los medicamentos con otros factores como la concentración de nitritos en la dieta, ya que se ha reportado la formación endógena de nitrosaminas carcinogénicas cuando reaccionan diversas moléculas aminadas con nitrito bajo las condiciones ácidas del estómago. Este tipo de estudios, los cuales se realizan en nuestro laboratorio, llevarán a establecer recomendaciones acerca de los alimentos que habría que evitar cuando nos encontremos bajo tratamiento con este tipo de fármacos.

Por último, en base a la experiencia obtenida en el desarrollo de este trabajo, además de las últimas revisiones de la literatura acerca de la utilidad de los ensayos bacterianos para la evaluación cuantitativa del riesgo genotóxico de sustancias, creemos que el uso de la prueba de Salmonella typhimurium es suficiente para este fin.

BIBLIOGRAFIA

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 1) Doll, R. and Peto R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Natl. Cancer Inst. 66: 1193-1308, 1981.
- 2) Farber, E. Chemical carcinogenesis. A biologic perspective. Am. J. Pathol. 106: 270-296, 1982.
- 3) Shubik, P. Progression and promotion. J. Natl. Cancer Inst. 73: 1005-1011, 1981.
- 4) Bishop, J.M. The molecular genetics of cancer. Science 235: 305-311, 1987.
- 5) Fox, T.R. and Watanabe, P.G. Detection of a cellular oncogene in spontaneous liver tumors of B6C3F₁ mice. Science 228: 596-597, 1985.
- 6) Reynolds, S.H., Stowers, S.J., Maronpot, R.P., Anderson, M.W. and Aaronson, S.A. Detection and identification of activated oncogenes in spontaneously occurring benign and malignant hepatocellular tumors of the B6C3F₁ mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83: 33-37, 1986.
- 7) Wiseman, R.W., Stowers, S.J., Miller, E.C. Anderson, M.W. and Miller, J.A. Activating mutations of the c-Ha-ras protoonco-

- gene in chemically induced hepatomas in the male B6C3F1 mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)* 83: 5825-5829, 1986.
- 8) Leder, P., Battay, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. and Taub, R. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771, 1983.
- 9) Winter, E. and Perucho, M. Oncogene amplification during tumorigenesis of established rat fibroblasts reversibly transformed by activated human ras oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 6(7): 2562-2570, 1986.
- 10) Shen-ong, G., Morse III, H.C., Potter, M. and Mushinski, F. Two modes of c-myc activation in virus-induced mouse myeloid tumors. *Mol. Cell. Biol.* 6(2): 380-392, 1986.
- 11) Garte, S.J., Hood, A.T., Hochwait, A.E., D'Eustachio, P., Snyder, C.A., Segal, A. and Albert, R.E. Carcinogen specificity in the activation of transforming genes by direct-acting alkylating agents. *Carcinogenesis* 6: 1709-1713, 1985.
- 12) Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. Induction of mammary carcinomas in rats by nitroso-pentyl-urea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature* 306: 658-661, 1983.

- 10) Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. Direct mutagenesis of H-ras-1 oncogenes by nitroso-methyl-urea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature* 315: 382-385, 1985.
- 14) Stowers, J., Maronpot, R., Reynolds, S. and Anderson, M. The role of oncogenes in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspectives* 75: 81-86, 1987.
- 15) Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M. and Balmain, H. Carcinogen-specific amplification of H-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322: 78, 1986.
- 16) Knudson, A.G. Jr. Hereditary cancer: oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res.* 45: 1437-1443, 1985.
- 17) Ashby and R.W. Tennant. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.* 204(1): 17-115, 1988.
- 18) Inman, M., Butler, M., Connor, T. and Matney, T.S. The effects of excision repair and the plasmid pKM101 on the induction of His^r revertants by chemical agents in Salmonella typhimurium. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 3: 491-501, 1983.

- 19) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70(8): 2281-2285, 1973.
- 20) Kalter, H. Correlations between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals. In: Chemical Mutagens. principles and methods for their Detection. Ed. A. Hollaender, vol. I, p. 57, 1971.
- 21) Mc Kusick, A.V. Mendelian inheritance in man. Catalog of autosomal dominant, autosomal recessive and x linked phenotypes. John Hopkins University Press, 1975.
- 22) Nomura, T. Parental exposure to x rays and chemical induces heritable tumour and anomalies in mice. Nature 296: 575-577, 1982.
- 23) Shelby, M.D. The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. Mutat. Res. 204(1): 3-15, 1988.
- 24) Organización Mundial de la Salud. Series de informes técnicos No. 341, 1966.
- 25) Rosenkranz, H.S., Klopman, G., Chancong, V., Pet-Edwards, J. and Haimes, Y. Prediction of environmental carcinogens: A strategy for the Mid-1980s. Environ. Mutagen. 6(2): 231-258, 1984.

- 26) Durston, W. and Ames, B.N. A simple method for the detection of mutagens in urine: Studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71(3): 737-741, 1974.
- 27) Curvall, M., Romert, L., Norlén, E. and Enzell C.R. Mutagen levels in urine from snuff users, cigarette smokers and non tobacco users- A comparison. Mutat. Res. 188: 105-110, 1987.
- 28) Gabridge, M.G. and Legator, M.S. A host mediated microbial assay for the detection of mutagenic compounds. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 130: 831-834, 1969.
- 29) Arni, F., Mantel, Th., Deperade, E. and Müller, D. Intra-sanguine host-mediated assay with Salmonella typhimurium. Mutat. Res. 45: 291-307, 1977.
- 30) McCann, J., Choi, E., Yamazaki, E. and Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals, Part I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 5135-5139, 1975.
- 31) McCann, J. and Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals (discussion), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 950-954, 1976.

- 32) Purchase, I., Longstaff, E., Ashby, J., Styles, J., Anderson, D., Lefevre P. and Westwood, F. Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendation for their use. *Nature (London)* 264: 624-627, 1976.
- 33) Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M. and Kawachi, T. Overlapping of carcinogens and mutagens, in: P.W. Magee, S. Takayama, T., Sugimura and T. Matsushima (eds.), *Fundamentals in Cancer Prevention*, University Park Press, Baltimore, p. 191-215, 1976.
- 34) Rinkus, S.J. and Legator, M.S. Chemical Characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system, *Cancer Res.* 39: 3289-3318, 1979.
- 35) Zeiger, E. Knowledge gained from the testing of large numbers of chemicals in a multi-laboratory, multi-system mutagenicity testing program, in: T. Sugimura, S. Kondo and H. Takebe (eds.), *University of Tokyo Press, Tokyo and Liss, New York*, p. 337-344, 1982.
- 36) Zeiger, E. Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res.* 47: 1287-1296, 1987.

- 37) Claxton, L., Stead, A. and Walsh, D. An analysis by chemical class of Salmonella mutagenicity test as predictors of animal carcinogenicity. *Mutat. Res.* 205: 197-225, 1988.
- 38) Langenbach, R., Gingell, R., Kuszynski, C., Walker, B., Nagel, D. and Pour, P. Mutagenic activities of oxidized derivatives of N-nitrosodipropylamine in the liver cell-mediated and Salmonella typhimurium assays. *Cancer Res.* 40: 3463-3467, 1980.
- 39) Travis, C.C., Richter, S. and Yambert, M.W. Prediction of carcinogenic potency from toxicological data. Mandado a publicacion.
- 40) Miller, J.A. and Miller, E.C. Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. en: H.H. Hiatt, J.D. Watson and J.A. Winsten (Eds.), *Origins of Human Cancer*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 605-628, 1977.
- 41) Guengerich, F. Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 48: 2946-2954, 1988.
- 42) Farber, E. Possible etiologic mechanisms in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 75: 65-70, 1987.

- 43) Nebert, D.W. and Negishi, M. Multiple forms of cytochrome P-450 and the importance of molecular biology and evolution. *Biochem. Pharmacol.* 31: 2311-2317, 1982.
- 44) Ekstrom, G., von Bahr, C., Glaumann, H. and Ingelman-Sundberg, M. Interindividual variation in benzo(a)pyrene metabolism and composition of isoenzymes of cytochrome P-450 as revealed by SDS-gel electrophoresis.
- 45) Fujino, T., Park, S.S., West, D. and Gelboin, H.V. Phenotyping of cytochromes P-450 in human tissues with monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3682-3686, 1982.
- 46) Conney, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res.* 42: 4875-4917, 1982.
- 47) Harris, C.C., Trump, B.F., Grafstrom, R. and Autrup, H. Differences in metabolism of chemical carcinogens in cultured human epithelial tissues and cells. *J. Cell. Biochem.* 18: 285-294, 1982.
- 48) Kouri, R.E., Schechtman, L.M. and Nebert, D.W. Metabolism of chemical carcinogens. in: Kouri, R.E. ed. Genetic differences in carcinogenesis. Boca Raton: CRC Press, p. 21-66, 1980.

- 49) Pelkonen, O. and Nebert, D.W. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34: 189-192, 1982.
- 50) Kouri, R.E., McKinney, C.E. and Slomiany, D.J. Positive correlation between high aryl hydrocarbon hydroxylase activity and primary lung cancer as analyzed in cryopreserved lymphocytes. *Cancer Res.* 42: 5030-5037, 1982.
- 51) Korsgaard, R., Trelle, E., Kitzing, P. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and smoking habits in patients with laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 94: 368-373, 1984.
- 52) Evans, D.A., Eze, L.C. and Whibley, E.J. The association of the slow acetylator phenotype with bladder cancer. *J. Med. Genet.* 20: 330-333, 1983.
- 53) Lower, G.M. Jr., Nilsson, I. and Nelson, C.E. N-Acetyl transferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark. *Environ. Health Perspect.* 29: 71-79, 1979.
- 54) Mommsen, S., Barford, N. and Aagaard J. N-Acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of a low-risk population. *Carcinogenesis* 2: 199-201, 1985.

- 55) Becher, G. Determination of exposure to PAH by analysis of urine samples. en: Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis: Danbury Report 23. D. Hoffman and C.C. Harris eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 33-34, 1986.
- 56) Sun, T., Wu, S., Wu, Y. and Chu, Y. Measurements of individual aflatoxin exposure among people having different risk to primary hepatocellular carcinoma. en: Diet, Nutrition and Cancer. Proceedings of the International Symposium of Princess Takamatsu Cancer Research Fund. en prensa.
- 57) Ames, B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 204: 587-593, 1979.
- 58) Petrakis, N.L., Dupuy, M., Lee, R., Lyon, M., Maack, C., Gruenka, L. and Craig, J. Mutagen in nipple aspirates of breast fluid. en: Indicators of Genotoxic Exposure: Danbury Report 13. B.A. Bridges B.E. Butterworth, and I.B. Weinstein, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. p. 67-82, 1982.
- 59) Hudac, T., Thean, J., Kuéhl, J. and Dougherty, R.C. Tris-(dichloropropyl)-phosphate, a mutagenic flame retardant: Frequent occurrence in human seminal plasma. Science 211: 931-932, 1981.

- 60) Garner, R., Ryder, R. and Montesano, R. Monitoring of aflatoxins in human body fluids and application to field studies. *Cancer Res.* 45: 922-928, 1985.
- 61) Shireman, R.B. and Schneider, M. Association of aflatoxin B₁ with plasma components in vitro. *Toxicol. Lett.* 14: 213-220, 1982.
- 62) Kutz, F., Strassman, S. and Sperling, J. Survey of selected organochlorine pesticides in the general population of the United States. Fiscal years 1970-75. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 320: 60-68, 1979.
- 63) Mes, J., Campbell, G., Robinson, R. and Davies, D. Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide residues in adipose tissue of Canadians. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 17: 196-203, 1977.
- 64) Eisenstadt, E., Kado, N. and Putzrath, R. Detecting mutagens in cigarette smokers urine. in: *Indicators of Genotoxic Exposure: Banbury Report 13*. B.A. Bridges, B.E. Butterwoth, and T.R. Weinstein, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., p. 33-38, 1982.
- 65) Krichel, D., Commoner, D., Bollinger, D., Bronsden, A., Gold, J. and Henry, J. Detection of occupational exposure to genotoxic agents with a urinary mutagen assay. *Mutat. Res.* 103: 67-79, 1983.

- 66) La Voie, E., Sasson, I. and Hoffmann, D. Mutagens in the urine of cigarette smokers. en: Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis. Banbury Report 23. D. Hoffmann and C.C. Harris eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., p. 121-137, 1986.
- 67) Elespuru, R.K. Inducible response to DNA damage in bacteria and mammalian cells. Environ. and Molec. Mutagen. 10: 97-116 (1987).
- 68) Young, A.T., Mattes, W., Oh, e. and Grossman, L. Enzymatic properties of purified *Escherichia coli* UvrABC proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6157-6161, 1983.
- 69) Grossman, L., Caron, P.R. and Oh, E.Y. The involvement of an *E. coli* multiprotein complex in the complete repair of Uv-damage DNA. en: M.G. Simic, L. Grossman and A.C. Upton (eds.) Mechanisms of DNA Damage and Repair, Plenum Press N.Y. p. 287-294, 1986.
- 70) Maher, V.M., Dorney, D., Mendrala, A., Konze-Thomas, B. and McCormick, J.J. DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet radiation. Mutat. Res. 62: 311-320, 1979.

- 71) Radman, M. SOS repair hypothesis: Phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. in: P. Hanawalt and R.B. Setlow (Eds.). Molecular Mechanisms for Repair of DNA; Part A Plenum Press N.Y. p. 355-367, 1975.
- 72) Radman, M. Is there SOS induction in mammalian cells? Photochem. Photobiol. 32: 823-830, 1980.
- 73) Walker, G.C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli Microbiol. Rev. 48: 60-93, 1984.
- 74) Craig, N. and Roberts, J.W. E. coli recA protein-directed cleavage of phage repressor requires polynucleotide. Nature 283: 26-30, 1980.
- 75) Oishi, M., Irbe R.M., Morin, L. Molecular mechanism for the induction of "SOS" functions. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 26: 281-301, 1981.
- 76) Smith, C.L. Response of rec-A dependent operons to different DNA damage signals. J. Biol. Chem. 260: 10069-10074, 1985.
- 77) Marsh, L. and Walker, G.C. Mutagenic DNA repair in bacteria: The role of UmubC and MucAD. in: M.R. Simic, L. Grossman and A.C. Upton (eds.) Mechanisms of DNA Damage and Repair, Plenum Press N.Y. p 273-280.

- 78) Rossman, T.G. and Klein, C.B. From DNA damage to mutation in mammalian cells: A Review. Environ. and Molec. Mutagen 11:119-133, 1988.
- 79) Toorchen, D. and Topal, M.D. Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: Effects on DNA replication of methylation at the O6-guanine position of dGTP. Carcinogenesis 4: 1591-1597, 1983.
- 80) Larson, K., Sahm, J., Shenkar, R. and Strauss, B. Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. Mutat. Res. 150: 77-84, 1985.
- 81) Singer, B. Mutagenic effects of nucleic acid modification and repair assessed by in vitro transcription. In: Induced Mutagenesis. Molecular Mechanisms and their implications for environmental protection. C.W. Lawrence (ed.) Plenum Press, N.Y. p. 1-34, 1983.
- 82) Lackey, D., Krauss, G.W. and Linn, S. Isolation of an altered form of DNA polymerase I from *Escherichia coli* cells induced for recA/LexA functions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 330-334, 1982.
- 83) Blanco, M., Herrera, G., Collado, P., Rebollo, J. and Botella, L.M. Influence of recA protein on induced mutagenesis. Biochimie 64: 633-636, 1982.

- 84) Wigle, J.J. Induction of mutation in a bacterial virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39: 629-636, 1953.
- 85) Sarasin, A. and Hanawalt, P.C. Carcinogens enhance survival of UV irradiated simian virus 40 in treated monkey kidney cells: Induction of a recovery pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 346-350, 1978.
- 86) Bockstahler, L.E. and Lytle, C.D. X-ray enhanced reactivation of ultraviolet-irradiated human virus. J. Virol. 8: 601-602, 1971.
- 87) Lytle, C.D., Coppey, J. and Taylor, W.D. Enhanced survival of ultraviolet irradiated herpes simplex virus in carcinogen treated cells. Nature 272: 60-62, 1978.
- 88) Yeager, J.D., Zurlo, J. and Penn, A.L. Heat-shock-induced enhanced reactivation of UV-irradiated herpes virus. Mutat. Res. 146: 121-128, 1985.
- 89) Das Gupta, U.B. and Summers, W.C. Ultraviolet reactivation of herpes simplex virus is mutagenic and inducible in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2378-2381, 1978.
- 90) Lytle, C.D., Goddard, J.G. and Lin, G. Repair and mutagenesis of herpes simplex in UV irradiated monkey cells. Mutat. Res. 70: 139-149, 1980.

- 91) Sarasin, A. and Benoit, A. Enhanced mutagenesis of UV-irradiated simian virus 40 occurs in mitomycin C-treated host cells only at low multiplicity of infection. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1102-1107.
- 92) Sarasin, A. and Benoit, A. Induction of an error-prone mode of DNA repair in UV-irradiated monkey kidney cells. *Mutat. Res.* 70: 71-81, 1980.
- 93) Stone-Wolff, D.S. and Rossman, T.G. Effects of inhibitors of the novo protein synthesis on UV-mutagenesis via inducible, error-prone DNA repair. *Mutat. Res.* 82: 147-157, 1981.
- 94) Angel, P., Poting, A., Mallick, V., Rohmsdorf, H.J., Schorpp, M. and Herrlich, P. Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1760-1766, 1986.
- 95) Sarasin, A. SOS response in mammalian cells. *Cancer Invest.* 3(2): 163-174, 1985.
- 96) Tlsty, T.D., Brown, P.C. and Schimke, R.T. U.V. irradiation facilitates methotrexate resistance and amplification of the dihydrofolate reductase gene in cultured 3T6 mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4: 1050-1056, 1984.

- 97) Das, S.K., Benditt, E.P. and Loeb, L.A. Rapid changes in deoxynucleotide triphosphate pools in mammalian cells treated with mutagens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 458-464, 1983.
- 98) Miskin, R. and Reich, E. Plasminogen activator: Induction of synthesis by DNA damage. *Cell.* 19: 217-224, 1980.
- 99) Rahmsdorf, H.J., Koch, N., Mallick, U. and Herrlich, P. Regulation of class I in variant chain expression: Induction of synthesis in human and murine plasmacytoma cells by arresting replication. *EMBO J.* 2: 811-816, 1983.
- 100) Schorpp, M., Mallick, U., Rahmsdorf, H.J. and Herrlich, P. UV-induced extracellular factor from human fibroblasts communicates the UV response to nonirradiated cells. *Cell* 37: 861-868, 1984.
- 101) Hartman, P.E., Hartman, Z., Sthal, R.C. and Ames, B.N. Classification of spontaneous and induced mutations in the histidine operon of Salmonella. *Adv. Genet.* 16: 1-34, 1971.
- 102) Barnes, W., Tuley, E. and Eisenstadt, E. Base-sequence analysis of his^r revertants of the his G46 missense mutation in Salmonella typhimurium. *Environ. Mutagen.* 4: 297, 1982.

- 103) Hartman, P.E., Ames, B.N., Roth, J.R., Barnes, W.M. and Levin, D.E. Target sequences for mutagenesis in Salmonella histidine-requiring mutants. Environ. Mutagen. 8: 631-641, 1986.
- 104) Levin, D.E. and Ames, B.N. Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions: A simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay. Environ. Mutagen. 8: 9-28, 1986.
- 105) Geschger, N.S. and Hartman, P.E. ICR-Induced frameshift mutations in the histidine operon of Salmonella. Journal of Bacteriology 101: 490-504 1970.
- 106) Riddle, D.L. and Roth, J.R. Frameshift suppressors III. Effects of suppressor mutations on transfer RNA. J. Mol. Biol. 66: 495-506, 1972.
- 107) Ames, B.N., Sims, P. and Grover, P. Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frameshift mutagens. Science 176: 47-49, 1972.
- 108) Isono, K. and Yourno, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71(5): 1612-1617, 1974.

- 109) McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N. Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 979-983, 1975.
- 110) Alper, M.D. and Ames, B.N. An improved test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 782-786, 1973.
- 111) Kelly, R., Atkinson, M., Huberman, J. and Kornberg, A. Excision of thymine dimers and other mismatched sequences by DNA polymerase of Escherichia coli. Nature, 224: 495-501, 1969.
- 112) Slater, E., Anderson, M. and Rosenkranz, H.S. Rapid detection of mutagens and carcinogens. Cancer Research, 31: 970-973, 1971.
- 113) Rosenkranz, H.S. and Leifer, Z. Determining the DNA-modifying activity of chemicals using DNA-Polymerase-deficient Escherichia coli. in: Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection vol. 6 F.J. de Serres and A. Hollaender eds. Plenum Press N.Y. P. 109-147. 1980.
- 114) De Lucia, P. and Cairns, J. Isolation of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224: 1164-1166, 1969.

- 115) Gross, J. and Gross, M. Genetic analysis of an E. coli strain with a mutation affecting DNA polymerase. Nature 224: 1166-1168, 1969.
- 116) Kada, T., Hirano, K. and Shirasu, Y. Screening of environmental chemical mutagens by the Rec-Assay system with Bacillus subtilis. in: Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection vol. 6. F.J. de Serres and A. Hollaender eds. Plenum Press N.Y. p. 149-173, 1980.
- 117) Kada, T. and Sadaie, Y. Recombination-deficient mutants of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 125(2): 489-500, 1976.
- 118) Shahin, M. and Von Borstel, R.C. Mutagenic and lethal effects of α -benzene hexachloride, dibutyl phthalate and trichloroethylene in Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res. 48: 173-180, 1977.
- 119) Grollman, A.P. Structural basis for inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 1867-1874, 1966.
- 120) Huang, T. and Grollman, A.P. Novel inhibitors of protein synthesis in animal cells. Fed. Proc. 29: 609, 1970.

- 121) Rollo, I.M. Drugs used in the chemotherapy of malaria. en: The pharmacological basis of therapeutics 6th edn. A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman eds. MacMillan Publishing Co. Chapter 45 p. 1038-1060, 1980.
- 122) Rollo, I.M. Drugs used in the chemotherapy of amebiasis. en: The pharmacological basis of therapeutics 6th edn. A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman eds. MacMillan Publishing Co. Chapter 46 p. 1061-1069, 1980.
- 123) Berggren, L. and Hansson, O. Absorption of intestinal antiseptics derived from 8-hydroxyquinolines. Clin. Pharmacol. Ther. 9: 67-70, 1968.
- 124) Thompson, J.H. Farmacos utilizados en el tratamiento de la helmintiasis. en: Fundamentos de Farmacología. J.H. Beran ed. Harper and Row, Publishers, México p. 516-523, 1978.
- 125) Rollo, I.M. Drugs used in the chemotherapy of helminthiasis en: The pharmacological basis of therapeutics 6th edn. A.G. Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman eds. MacMillan Publishing Co. Chapter 44 p. 1013-1037, 1980.
- 126) Borgers, M., De Nollin, S., De Brabander, M. and Thiéront, D. Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. Am. J. Vet. Res. 36: 1153, 1975.

- 127) Vogel, H.J. and Bonner, D.M. Acetylornithinase of Escherichia coli: partial purification and some properties. J. Biol. Chem. 218: 97-106, 1956.
- 128) Maron, D.M. and Ames, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215, 1983.
- 129) Green, M., Muriel, W. and Bridges, B. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutat. Res. 38: 33-42, 1976.
- 130) Hyman, J., Leifer, Z. and Rosenkranz, H.S. The E. coli polA⁻ assay, A quantitative procedure for diffusible and non-diffusible chemicals. Mutat. Res. 74: 107-111, 1980.
- 131) Zaiger, E. Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. Cancer research 47: 1287-1296, 1987.
- 132) Ostrosky, P.W., Garcia, G., Montero, R., Perez, D., Alvarez, R. and Cortinas de Nava, C. Susceptibility to genotoxic effects of niclosamide in human peripheral lymphocytes exposed in vitro and in vivo. Mutat. Res. 173: 81-87, 1985.
- 133) Vega, S., Ruzmán, P., Garcia, L., Espinosa, J. and Cortinas de Nava, C. Sperm shape abnormality and urine mutagenicity in mice treated with niclosamide. Mutat. Res. 204: 269-276, 1988.

- 134) Fouts, J. and Brodie, B. The enzymatic reduction of chloramphenicol, p-nitrosobenzoic acid and other aromatic nitro compounds in mammals. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 119: 197-1957.
- 135) Fernández, I. Evaluación genotóxica de dos antiparasitarios de amplio uso en Cuba, empleando modelos "in vivo". Primera Jornada Científica de la Industria Médico Farmacéutica, Septiembre 26-27, La Habana, Cuba, 1985.
- 136) El-Mofty, M., Renber, M., El Sebae, A. and Sabry, I. Induction of neoplastic lesions in toads (*Bufo regularis*) with Bayluscid (Niclosamide) Bayer 73. Proceedings of International symposium on Prevention of Occupational Cancer, Helsinki, April 21-24 p. 173-176, 1982.
- 137) Tutikawa, K., Shimoi, N. and Yagi, Y. Mutagenicity of the products generated by a reaction between chloroquine and nitrite. *Mutat. Res.* 54: 230, 1978.
- 138) De la Iglesia, F., Lake, R., Fitzgerald, J., Bueding, E. and Brusick, D. Bacterial mutagenesis and cell transformation assays of pyriminium pamoate (Povan), an antiparasitic agent. *J. Am. College Toxicol.* 3: 285-294, 1984.

- 139) MacPhee, D.G. and Podger, D.M. Mutagenicity tests on anthelmintics: microsomal activation of pyrvinium embonate to a mutagen. *Mutat. Res.* 48: 307-312, 1977.
- 140) Henning, U., Von Borstel, R. and Razzaki, T. A comparison of the genetic activity of several medical grades of pyrvinium pamoate in Saccharomyces cerevisiae and Salmonella typhimurium. *Environ. Mutagen.* 6: 472 (resumen), 1984.
- 141) Callen, D.F. and Philpot, R. Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in Saccharomyces cerevisiae. *Mutat. Res.* 45: 303-324, 1977.
- 142) Hart, R., Freni, S., Gaylor, D., Gillete, J., Lowry, L., Ward, J., Weisburger, E., Lepore, P. and Turturro, A. Final report of the color additive scientific review panel. *Risk Analysis* 6(2): 117-154, 1986.
- 143) Rosenkranz, H., Gutter, B. and Speck, W. Mutagenicity and DNA-modifying activity: A comparison of two microbial assays. *Mutat. Res.* 41: 61-70, 1976.
- 144) Schuppach, M.E. Mutagenicity evaluation of the two antimalarial agents chloroquine and mefloquine, using a bacterial fluctuation test. *Mutat. Res.* 68: 41-49, 1979.

- 145) Waring, M.J. Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs. Evidence for molecular models involving intercalation. *J. Mol. Biol.* 54: 247-279, 1970.
- 146) Schreiber, J.P. and Daune, M.P. Fluorescence of complexes of acridine dye with synthetic polydeoxyribonucleotides: A physical model of frameshift mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 83: 487-501, 1974.
- 147) Young, P., Ma., R., Marfey, P. and Kallenbach, N. Frameshift mutagenesis of 9-aminoacridine derivatives in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 90: 1-10, 1981.
- 148) Thomas, S., Gilbert, K. and MacPhee, D. Frameshift mutagenesis by chloroquine in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 192: 233-237, 1987.
- 149) Ostrosky-Wegman, P., Garcia, G., Arellano, L., Espinosa, J.J., Montero K. and Cortinas de Nava, C. Genotoxicity of antiamebic, anthelmintic and antimycotic drugs in human lymphocytes. in: R.R. Tice and A. Hollaender eds. *Sister Chromatid Exchanges*, Plenum N.Y. p. 915-925, 1984.
- 150) IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some miscellaneous pharmaceutical substances vol. 13, 1977.

- 151) Bignami, M., Morpurgo, G., Pagliani, R., Corere, A., Conti, G. and Di Giuseppe, G. Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in aspergillus nidulans. Mutat. Res. 26: 159-170, 1974.
- 152) D'Alisa, R.M., Carden, G.A., Carr, H.S. and Rosenkranz, H.S. "Reversion" of DNA Polymerase deficient Escherichia coli. Mol. Gen. Genet. 110: 23-26, 1971.
- 153) Hennig, U., Galindo, O., Cortinas de Nava, C., Savage, E. and von Borstel, R.C. A comparison of the genetic activity of pyvinium pamoate with that of several other anthelmintic drugs in Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res. 187: 79-89, 1987.
- 154) de la Torre, R.A. y col. Datos no publicados.