



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

“ VALORACION DEL RIESGO DE EXPOSICION A COMPUESTOS N-NITROSO (NITROSAMIDAS) EN CEPAS DE *Salmonella typhimurium* CON DIFERENTE CAPACIDAD DE REPARACION ”

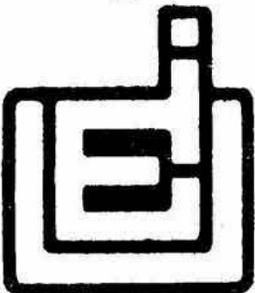
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
ANA LAURA DEYTA TECO

Director de Tesis
DRA. EN C.B. MYRIAM ARRIAGA ALBA

IZTACALA, ESTADO DE MEXICO

1993





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la Dra. Myriam Arriaga
por su apoyo y paciencia
en la realización de es-
te trabajo, y por la oportu-
nidad de aprender algo
más en esta vida.

A todas las personas que
colaboraron para la rea-
lización y termino de es-
te trabajo.

Con cariño:

A mis padres Sara y Jorge

"Sabido que jamás existirá una forma de agradecer esta vida de lucha, sacrificio y superación constante, solo deseo que entiendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes y constituyen la herencia más valiosa que pudiera recibir"

A mis hermanos Norma y Jorge

Por su apoyo y ayuda incondicional

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATO
RIO DE BACTERIOLOGIA (DE NUEVA CREACION)
DE LA DIRECCION DE INVESTIGACION Y ENSE
ÑANZA DEL HOSPITAL JUAREZ DE MEXICO.

SE AGRADECE EL APOYO FINANCIERO A
CONACYT No. D113 - 903971

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
ANTECEDENTES	6
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y METODO	33
RESULTADOS	46
DISCUSION	67
CONCLUSIONES	84
ANEXO	86
BIBLIOGRAFIA	91

R E S U M E N

Los daños inducidos por agentes químicos y/o físicos que no son reparados pueden inducir mutaciones, las cuales -- pueden originar carcinogénesis química si el daño se ha efectuado en células somáticas o teratogénesis, si el daño ha afectado células germinales. Uno de los mutágenos químicos mejor conocidos, son los compuestos N-nitroso, -- un grupo de estos compuestos, las nitrosamidas, son utilizadas frecuentemente en quimioterapias y se han detectado también en cerveza y pescados ahumados. No obstante existen pocos reportes sobre los efectos de la reparación de daños al ADN, inducidos por nitrosamidas.

Empleando una prueba de *Salmonella typhimurium* Uvr⁺/Uvr⁻ conteniendo y no el plásmido pKm101, el cual contiene el sistema de reparación propenso a error SOS, se encontró -- que la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina y la N-nitroso-N-metilurea producen mutaciones por substitución de bases, las cuales no son corregidas por el sistema de reparación por escisión UvrB. La N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina -- y la N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina indujeron mutaciones por substitución de bases, las cuales pueden ser -- corregidas por el sistema de reparación por escisión de --

una manera dependiente de la dosis. Se infiere que al incrementar el tamaño del radical alquil en las nitrosamidas, se disminuye el riesgo de exposición del humano a estos compuestos químicos mutagénicos, siempre y cuando la exposición no sea a dosis altas. El compuesto etilante fué tóxico para las cepas de *Salmonella typhimurium*, pero su efecto fue reducido por el sistema SOS presente en las cepas TA100 y UHT8414. La mutagenicidad de estos cuatro compuestos no pudo ser incrementada en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA1535 y TA1975 carentes del plásmido pKm101 son más susceptibles para detectar compuestos N-nitroso y poder evaluar el alto riesgo de exposición que representan estos compuestos al ser humano.

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad la producción masiva de diversas sustancias químicas que se han desarrollado para mejorar las condiciones de vida, ha propiciado una mayor exposición del hombre a este tipo de compuestos, siendo evidente que algunos de ellos tiene efectos indeseables al producir daños al material genético, pudiendo traducirse dichos daños en mutaciones heredables, las cuales pueden iniciar el proceso de carcinogénesis en células somáticas o teratogénesis si el daño se da en células germinales (13).

Los compuestos N-nitroso encontrados frecuentemente en alimentos, bebidas y que pueden originarse a partir de sus precursores como medicamentos aminados y nitritos, son considerados en la actualidad como uno de los grupos más importantes de compuestos químicos, que pueden ser mutagénicos y carcinogénicos, ya que se ha comprobado que son capaces de producir cáncer en esófago, colón, hígado y estómago, así como tumores hepáticos en diferentes especies animales. Al ser el hombre capaz de activar los compuestos N-ni-

troso al igual que los animales de laboratorio, puede ser también sensible a su efecto carcinogénico (32). Por otro lado, existe evidencia epidemiológica que señala una mayor incidencia de cáncer en lugares con alto consumo de nitritos, nitrosaminas y nitrosamidas, con respecto a zonas menos expuestas a este tipo de compuestos -- (5).

El proceso sobre la comprensión de la carcinogénesis química ha sido lento, sin embargo se sabe que el daño producido al ADN por cualquier compuesto no es necesariamente traducido en una mutación o muerte celular, ya que la célula cuenta con diferentes mecanismos de reparación. No obstante, en la actualidad existen pocos reportes acerca del papel que juegan los sistemas de reparación celular en cuanto a la corrección de daños al ADN que producen los compuestos N-nitroso, encontrando que a pesar de la dificultad que representa extrapolar los datos obtenidos mediante el uso de sistemas bacterianos, se considera que si el daño inducido por algún compuesto en el ADN de las bacterias puede ser corregido, representaría un riesgo menor a la salud, dado que en el ser humano existen mecanismos de reparación similares a los de los procariontes (13, 39). Es

por ello que en el presente trabajo se dará un aporte al conocimiento de la valoración del riesgo de exposición a compuestos N-nitroso (nitrosamidas), determinando el rango de dosis en el que los daños producidos al ADN por estos compuestos puedan ser corregidos mediante el sistema de reparación por escisión libre de error presente en las cepas $UvrB^+$ del sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames. Por otro lado con el empleo de cepas del mismo sistema pero que contienen el plásmido pKm101, se determinará si el sistema de reparación propenso a error SOS facilita la detección de estos compuestos, determinando la influencia de este sistema tanto en efectos mutagénicos como en el incremento de sobrevivencia del mismo con respecto a las cepas carentes de este plásmido.

A N T E C E D E N T E S

MUTACIONES Y SUS EFECTOS BIOLOGICOS

Relación entre Mutación y Cáncer

Si se acepta el concepto de enfermedad como una manifestación de los disturbios de los procesos biológicos, bioquímicos o biofísicos controlados por productos génicos interactuando con factores ambientales, conceptualmente la mutación debe -- ser una causa importante de enfermedades. Así -- mismo al demostrarse que la mutagénesis está bajo un control genético tanto en procariontes como en eucariontes, que los mecanismos de reparación del ADN parecen ser responsables de la mutagénesis en ambos casos y que los defectos en dichos mecanismos de reparación parecen estar asociados con varios síndromes humanos, relacionados entre otros el cáncer y otras enfermedades -- no contagiosas, se puede establecer una relación causal entre las mutagénesis y la carcinogénesis. Por otro lado la mutagénesis ha sido postulada -- como un mecanismo responsable del cáncer, teratogénesis y envejecimiento (58).

Existe un gran número de estudios que originan - modelos y/o teorías que describen el proceso de inducción del cáncer por parte de varios agentes físicos, químicos y virales. Así mismo hay que tener en cuenta que si conceptualizamos al cáncer como un fenotipo, entonces, al igual que los demás fenotipos necesita ser la consecuencia de un conjunto complejo de interacciones que involucra tanto elementos génicos como ambientales. Por otra parte la revisión de la literatura parece apoyar el hecho de que tanto la mutación como los procesos epigenéticos tienen que ver (como componentes) con la carcinogénesis (10, 58).

Tipos de Mutación y Efecto Biológico

La estabilidad de las moléculas hereditarias que se presenta como un requisito para desempeñar su papel biológico que existen y han existido a partir del primer ser vivo, se ha originado a consecuencia de la aparición de errores sistemáticos, los cuales han permitido la diversificación de las moléculas hereditarias. Sin embargo es conveniente distinguir las mutaciones espontáneas - que tienen lugar ocasionalmente en la naturaleza, de aquellas que son producidas por efecto de ciertos agentes inductores o mutágenos físicos y quí

micos, teniendo en cuenta que los mecanismos moleculares productores del cambio de la secuencia de bases pueden ser diferentes según el origen - que tengan (52).

En cuanto a las mutaciones inducidas por factores externos, son numerosos los agentes inductores de mutaciones génicas o cromosómicas, y pueden ser tanto físicos como químicos. El efecto de la luz UV (ampliamente utilizada en la inducción de mutaciones) es uno de los más conocidos, dando lugar a dos tipos de consecuencias:

- a) El cambio de una base por su forma tautomérica que puede originar una transición de las bases nucleóticas.

- b) La formación de dímeros de timina, que distorsiona la estructura del ADN, pudiendo producir ruptura de la cadena complementaria. La distorsión puede ser reparada o conducir a una sustitución de bases y consecuentemente a la aparición de transiciones y transversiones.

La luz UV también puede causar cambios estructurales cromosómicos, así como las radiaciones - -

ionizantes (cósmicas, isótopos radioactivos, rayos X) pueden cambiar las propiedades de distribución electrónica de las moléculas hereditarias, provocando tanto cambios de bases en los ácidos nucleicos, como rupturas en moléculas y cromosomas (52), en tanto que los matágenos químicos, pueden actuar principalmente de tres formas para causar alteraciones en la secuencia de bases del ADN:

- 1) Mutación por reacción con el ADN. El ácido nitroso, la hidroxilamina y los agentes alquilantes, actúan por modificación de la estructura química de las bases produciendo el cambio en la secuencia de las mismas. Los agentes alquilantes introducen grupos alquilo en las bases del ADN pudiendo originar la formación tautomérica de bases, dando lugar a transiciones, la producción de bases alquiladas de difícil reconocimiento para la ADN polimerasa durante la replicación y la producción de transiciones, transversiones y grandes deleciones.
- 2) Mutación por sustitución de bases durante la replicación. Este efecto lo producen además de los que ya se han mencionado ciertos com--

puestos análogos de bases que intervienen en la estructura del ADN, e introducen errores durante la replicación.

- 3) Mutación por distorsión de la doble hélice de ADN. Efecto producido por compuestos policíclicos y las acridinas (grupo de moléculas aromáticas). La consecuencia de los efectos producidos por éstos agentes consiste en la adición o delesión de pares de bases, desde una hasta veinte (52).

De acuerdo con la naturaleza del gen a que afectan, las mutaciones que implican cambios en las secuencias de bases de las moléculas informativas, pueden tener diferente repercusión. Una mutación que afecta a un gen que ha de ser traducido en una cadena polipeptídica puede tener consecuencias muy concretas para el individuo, que dependen de la importancia del gen y del tipo de cambio producido. Las mutaciones que afectan a los genes que codifican las síntesis de los ARNt pueden tener un efecto más amplio que las anteriores, ya que pueden afectar peliotrópicamente a la síntesis de proteínas de otros genes (52).

LOS COMPUESTOS N-NITROSO

Los compuestos N-nitroso constituyen un grupo extenso de productos químicos cuyo interés de estudio surgió desde 1956, cuando se puso en evidencia tanto su capacidad carcinogénica como su actividad biológica. Con ésto se incrementó el interés por el estudio de las posibles implicaciones de los mismos en el cáncer humano, iniciándose el estudio de la identificación de las formas de exposición a estos compuestos (50).

Definición

Los compuestos N-nitroso se definen químicamente como el producto de la reacción catalítica a pH ácido entre el ion nitrito y diferentes compuestos nitrogenados. Estos compuestos se subdividen en nitrosaminas y nitrosamidas, en base al compuesto nitrogenado que ha dado lugar a su formación.

Se denominan nitrosaminas a los productos de la reacción del nitrito con aminas secundarias alifáticas, aminas terciarias alifáticas y aminas secundarias y terciarias heterociclícas, derivados pirimidínicos y enaminas. Las nitrosamidas por su parte, son el producto de la reacción con

N-alquilureas, N-alquilcarbamatos, hidroxilaminas, hidrazinas, hidrazonas, N-alquilamidas y guanidinas (12, 16, 34, 42).

Compuestos N-Nitroso y Cáncer

Los compuestos N-nitroso están relacionados con el cáncer, ya que son capaces de originar mutaciones al introducir grupos alquilo en el ADN, siendo este tipo de lesión considerada como un mecanismo involucrado en la fase de iniciación del cáncer (8, 50). Sin embargo, en cuanto a su actividad carcinogénica, existen diferencias notables en el comportamiento de las nitrosaminas y las nitrosamidas, siendo estas últimas capaces de inducir cáncer y tumores cerca del sitio de su aplicación, por ser agentes alquilantes directos de las bases nitrogenadas del ADN, mientras que las nitrosaminas deben ser transformadas metabólicamente y por lo tanto, su vía de administración no influye en su especificidad por algún órgano (5, 43).

Los adenocarcinomas mamarios se inducen con un elevado porcentaje (90%), después de 6 a 12 meses de una inyección intravenosa del agente alquilante N-nitroso-N-metilurea (NMU) a ratas jóvenes

nes, así mismo, si éste compuesto se inyecta intraperitonealmente en ratones jóvenes puede inducir tumores en el timo. Por otra parte, la inyección transplacentaria de la N-etil-N-nitrosourea (ENU) se ha utilizado para la inducción de tumores del sistema nervioso en fetos de rata, obteniendo una eficacia del 95% (30). En otros estudios, Lu en 1989, confirmó que el carcinoma esofágico en el condado de Linxian puede ser inducido por N-nitrosaminas. Bartsh y colaboradores en 1989, reportaron un papel etiológico de los compuestos N-nitroso en cánceres humanos, como el de la cavidad oral, esófago, estómago y vejiga urinaria. Archer en 1989, determinó que se se puede predecir con un alto grado de confiabilidad que los compuestos N-nitroso son carcinogénicos en el humano. En 1989 Preston-Martín mostró que varios compuestos N-nitroso, son potencialmente carcinógenos del sistema nervioso en animales, particularmente cuando se exponen transplacentariamente. No obstante, se ha discutido que no hay una asociación directa "causa y efecto" entre la exposición a nitratos y el riesgo a un cáncer ya que existen otros factores que están implicados en la formación endógena de los compuestos N-nitroso (7, 18). Mueller en 1989, menciona que la literatura de las nitrosaminas y

nitrosamidas es abundante, sin embargo es imposible hacer una valoración natural del daño que presentan los compuestos N-nitroso y sus precursores para el hombre. De igual forma, Anderson y colaboradores (1989) determinaron que a pesar de que existe una posible hipótesis acerca de los compuestos N-nitroso como agentes causales de cáncer en jóvenes, no se puede sostener ni refutar concluyentemente que puedan iniciar tumores neurogénicos en fetos de ratón. Por otra parte, se sabe que los compuestos N-nitroso son capaces de inducir cáncer en más de 22 especies diferentes de animales de laboratorio, habiéndose descrito también una alta incidencia de cáncer de esófago, colón y estómago en lugares en los cuales se ingieren alimentos con alto contenido de compuesto N-nitroso o de sus precursores (32, 35).

Actividad Mutagénica de los Compuestos N-nitroso

La actividad mutagénica de los compuestos N-nitroso se debe específicamente a su capacidad de alquilar el ADN (19, 50). La capacidad mutagénica de diferentes grupos de nitrosaminas con diferente estructura química, se ha valorado en varios estudios empleando el sistema de cepas de -

Salmonella typhimurium descrito por Ames y colaboradores en 1973. Dada la capacidad alquilante de estos compuestos y la consecuente generación de sustituciones de bases, las cepas TA1535 y TA100 de *Salmonella typhimurium* hisG46, susceptibles de ser revertidas por dicho mecanismo, son las más adecuadas y sensibles para detectar su actividad - (3, 33, 61, 62).

Dentro del grupo de las nitrosamidas destacan -- los derivados N-nitroso de ureas y guanidinas, - ya que por sus propiedades citostáticas se han - empleado como drogas anticancerígenas. La activi- dad mutagénica de este tipo de alquilantes puede ser detectada en el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* hisG46 sensibles a la reversión por -- sustitución de bases. Lijinski y Andrews (1979), probaron 34 nitrosamidas, resultandoser todas mu- tágenos de acción directa, pero de potencia muy variable. Estas mismas, fueron probadas con el - efecto de incubación mediante la preparación mi- crosomal empleada en el método de Ames, encon- trando que no hubo un incremento en la actividad mutagénica. Existen otros trabajos en los que se han estudiado nitrosaminas heterocíclicas, carci- nogénicas y no carcinogénicas en cepas de *Salmonella typhimurium* hisG46 uvrB⁻, resultando ser todas mutagénicas en el sistema (61, 62).

Por otro lado, Andrews y Lijinsky (1980), examinaron la mutagenicidad de 45 nitrosaminas en *Salmonella typhimurium* TA1535, encontrando una relación carcinogénica. Negishi y colaboradores en 1991 probaron la genotoxicidad de N-nitrosaminas (alifáticas y cíclicas) en células somáticas de *Drosophila melanogaster in vivo*, encontrando que el efecto genotóxico obtenido, está en relación al efecto mutagénico de las nitrosaminas probadas en el sistema de Ames. Horsfall y colaboradores (1989), determinaron la especificidad mutagénica de la N-nitroso-N-dimetilamina metabolizada *in vivo*, encontrando que la mutación predominante fue la transición G:C - A:T, con una especificidad similar a la reportada para agentes alquilantes de acción directa. Así mismo, Guttenplan en 1990, estudio la relación entre la alquilación de bases, reparación y mutagénesis del ADN utilizando algunos compuestos N-nitroso en cepas de *Salmonella typhimurium* uvr+/uvr-, encontrando que los alquilantes metil y etil presentan una alta eficiencia mutagénica, la cual se refleja en el cambio del par de base GC, en comparación con los demás compuestos probados, determinando que la eficiencia mutagénica puede ser afectada por los sistemas de reparación y en algunos casos por la dosis estudiada. Así mismo,

se comprobó que las principales lesiones mutagénicas producidas por compuestos N-nitroso son la metilación del O₆ de la guanina y la metilación 7 de la guanina (19, 43).

Fuentes de exposición Humana a los compuestos N-nitroso

Los compuestos N-nitroso se han detectado en diferentes fuentes a las cuales el hombre está expuesto. Los alimentos, bebidas, medicamentos y pesticidas son las principales fuentes de aporte de compuestos nitrogenados que pueden ser nitrosados. Siendo particularmente los alimentos una fuente importante y probablemente la más conocida de precursores de compuestos N-nitroso. Entre los alimentos en donde estos se han encontrado con mayor frecuencia están los embutidos, algunos quesos, leche descremada en polvo, pescado ahumado, cerveza, whisky y algunas bebidas alcohólicas del este de Africa. Así por ejemplo en pescados se han detectado aminas volátiles, mientras que en el jamón se ha encontrado N-propilamina e isopropilamina en carnes, así mismo la creatinina presente en pescados y jamón asado ha sido identificada como un precursor de la metilurea. Por otro lado, las poliaminas identificadas en cereales como avena, maíz y arroz, se - -

constituyen como precursores de los compuestos N-nitroso (37, 44).

Los productos preservados son una fuente importante de nitrosaminas y de sus precursores, ya que durante su manufactura son tratados con nitrato de sodio. En algunos lugares de Europa se añade nitrato en los quesos para prevenir el crecimiento de especies de Clostridios (19). También se han detectado compuestos N-nitroso en algunos de los aditivos y saborizantes de alimentos como la salsa de soya y la pimienta blanca y negra (48, 57). En los alimentos al estilo oeste se han detectado nitrosaminas volátiles, aunque en cantidades poco detectables ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$) - en tanto que en los alimentos fermentados como el youghurt, pan y queso presentan niveles inferiores a $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ de compuestos N-nitroso (23, 40).

Si bien los alimentos y bebidas representan la forma de exposición más importante y más frecuente a nitrosaminas y nitrosamidas para la población en general, la exposición ocupacional aunque restringida a una parte de ella también es considerable, debido a las altas concentraciones que se pueden alcanzar en el ambiente de traba-

jo, como en el caso de la industria del hule, en donde se manipula la N-nitroso-N-nifenilamina como retardante de la vulcanización, detectando a su vez en este mismo ambiente la presencia de nitrosodifenilamina, nitrosodimetilamina y nitroso morfolina (5). Otra fuente importante de exposición a precursores de los compuestos N-nitroso - lo constituyen los pesticidas, entre los que se encuentran compuestos nitrosables que dan lugar a la formación de nitrosamidas como en el caso - de las N-alquilureas y del bisdialquiltiocarbamildisulfato (43).

Sin embargo, en la actualidad se considera que - la principal fuente de exposición del ser humano a compuestos N-nitroso potencialmente carcinogénicos es la formación de los mismos dentro del - organismo, al reaccionar nitritos y aminas que - se ingieren junto con las bebidas, alimentos y - medicamentos (6, 7, 32). La reducción de nitratos y nitritos por bacterias orales o gástricas mediante la reacción con los substituyentes nitrogenados del jugo gástrico, puede ocurrir principalmente para la formación *in situ* de los compuestos N-nitroso. El principio es que dependiendo de la concentración relativa del agente reductor, nitrito y oxígeno, la inhibición o ca-

tálisis de la nitrosación puede ocurrir (27).

La prueba de excreción urinaria de N-nitrosoprolina en humanos voluntarios para cuantificar la exposición endógena a los compuestos N-nitroso, mostró que en sujetos de alto riesgo, de cáncer de estómago, esófago, cavidad oral y vejiga urinaria, el índice de nitrosación endógena es mayor que en sujetos de menor riesgo (9). Así mismo, se han reconocido otras vías no gástricas de nitrosación endógena, incluyendo aquellas catalizadas por bacterias. Así por ejemplo, la contribución de esas vías de nitrosación endógena con respecto a la nitrosoprolina, es de aproximadamente 20 mol/día, teniendo en cuenta que para que se lleve a cabo la nitrosación endógena, se requieren condiciones especiales de pH, así como la presencia simultánea de ambos precursores en la cavidad gástrica (7, 9, 28). Así mismo, se consideran importantes las concentraciones de NO_3^- que se ingieren diariamente, ya que se ha encontrado que dentro de una población rural se pueden alcanzar niveles de 37 mg a 47 mg por día (40),

El tabaquismo, es posiblemente el factor etiológico del cáncer en el humano que más se ha estu-

diado, habiéndose demostrado que las nitrosaminas propias del tabaco pueden formarse en la saliva de personas con hábito de mascar tabaco y rapé en un área central de Rusia (60). Así mismo, se ha reportado que con el incremento de nitrito en el tabaco, desde 0.5% hasta 1.0% entre 1960 y 1980, se ha incrementado el potencial carcinogénico del mismo, debido a la formación de derivados N-nitroso de la nicotina y de la nornicotina (21).

MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA DAÑOS PRODUCIDOS POR COMPUESTOS N-NITROSO

Inhibición de las Reacciones de Nitrosación

La formación de los compuestos N-nitroso puede ser inhibida por diferentes compuestos naturales que se encuentran distribuidos en las plantas, como la cafeína, ácido cafeico, alfa-tocoferoles (vitamina E) y ácido ascórbido (vitamina C). Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la inhibición de las reacciones de nitrosación -- *in vivo* parece estar influenciada por diferentes factores como el pH, solubilidad de los compuestos y la rapidez de absorción de cada uno de ellos, así como la presencia simultánea de ambos precursores en el estómago (7). Existen eviden-

cias de que la vitamina C es capaz de alargar el período de inducción del cáncer, así como de reducir la gravedad de los tumores en animales de laboratorio. Paralelamente se han reportado datos que asocian la carencia de vitamina C a una frecuencia mayor de cáncer de estómago, esófago, laringe, boca, y cerviz (9, 36, 42). No obstante, el empleo de la vitamina C debe tomarse con mucha reserva, ya que se ha demostrado que como resultado de esas reacciones de inhibición es capaz de inducir rompimientos en la cadena del ADN (53).

Sistemas Celulares de Reparación de Daños al ADN

Como ya se mencionó, existen numerosos agentes químicos naturales o derivados de las actividades del hombre, así como los peróxidos y radicales libres derivados de las reacciones metabólicas normales del organismo que inducen cambios en el ADN. Sin embargo el daño producido al ADN por cualquiera de estos, no es necesariamente traducido en mutación o muerte celular, ya que la célula cuenta con diferentes mecanismos de reparación, los cuales responden a diferentes modelos de activación. Así tenemos que los mecanismos de reparación *in situ* por fotoreactivación,

sólo se llevan a cabo en presencia de luz, así - como el mecanismo de la respuesta adaptativa a - algunos compuestos químicos, especialmente del - tipo metilantes como el metil-mettrano-sulfonato, debido a la inducción de las metilasas específicas (31, 52, 25). Otros sistemas de reparación de daños al ADN, en los cuales intervienen numerosas enzimas han sido posiblemente más estudiados, destacándose entre estos los sistemas de re^{re}paración post-replicación, por escisión de bases libre de error, y el sistema SOS propenso a error (25). El sistema de reparación por escisión ha sido también descrito en los seres humanos , notándose su ausencia en los pacientes con Xeroderma Pigmentoso (52). Siendo esta la razón por la cual se valora el riesgo de exposición a mutágenos, en base a la capacidad de los compuestos -- químicos de producir mutaciones que no puedan -- ser corregidas por este sistema de reparación -- (39). El sistema de reparación SOS propenso a - error tiene una gran importancia para el estudio de mutagénos químicos, ya que su presencia ha fa^{fa}cilitado la detección de los mismos (1, 41).

Sistema de Reparación por Escisión

Por la forma de operar del sistema de reparación

por escisión, se ha descrito como de "Corte y Enlace", y la secuencia de acontecimientos del mismo fue probada directamente por Pettijhon y Hanawalt en 1965. La reparación por escisión resultó ser uno de los sistemas fundamentales en la corrección de daños al ADN, no solo en bacterias sino también en células de mamífero (incluyendo al hombre), pues además de eliminar dímeros de pirimidinas actúa sobre todo tipo de lesiones al ADN (24,52). En este proceso intervienen tres enzimas especiales, determinadas por los genes *uvrA*, *uvrB*, y *uvrC*, estando relacionados los productos génicos de los dos primeros, con la actividad de reconocimiento de la lesión y corte endonucleolítico de la incisión de los dímeros, mientras que los correspondientes al gen *uvrC* están probablemente implicados en el proceso de corte o escisión. La forma en que este proceso se lleva a cabo es en primer lugar con el reconocimiento del daño por la proteína *uvrA*, seguido de un corte endonucleolítico por la enzima *uvrB*. A continuación, la proteína *uvrC* realiza una incisión en el extremo 5' de la región dañada. En presencia de la proteína *uvrC* entra en acción la polimerasa, la cual tiene una doble actividad, en primer lugar actúa como exonucleasa, liberando específicamente los dímeros en dirección - -

5'-3' y en segundo lugar actua añadiendo al extremo-OH 3' nuevas bases, empleando como molde la cadena complementaria, que no ha sido dañada. Finalmente una ligasa enlaza los extremos 3' de las bases recién añadidas con el extremo 5' libre de la cadena reparada (24, 52).

Sistema SOS

El sistema de reparación SOS ha sido frecuentemente referido como "reparación propenso a error", "reparación SOS" o "proceso SOS". La existencia de este sistema SOS fue deducida principalmente a partir de experimentos fisiológicos y genéticos, los cuales indicaron que las funciones celulares tuvieron que ser inducidas por algún daño al ADN. Esto requiere del funcionamiento de al menos tres genes, *umuD*, *umuC*, *recA*, los cuales son inducibles y están regulados como parte del sistema del operón *lexA* (59).

En una célula en crecimiento que no ha sufrido daño alguno, los genes estructurales del operón SOS se encuentran casi totalmente reprimidos por la proteína **LexA**, encontrándose sin embargo niveles basales de los genes *uvr* que se expresan solo en forma constitutiva, para que la célula pueda llevar a cabo esporádicas reparaciones por --

escisión. Cuando ésta se expone a una dosis significativa de radiación ultravioleta, los dímeros de pirimidina que no pueden ser reparados con las enzimas presentes en el estado no inducido de la célula, originan la formación de huecos post-replicativos. Así los niveles constitutivos de la proteína *recA* que en aquel momento haya en la célula se unen al ADN unicitenario que queda frente a los huecos, al ADN dañado estimula la actividad proteasa de *recA* y se induce la respuesta SOS. La proteína *recA* destruye a los represores de LexA, eliminando la represión del gen *recA* y a otros genes regulados en el mismo operon, sintetizándose grandes cantidades de *recA* que se unen al ADN unicitenario todavía libre y posteriormente a regiones contiguas. En estas condiciones la proteína LexA se destruye en cuanto se sintetiza y los genes estructurales regulados por *recA* y LexA permanecen activados mientras haya ADN unicitenario en la célula para estimular la actividad proteasa. Cuando la proteína LexA recién sintetizada no se destruye y puede cumplir su función represora, entonces la célula vuelve al estado no inducido (24). No obstante dentro de este sistema SOS, la polimerasa introduce bases en forma errónea eliminando las lesiones de tipo letal, pero se introducen -

mutaciones, que cambian la estructura original. La respuesta SOS estimula de manera más amplia la reparación del ADN, ya que aumenta la disponibilidad de enzimas para la reparación por escisión y abre la vía de la reparación post-replicación dependiente del buen funcionamiento del gen *recA* (24).

SISTEMA DE CEPAS DE *Salmonella typhimurium* DE AMES

La determinación de la mutagenicidad de diversos productos, para identificar situaciones peligrosas para el ser humano y desarrollar medidas de control o prevención de riesgos es muy importante. De ahí que las pruebas de mutagénesis de corta duración son una excelente opción, ya que además de rápidas, son generalmente sensibles y de bajo costo. En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de pruebas con capacidad para detectar diversos daños al ADN, que van desde la detección de mutaciones puntuales, hasta daños cromosómicos en cultivo de linfocitos de mamíferos (10). Entre las pruebas de corta duración, los sistemas bacterianos han sido los más empleados, especialmente la prueba desarrollada por el Dr. Ames (1), para detectar el efecto mutagénico

de sustancias químicas, mediante el uso de diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* que pueden ser revertidas a su fenotipo original por la acción de un gran número de compuestos mutagénicos y carcinogénicos que actúan por diferentes mecanismos. Esta prueba se basa en el uso de diversos grupos de cepas bacterianas construidas a partir de la cepa silvestre *Salmonella typhimurium* LT2, entre las cuales se encuentran la TA1537 -- (*hisC3076, rfa uvrB*), TA1538 (*hisC3052, rfa uvrB*), y la cepa *hisD20018*, las cuales son revertidas al fenotipo original solo por compuestos capaces de inducir mutaciones por corrimiento de formato. Otro grupo de cepas son aquellas que solo pueden ser revertidas por mutágenos que actúan a un nivel de substitución de bases en el par G/C, como es el caso de las cepas *hisG46*, como la TA1535 - (*hisG46 rfa, uvrB*), y las cepas *hisG48* que son capaces de detectar compuestos que actúan por -- transiciones AT__TA (20). Posteriormente, este sistema fué mejorado mediante la introducción -- del plásmido pKm101 que contiene los genes *umuB* - y *umuC* que promueven el mecanismo de reparación propenso a error, con lo cuál se amplió el espectro de mutágenos químicos que pueden ser monitoreados con esta prueba (1). Así por ejemplo, a partir de las cepas TA1537 y TA1538, se crearon

las cepas TA97 y TA98 respectivamente, para detectar compuestos intercalantes que produzcan corrimientos de formato. Igualmente al introducir este plásmido en la cepa TA1535, se obtuvo la cepa TA100 dándole mayor sensibilidad para detectar algunos compuestos capaces de inducir mutaciones por substitución de bases (38).

En general, las cepas del sistema de Ames empleadas con mayor frecuencia son la TA1535, TA1537, TA1538, TA97, TA98 y la TA100, las cuales presentan una delección en el gen *u₇₉a* del minuto 79 de su cromosoma bacteriano, confiriendoles la falta de una proteína en la pared celular, haciendolas más sensibles al paso de diferentes compuestos químicos, como es el caso de algunos colorantes tales como el cristal violeta (38, 51).

Así mismo la mutación *uvrB* ya mencionada, es debida a una delección del minuto 18 del cromosoma bacteriano, que involucra a los genes *galC*, *Bio*, *uvrB* y *Chl*, esta mutación les confiere un fenotipo auxótrofo para biotina y ha sido útil para facilitar el monitoreo de compuestos químicos capaces de reaccionar con el ADN, sin que interfieran los sistemas celulares de reparación. Sin embargo, debido a la gran importancia de estos sistemas en la capacidad de un compuesto de producir

mutaciones heredables, se cuenta en el sistema -
de Ames con cepas similares carentes de esta de-
lesión, como son las cepas TA1975 (*hisG46, Δrfa*),
UHT8413 (*hisD3052, Δrfa*) y UHT8414 (*hisG46, Δrfa,*
pKm101) entre otras (1, 20, 38, 39, 41).

O B J E T I V O S

GENERAL

Dar un aporte al conocimiento de la magnitud de daños producidos por cuatro compuestos N-nitroso (nitrosamidas; MNNG, NMU, ENNG y PNNG) con actividad mutagénica, en base a su capacidad de producir daños que no puedan ser corregidos, empleando cepas de *Salmonella typhimurium* con diferente capacidad de reparación.

PARTICULARES

- Estandarizar la técnica del sistema de cepas - *Salmonella typhimurium* en el laboratorio.
- Conocer cual de estas nitrosamidas pueden producir mutaciones que no puedan ser reparadas.
- Establecer los rangos de dosis en los cuales - el daño producido por estos compuestos puede - ser reparado.
- Conocer la capacidad de las nitrosamidas para

- .. producir daños al ADN que puedan ser letales y estudiar si estos mismos pueden ser corregidos por el sistema de reparación SOS propenso a -- error.

- Valorar cual de estos compuestos podría representar un riesgo mayor de exposición, en base a su capacidad de producir mutaciones que no puedan ser corregidas.

MATERIAL Y METODO

CEPAS BACTERIANAS

Se utilizaron cultivos de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA1535 (*hisG46*, Δrfa^+ , *uvrB*⁻), TA100 (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁻, pKm101), TA1975 - - (*hisG46*, Δrfa^+ , *uvrB*⁺), donadas por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California, Berkeley CA.947020. B.C. 43, USA, como de la cepa - - UHT8414 (*hisG46*, Δrfa^+ , *uvrB*⁺, pKm101), donada por el Dr. J. Espinosa Aguirre del Departamento de biología del desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

REACTIVOS

El Dimetil Sulfóxido (DMSO) fué adquirido de J.T. BAKER (No.Cat. 9224). Los compuestos N-nitroso - (nitrosamidas): N-metil-N-nitroso-N-nitrosoguanidina (No.Cat. M-7629), N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (No.Cat. E-4130), N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (No. Cat. P7028), N-nitro-N-metilurea (No.Cat. N-0132), fueron adquiridos de SIGMA. Las sales inorgánicas fueron: Sulfato de

Magnesio ($\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$) No.Cat 6362, ácido cítrico. H_2O No.Cat. 0522, obtenidas de p.q. MONTERREY, Fosfato de Potasio (K_2HPO_4 anhidro) No.Cat. 3252 y Fosfato de Sodio y Amonio ($\text{NaNH}_4 \text{HPO}_4 - 4\text{H}_2\text{O}$) No.Cat. 3690, la Dextrosa anhidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) No. Cat. 0840, y el Cloruro de Sodio (NaCl) No. Cat. 2490, fueron adquiridos de p.q. MONTERREY. Los aminoácidos fueron: D-Biotina No.Cat. B-4501 adquirida de SIGMA y L-Histidina No.Cat. 4351 -- adquirida de MERCK. El Cloruro de Potasio (KCl) No.Cat. 1500 fue adquirido de TECNICA QUIMICA, - el Cloruro de Magnesio (MgCl) No.Cat. 192 fué adquirido de p.q. CTR.

MEDIOS DE CULTIVO

El agar Bacteriológico No.Cat. 1 50-1 y la Infusión Cerebro Corazón (BHI) No.Cat. 112-1 fueron adquiridos de BIOXON, El caldo nutritivo OXOID - No. 2 recomendando por Maron y Ames (1983), fue substituido por caldo nutritivo BIOXON No.Cat. - 103-1. Los medios de cultivo se describen en el anexo.

VERIFICACION DE MARCADORES GENETICOS Y DETERMINACION DE LA REVERSION ESPONTANEA

Se estandarizó la metodología de los marcadores genéticos para el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames.

Requerimiento de Histidina

Se sembró por medio de estrías una alícuota del cultivo de 16 horas sobre cajas petri conteniendo previamente medio mínimo de Vogel-Boner*. Se hizo lo mismo sobre medio mínimo Vogel-Boner complementario con un exceso de histidina-biotina -- (0.5 mM)*. Se dejó incubado 24 horas a 37°C. Solamente debe haber crecimiento en las cajas de medio mínimo complementadas con histidina-biotina (15, 38).

Sensibilidad al Cristal Violeta

Para verificar el marcador *rfa* (modificación de la pared celular) se determinó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta*, inoculando 0.1ml. del cultivo de 16 horas ($1-2 \times 10^9$ células/ml) en cajas de petri con medio BHI (Infusión Cerebro Corazón)*, se dejó solidificar y se colocó un disco de papel filtro estéril (0.5 cm. de

*VER ANEXO

diámetro) en el centro de la caja y con una micropipeta se agregó sobre el disco 10 μ l de una solución de cristal violeta (1 mg/ml)*. Las cajas se incubaron invertidas durante 24 horas a 37°C. Una zona clara de inhibición alrededor -- del disco indica la presencia de la mutación - - ufa (15, 38).

Presencia de Plásmido pKm101

Para verificar la presencia del plásmido pKm101 (confiere la resistencia a la ampicilina), se -- determinó la resistencia de las cepas TA100 y - UHT8414 a la ampicilina*, inoculando 0.1ml del cultivo de 16 horas ($1-2 \times 10^9$ células/ml) en ca-- jax de petri con medio BHI*, se dejó solidifi-- car y se colocó un disco de papel filtro esté-- ril (0.5 cm de diámetro) en el centro de la ca-- ja, y con una micropipeta se agregó sobre el -- disco 10 μ l, de una solución de ampicilina (8mg/ ml en NaOH 0.02N)*. Las cajas se incubaron in-- vertidas durante 24 horas a 37°C. Una zona cla-- ra de inhibición indica la ausencia del plásmi-- do pKm101 (15, 38).

*VER ANEXO

Sensibilidad a la Luz Ultravioleta

Para verificar la presencia de la mutación *uvrB* (afección del sistema de reparación por escisión) se determinó la sensibilidad de las cepas a la luz ultravioleta; colocándolas en cajas petri con medio BHI* por medio de estrías una alicuota de los cultivos de 16 horas ($1-2 \times 10^9$ células/ml). Se tapó la mitad de las cajas con papel aluminio y se irradió con una lámpara germicida de luz - UV. de 15 W., a una distancia de 33-35 cm., por 6 segundos para las cepas que no contienen el - plásmido y 8 segundos para las cepas que si lo contienen. Las cajas se incubaron invertidas de 18-24 horas a 37°C. Las cepas que contienen el marcador *UvrB*, solo crecen en la mitad de la caja que no fue irradiada y las que no lo tienen - crecen en toda la caja (38).

Frecuencia de la Reversión Espontánea

En un tubo de ensayo con tapón de rosca, que contenía 2 ml de agar suave mínimo complementado -- con histidina-biotina (0.5 mM)*. a 45°C; se agregó 0.1 ml. del cultivo bacteriano de 16 horas -- ($1-2 \times 10^9$ células/ml), se agitó suavemente en - un agitador Vortex (Fisher, Genie. No.Cat. 12 - 812) y se distribuyó uniformemente en cajas con

*VER ANEXO

medio mínimo de Vogel-Boner*, se dejó solidificar y después se incubó a 37°C durante 48 horas con las cajas invertidas, contando las colonias revertantes que resultaron (15, 38).

OBTENCION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Las cepas bacterianas (excepto la UHT8414) se obtuvieron directamente del Dr. Bruce N. Amex: Biochemistry Department University of California Berkeley, 94720 BC 43, USA, las cuales llegaron en discos de papel filtro impregnados con los -- cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsas de plástico con agar suave para evitar su desecación. Se colocaron los discos con pinzas estériles en 5 ml. de caldo nutritivo (BIOXON Mex.) y se incubaron aproximadamente de 18 a 24 horas. a 37°C con agitación a 120 rpm. Los cultivos así obtenidos se sometieron a las pruebas anteriormente descritas para verificar la presencia de los marcadores genéticos, así como la evaluación de la frecuencia de reversión espontánea (15, -- 38). Preparándose cultivos de reserva descritos a continuación.

*VER ANEXO

Cultivos de Reserva a Largo Plazo

Los cultivos de reserva de éste tipo se prepararon a partir de 0.9 ml del cultivo bacteriano de 16 horas ($1-2 \times 10^9$ células/ml), agregando 0.10ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO), en viales estériles (NUNC) con tapón de rosca y se congelaron rápidamente sobre hielo seco, para mantenerlos posteriormente almacenados a -70°C . en un ultracongelador (VWR Scientific Company. Mod. No. A 8514 -- C-O-S) (15, 38).

Cultivos de Reserva a Corto Plazo

Para evitar congelar y descongelar los cultivos de reserva (a largo plazo), se prepararon cultivos de reserva secundarios (a corto plazo), los cuales se almacenaron a 4°C . hasta por 1 ó 2 meses. Para ésto, se tomó con una pipeta de vidrio estéril una muestra del cultivo de reserva (manteniéndolo en hielo seco), y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo BIOXON* incubando en baño maría con agitación a 120 rpm. (American Scientific Products DT-23), durante 18 horas a 37°C ., de este cultivo se sembraron alícuotas por medio de estrías en cajas de petri con medio mínimo de Vogel-Boner complementado con un exceso de histidina-biotina (0.1M)*, se incubaron du

*VER ANEXO

rante 24 horas a 37°C., con las cajas invertidas y se almacenaron a 4°C. Por seguridad se comprobaron nuevamente los marcadores genéticos y la reversión espontánea. Para las cepas que contienen el plásmido se agregó también ampicilina*, a la caja durando solamente de 1 a 2 meses (15, 38).

SOLUCIONES DE MUTAGENOS

Todos los compuestos se disolvieron con Dimetil Sulfóxido (DMSO) y las soluciones se prepararon en tubos con tapón de rosca estériles, conservándolas a -20°C., antes de ser usadas. A partir de los cuales se realizaron las diluciones correspondientes con DMSO, colocándolas en tubos ependor estériles.

ENSAYO DE MUTAGENESIS

Este ensayo se realiza utilizando controles positivos y negativos; sin embargo en este trabajo se omitieron los controles positivos ya que se sabe que los compuestos con los que se trabajó (notrosamidas) son mutagénicos para las cepas de *Salmonella typhimurium* hisG46 (33, 54, 29).

Los cultivos utilizados para esta prueba, se pre

*VER ANEXO.

pararon tomando con una asa de platino estéril - una muestra de las cajas de reserva a corto plazo y se sembró en un matraz de 150 ml conteniendo 20 ml de caldo nutritivo (BIOXON)*. Se incubaron a 37°C., durante 16 horas en baño maría -- con agitación (American Scientific Products BT-23) a 120 rpm, hasta una densidad aproximada de $1-2 \times 10^9$ células/ml, a partir de este cultivo se realizó el ensayo de mutagénesis. En un tubo de tapón de rosca que contenía 2 ml de agar suave* precalentado a 45°C, se añadió rápidamente 0.1ml del cultivo de 16 horas más 0.01 ml de la solución del compuesto a probar mientras que el control negativo contenía 0.1ml del cultivo de 16 - horas más 0.01ml del solvente empleado (DMSO). El contenido se agitó con ayuda de un vortex - - (Fisher, Genie 2 No.12-812) distribuyéndose perfectamente sobre cajas petri con medio mínimo de Vogel-Boner*, de manera que se forme una capa homogénea. Las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se incubaron invertidas a -- 37°C, durante 48 horas. Contándose las revertantes obtenidas con la ayuda de un cuenta colonias (Fisher Mod. 133-8002) (15, 38).

* VER ANEXO

ENSAYO DE SOBREVIDA

Los cultivos utilizados en este ensayo se obtuvieron de la misma forma que para el ensayo de mutagénesis. A partir del cultivo de 16 horas ($1-2 \times 10^9$ células/ml), se realizaron diluciones en solución salina- isotónica estéril*, hasta obtener alrededor de 3×10^3 bacterias por mililitro. En un tubo de tapón de rosca con 2 ml de agar nutritivo suave* precalentado a 45°C , se añadió rápidamente 0,1 ml más 0,01 ml del compuesto a probar. El control negativo contiene lo mismo, sustituyéndose el compuesto a probar por el solvente empleado (DMSO), el contenido se agitó con ayuda de un vortez y se distribuyó perfectamente sobre agar BHI* contenido en cajas petri. Dejándose solidificar a temperatura ambiente y se incubaron invertidas durante 24 horas a 37°C , se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc) resultantes, con un cuenta colonias (15).

ENSAYO CON DMSO

En este trabajo se utilizó como solvente el Dimetil Sulfóxido (DMSO), por ser uno de los más empleados en pruebas con el sistema de *Salmonella*

*VER ANEXO

typhimurium de Ames (38). Para determinar la cantidad de solvente que se va a agregar en los controles negativos de los experimentos así como el volumen mínimo necesario para disolver los compuestos problema sin que este resulte ser mutagénico o tóxico para las cepas, se realizaron ensayos tanto de mutagénesis como de sobrevivencia según lo descrito anteriormente.

ESTUDIOS DE REPARACION

Con el fin de conocer el efecto del sistema de reparación por escisión sobre la acción de los compuestos N-nitroso (nitrosamidas); se utilizó el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* -- Uvr⁺/Uvr⁻, inoculando las cepas durante 16 horas a 37°C, en baño maría con agitación a 120 rpm. Con este cultivo se procedió a trabajar simultáneamente el ensayo de mutagénesis y el de sobrevivencia con las nitrosamidas a probar.

Así mismo para conocer el efecto del sistema de reparación propenso a error SOS, sobre la acción de las nitrosamidas, se utilizó el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* con y sin la presencia del plásmido pKm101. Realizando los mismos procedimientos que en el caso anterior.

* VER ANEXO

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Mutagénesis

Se consideró que hubo un efecto mutagénico positivo, cuando al adicionar el compuesto N-nitroso (nitrosamidas) se incrementó cuando menos al doble el número de revertantes espontáneas, y que al incrementar la dosis del compuesto se observe una curva dosis respuesta.

Toxicidad

Se consideró que hubo un efecto tóxico, cuando al adicionarle el compuesto N-nitroso (nitrosamidas) se disminuyo a casi la mitad del número de unidades formadoras de colonias (ufc/ml).

ANALISIS DE RESULTADOS

Se realizaron varios experimentos hasta contar con tres reproducibles para cada caso, introduciendo tres placas en cada uno de los puntos, como se recomienda en Maron y Ames (1983), mostrándose un ensayo representativo para cada compuesto probado. Para comparar los efectos de los sistemas de reparación, se realizaron estudios -

en paralelo de las cepas uvr^- y uvr^+ , deficiente y eficiente en el sistema de reparación por escisión, tanto con el plásmido pKm101, como sin él. Los resultados obtenidos se graficaron empleando el programa Harvard Graphics 3.0.

R E S U L T A D O S

MARCADORES GENETICOS Y ESTANDARIZACION DEL METODO DE AMES

En la tabla no. 1, se muestran los resultados -- correspondientes a los marcadores genéticos de - cada una de las cepas empleadas en este trabajo (TA1535, TA1975, TA100 y UHT8414). Enmarcando - la presencia del plásmido pKm101 y de las muta- ciones r^+ y $uvrB$, en las cepas como positivo (+) y negativo (-) en el caso de la ausencia de los mismos. Observándose que las cuatro cepas se en- contraban en condiciones adecuadas para poder -- trabajar los compuestos problema, según lo repor- tado por Maro y Ames 1983. Así mismo se presen- ta la reversión espontánea (R.E) de cada una, ob- tenida a partir de la cepas enviadas de Berkeley CA.

En la tabla No. 2 se muestran los resultados ob- tenidos con respecto al uso del Dimetil Sulfóxi- do (DMSO) como solvente para los diferentes com- puestos N-nitroso, empleando a la cepa TA100 tan- to en el estudio de inducción de revertantes - -

His⁺, como en la prueba de toxicidad. Obteniendo que a las dosis probadas del solvente no se observa un efecto mutagénico ni tampoco un efecto tóxico.

T A B L A N o. 1

MARCADORES GENETICOS Y REVERSION ESPONTANEA

CEPA	<i>rfa</i>	PLASMIDO	<i>uvr</i>	R.E
TA1535	+	-	+	17.0
TA1975	+	-	-	8.0
TA100	+	+	+	156.0
UHT8414	+	+	-	10.0

+ Presencia del marcador.

- Ausencia del marcador.

R.E Reversión espontánea obtenida del promedio de tres placas.

TABLA No.1. Marcadores genéticos y reversión espontánea de cuatro cepas de *Salmonella typhimurium* Uvr +/-, con y sin la presencia del plásmido.

T A B L A No. 2

ENSAYO CON "DMSO"

CEPA	DMSO	R.E	UFC 10 ⁶ /ml	SOBREVIDA %
100.1	10.1			
TA100	0.0	146.3	37.5	100.0
TA100	10.0	198.3	41.5	110.6
TA100	20.0	234.3	43.5	116.0
TA100	40.0	193.6	37.0	98.6

DMSO. Dimetil Sulfóxido (CH₃)₂SO.

UFC. Unidades formadoras de colonias.

R.E Reversión espontánea (\bar{x} de 3 placas)

% Porcentage de sobrevida con respecto al control negativo.

TABLA No.2. Ensayo de mutagénesis y sobrevida con el solvente Dimetil Sulfóxido, en la cepa TA100 del sistema de cepas de *S. typhimurium*.

MUTAGENESIS Y REPARACION

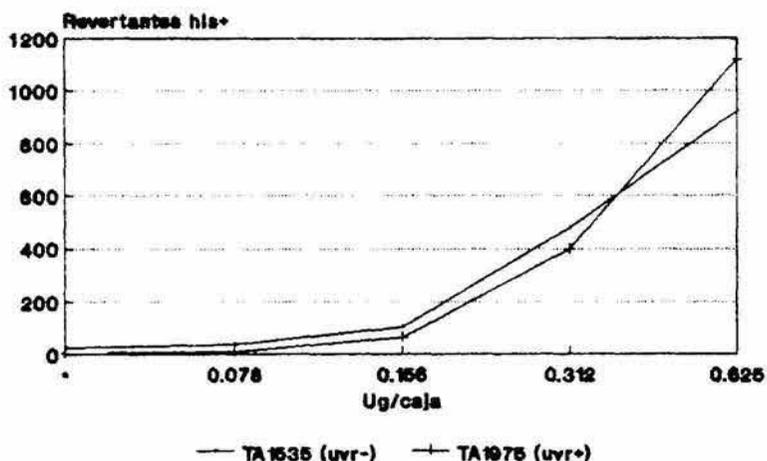
Influencia del Sistema de Reparación por Escisión en Mutaciones Inducidas con Nitrosamidas

En las gráficas de la 1 a la 4 se presentan las respuestas de las cuatro nitrosamidas probadas: MNNG, NMU, ENNG y PNNG respectivamente en cepas de *Salmonella typhimurium* (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁻ e *hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁺). Los resultados mostrados fueron trabajados por triplicado, obtenidos de un ensayo representativo y reproducible.

GRAFICA No.1

EFFECTO MUTAGENICO DE MNNG EN CEPAS DE

Salmonella typhimurium uvr+/-



•Control negativo (DMSO.P.M.78.13)

R.E: TA1535:23.8 TA1975:6.33

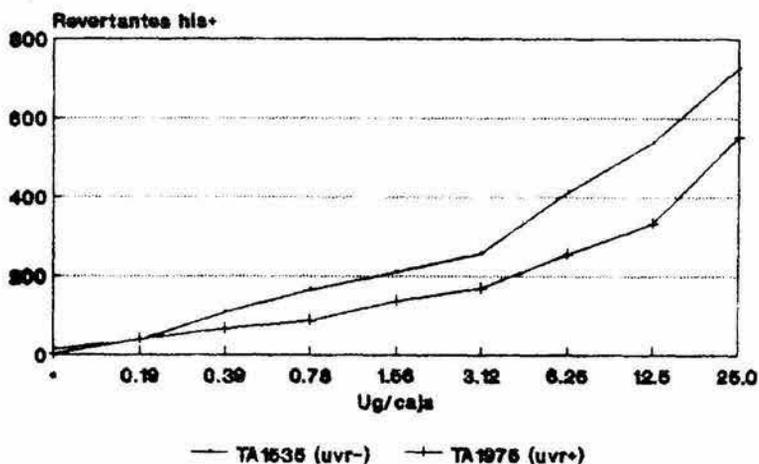
MNNG N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.1. Se muestran los resultados obtenidos con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). Observándose que el compuesto fué mutagénico para ambas cepas: TA1535 uvrB⁻ y TA1975 uvrB⁺, a partir de la dosis de 0.156 μ g/caja. Así mismo se puede observar el inicio de un comportamiento dosis-respuesta.

GRAFICA No.2

EFEECTO MUTAGENICO DE MNU EN CEPAS DE

Salmonella typhimurium uvr+/-



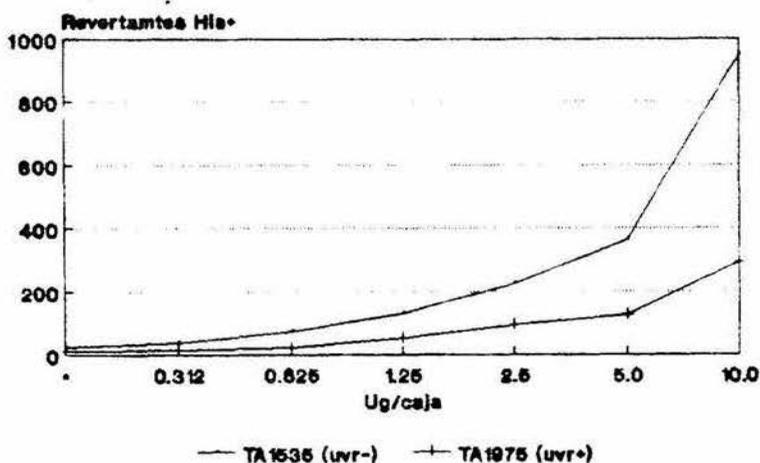
• Control negativo (DMSO. P.M.78.13)
 R.E. TA1535: 15.5 TA1975:15.6
 NMU Nitroso-N-metilurea

GRAFICA No.2. Se muestran los resultados obtenidos con la N-nitro-N-metilurea (NMU). Observandose que este compuesto es mutagénico para ambas cepas: -- TA1535 uvrB⁻ y TA1975 uvrB⁺, a la dosis de 0.19 μ g /caja. Apartir de la cual se observa una tendencia de comportamiento dosis-respuesta.

GRAFICA No.3

EFEECTO MUTAGENICO DE ENNG EN CEPAS DE

Salmonella typhimurium uvr+/-

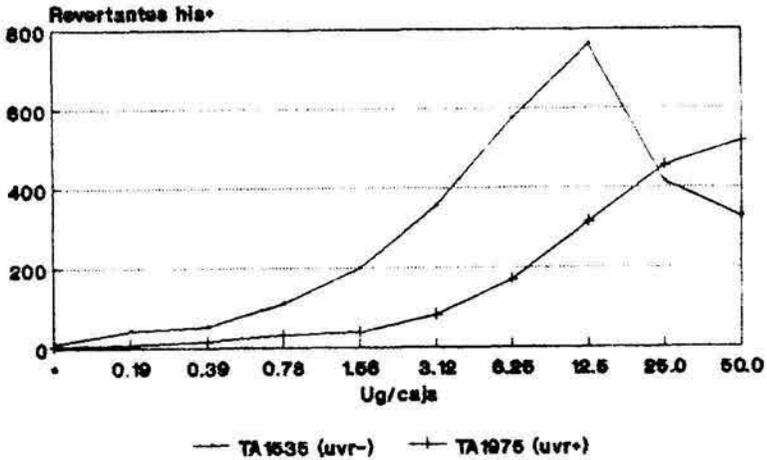


• Control negativo (DM80. P.M.78.13)
 R.E. TA1535: 15.5 TA1975: 15.6
 ENNG N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.3. Se muestran los resultados obtenidos con N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG). Observándose que este compuesto fué mutagenico para la cepa TA1535 uvrB⁻ a partir de la dosis de 0.625 μ g/caja, mientras que para la cepa TA1975 uvrB⁺ fué mutagenico a partir de la dosis de 1.25 μ g/caja. Obteniendo un comportamiento dosis-respuesta a partir de la dosis mutagénica correspondiente a cada cepa.

GRAFICA No.4

EFFECTO MUTAGENICO DE PNNG EN CEPAS DE
Salmonella typhimurium uvr+/-



• Control negativo (DM80.P.M.78.13)
R.E. TA1535: 11.6 TA1975: 4.7
PNNG N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

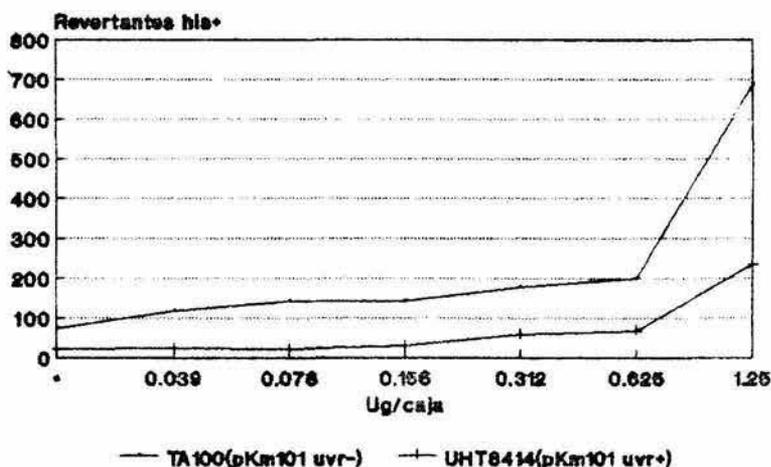
GRAFICA No.4. Se muestran los resultados obtenidos con N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (PNNG). Teniendo que para la cepa TA1535 uvrB⁻ el compuesto - fué mutagénico a partir de la dosis de 0.19 μ g/caja, mientras que para la cepa TA1975 uvrB⁺ lo fué a la - dosis de 0.78 μ g/caja. Observándose un comportamiento dosis-respuesta para cada una de las cepas.

Influencia del Sistema de Reparación Propenso a Error "SOS" en Mutaciones Inducidas con Nitrosamidas

En las gráficas de la 5 a la 8 se representan -- las respuestas de las cuatro nitrosamidas probadas: MNNG, NMU, ENNG y PNNNG respectivamente, en cepas de *Salmonella typhimurium* (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁻, pKm101 e *hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁺, pKm101). Los resultados mostrados fueron trabajados por triplicado, obtenidos de un ensayo representativo reproducible.

GRAFICA No. 5

EFECTO MUTAGENICO DE MNNG EN CEPAS DE
Salmonella typhimurium pKm101 uvr+/-

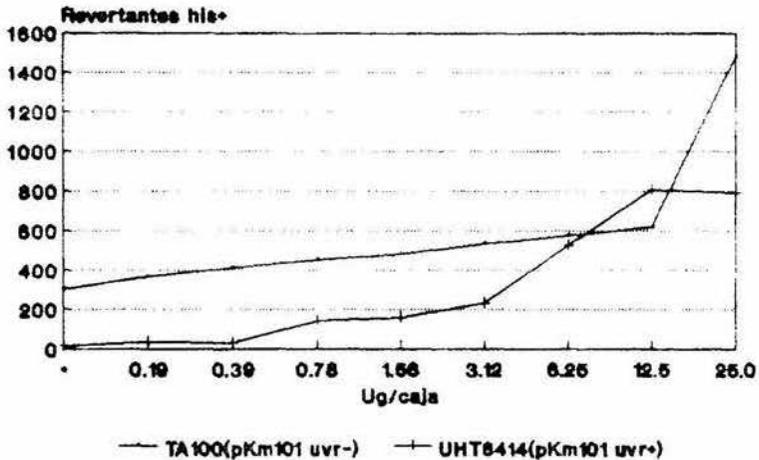


• Control negativo (DMSO. P.M.78.13)
R.E. TA100: 97.0 UHT8414: 24.0
MNNG N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.5. Se muestran los resultados correspondientes a la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina - (MNNG). Observándose que el compuesto fué mutagénico para ambas cepas: TA100 uvrB⁻ y UHT8414 uvrB⁺, a partir de la dosis de 0.312 μ g/caja.

GRAFICA No. 6

EFFECTO MUTAGENICO DE NMU EN CEPAS DE
Salmonella typhimurium pKm101 uvr⁺6-

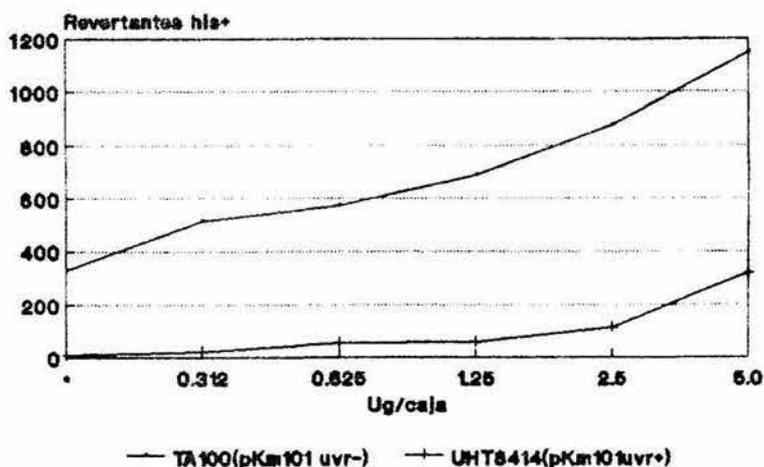


• Control negativo (DMSO.P.M.78.13)
R.E. TA100: 279.3 UHT8414: 14.2
NMU Nitroso-N-metilurea

GRAFICA No.6. Se muestran los resultados obtenidos con N-nitroso-N-metilurea (NMU). Observándose que el compuesto fué mutagenico para ambas cepas, pero a diferentes dosis. Para la cepa TA100 uvr⁻ fué positivo a la dosis de 6.25 μ g/caja, mientras que para la cepa UHT8414 uvr⁺ fué positivo a la dosis de 0.78 μ g/caja.

GRAFICA No.7

EFEECTO MUTAGENICO DE ENNG EN CEPAS DE
Salmonella typhimurium pKm101 uvr+/-

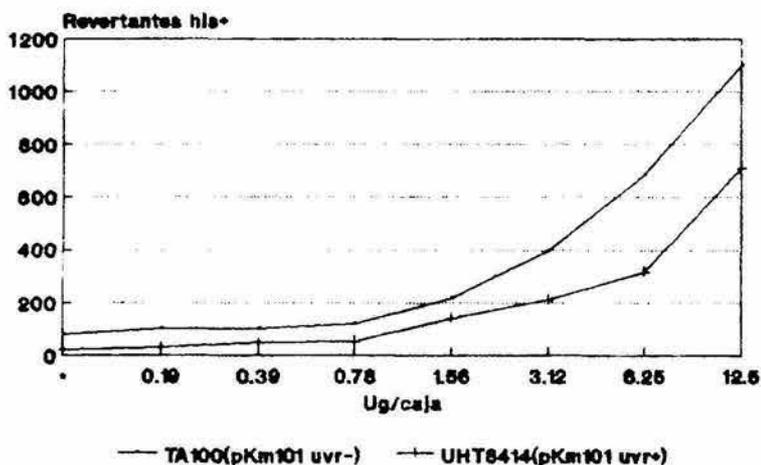


• Control negativo (DMSO.P.M.78.13)
R.E. TA100: 2213 UHT8414: 10.3
ENNG N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.7. Se muestran los resultados obtenidos para la N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG). - Observandose que para ambas cepas: TA100 uvrB⁻ y -- UHT8414 uvrB⁺, el compuesto fué mutagénico a la dosis de 1.25 μ g/caja.

GRAFICA No. 8

EFECTO MUTAGENICO DE PNNG EN CEPAS DE
Salmonella typhimurium pKm101 uvr+/-



• Control negativo (DMSO.P.M.78.13)
R.E. TA100: 79.3 UHT8414: 17.33
PNNG N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.8. Se presentan los resultados obtenidos con N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (PNNG). Observándose que el compuesto fué mutagénico para ambas cepas: TA100 uvrB⁻ y UHT8414 uvrB⁺, a la dosis de 0.78 μ g/caja.

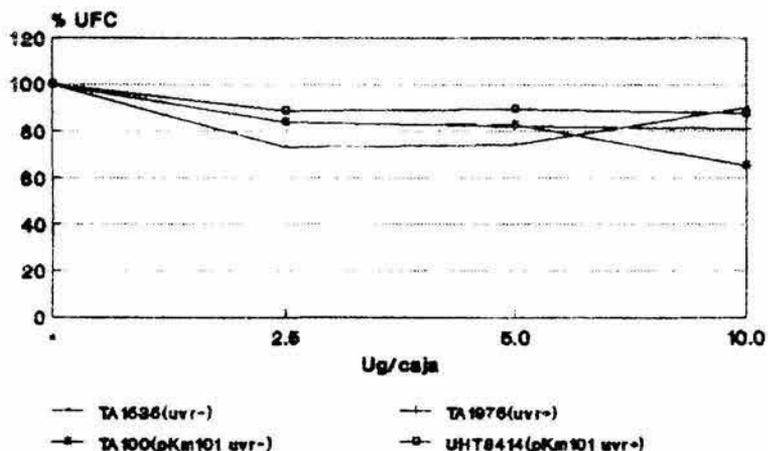
EFFECTO TOXICO DE COMPUESTOS N-NITROSO (NITROSAMIDAS) EN CEPAS DE *Salmonella typhimurium*

El efecto tóxico de cuatro compuestos N-nitroso (nitrosamidas: MNNG, NMU, ENNG Y PNNG), fue valorado mediante el uso de los dos sistemas de cepas de *Salmonella typhimurium* $uvrB^+$ / $uvrB^-$ con y sin la presencia del plásmido pKm101, mencionados anteriormente.

En las siguientes cuatro gráficas se muestran -- los resultados obtenidos, para cada uno de los -- compuestos probados. Utilizando la técnica de -- incorporación en placa (sobrevida), en la cual -- cada dilución del compuesto fue probada por triplificado. Se grafican los resultados de un experimento y reproducible.

GRAFICA No. 9

CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium*
EN PRESENCIA DE MNNG

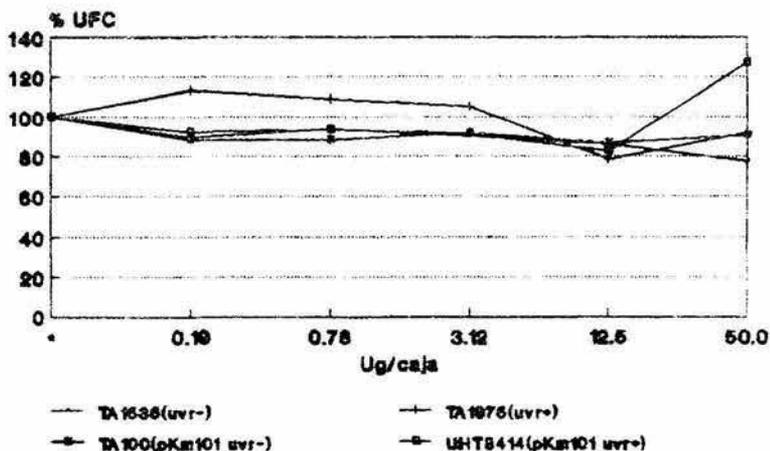


• Control negativo (DMSO.P.M.78.13)
UFC: Unidades formadoras de colonias
MNNG N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.9. Se muestran los resultados obtenidos con la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). Observándose que a las dosis estudiadas, este compuesto no produce un efecto tóxico que disminuya el crecimiento de alguna de las cuatro cepas utilizadas.

GRAFICA No. 10

CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium*
EN PRESENCIA DE NMU

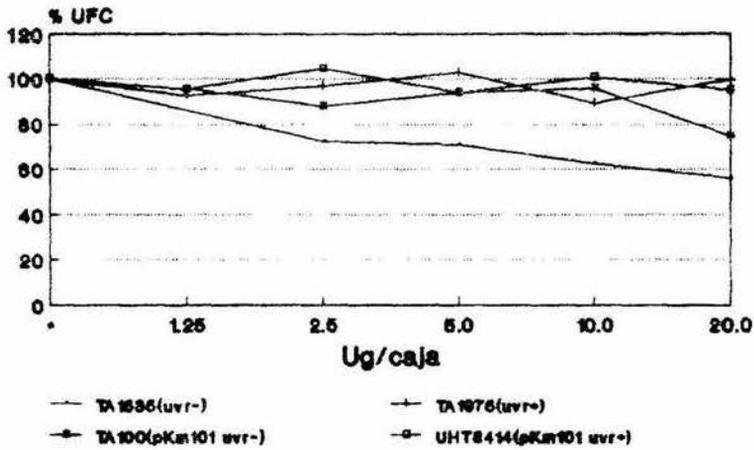


• Control negativo (DMSO.P.M.78.13)
UFC: Unidades formadoras de colonias
NMU Nitroso-N-metilurea

GRAFICA No.10. Se muestran los resultados obtenidos con N-nitro-N-metilurea (NMU). Observándose nuevamente que el compuesto no resulto ser tóxico para ninguna de las cuatro cepas utilizadas, a las dosis empleadas.

GRAFICA No. 11

CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium*
EN PRESENCIA DE PNNG

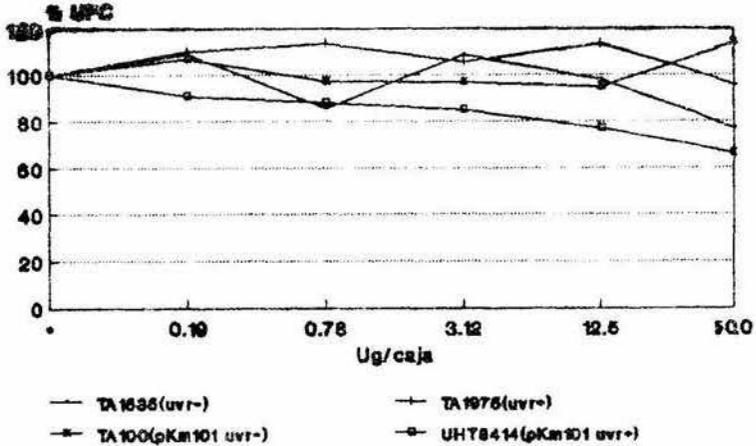


• Control negativo (DM80.P.M.76.13)
UFC: Unidades formadoras de colonias
ENNG N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.11. Se muestran los resultados obtenidos con la N-etil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG). Observándose que el compuesto fué toxico para la cepa TA1535 uvrB⁻, en una forma directamente proporcional a la concentración, no observándose dicho efecto en las cepas restantes uvrB⁺ y pKm101.

GRAFICA No. 12

CRECIMIENTO DE *Salmonella typhimurium*
EN PRESENCIA DE PNNG



• Control negativo (DM80.P.M.78.13)
UFC: Unidades formadoras de colonias
PNNG N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

GRAFICA No.12. Se muestran los resultados obtenidos con N-propil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (PNNG), en el crecimiento de las cuatro cepas empleadas, observándose que este compuesto no resultó ser tóxico para ninguna de las cepas a las dosis empleadas.

DOSIS MÍNIMA MUTAGÉNICA

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente se determinó la dosis mínima mutagénica, para cada una de las nitrosamidas probadas, en base a la cantidad de manomoles necesaria para incrementar al doble la Reversión Espontánea de cada cepa. En la tabla No. 3, se observan los resultados obtenidos mediante la utilización de cuatro cepas de *Salmonella typhimurium* $uvrB^+$ / -- $uvrB^-$ con y sin la presencia del plásmido pKm101. Observándose que en las cepas carentes del plásmido se presentan las dosis mínimas mutagénicas más bajas con respecto a las cepas que contienen el marcador.

TABLA No.3

DOSIS MINIMA MUTAGENICA DE CADA NITROSAMIDA

COMPUESTO	CEPAS			
NITROSAMIDAS	TA1535	TA1975	TA100	UHT8414
NOMBRE	nM/caja			
MNNG	1.060	1.060	2.121	2.121
NMU	1.843	1.843	60.620	7.565
ENNG	3.879	7.759	7.759	7.759
PNNG	1.084	4.452	4.452	4.452

PESO MOLECULAR. MNNG:147.1, NMU:103.1, ENNG:161.1,

PNNG:175.2

GENOTIPOS: TA1535 (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁻)

TA100 (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁻, pKm101)

TA1975 (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁺)

UHT8414 (*hisG46*, Δrfa , *uvrB*⁺, pKm101)

TABLA No.3. Dosis minima mutagénica encontrada para cada una de las nitrosamidas probadas para el sistema - de cepas de *Salmonella typhimurium* *uvr*⁺/*uvr*⁻ con y sin la presencia del plásmido pKm101.

D I S C U S I O N

CONTROL DEL SISTEMA

Como se mencionó anteriormente este trabajo fue realizado en un laboratorio de microbiología de nueva creación. Siendo evidente la necesidad de establecer un patrón propio en cuanto al manejo adecuado del sistema de cepas de *Salmonella typhimurium*, debido a que las condiciones ambientales y de trabajo, varían de un lugar a otro. Por otro lado se han encontrado que pueden existir variaciones intralaboratorios con respecto a los resultados obtenidos con mutágenos de acción directa (11). En este caso se trató de apegar lo más posible a los patrones establecidos por Maron y Ames (1983) y Espinosa Aguirre (1980).

Marcadores Genéticos

El manejo y verificación de los marcadores genéticos de cada una de las cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames, que se utilizaron para probar los diferentes compuestos, es de suma importancia para obtener resultados confiables, compa

rables a los reportados en la Literatura Científica.

Las pruebas para corroborar la presencia de los -- marcadores genéticos, fueron realizadas al obtener las cepas del Dr. Bruce N. Ames. Determinando que las cepas llegaran en buen estado para -- trabajar inmediatamente, posteriormente y durante la realización del trabajo fue confirmado el genotipo de cada una de las cepas, especialmente en los casos en que la reversión espontánea se - saliera del patrón normal y/o cuando se perdía - la sensibilidad de la prueba.

La valoración de la presencia de la mutación λ/a en las cepas mutantes, las cuales presentan la - falta de polisacáridos en la membrana celular externa, facilitando el acceso de los compuestos, - mediante la inhibición de crecimiento con respecto a los compuestos con moléculas de gran tamaño, como lo es el cristal violeta utilizando en esta prueba (38), fue importante para la realización del trabajo, ya que si bien éste no está enfocado hacia la capacidad penetrante de los compuestos probados (nitrosamidas), había que asegurar su introducción en las bacterias.

Así mismo se confirmó la presencia del plásmido pKm107 en las cepas TA100 y UHT8414, el cuál les confiere resistencia a la ampicilina, además de que se ha visto que incrementa tanto la sensibilidad para detectar mutágenos como su resistencia al daño producido por la luz UV. (38, 41), - mediante la falta de inhibición del crecimiento de las bacterias en presencia de ampicilina. Por otra parte se observó que después de cinco semanas de almacenamiento de los cultivos de reserva secundaria, no se logró detectar la presencia -- del plásmido, asumiendo que las cepas correspondientes lo habían perdido a causa de la inestabilidad del plásmido, coincidiendo éste período -- con el establecido de 1 a 2 meses para éste tipo de cepas en otros trabajos (38).

En cuanto a la determinación de la mutación *uvrB* presente en las cepas TA1535 y TA100, ocasionada por la delección del minuto 18 del cromosoma bacteriano, que origina la pérdida de la capacidad para efectuar la reparación por escisión de los daños producidos al ADN (38, 51), se realizó con menor frecuencia debido a que es una de las más estables dentro del sistema de *Salmonella* - - *typhimurium*, no obstante hay que enfatizar la importancia que tiene el marcador para la realiza-

ción de este trabajo con respecto a la reparación de daños.

Reversión Espontánea

La reversión espontánea está determinada por el número de revertantes his⁺ por placa y cada cepa tienen su frecuencia característica (38). En este caso la reversión espontánea de cada una de las cepas fué valorada rutinariamente, como parte de los experimentos de mutagénesis, con lo cual cada experimento contó con su patrón de comparación, para la determinación de un resultado positivo, además de ser constituir un control del buen estado de las cepas. De tal forma que en el laboratorio de microbiología del Hospital Juárez de México, el número de revertantes fluctúa alrededor de los siguientes valores: TA1535: 17.0, TA1975: 8.0, TA100: 156.0 y UHT8414: 10.0. Debe hacerse notar que la substitución del caldo nutritivo Oxoid No. 2 recomendado por Maron y Ames (1983) por caldo nutritivo BIOXON (México), no alteró la prueba de Ames en este laboratorio, por lo que se presenta este medio como una alternativa adecuada para laboratorios cuyos reglamentos dificulten la importación de reactivos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de control de calidad, queda asumido el buen manejo del sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames en el laboratorio del Hospital Juárez de México apoyando así los resultados obtenidos con respecto a la finalidad de este -- trabajo.

ESTANDARIZACION DEL USO DEL DMSO EN LA PRUEBA DE AMES

En la actualidad se conocen una gran cantidad de solventes para los diferentes compuestos, siendo el Dimetil Sulfóxido el solvente mejor conocido dentro del sistema de *Salmonella typhimurium*, para compuestos no solubles en agua (38). De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de mutagénesis y sobrevida (ver tabla -- no. 2), se determinó utilizar la cantidad de -- 10 μ l de DMSO como control negativo en los ensayos además de utilizarlo como solvente para los compuestos. Confirmando así la disponibilidad -- del Dimetil Sulfóxido como solvente dentro del -- sistema de cepas de *Salmonella*.

ACTIVIDAD MUTAGENICA

En este trabajo se han presentado evidencias de

que las cuatro nitrosamidas probadas (MNNG, NMU, ENNG y PNNG) inducen mutaciones dentro del sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames. En este caso también se tomó en cuenta que un resultado positivo puede ser confirmado al demostrar una curva dosis-respuesta utilizando rangos estrechos de concentración, sin embargo ocasionalmente se encuentran respuestas de tipo no lineal, como es el caso de la MNNG, aunque un incremento de revertantes His⁺ en forma directamente proporcional a la dosis se considera como un efecto mutagénico (38). No obstante se ha reportado también que en la prueba de *Salmonella typhimurium*, la mayoría de los mutágenos probados a dosis bajas, presentan una relación lineal en las curvas dosis-respuesta (56), siendo este último comportamiento comparable con lo obtenido para los compuestos probados en este trabajo.

Una gran cantidad de compuestos N-nitroso dentro de los cuales se encuentran las nitrosamidas, -- han sido probados en diversos sistemas para determinar su capacidad mutagénica y en algunos casos su capacidad carcinogénica (33, 3, 22, 54, 29, 43). En estos estudios se ha demostrado que la nitrosamidas son especialmente mutagénicas en cepas de *Salmonella typhimurium*, hisG46, sin ob-

servarse un incremento considerable de la respuesta mutagénica de las nitrosamidas al ser biotransformadas. De ahí que en este trabajo, sólo se empleó la técnica de incorporación en tubo -- descrita por Maron y Ames (1983). Permitiendo -- realizar una comparación de la respuesta mutagénica entre las cepas $uvrB^-$ usadas en otros reportes de la literatura y las cepas $uvrB^+$ estudiadas en este trabajo.

Por otra parte, la recolección de datos generados ha mostrado una alta correlación entre la mutagenicidad y carcinogenicidad de más de trescientos compuestos químicos. Con lo cual se enfatiza la importancia de haber obtenido respuestas mutagénicas por parte de las cuatro nitrosamidas probadas a dosis bajas.

EFFECTO DEL SISTEMA DE REPARACION POR ESCISION SOBRE MUTACIONES INDUCIDAS POR COMPUESTOS N-NITROSO (NITROSAMIDAS)

En este trabajo se probaron dosis bajas de los compuestos, para ver hasta que grado los compuestos (nitrosamidas) dejan de ser potencialmente mutagénicos, tomando como base las concentraciones utilizadas por Lijinsky y Andrews (1979), --

quienes trabajaron con respecto a la potencia -- mutagénica de algunos compuestos N-nitroso entre los cuales incluyeron a algunos de los que se -- han empleado en este trabajo, empleando cepas -- hisG46 uvrB⁻ únicamente.

Los resultados evidencian que tanto la MNNG como la NMU, son mutagénicas para las cepas de *Salmonella typhimurium* hisG46, tanto uvrB⁺, como - - uvrB⁻, ya que en ambos casos el sistema de reparación por escisión presente en la cepa TA1975 - (uvrB⁺), no tuvo efecto sobre la acción de los - dos compuestos. Observándose que la MNNG mani-- festó una mayor capacidad mutagénica que la NMU, ya que esta última requiere de una dosis mayor - para ser mutagénica que la MNNG. No obstante am-- bos compuestos pueden considerarse como mutáge-- nos potentes. Por otro lado, en el caso de la - ENNG y de la PNNG, indujeron mutaciones en la ce-- pa de *Salmonella typhimurium* hisG46 TA1535 Uvr⁻ que pueden ser corregidas cuando el sistema de - reparación funciona adecuadamente como en el ca-- so de la cepa *Salmonella typhimurium* TA1975 - - hisG46 uvrB⁺. Observándose que en el caso de la ENNG se requiere de una dosis dos veces mayor pa-- ra inducir mutaciones en esta última cepa. Así - mismo, para la PNNG se requiere de una dosis cua

tro veces mayor para inducir mutaciones en la ce -
pa TA1975 uvr⁺. Esta situación nos manifiesta -
que sólo las metilaciones del ADN no son corregi -
das por el sistema de reparación por escisión.
Por otra parte se sabe que los agentes alquilan -
tes inducen lesiones al ADN que son corregidas -
por mecanismos específicos de reparación para es -
tos agentes y uno de ellos puede ser por la libe -
ración de grupos alquilo de bases alquiladas (es -
pecialmente la O⁶-metilguanidina) por parte de -
las metilasas, los cuales permanecen hasta la re -
plicación del ADN (26, 31). Los datos de esos -
estudios coinciden con los reportados por Gutten -
plan en 1990, en donde se muestra que la metila -
ción de bases es una lesión con mayor potencia -
mutagénica.

Por consiguiente en este trabajo se presentan --
evidencias de que el buen funcionamiento del sis -
tema de reparación por escisión, constituye un -
mecanismo de defensa que presenta la célula para
poder redicir el daño causado por la actividad -
mutagénica de algunos compuestos N-nitroso. Así
mismo se determina que el daño reparado por la -
bacteria en forma dependiente de la dosis, po -
dría representar un riesgo menor para la salud -
que aquellos cuyo daño aún a dosis bajas no pue -

de ser corregido por el sistema de reparación -- por escisión libre de error (39). En base a esto determinamos que los compuestos metilantes -- constituyen un grupo de mayor riesgo para la salud. Teniendo en cuenta que se ha discutido que la capacidad de un compuesto para ser carcinogénico esta muy relacionada con la capacidad de un organismo para reparar el daño al ADN producido por dicho compuesto y que la reparación de las lesiones, constituye otro aspecto importante dentro del proceso de iniciación del cáncer (58, -- 10).

EFFECTO DEL SISTEMA DE REPARACION PROPENSO A ERROR "SOS" SOBRE MUTACIONES INDUCIDAS POR COMPUESTOS N-NITROSO (NITROSAMIDAS)

Para determinar el efecto del sistema de reparación SOS sobre las mutaciones inducidas por las nitrosamidas se emplearon dosis bajas, tomando como base las concentraciones utilizadas en la determinación del efecto del sistema de reparación por escisión,

Los resultados nos muestran que las cuatro nitrosamidas; MMNG, NMU, ENNG y PNNG inducen mutaciones en las cepas de *Salmonella typhimurium* hisG46,

tanto la $uvrB^+ pKm101$ como la $uvrB^- pKm101$, que no son corregidas, esta respuesta mutagénica de la MNNG y la NMU era de esperarse ya que estos compuestos metilantes indujeron daños no reparables en cepas $uvrB^+$, aún sin el plásmido ($pKm101$), -- mientras que la reparación de daños obtenida con el sistema $uvrB^+$ sin el plásmido $pKm101$ para los compuestos ENNG y PNNG, está siendo enmascarada por la presencia de errores introducidos por el plásmido. Por otro lado, se obtuvieron evidencias de que las nitrosamidas probadas originaron un efecto mutagénico en las cepas que contienen el plásmido a dosis que se encuentran por arriba de las obtenidas con las cepas carentes del mismo. Así se manifiestan dos situaciones importantes;

- 1) El sistema de reparación SOS propenso a error no proporciona un incremento de la sensibilidad en las cepas que lo contienen para la identificación de los compuestos N-nitroso (Nitrosamidas).
- 2) Así como origina un incremento en el número de revertantes his^+ en comparación con el número obtenido con las cepas carentes del plásmido, debido a la introducción de errores del sistema SOS (41).

Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores que han estudiado a los compuestos N-nitroso (61, 62, 32, 33).

Estos efectos del plásmido pKm101 han sido también investigados anteriormente en otros sistemas, en donde se ha determinado el gran impacto que tiene sobre la detección de mutaciones espontáneas, así como su habilidad para realzar la mutagénesis y sobrevivencia celular, seguida de la exposición del ADN al agente causal del daño (14).

VALORACION DE LA CAPACIDAD TOXICA DE LAS NITROSAMIDAS EN CEPAS DE *Salmonella typhimurium*

La mayoría de los compuestos presenta a altas dosis cierto grado de toxicidad, aunque no todos presentan este tipo de comportamiento. La mutagenicidad de un compuesto puede manifestarse a concentraciones por debajo de su nivel tóxico o muy cercano a él. Para estos últimos, que inhiben el crecimiento bacteriano impidiendo evaluar su acción mutagénica, se han desarrollado diversas estrategias para evitar resultados falsos negativos de tal forma que para seleccionar las concentraciones del compuesto problema se realizan las pruebas de toxicidad (15).

En este trabajo se realizaron pruebas de sobrevida (ver material y métodos) para determinar la - capacidad tóxica de las nitrosamidas probadas sobre el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames, utilizando las concentraciones determinadas para la prueba de mutagénesis, ya que en - este caso no se trató de encontrar o comprobar - la dosis más alta mutagénica.

Los resultados nos muestran evidencias de que a dosis bajas únicamente la ENNG presentó cierto - grado de toxicidad y sólo en la cepa TA1535 - - (uvr⁻), esta tendencia coincide con lo reportado por Lijinsky y Andrews (1979), quienes determinaron un efecto bactericida para la ENNG a 50 g, este efecto no se observa en la cepa TA100 (uvr⁻, pKm101) debido a que cuenta con el sistema de reparación SOS, el cual origina un incremento en - la sobrevivida. Por otra parte hay que tener en - cuenta que cuando el compuesto es debilmente mutagénico y fuertemente tóxico, es difícil hayar un rango de concentraciones en el cual la potencia mutagénica no esté enmascarada con la toxicidad (38), sin embargo en este caso no se cree -- que afecte los resultados obtenidos anteriormente, ya que el daño causado por la ENNG al ADN -- puede ser corregido, sólo en forma dependiente -

de la dosis. Así mismo, en este trabajo se está demostrando que en el rango de dosis en que hay corrección de daños en las cepas $uvrB^+$ los compuestos no fueron tóxicos para ninguna de las cuatro cepas estudiadas.

VALORACION DEL RIESGO DE EXPOSICION A NITROSAMIDAS

En la actualidad la difusión masiva de contaminantes (plaguicidas, desechos industriales, etc.) y el incremento en el consumo de otros productos como aditivos de alimentos, drogas terapéuticas, cosméticos, etc., pueden constituir un riesgo para la población en general por la exposición crónica, aún cuando no se alcancen niveles muy altos de esas sustancias (10). En este caso, como se puede ver en la tabla no. 3 se obtuvieron las dosis mínimas mutagénicas a concentraciones muy bajas, lo que nos indica que la exposición humana a los compuestos nitrosados, en este caso nitrosamidas (MNNG, NMU, ENNG y PNNG) podría ser un riesgo considerable, teniendo en cuenta los reportes de Matney y colaboradores (1985), en donde valoraron a los compuestos en base a su capacidad de producir mutaciones que no puedan ser debidamente corregidas por el sistema de repara-

ción por escisión, obteniendo que los compuestos metilantes (MNNG, NMU) pueden ser considerados + como de alto riesgo, mientras que los compuestos con radicales alquilo de mayor tamaño, pueden -- ser considerados de menor riesgo, al originar -- una respuesta dependiente de la dosis, como se observa en este estudio con la ENNG y la PNNG.

En base a lo anterior, se recomienda que en estudios posteriores se deben de tomar en cuenta a - los sistemas de reparación en la valoración del riesgo de exposición a agentes mutagénicos y carcinogénicos, ya que si bien el hombre por naturaleza esta expuesto a una gran cantidad de substancias peligrosas a través del tiempo, este ha podido superar dichos obstáculos y en gran medida a los sistemas de reparación presentes en sus células. Por otro lado se recomienda realizar - constantes pruebas de valoración de exposición a los compuestos N-nitroso, a aquéllas personas -- que tienen mayor contacto con ellos, ya sea por ingestión de los mismos o de sus precursores o - por contacto exterior en sus diferentes ambientes en donde se desenvuelven.

Los sistemas celulares de reparación y sobre todo el sistema uvrB libre de error, constituyen -

un factor determinante para poder evaluar los -
diversos riesgos de exposición a las nitrosami-
das en base a la dosis mínima mutagénica obteni-
da para cada compuesto y poder conocer en un mo-
mento dado si el daño provocado por algún agente
químico como lo son las nitrosamidas, puede ser
corregido. Se conocen diversas evidencias epi-
demiológicas que relacionan la exposición a ni-
tratos con algún cáncer en humanos, especialmen-
te cáncer gástrico, las cuales han sido basadas
en gran parte en estudios de correlación geográ-
fica. Sin embargo se discute sobre la insufi- -
ciencia de pruebas que apoyen una asociación di-
recta causa efecto entre la exposición a nitra--
tos y el riesgo de contraer cáncer, debido a que
la exposición de hombre a los compuestos N-nitro
so, no es a los compuestos individualmente, sino
con mezclas altamente complejas como lo es la co
mida o productos del tabaco, los cuales pueden -
contener varios compuestos N-nitroso. De lo an-
terior se enfatiza la necesidad de estimar el --
riesgo que representa la exposición a cada com--
puesto por medio de determinaciones cualitativas
(relación causa-efecto) y cuantitativas (rela- -
ción magnitud-respuesta). Sin embargo hay que -
tomar en cuenta que estas manifestaciones son di
fíciles de determinar en humanos por el período

de latencia entre la exposición al factor y la manifestación de el proceso maligno (10, 18).

Un proceso sensitivo que puede ser utilizado para cuantificar la exposición humana a compuestos endógenos N-nitroso, esta basada en la excreción urinaria de N-nitrosoprolina (NNP), como un índice de nitrosación endógena subsiguiente a la ingestión de precursores, los cuales al parecer estan modulados por precursores o inhibidores dietéticos (9, 28). Por otra parte, en diversos estudios la exposición a los compuestos N-nitroso ha sido inferida a partir de la presencia característica de aductos alquil, mediante el análisis de los mismos en el ADN de linfocitos periféricos, siendo esta una medida prometedora y accesible para cuantificar el daño por alquilación - (55).

C O N C L U S I O N E S

- Los cuatro compuestos N-nitroso (nitrosamidas): MNNG, NMU, ENNG y PNNG, son mutagénicos para el sistema de cepas de *Salmonella typhimurium* de Ames.
- Los compuestos N-nitroso metilantes inducen lesiones en el ADN que no son corregidas por el sistema de reparación por escisión UvrB.
- Los compuestos etilantes y propilante inducen lesiones en el ADN que son corregidos por el sistema de reparación por escisión UvrB, en una forma dependiente de la dosis.
- Se piensa que el incremento en el tamaño del radical alquilante origina un menor riesgo de daño para el humano.
- Estos resultados confirman reportes previos de que el plásmido pKm101 no incrementa el efecto mutagénico de los compuestos N-nitroso.

- La presencia del plásmido pKm101 en las cepas de *Salmonella typhimurium* no incrementa su sensibilidad para detectar compuestos N-nitroso, por lo que se recomienda utilizar el sistema uvrB+/- sin la presencia del plásmido.
- La ENNG produce un efecto tóxico en cepas de *Salmonella typhimurium* si no tienen un sistema eficiente de reparación.
- Se confirma que el sistema de reparación pro-penso a error SOS mejora la sobrevivencia celular, en presencia de compuestos tóxicos como la ENNG en forma más eficiente que el sistema de reparación por escisión libre de error.
- El riesgo de exposición a mutágenos está determinado por el buen funcionamiento de los sistemas de reparación presentes en las células.
- Se recomienda realizar estudios cotidianos en personas que se encuentren de una u otra forma más expuestas a estos compuestos.
- Así mismo se recomienda prestar más atención en cuanto a la producción de productos cuyas concentraciones de compuestos mutagénicos o carcinogénicos rebasen las dosis mínimas mutagénicas.

A N E X O

MEDIOS DE CULTIVO.

A) Caldo Nutritivo BIOXON.

Caldo nutritivo BIOXON	0.8 g
Agua destilada	100.0 ml

Los ingredientes se mezclan y se colocan en matraces de - 150 ml que se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez esterilizados, se almacenan a temperatura ambiente.

B) Infusión de Cerebro y Corazón.

BHI	3.7 g
Agua destilada	100.0 ml

Los ingredientes se mezclan y se colocan en matraces de - 150 ml que se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez esterilizados, se almacenan a temperatura ambiente.

C) Agar Suave.

Cloruro de Sodio	0.5 g
Agar Bacteriológico	0.6 g
Agua destilada	90.0 ml
Solución His-Bio (ver H)	10.0 ml

Los tres primeros ingredientes se mezclan y se colocan en un frasco con tapón de rosca que se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se deja enfriar y se almacena a 4°C. Cuando se utiliza, se funde y se le agrega la solución His-Bio y se mezclan.

D) Sales de Vogel-Boner. (50x)

Sulfato de Magnesio	10.0 g
Acido Cítrico.H ₂ O	100.0 g
Fosfato de Potasio Dibásico	500.0 g
Fosfato de Sodio y Amonio	175.0 g
Agua destilada	

En 600 ml de agua bidestilada se disuelven en este orden las sales y se afora a 1 lt, agregando posteriormente 1 ml de cloroformo para evitar la contaminación y se almacena a temperatura ambiente en obscuridad.

E) Medio Mínimo de Vogel-Bones.

1) Dextrosa	10.0 g
Agar Bacteriológico	7.5 g
Agua destilada	400.0 ml

2) Agua destilada	90.0 ml
Sales de Vogel-Boner	10.0 ml

Los ingredientes de las soluciones 1 y 2 se esterilizan - por separado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente se reunen las dos soluciones, se mezclan perfectamente y se distribuye en cajas petri esterilizadas - esterilizadas con calor seco a 180°C por 90 minutos.

f) Medio de Vogel-Boner complementado con Histidina y Biotina.

Solución estéril de Histidina 0.1 M - Biotina 0.5 mM
0.2 ml/ caja.

Cajas petri con medio mínimo de Vogel-Boner.

Se distribuye la solución sobre la superficie del medio - con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril. Se dejan secar y se almacenan las cajas a 4°C.

G) Solución Salina.

Cloruro de Potasio	61.5 g
Cloruro de Magnesio 0.4 M	40.7 g
Agua destilada	500.0 ml

Se mezclan los ingredientes en un matraz y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se almacena a - temperatura ambiente.

H) Solución Histidina 0.1 M/ Biotina 0.5 mM.

L-histidina 0.1 M	1.5516 g
D-biotina 0.5 mM	0.0122 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelven los aminoácidos en el agua y se coloca la solución en un frasco con tapón de rosca y se almacena en oscuridad a 4°C.

I) Solución Histidina 0.5 M/ Biotina 0.5 mM.

L-histidina 0.5 M	0.0077 g
D-biotina 0.5 mM	0.0122 g
Agua destilada	100.0 ml

Se disuelven los aminoácidos en el agua, se coloca la solución en un frasco con tapón de rosca y se almacena en oscuridad a 4°C.

J) Solución de Cristal Violeta,

Cristal violeta	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se mezclan los ingredientes y se coloca la solución en un frasco con tapón de rosca. Se almacena a 4°C en oscuridad.

K) Solución de Ampicilina,

Ampicilina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se mezclan los ingredientes y la solución se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ y se coloca en un frasco con tapón de rosca y se almacena a -4°C en oscuridad.

B I B L I O G R A F I A

1. Ames B.N., Lee F.D. y Durston W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 70 : 782-786.
2. Anderson L.M., Hagiwara A., Kovatch R.M., Rehm S. y Rice J.M. 1989. Transplacental initiation of liver, lung, neurogenic, and connective tissue tumors by - N-nitroso compounds in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12 (3) : 604-20.
3. Andrews A.W. y Lijinsky W. 1980. The mutagenicity of 45 nitrosaminas in *Salmonella typhimurium*. *Teratogene Carcinog. Mutagen.* 1 : 295-303.
4. Archer M.C. 1989. Mechanims of action of N-nitroso - compounds. *Cancer. Surv.* 8 (2) : 241-50.
5. Arriaga Alba M. 1988. Estudio de la actividad mutagénica en *Salmonella typhimurium* de compuestos N-nitroso, derivados de medicamentos antiparasitarios aminados. Tesis. UNAM. Facultad de Medicina. Div. de Est. de Posgrado.

6. Arriaga Alba M., Espinosa Aguirre J. y Cortinas de Nava C. 1988. Mutagenicity of products Generated by the Teaction between Several Antiparasitic Drugs and Nitrite. *Environ. Mol. Mutagen.* 12 : 65-73.
7. Arriaga Alba M., Espinosa Aguirre J., Ramirez J. y Cortinas de Nava C. 1989. Mutagenicity of urine from mice exposed orally to nitrate and various aminated antiparasitic drugs. *Environ. Mol. Mutagen.* 14 (1) - 13-19.
8. Bartsh H. y Montesano R. 1984. Relevancy of Nitrosamines to Human Cancer, *Carcinogenesis.* 5 (11)1381-93.
9. Bartsh H., Ohshima H., Pignatelli R. y Calmels S. 1989. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer, Surv.* 8 (2) : - 335-362.
10. Cortinas de Nava C, 1980. Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratógénesis. En Manual de Metodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, Vol.11 : 1-17.

11. Cheli C., DeFrancisco D., Petrullo L., McCoy E. y Rosenkranz H. 1980, The Salmonella mutagenicity assay: reproducibility. *Mutation. Resch.* 74 : 145-150.
12. Chow Y.L. 1973. Nitrosamin Photochemistry. *Acc. Chem. Res.* 6 : 324-360.
13. Devoret R. 1979. Test bacterianos de sustancias potencialmente carcinogénicas. *Investigación y Ciencia.* 36-37 : 6-16.
14. Eisenstadt E., Kelvin M.J., Kahng L. y Barnes W. - - 1989. Influence of *uvrB* and *pKm101* in the spectrum of spontaneous *uvr⁻* and *ray⁻* induced base substitutions that revert *hisG46* in *S. typhimurium*. *Mutation Res.* 210 : 113-125.
15. Espinosa Aguirre J. 1980. Metodo para la evaluación de mutaciones génicas en *Salmonella typhimurium*. En Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Vol.1 : 31-50.
16. Fielder W., Pensabene J., Doer R.C. y Wasserman A.E. 1972. Formation of *N*-nitroso dimethylamina from natural occurring quaternary amonium Compuns and terialy amines. *Nature.* (London), 236 : 307.

17. Fine H.D. 1982. Nitrosamines in the General Environment and Food. In Magee P.M. Nitrosamines and Human Cancer. Cold. Spring. Harbor Laboratory.: 199-207.
18. Foxman D. 1989. Are nitrites a significant risk factor in human cancer?. *Cancer. Surv.* 8 (2): 443-458.
19. Guttenplan J.B. 1990. Mutagenesis by N-nitroso compounds: Relationships to DNA adducts, DNA repair and mutational efficiencies. *Mutation. Res.* 233 (1-2) : 177-187.
20. Hartman Z., Hartman P.E., Barnes W.E. y Tuley E. - - 1984. Spontaneous Mutation Frequencies in *Salmonella* Enhancement of G/C to A/T Transversions and Depression of Detection and Frameshift Mutation Frequencies Afforded by Anoxic Incubation. *Environ. Mutagenesis.* 6 (5) : 633-655.
21. Hoffman D. y Adams J.P. 1981. Carcinogenic Tobacco - Specific N-nitrosamines in snuff and the saliva of - snuff dippers. *Cancer. Res.* 41 (11) : 4305-4308.
22. Horsfall M., Zeilmaker M., Mohn G. y Glickman B. 1989 Mutational specificities of environmental carcinogens in the *lacI* gen of *Escherichia coli*. II: A host mediated approach to N-nitroso-N, N-dimethylamine and endogenous mutagenesis in vivo. *Mol.Carcinog.* 2 (2) : 107-115.

23. Hotchkiss J.H. 1989. Preformed N-nitroso compounds - in foods and beverages. *Cancer. Surv.* 8 (2): 295-321.
24. Howard F.P. 1982. Reparación inducible del ADN. *Investigación y Ciencia.* 64 : 28-37.
25. Kimball R.F. 1987. The developmen of ideas about the affects of DNA repair on the induction of gene mutations and chromosomal aberrations by radiative ans - Chemicals. *Mutation. Res.* 186 : 1-27.
26. Kuroda Y. e Inove T. 1988. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation. Res.* 202 387-391.
27. Kyrtopoulos S.A. 1989. N-nitroso compounds formation in human gastric juice. *Cancer. Surv.* 8 (2) :423-42.
28. Leaf C.D., Wishnok J.S. y Tannenbaum S.R. 1989. Mechanims of endogenous nitrosation. *Cancer. Surv.* 8 - (2) : 323-334.
29. Lee J., Gold B. y Miryish S.S. 1977. Mutagenicity of 22 N-nitrosamidas and related compounds from *Salmone* *lla typhimurium* TA1535. *Mutation. Res.* 48: 131-138.

30. Leon J. 1988. Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Investigación y Ciencia*. - 146-147 : 28-35.
31. Lindhal. 1982. DNA Repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 51 : 61-87.
32. Lijinsky W. 1974. Reaction of drugs with Nitrous as a source Carcinogenic Nitrosamines. *Cancer. Res.* 34 225-258.
33. Lijinsky W. y Andrews A.W. 1979. The mutagenicity of nitrosamides in *Salmonella typhimurium*. *Mutation. - Res.* 68 : 1-8.
34. Lijinsky W., Conrad E. y Van de Bogart R. 1972. Carcinogenic Nitrosamines formed by drugs / Nitrite interactions. *Nature.* 239 : 165-167.
35. Lu SX. 1989. (Esophageal carcinoma in human fetus induced by N-methyl-N-benzyl nitrosamines NMBzA) *Chung. Hua. Chung. Liu. Tsa. Chih.* 11 (6) : 401-103.
36. Mackerness C.W., Leach S.A., Thompson M.H., Hill M.J. 1989. The inhibition of bacterially mediated N-nitrosation by vitamin C: relevance to the inhibition of endogenous N-nitrosation in the Chlorhydric stomach. *Carcinogenesis.* 10 (2) : 197-399.

37. Maja J.A. 1978. Amines in Foods. Crit.Rev. Food. Sci. Nutr. 10 : 373-403.
38. Maron D.M. y Ames B.N. 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation. Res. 113 : - 173-215.
39. Matney S.R., Nuguyen T.V., Connor T.H. y Danna W.J. 1985. Genotoxic classification of anticancer Drugs. Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 51 : 319-328.
40. Massey R. y Key P.E. 1989. Examination of some fermented foods for the presence of apparent total N-nitroso compounds. Food>Addit.Contam. 6 (4): 453-458.
41. Mc Cann J., Spingarn N., Kobori J. y Ames B. 1975. - Detection of carcinogens as mutagens; Bacterial tester strains with R factor plasmid. Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (2) : 979-983.
42. Mirvish S.S. 1986. Effects of Vitamin C and E on N-nitroso compounds formation, carcinogenesis and Cancer. Cancer. 58 : 1842-1850.
43. Mirvish S.S. 1975. Formation of N-nitroso compounds: Chemistry Kinetics and *in vivo* occurrence. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31 : 325-351.

44. Mirvish S.S. y Cairnes D.A. 1981. Identification of compound in a fish product yielding metylurea (MU) - on nitrosation dinitrosation, as creatinine (CRN). - Proc. Am. Assoc. Cancer. Res. 22 140, Abstract 555.
45. Moller H., Landt J., Jensen P., Pedersen E., Autrup H. y Jensen O.M. 1989. Nitrate exposure from drinking water and diet in a danish rural population. - Int. J. Epidemiol. 18 (1) : 206-12.
46. Mueller R.L. 1989. Das Problem Kanzarogener N-nitroso Verbindungen--30 Jahre alt. Off-Gesundheitswes. - 51 (41) : 182-185.
47. Negishi T., Shiotani T., Fujikawa K. y Hayatsu H. - 1991. The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster*. *in vivo*: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test. Mutation. Res. 252 : 119-128.
48. Osawa T., Ishibashi H., Namiki M., Yamanska N. y Namiki K. 1981. Formation of mutagens by Paper-Nitrite reaction. Mutation. Res. 91 : 291-295.
49. Preston-Martin S. 1989. Epidemiological studies of perinatal carcinogenesis. IARC. Sci. Publ. (96):289-314.

50. Preussman R. y Stuart B.W. 1984. N-nitroso carcinogens. In Searle C.E. chemical carcinogens. Monographs Washington, D.C. : 643-731.
51. Sanderson K.E. y Hurley J.A. 1988. Linkage Map of - *Salmonella typhimurium*. In Ingraham J.L., Brooks Low K., Magasanilk B., Schaechter M. y Umbarger H.E. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology A.S.M. Washington. D.C. 2 : - 877-918.
52. Sanchez M.E. y Jouye N. 1982. Genética. Ed. OMEGA. - S.A. Barcelona; 309-340.
53. Shamberger R.J. 1984. Genetic Toxicology of ascorbic acid. *Mutation. Res.* 133 : 361-69.
54. Shirai A., Umezawa K., Matsushima T. y Sugimura T. - 1980. Enhancemen of the mutagenicities of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine and N-methyl-N-nitroso-urea by glucosa. *Mutation. Res.* 72 : 75-77.
55. Shuker D. 1989. Detection of aducts Arising from human exposure to N-nitroso compounds. *Cancer. Surv.* 8 (2) : 475-87.

56. Stead A.G., Hossblad V., Creason J.P., y Claxton L., 1981. Modeling the Ames test, *Mutation, Res.* 85: - 13-27.
57. Sugimura T. y Sato. S. 1983. Mutagens-Carcinogens in food. *Cancer. Res.* (Suppl.43): 2451-221.
58. Trosko J.E. y Chang Ch/Ch. 1978. Relationship between mutagenesis and carsinogenesis. *Photochemistry and - Photobiology.* Vol. 28 : 157-168.
59. Walker G.C. 1987. The SOS response of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Celular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington D.C. 2 : 1346-1357.
60. Zardie D.G., Bletiner M., Trapeznikov V.N., Kuishinov J.P., Martiakin E.G., Puljakuy B.P., Parshikova S.M., Tottenberg V.I., Chamrakulou I.S., Hoajaeava M.C., - Stich H.F., Rosin M.P., Thurnham D.I., Hjoffman D. y Brunnemanm K.D. 1985. Survey of Oral and Oesophageal Cancer. *Int, J, Cancer,* 36 : 153-158.
61. Zeiger E. y Sheldon A.T. 1978a. The mutagenicity of heterocyclic N-nitrosamines for *Salmonella typhimurium*. *Mutation.Res.* 57 (1) : 1-7.

62. Zeiger E. y Sheldon A.T. 1978b. The mutagenicity of N-nitrosopiperidine for *Salmonella typhimurium*. Muta
tion. Res. 57 : 85-89.