UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO PARA LA DETECCION DEL PODER MUTAGENICO DE MEBENDAZOL, DIYODOHIDROXIQUINOLINA, VIOFORMO, PIRANTEL Y NICLOSAMIDA EN CEPAS MUTANTES DE S. typhimurium.

45

DEPTO DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

LAURA GARCIA RIVERA
ANA MARIA ZAPATA PLASCENCIA
EVARISTO MARTINEZ ROMERO
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO, D. F. 1981

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER

V O C A L : HECTOR JESUS JARA FARJEAT

SECRETARIO: RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

1er.SUPLENTE: SALVADOR MARTIN SOSA

2do.SUPLENTE: JOSE LUIS IBARMEA AVILA

EL TEMA SE DESARROLLO EN: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

NOMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: Laura García R.

LAURA GARCIA RIVERA

NOMBRE Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER

V O C A L : HECTOR JESUS JARA FARJEAT

SECRETARIO: RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

1er.SUPLENTE: SALVADOR MARTIN SOSA

2do.SUPLENTE: JOSE LUIS IBARMEA AVILA

EL TEMA SE DESARROLLO EN: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

NOMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

ANA MARIA ZAPATA PLASCENCIA

NOMBRE Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

URADO ASIGNADO

PRESIDENTE: JUAN JOSE MANDOKI WEITZNER

V O C A L : HECTOR JESUS JARA FARJEAT

SECRETARIO: RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

1er.SUPLENTE: SALVADOR MARTIN SOSA

2do.SUPLENTE: JOSE LUIS IBARMEA AVILA

L TEMA SE DESARROLLO EN: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

OMBRE Y FIRMA DEL SUSTENTANTE: Martínez Romero Evaristo

EVARISTO MARTINEZ ROMERO

OMBRE Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA: _____

RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR

A NUESTROS PADRES.

AL QFB. RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR.

A JAVIER ESPINOSA AGUIRRE.
POR SU VALIOSA AYUDA

Este trabajo se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Cristina Cortinas de Nava, formando parte del proyecto de Investigación PCSANAL 79024 subencionado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

I N D I C E

página

Objetivo 1

Introducción..... 2

Generalidades..... 6

a) Descripción prueba de Ames..... 6

b) Fundamentación para la selección de -- los compuestos en estudio..... 9

c) Algunos aspectos farmacológicos y Farmacocinéticos generales y de los com-- puestos en estudio..... 11

Materiales..... 37

Métodos..... 44

Resultados y Discusión..... 54

I.- Determinación del contenido en proteínas y actividad metabolica de los homogenados hepáticos..... 54

II.-Determinación de la actividad mutagénica de medicamentos antiparasitarios 63

Conclusiones 80

Apendice..... 81

Bibliografía..... 89

O B J E T I V O.

Detectar el posible efecto mutagénico en el sistema bacteriano de Salmonella typhimurium/ microsomas hepáticos (Método de -- AMES), de los siguientes compuestos: Diyodohidroxiquinolina, Mebendazol, Niclosamida, Pamoato de Pirantel y Vioformo.

En aquéllos compuestos que muestren mutagenicidad, se determinará la actividad mutagénica en orina de ratones tratados previamente con dichos compuestos.

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

En los últimos años se ha manifestado en el mundo una in -- quietud cada vez mayor por el peligro que representa para la humanidad la producción de mutaciones génicas y aberraciones cromo sómicas causadas por medicamentos y por otros productos químicos.

Aunque no se conoce la proporción de casos de mutagénesis por- medicamentos, las siguientes observaciones hacen temer que el -- problema planteado sea grave:

a) Se ha observado que muchas sustancias causan mutaciones génicas en diversos organismos de prueba.

b) Se han observado aberraciones cromosómicas mayores que- las normales en productos de abortos espontáneos y en - recién nacidos pero no se conoce la influencia que puedan tener en ese fenómeno el uso de medicamentos.

c) Se ha observado en algunos países con sistemas de atención médica avanzada que los padecimientos genéticos y de cáncer se han incrementado.

d) Cada vez es más frecuente el uso de medicamentos con -- efectos sobre los ácidos nucléicos para el tratamiento- de niños y adultos con enfermedades malignas o con --- transtornos debidos a modificaciones de la reactividad- inmunológica. (52) (53)

MEDICAMENTOS QUE DEBEN PROBARSE Y EVALUARSE.

Las evaluaciones pueden basarse en los resultados de la experimentación sobre animales y en las propiedades estructurales, bioquímicas y farmacológicas de la sustancia estudiada que puedan causar directa o indirectamente lesiones genéticas.

Esta evaluación debe hacerse en fármacos que presenten las siguientes características:

1.- Productos que tengan afinidad química, farmacológica y bioquímica con mutágenos conocidos o potenciales.

2.- Productos que afectan la respuesta inmunológica con las dosis máximas toleradas.

3.- Medicamentos de uso frecuente y prolongado durante varios años, especialmente en niños y adultos jovenes.

4.- Medicamentos prescritos a una proporción elevada de la población.

5.- Medicamentos objeto de consumo sin prescripción médica.

6.- Productos que entren en contacto con células germinales en concentraciones elevadas. (53)

Para estimar el riesgo que representa una sustancia, para una población expuesta a él, es necesario establecer en que medida un agente químico afecta a un tipo dado de individuos y cuales son las manifestaciones de dicho efecto; difícilmente se pueden hacer evaluaciones directas en humanos, como es el caso de los estudios epidemiológicos, por lo que se han desarrollado diversos sistemas biológicos para la identificación de mutágenos como

son los mostrados en la tabla (A).

De estas pruebas se eligió para el presente estudio, la -- prueba bacteriana con Salmonella typhimurium debido a su bajo -- costo y rapidez en la obtención de resultados (11).

TABLA A CARACTERISTICAS DE LOS SISTEMAS BIOLOGICOS PARA IDENTIFICAR MUTAGENOS

SISTEMA		ALTERACION IDENTIFICADA	DURACION APROXIMADA DE UNA PRUEBA	FACTORES LIMITANTES
A D N		CAMBIOS DE LA MOLECULA	2-3 DIAS	COSTO DEL EQUIPO, USO DE TECNICAS RELATIVAMENTE DIFICILES
VIRUS		MUTACIONES GENICAS, INDUCCION DE PROFAGOS	2-3 DIAS	MINIMOS
BACTERIAS		MUTACIONES GENICAS	3-5 DIAS	MINIMOS
HONGOS		MUTACIONES GENICAS SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA	1-3 SEMANAS	MINIMOS
ENSAYO VIA HOSPEDERO: HONGOS, BACTERIAS Y CULTIVO DE CELULAS DE MAMIFERO.		LAS CITADAS EN CADA SISTEMA	1-5 SEMANAS	REQUERIMIENTO DE BIOTERIO
PLANTAS		MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-5 SEMANAS	MINIMOS
INSECTOS		MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-7 SEMANAS	MINIMOS
CULTIVOS DE CELULAS DE MAMIFERO		MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-5 SEMANAS	COSTO, USO DE TECNICAS LABORIOSAS, INTERPRETACION CITOGENETICA.
MAMIFEROS		MUTACIONES GENICAS, REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	2-7 MESES	COSTO, REQUERIMIENTO DE BIOTERIO
HUMANOS	CELULAS SOMATICAS	REARREGLOS CROMOSOMICOS, NUMERICOS Y ESTRUCTURALES	1-2 SEMANAS	CONTROL DE VARIABLES OBTENCION DE DONADORES.
	CELULAS GERMINALES	CROMOSOMA "Y" EN EXCESO	1-2 DIAS	PROBLEMAS ETICOS.
		TRANSMISION DE MUTACIONES A LOS DESCENDIENTES	AÑOS	NECESIDAD DE ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

Tomada de (17)

G E N E R A L I D A D E S.

A) DESCRIPCION DE LA PRUEBA DE AMES

El Dr. Bruce N. Ames ha desarrollado un método de prueba -- usando bacterias mutantes de Salmonella typhimurium y enzimas microsomales de mamíferos para detectar el posible efecto mutagénico de sustancias (10) (11) (39).

Las bacterias usadas en la prueba, poseen genotipo his^-, -- presentan mutaciones del tipo uvrB, GAL^- y dos de ellas poseen - un plásmido de resistencia a ampicilina, que las hacen más sensibles a las respuestas de los posibles mutágenos (38) (11).

Durante la prueba de mutagénesis las bacterias permanecen - en contacto con la sustancia en estudio dando tiempo así, a que- suceda el proceso de mutación.

Por otro lado, se sabe que el hombre tiene la capacidad de- metabolizar aquéllas sustancias a las que se ve expuesto y que - en varias ocasiones los metabolitos resultantes son los responsables del daño genético causado; en virtud de este hecho, el sistema de Salmonella typhimurium ha sido complementado con un sistema de metabolismo "in vitro" en el que se utiliza un homogenado de hígado de rata que se encarga de hacer la transformación - de aquéllos compuestos que necesitan "activarse" para ejercer su acción mutagénica.

La cantidad de bacterias usadas en la prueba de mutagénesis y que son expuestas al agente químico, con y sin activación metabólica, es de 1 a 2 X 10^8 bacterias de un cultivo de 16 horas de

incubación, cantidad que presenta la gran ventaja de someter a - prueba a una población numerosa.

El tiempo que permanecen en contacto bacterias, fármaco y - homogenado es de 48 horas (a una temperatura de 37°C), tiempo - en el cual se espera ocurra el proceso mutacional. Transcurrido ese lapso, la respuesta obtenida se cuantifica determinando - la frecuencia de mutación por caja en los cultivos expuestos al fármaco y las cajas control.

Si el número de revertantes en las cajas problema es del doble ó más del número de colonias mutantes espontáneas, se dice - que se obtuvo una respuesta positiva, es decir que la sustancia- probada es mutagénica para la cepa de Salmonella typhimurium, -- considerando desde luego si se debe al fármaco ó alguno de sus - metabolitos.

Es conveniente recordar que sólo es posible concluir de esta manera después que se han hecho dos repeticiones del mismo experimento y confirmado los resultados haciendo una curva dosis-- respuesta (11).

Esta prueba es también usada para la detección de metabolitos mutagénicos en fluidos corporales (5) (24) (28) (43) (47) -- (66) (68). En este caso se adiciona a la caja de petri conte-- niendo las bacterias, fluidos corporales (orina, sangre etc...)- de animales tratados con el compuesto de prueba, en el caso de utilizar orina, se añade beta-glucuronidasa para saber si dichos- metabolitos se encuentran libres o conjugados.

Un ejemplo de ello es el experimento realizado por Ames y - Durston en 1974 (68) en el cual demuestran la mutagenicidad de - los metabolitos del 2-acetilaminofluoreno presentes en orinas.

Esto se pone de manifiesto cuando al sistema de prueba se le adiciona beta-glucuronidasa, ya que los resultados únicamente con - orinas muestran una débil respuesta, y cuando se agrega beta-glucuronidasa el número de colonias mutantes es mayor.

En general se pueden seguir los procedimientos que a continuación se enuncian para examinar la presencia de metabolitos en orina sangre u homogenados de algún tejido en particular (24) -- (26) (43) (68).

a) Incorporación directa de homogenado de tejido, orina o- sangre, al medio donde están los microorganismos de -- prueba.

b) Liofilización de homogenado de tejido, orina o sangre - antes de la adición al sistema de prueba.

c) El uso de columnas de amberlita o el uso de solventes - de diferente polaridad así como cambios de pH para la - extracción de metabolitos.

En experimentos en los cuales se puede llevar a cabo la formación de un compuesto mutagénico, como es el caso de la producción de nitrosaminas a partir de aminas secundarias en presencia de iones nitrito en medio ácido, simulando así las condiciones - ácidas del estómago de mamíferos (8) (20) (28) (34) (35) (59) -- (69) (70) (73).

B) FUNDAMENTACION PARA LA SELECCION DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO

Entre los múltiples problemas de salud pública que afectan a la población mexicana, las parasitosis ocupan uno de los pla-- nos primordiales.

Revisando la literatura se encontró que en estudios realizados en el lapso de 1956 a 1976 indican que las frecuencias de parasitosis por diferentes protozoarios eran (18) (38):

PROTOZOARIO	%
Entamoeba coli	37.7
Giardia lamblia	18.98
Entamoeba histolytica	15.9
Endolimax nana	14.03
Trichomonas hominis	11.90

Para el caso de Helmintiasis (18) (38):

Ascariasis	26 %
Tricocefalosis	21.3 %
Enterobiasis (oxiuriasis)	20.9 %
Uncinariasis	19.2 %
Himenolipiasis	15.8 %
Estrongiloidosis	4.3 %
Teniasis	1.5 %

Y en el caso de la frecuencia de parasitosis en niños de la República Mexicana de acuerdo a tres de sus etapas de vida son:

PARASITOSIS	% LACTANTES	% PREESCOLARES	% ESCOLARES
Giardiasis	23.7	20.7	14.1
Amibiasis	11.9	10.1	14.5
Ascariasis	19	42.7	41
Tricocefalosis	8.2	39.3	40.4
Uncinariasis	88.5	25.5	42.8
Estrongiloidosis	1.9	6.9	8.5

Tomada de (38).

Ahora si analizamos la evolución del mercado en cuanto a lo que a venta de amebicidas en sus diferentes presentaciones se refiere, encontramos lo siguiente:

NOMBRE GENERICO	1976	1977	1978	1979
Metronidazoles	58 513	71 138	96 944	149 160
Combinaciones con Quinolinas	30 607	30 488	51 593	32 575
Tinidazoles	26 671	26 813	30 719	18 162
DIHQ	25 662	27 158	30 719	12 412
Emetinas	4 131	4 727	3 517	?
Otras Sales	17 358	15 057	19 425	31 345

Tomada de (18).

En el caso de helmintiasis, el Instituto Nacional de Pediatría reporta el consumo de los siguientes antihelmínticos durante el año 1979.

Mebendazol	4 000 cajas y/o frascos
Niclosamida	600 cajas
Pirantel	200 cajas y/o frascos
Tiabendazol	150 cajas y/o frascos
Pirvinio	100 frascos

De los datos aquí presentados podemos concluir que las parasitosis en México están muy lejos de controlarse y menos aún, de erradicarse. Ya que vemos que la población parasitada va aumentando y por ende la proporción de la población que va siendo expuesta a la acción de los diferentes antiparasitarios.

Mientras no se conozca la relación que hay entre los efectos mutagénicos de un compuesto químico en sistemas celulares experimentales y su aptitud para producir esos mismos efectos en el hombre, debe considerarse que el riesgo es suficiente para que se adopten de inmediato medidas de protección basadas en todos los conocimientos disponibles, por lo que de aquí surge la necesidad de hacer este estudio.

C) ALGUNOS ASPECTOS FARMACOLOGICOS Y FARMACOCINETICOS GENERALES Y DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO

Es importante considerar algunos aspectos farmacológicos y farmacocinéticos generales y de los compuestos químicos que han-

de ser administrados a ratones, en cuyas orinas se probará el -- efecto mutagénico, de las sustancias que hayan dado respuesta positiva.

Cualquier fármaco administrado al organismo y del cual se - espera un efecto característico, debe alcanzar una concentración adecuada en el lugar de acción, que va a depender no sólo de la- dosis administrada sino de la vía, magnitud y velocidad de absorción, distribución, asociación a tejidos, inactivación y excre-- ción.

Directa o indirectamente la absorción, distribución, bio--- transformación y excreción de un fármaco implican su paso por -- membranas celulares que hacen esencial considerar los mecanismos por los cuales éstos atraviezan y sus propiedades fisicoquímicas tales como:

a) Tamaño molecular
b) Forma de la molécula
c) Grado de ionización
d) Solubilidad relativa en lípidos de las formas ionizadas y no ionizadas.

Dependiendo de la vía de administración de un fármaco serán diferentes las barreras que intervienen en el movimiento farmacológico hasta su sitio de acción y que pueden ser membranas.

El paso de sustancias a través de estas barreras biológicas puede efectuarse por mecanismos como: Difusión pasiva, filtración, transporte activo y difusión facilitada.

BIOTRANSFORMACION DE FARMACOS

Una vez que el fármaco ha penetrado y distribuido en el organismo, éste empieza a sufrir una serie de transformaciones que lo llevan a su inactivación y a su eliminación.

Las reacciones que puede sufrir una sustancia extraña dentro del organismo son:

a) Reacciones de oxidación
b) Reacciones de reducción
c) Hidrólisis
d) Síntesis (conjugación)

El tipo de biotransformación del compuesto químico va a depender obviamente de sus características estructurales químicas y del o los sitios donde se lleve a cabo.

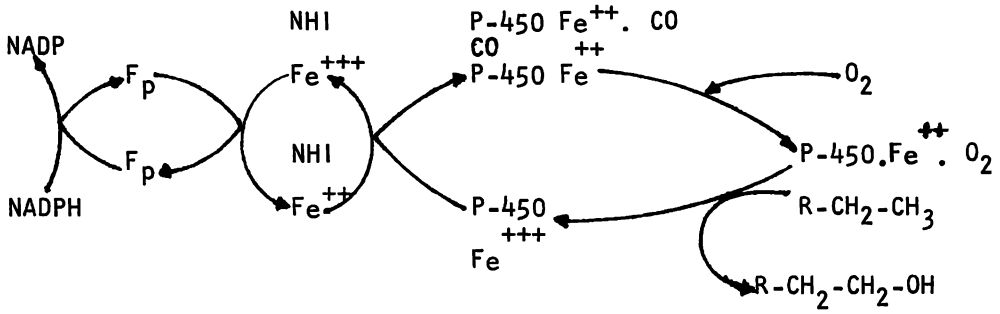
Así se sabe que el principal órgano responsable de este proceso es el hígado, aunque también contribuyen a él otros órganos como riñones, pulmones, aparato gastrointestinal e incluso plasma (42) (61) (62).

Muller y Miller (1949-1953) son los primeros en reportar la descripción del metabolismo de un compuesto extraño en tejido hepático. (41). Ellos encontraron que la fracción microsomal de un homogenado de hígado cataliza el rompimiento y reduce el enlace azo y la N-demetilación oxidativa de los colorantes azo. Los requerimientos para que funcione esta fracción microsomal son nicotín adenín difosfato (NADP), nicotín amida dinucleótido (NAD) y oxígeno molecular.

Cuando se homogeniza el tejido hepático, el retículo endo--

plásmatico existente se fragmenta en pequeñas vesículas llamadas microsomas que contienen muchas de las enzimas causantes de la - biotransformación de fármacos (42) (62). Estos microsomas catalizan una variedad muy amplia de reacciones como son: Desaminación O-, N- y S-desalquilación, hidroxilación de hidrocarburos - alquílicos y arílicos, epoxidación, formación de derivados de alquilo, N-hidroxilación, N- y S-oxidación y deshalogenación, así- como las reducciones azo y nitro. Además las enzimas microsomales participan en la síntesis de glucurónidos a través de la acción de la uridín difosfato glucuronil transferasa.

El sistema microsomal, se describe como un sistema de oxidasas de función mixta. Las principales enzimas de este sistema- aparecen ilustradas en la figura 1 y son el NADPH-citocromo C reductasa, la flavina, enzima involucrada en la oxidación de NADPH, el citocromo P-450, y la NADPH citocromo P-450 reductasa, la -- cual funciona en la reducción del citocromo P-450 oxidado. Para llevar a cabo una oxidación mediante este mecanismo se requieren cantidades equivalentes de NADPH, oxígeno y del sustrato utilizado en el proceso. El esquema general para la oxidación de una- sustancia química según Omura t col, (1965-1966) es el siguiente:



Por otra parte Guillete y col. en 1968 (42) proponen un segundo mecanismo para explicar la función mixta del citocromo -- P-450 para oxidar y reducir fármacos.

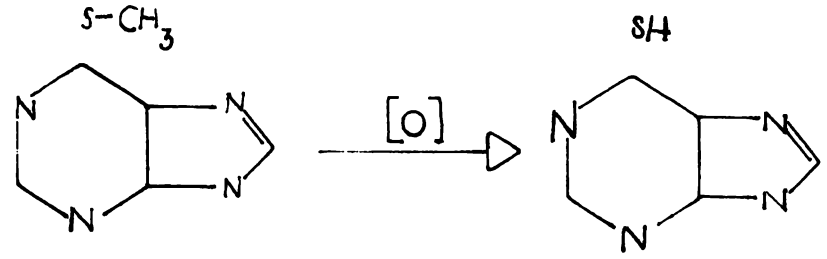
En otro esquema propuesto por Sih y col. en 1969 se explica la participación del citocromo P-450 en la oxidación de corticoesteroides por la mitocrondia de células de la corteza adrenal.

Debido a la versatilidad del citocromo P-450 para biotransformar fármacos se ha tratado de saber que tan universal es este citocromo y lo que se ha encontrado es que el citocromo P-450, - no sólo se encuentra en abundancia en los microsomas hepáticos,- sino también en microsomas y mitocondrias de las células de la - corteza adrenal. También se detectaron en el riñón y en la mucosa intestinal. Otro reporte nos indica que ha sido descrito en mitocondrias del cuerpo lúteo, en microsomas hepáticos de difer-- rentes especies como son algunos mamíferos, aves, réptiles, anfibios y peces, así como en organismos más simples del tipo de las bacterias, bacteroides y en levaduras (13) (49) (51) (54).

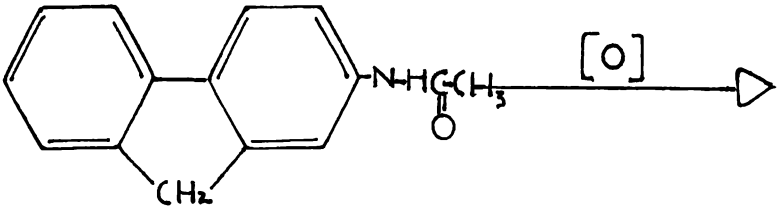
El citocromo P-450 no debe ser idéntico en todos los tejidos y en todas las especies, esto se desprende de su capacidad metabólica en diferentes tejidos frente a diferentes fármacos (64) - (15).

Es muy probable que su acción se deba a las formas en que - esté asociado con la membrana microsomal o a diferencias cualitativas en otros componentes del sistema enzimático.

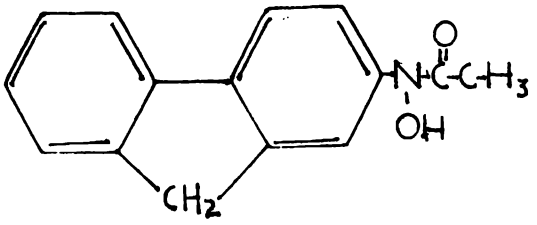
A continuación se presentan ejemplos de las reacciones llevadas a cabo por la fracción microsomal, que en algunos casos -- pueden conducir a productos mutagénicos (4) (63).



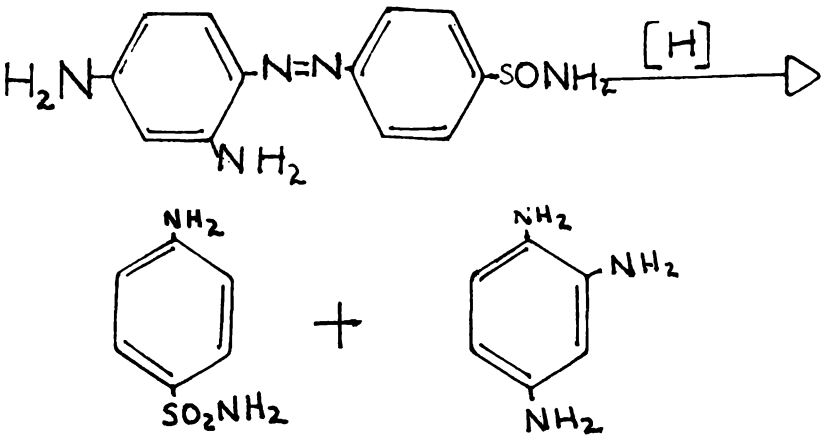
6-metiltiopurina 6-mercaptopurina

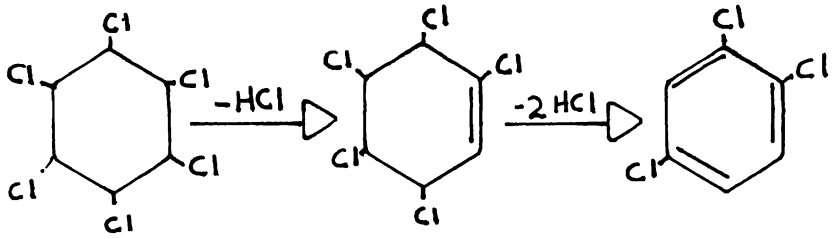


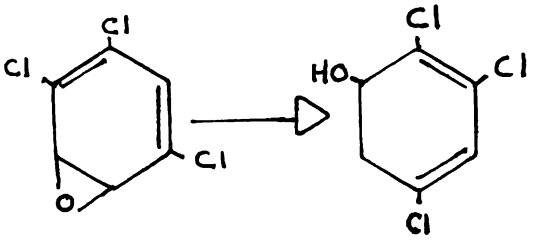
2-acetilaminofluoreno



N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno


H2N
N=N
SONH2
[H]
NH2
NH2
SO2NH2
NH2
NH2
NH2

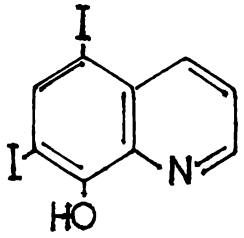

Cl
Cl
Cl
Cl
Cl
Cl
-HCl
Cl
Cl
Cl
Cl
Cl
-2 HCl
Cl
Cl
Cl


Cl
Cl
Cl
O
HO
Cl
Cl
Cl

DIYODOHIDROXIQUINOLINA

SINONIMOS: diyodohidroxiquina (USP), 8-hidroxi 5,7 diyodoquinolina.

FORMULAS: $C_9H_5I_2NO$



PM 397

DESCRIPCION: Polvo cristalino ligeramente amarillo a amarillo - café, inodoro, insípido, no se humedece fácilmente, es estable al aire, se descompone al fundir.

SOLUBILIDAD: Prácticamente insoluble en agua, parcialmente soluble en alcohol, acetona y éter. Protegerlo de la luz. Se extrae con solventes orgánicos de soluciones alcalinas acuósas.

EFECTOS FARMACOLOGICOS: La DIHQ es directamente amebicida para las formas móviles y para las quísticas; aunque es probable que su eficacia para hacer desaparecer los quistes deba atribuirse a su poder para matar los trofozoitos, el medicamento actúa sólo sobre las amibas que se hallan en el intestino y no tiene actividad ni en la hepatitis amibiana ni en el abceso amibiano, esto debido a que es irregularmente absorbida en el intestino delgado, y debido a su baja solubilidad la mayoria de la dosis alcanza el intestino grueso --

donde actúa sobre las amibas que viven en el lumen.

ABSORCION DESTINO Y EXCRECION: Berggren y Hansson (1968) compararon la absorción gastrointestinal de DIHQ con la yodoclorohidroxiquinoleina y otros ocho quinolinoles halogenados.- De los fármacos probados la DIHQ fué la que se absorbió en menor cantidad, aproximadamente un tercio de lo que se absorbió la yodocloro-hidroxiquinoleina. Estos datos concuerdan con observaciones del aumento de contenido de yodo en el plasma después de la administración de una y otra sustancia (Knight y Miller 1949). La mayor cantidad del fármaco se elimina por las heces. Por consiguiente no se sabe si el compuesto obra en amibiasis intestinal sólo en virtud de su presencia en el lumen del intestino.

La excreción de la DIHQ, parece ser dependiente sobre el modo de administración; en conejos después de dosis orales excretan en la orina el 39% del yoduro administrado y el 61% en las heces, mientras que después de dosis intravenosas solamente el 39% de yoduro es excretado. La mayor parte de la droga es excretada en la forma de glucurónido y sulfato-conjugados.

TOXICIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS: La DIHQ es poco tóxica quizá por su escasa absorción. En animales puede producir lesiones hepáticas. En individuos sometidos a dosis terapéuticas se han observado furunculosis (generalizada, grave, toxicodermia yódica) escalofríos, fiebre, dermatitis de ligera a

grave, irritación y prurito anales, molestias abdominales - transitorias, dearrea y cefalea, ligero alargamiento de la- glándula tiroides durante el tratamiento. En medicamento - está contraindicado en caso de lesión hepática y de intolerancia al yodo.

Los transtornos neurológicos se refieren a la neuropatía - mielo óptica subaguda SMON, que puede presentarse especialmente después de la ingestión de dosis elevadas de más de - 750 mg. de yodoclorohidroxiquinoleina o tres veces más de - DIHQ.

El cuadro comienza con diarrea e intenso dolor abdominal y luego aparecen los trastornos nerviosos en forma de parestesias en los miembros inferiores, paresia en los mismos, después disminución de la visión-atrofia óptica- que puede llegar a la ceguera en el 2 a 3% de los casos.

Estudios realizados especialmente en Japón, Europa y E.U. - muestran que este cuadro cede generalmente al interrumpirse la administración, pero los transtornos nerviosos pueden -- perdurar durante 1 a 2 años.

USOS TERAPEUTICOS: Es útil para el tratamiento colectivo de pacientes ambulantes y portadores asintomáticos. No exige reposo en cama.

Actúa principalmente en el lumen intestinal y es usada sola o combinada con metronidazol en el tratamiento de amibiasis intestinal principalmente para quistes pasajeros. Se ha -- usado como suplemento con emetina, cloroquina y tetraciclina en disenteria amebica aguda. Ha sido usada en balanti--

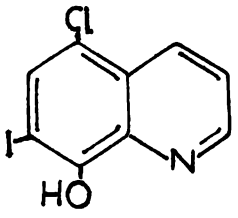
diasis y giardiasis y es usada contra Trichomonas vaginalis La DIHQ en dosis adecuadas fué especifica para el tratamiento de acrodermatitis enterohepática.

TRATAMIENTO: para amibiasis intestinal en el adulto se dan 0.75- a 1 g tres veces al día durante 20 días. A los niños se -- les prescribe una fracción de la dosis del adulto con arreglo a la edad y al peso hasta los 10 años, los mayores de - esta edad deben recibir la dosis completa del adulto. Si - es preciso repetir el tratamiento hay que dejar un intervalo de 2 o 3 semanas de descanso. Para los portadores asintomáticos puede ser suficiente una dosis diaria de 0.65 g. La DIHQ se utiliza especialmente en el tratamiento de la vaginitis producida por Trichomonas vaginalis. El tratamiento consiste en la colocación de 1 a 2 tabletas de 100 mg humedecidas e insertadas en la bóveda vaginal mañana y noche- previo lavado vaginal con agua acidulada, durante 1 a 2 meses (9) (14) (31) (44) (48) (56) (65).

VIOFORMO

SINONIMOS: quinoformo, cloroiodoquina, yodoclorohidroxiquinoleína, barquinol, viozol, 5-cloro-8 hidroxi-7-iodoquinoleína.

FORMULAS: C_9H_5ClINO



PM 305.5 peb. 180°C con descomposición.

SOLUBILIDAD: Prácticamente insoluble en H_2O y etanol, soluble - una parte en 130 partes de cloroformo, soluble una parte en 45 partes de etanol hirviente.

DESCRIPCION: Polvo amarillo, espectro de absorción en uv en HCl-3N a 267 nm.

DOSIS: 0.75 a 1.5 g en dosis divididas

ABSORCION METABOLISMO Y ELIMINACION: Es administrada por vía oral en el tratamiento de disentería bacilar y amibiana. En dosis consecutivas orales en el hombre el pico de concentración en la sangre parece que se alcanza al 7° día a más tardar, en conejos el 71% del yodo ingerido fué excretado, 3/4 partes en orina y 1/4 parte en las heces. La orina contiene conjugados del H_2SO_4 y del ácido glucurónico. Una gran-cantidad de la dosis ingerida pasa a través del tracto gastrointestinal sin ser absorbida, pero puede ocurrir un ---

un grado variable de absorción, algo del vioformo absorbido es rápidamente excretado en la orina en su forma conjugada- pero el resto es muy lentamente excretado y puede persistir por 2 meses o más. Después de una dosis de 250 mg administrada a 6 individuos, se excretan una media de 12.6% de la- dosis en orina durante las 10 horas siguientes.

TOXICIDAD: Aunque puede causar iodismo en los pacientes tratados raramente se han reportado efectos graves.

La aplicación local de vioformo en unguentos y cremas puede causar irritación severa. En estudios realizados en el Japón, de 263 pacientes que recibieron vioformo de 0.6 a 1.6- g diariamente, muestran que 44 han desarrollado síntomas -- neurológicos. En otro estudio sobre hombres de 32 años que desarrollaron dermatitis se encontró como causa el uso de - unguentos conteniendo vioformo al 1%. Se ha encontrado también que el vioformo produce confusión mental, alucinaciones y precoma por 4 a 5 días después de tomar 30 tabletas - de vioformo.

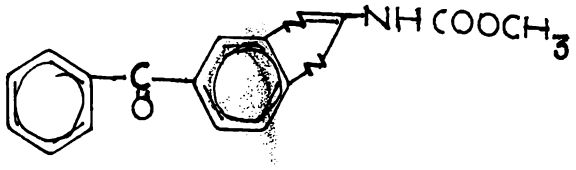
CONTRAINDICACIONES: Esta contraindicado a pacientes con defi -- ciencia renal o intolerancia al yodo. El vioformo por vía- oral puede interferir con determinaciones del enlace a proteínas del yodo en pruebas para la función de la tiroides.

USOS: usado en el tratamiento de amibiasis intestinal. Es usado en Shigellosis y algunas otras infecciones intestinales (9) (14) (31) (44) (48) (56) (65).

MEBENDAZOL

SINONIMOS: metil 5-benzoil benzimidazol-2-il carbamato.

FORMULAS: $C_{16}H_{13}N_3O_3$



PM 295.3

DESCRIPCION: Polvo blanco débilmente amarillo, pf= 280° con descomposición.

SOLUBILIDAD: Casi insoluble en agua, etanol, éter y cloroformo; fácilmente soluble en ácido fórmico.

ACCION FARMACOLOGICA: En los animales de experimentación el mebendazol es efectivo para erradicar la helmintiasis por nematodos en el cerdo, Ascaris swm y en la rata Syphacea muris y Estrongiloides valti.

En el hombre actúa eficazmente en tricocefalosis, oxiuriasis, ascariasis y uncinariasis.

El mebendazol no sólo actúa sobre nemátodos, sino también sobre los céstodos, por ejemplo, la Taenia saginata, que es eliminada por la acción de la droga.

MECANISMO DE ACCION: En forma semejante a las cianinas el mebendazol bloquea la captación de glucosa por nemátodos a concentraciones bajas, mientras que a dosis elevadas no afecta

el metabolismo de la glucosa en los mamíferos.

El mebendazol es poco tóxico en los animales y en el hombre. Posee cierta acción depresora sobre el sistema nervioso central, que en hombre se evidencia por mareos y somnolencia,- así como cierta acción irritante gastrointestinal que puede dar lugar a naúseas y vómitos.

ABSORCION DESTINO Y EXCRECION: Se absorben en el tracto gastrointestinal, dicha absorción se evidencia por su aparición - en la sangre como ha sido comprobado con la droga marcada - con ^{14}C radiactivo, sin embargo la absorción es escasa, apenas 5-10% de la dosis administrada.

Después de la administración oral de mebendazol, la concentración en el plasma de la droga y sus metabolitos alcanzan un máximo a las 2 o 4 horas. La mayor parte de la dosis excretada a las 48 horas como mebendazol inalterado. Entre 5 y 10% de la dosis es excretada en la orina, principalmente como un derivado descarboxilado del mebendazol.

TOXICIDAD: Transtornos gastrointestinales consistentes en anó-- rexia, naúseas, vómitos y diarrea. Manifestaciones nerviosas como; Mareos, cefalea, astenia y somnolencia. Estos -- transtornos son ligeros.

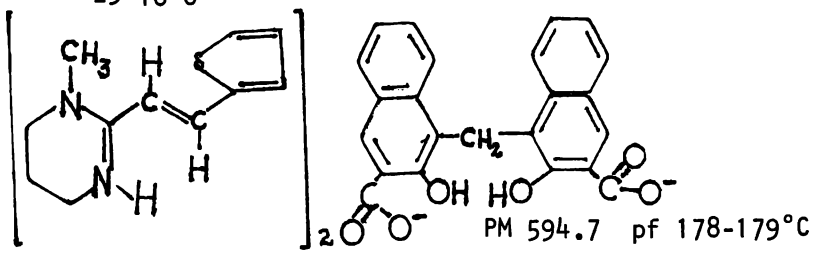
TRATAMIENTO: Oxiuriasis o enterobiasis.- una dosis de 100 mg. 2 veces al día después de la comida durante 3 días.

Ascariasis.- igual que enterobiasis (9) (14) (31) (44) (48) (56) (65).

PAMOATO DE PIRANTEL

SINONIMOS: trans 1,4,5,6 tetrahidro-1-metil-2-(2-/tienil/vinil)-pirimidina.

FORMULAS: $C_{23}H_{16}O_6$



PM 594.7 pf 178-179°C

DESCRIPCION: Polvo cristalino, inodoro e insípido.

SOLUBILIDAD: Insoluble en agua, alcohol, CH_3OH, soluble en dimetil sulfóxido (DMSO), ligeramente soluble en dimetilformamida.

ACCION FARMACOLOGICA: El pamoato de Pirantel fué introducido inicialmente en la práctica veterinaria como antihelmíntico de amplio espectro eficaz contra oxiuriasis, ascariasis y uncinariasis. Su eficacia y baja toxicidad motivaron ensayos contra helmintos que infestan al ser humano. El éxito de estos ensayos justifica que se añada a los diversos agentes útiles en el tratamiento de la infestación por nemátodos.

MECANISMO DE ACCION: El pirantel y sus análogos son agentes despolarizantes de bloqueo neuromuscular. Producen activación nicotinica intensa y persistente, que resulta en parálisis -

espática del verme. El pirantel también inhibe las colinesterasas. Causa contractura del desarrollo lento de preparaciones de ascaris con una céntesima parte de la concentración de acetilcolina necesaria para producir el mismo efecto En células musculares aisladas del helminto, el pirantel causa despolarización y aumento de la frecuencia de descarga de espigas, acompañados de aumento de la tensión.

En preparaciones de ascaris el pirantel y la piperacina se antagonizan mutuamente. El pirantel es eficaz contra uncinarias, oxiuros, ascarides, pero ineficaz contra tricocéfalos.

ABSORCION METABOLISMO Y EXCRECION: El pamoato de pirantel se absorbe en medida escasa por el aparato gastrointestinal; se excreta menos del 15% por la orina, como el fármaco inalterado y sus metabolitos; la parte principal de una dosis administrada puede obtenerse en las heces.

TOXICIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS: Cuando se administra por vía parenteral a conejos, el pamoato de pirantel puede provocar bloqueo neuromuscular completo; si se usa por vía oral, sólo las dosis muy grandes producen efectos tóxicos. En el ser humano se observan rara vez molestias gastrointestinales, al igual que cefalgia y vahídos; estos efectos no persisten.

El pamoato de pirantel no se ha estudiado en mujeres embarazadas, por lo cual está contraindicado su uso en estos pacientes. Tampoco se aconseja para niños menores de 1 año de edad. Considerando que existe la posibilidad de que el pamoato de pirantel y la piperacina se antagonicen mutuamente,

sería imprudente utilizarlos simultaneamente.

USOS TERAPEUTICOS: Agente de elección para tratar ascariasis. y enterobiasis. Se ha obtenido alta frecuencia de curación - en la Anquilostomiacis y necatoriasis.

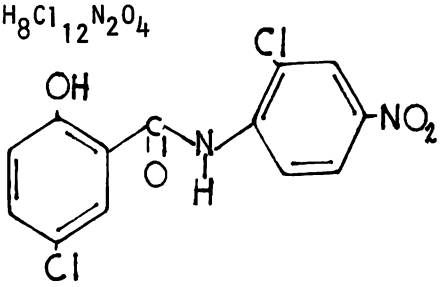
TRATAMIENTO: Para tratar las infestaciones por Ascaris lumbri - coides, Enterobius o Ancylostoma duodenale, debe adminis -- trarse una dosis única de 11 mg/Kg, hasta un máximo de 1 g; en el caso de oxiuros, suele ser prudente repetir el tratamiento después de dos semanas.

Contra Necator americanus se administra la misma dosis una- vez al día durante tres días (9) (14) (31) (44) (48) (56) - (65).

NICLOSAMIDA

SINONIMOS: N-(2'cloro 4'nitrofenil-5-clorosalicilamida), tenífugos, yomesan.

FORMULAS: $C_{13}H_8Cl_{12}N_2O_4$



DESCRIPCION: Polvo amarillo, inodoro e insípido. pf 227-230°

SOLUBILIDAD: Muy insoluble en agua, soluble en etanol 1/50, -- 1/350 de éter, 1/400 $CHCl_3$ y soluble en acetona.

EFECTOS FARMACOLOGICOS: La niclosamida obra principalmente contra los cestodos que parasitan a la especie humana. EL Enterobius vermicularis es también sensible. In vitro la H.- diminuta suspendida en solución salina absorbe muy poca cantidad de niclosamida; pero si a la solución se añade homogenado de intestino de rata normal o de rata ya tratada con - este medicamento, aumenta mucho la cantidad del mismo, que- toma el parásito. La niclosamida produce señalados efectos en el metabolismo de H. diminuta en las ratas. En bajas -- concentraciones estimula la absorción de oxígeno pero en altas concentraciones la respiración exógena es inhibida y la absorción de glucosa es bloqueada. Los gusanos afectados -

por la niclosamida tanto en el intestino como in vitro son- más sensibles a la acción de las enzimas proteolíticas. Después de administrar una dosis efectiva es posible que hayan sido digeridos el escolex y los proglotidios y no puedan -- ser identificados.

MECANISMO DE ACCION: In vitro, en la H. diminuta, la niclosamida transtorna el metabolismo del parásito sobre todo el metabolismo hidrocarbonado en forma tal que aquel se hace susceptible a las enzimas proteolíticas de los jugos digestivos que terminan por digerir los helmintos.

Estudios efectuados con el parásito entero y las mitocondrias del mismo aislados, han revelado que la acción principal de la niclosamida es inhibir la incorporación del fósforo inorgánico, por la formación de adenosintrifosfato ó ATP experimentos en que se empleo P_{32} radiactivo, y este transtorno es el que lleva a la perturbación del metabolismo hidrocarbonado descrito -se conoce el papel importante del -- ATP en el citado metabolismo parasitario-.

En el hombre la niclosamida es bien tolerada cuando se ingiere y por lo general no se producen manifestaciones indeseables.

TOXICIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS: Parece inocua, fuera de algún transtorno gastrointestinal. No se absorbe por el tubo digestivo, no tiene acción irritante directa ni ha producido efectos desfavorables cuando ha sido administrada a pacien-

tes debilitados y mujeres embarazadas. (Gonnert y Schaufstätter 1960).

La observación ulterior de los pacientes tratados con este medicamento no ha revelado transtornos de la función hepática ni de la renal, ni la alteración del número de corpúsculos de la sangre (Abdallah y Saif 1960).

No tiene contraindicaciones como tenicida. Pero conviene advertir que si el medicamento es letal para los gusanos adultos no lo es para los huevos contenidos en los proglotidios. Esto significa que el uso de la niclosamida para el tratamiento por infestación con T. solium lleva cierto peligro de cistisercosis, por que la digestión de los anillos muertos del gusano, pone en libertad huevos viables en la luz del intestino. De ahí la necesidad de administrar un purgante para eliminar todos los segmentos muertos del parásito antes que sean digeridos.

USOS TERAPEUTICOS: Produce curación de la teniasis en lo que se refiere a Taenia saginata y Taenia solium como el Hymenolepis nana y el Delatum. La acción se efectúa sobre los céstodos y no sobre nemátodos.

El fármaco posee acción vermicida, las tenias eliminadas no tienen signo de vida, los segmentos del parásito aparecen semidigeridos y muchas veces no se encuentra el escolex loque hace muy difícil el criterio de curación debiendo esperarse unos tres meses para asegurarlo.

TRATAMIENTO: En infestaciones por H. nana se toma 1 gramo diario durante 6 días. La dosis usual del adulto es de 2 gramos (9) (14) (31) (44) (48) (56) (65).

D) CONSIDERACIONES SOBRE LAS DISTINTAS FORMAS DE DAÑO GENETICO

Experimentos hechos desde 1944 han demostrado que el material genético está constituido por una sustancia llamada ácido desoxirribonucléico (ADN), que tiene dos funciones principales; una que consiste en transportar la información genética responsable del fenotipo especial de la célula; y la otra que es la de autoreplicarse. Para replicar el genotipo de la célula, el ADN actúa de molde para convertir un cromosoma en dos idénticos.

Por lo tanto cualquier alteración del material genético va a causar un cambio en las funciones dependientes del ADN, lo cual se traducirá como mutación.

Los componentes celulares que son suceptibles de algún cambio que nos conduzca a una mutación están ilustrados en la figura II.

El tipo de alteración genética obtenida depende del sitio y la forma en que se produzca la interacción del mutagéno con alguno de los componentes celulares suceptibles de mutación tal y como se ilustra en la tabla B. (17)

Los mecanismos moleculares de cada uno de los procesos mutacionales están descritos en la tabla C. (17)

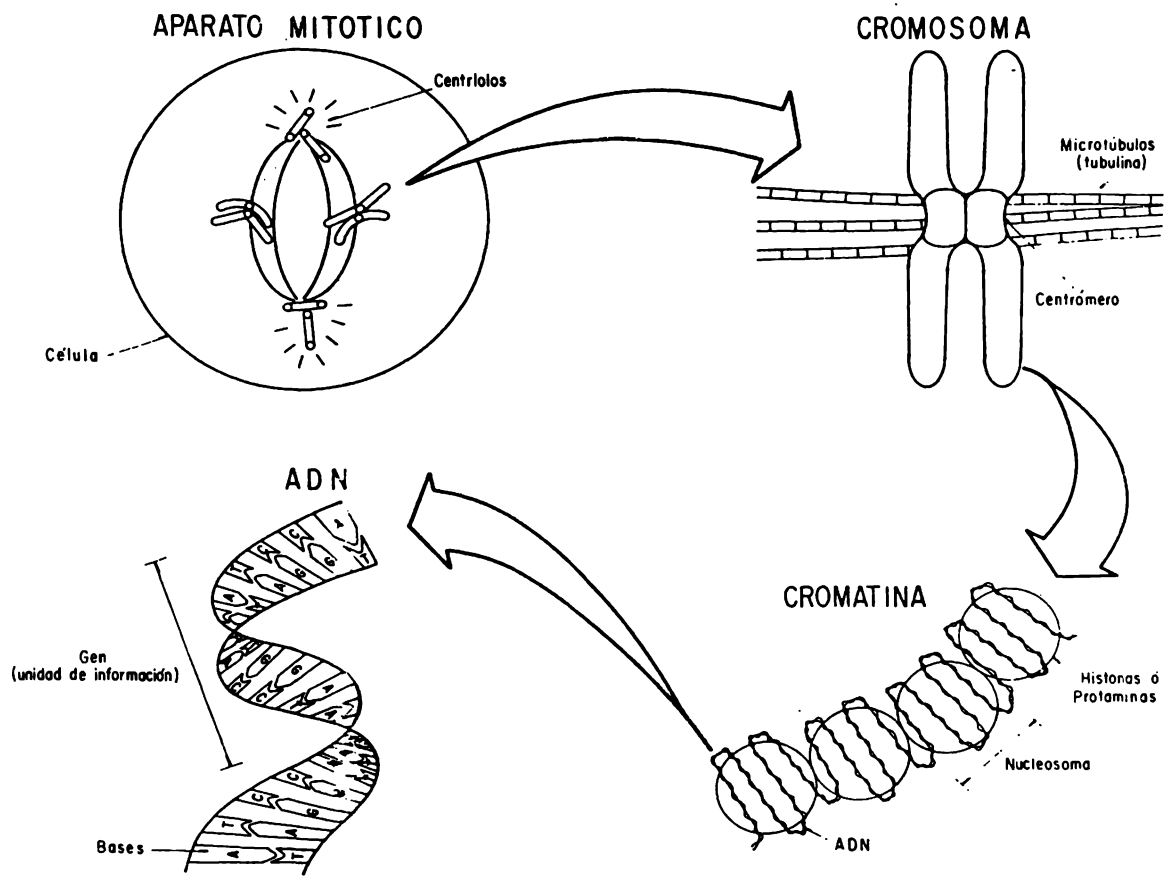


FIG. ' COMPONENTES CELULARES SUSCEPTIBLES A LOS PROCESOS MUTAGENICOS

TABLA B ALTERACIONES GENETICAS

NIVEL DE LA MUTACION	TIPO DE MUTACION	D E S C R I P C I O N
ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE BASES INTRAGENICA.	SUSTITUCION DE BASES	CAMBIO DE UNA BASE POR OTRA: a) TRANSICION PURINA PURINA PIRIMIDINA PIRIMIDINA b) TRANSVERSION PURINA PIRIMIDINA
ANOMALIAS EN EL ARREGLO DE LOS GENES	INVERSION	CAMBIO DE ORIENTACION DEL GENE, MANTENIENDO SU POSICION RELATIVA RESPECTO DE LOS OTROS GENES
	TRANSLOCACION	CAMBIO DE POSICION DE UN GENE CON RELACION A OTROS GENES
ANOMALIAS EN EL NUMERO DE GENES	ELIMINACION	PERDIDA DE UN GENE
	DUPLICACION	ADQUISICION DE UNA COPIA EXTRA DE UN GENE
ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES	REARREGLOS: TRANSLOCACIONES, INVERSIONES ANILLOS	CAMBIO EN EL NUMERO, POSICION U ORIENTACION DE GRUPOS DE GENES
MODIFICACION DEL NUMERO DE CROMOSOMAS	ANEUPLOIDIA: a) MONOSOMIA b) POLISOMIA	SEGREGACION CROMOSOMICA DEFECTUOSA - QUE RESULTA EN PERDIDA O ADQUISICION DE UNO O MAS CROMOSOMAS
	POLIPLOIDIA	AUMENTO DE JUEGOS COMPLETOS DE CROMOSOMAS

Tomada de (17)

TABLA C MECANISMOS DE ACCION DE ALGUNOS MUTAGENOS

TIPOS DE COMPUESTOS	MOLECULAS SUSCEPTIBLES	ALTERACION EN LAS MOLECULAS	ORIGEN DE LA MUTACION	MUTACIONES POSIBLES	EJEMPLOS DE COMPUESTOS
ALQUILANTES (MONO Y POLIFUNCIONALES)	ADN HISTONAS PROTAMINAS ENZIMAS DE REPARACION TUBULINA	INTRODUCCION DE RADICALES ALQUILOS: $-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, ENTRECRUZAMIENTOS INTER O INTRA CADENAS, BLOQUEO DE GRUPOS SULFHIDRILOS	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES, DESPURINACION, CAMBIO EN LA ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS, ALTERACION DEL ENSAMBLE DE MICROTUBULOS	GENICAS: TRANSICIONES, TRANSVERSIONES, ELIMINACIONES CROMOSOMICA; ABERRACIONES ESTRUCTURALES	METILMETANO SULFONATO, NITROSOGUANIDINA, CLOROQUINA, GRISEOFULVINA, DIELDRIN
ANALOGOS DE BASES	ADN	SUSTITUCION DE BASES	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES	GENICAS: TRANSICIONES CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	2-AMINO-PURINA, BROMOURACILO, 5-BROMODEOXIURIDINA
INTERCALANTES	ADN	INSERCION ENTRE BASES ADYACENTES EN LA DOBLE HELICE	ALTERACION DE LA HELICE. ERROR EN LA REPLICACION, LA REPARACION Y LA RECOMBINACION	GENICAS: DESFASAMIENTOS, ELIMINACIONES CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	QUINACRINA, ACRIDINA, PROFLAVINA, BROMURO DE ETIDIO
DESAMINANTES	ADN HISTONAS PROTAMINAS	ELIMINACION DE UN GRUPO AMINO CON INTRODUCCION DE UN GRUPO HIDROXILO ENTRECRUZAMIENTO INTER O INTRACADENAS	CONVERSION DE ADENINA A HIPOXANTINA, DE GUANINA A XANTINA, Y DE CITOSINA A URACILO. CAMBIO EN LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS	GENICAS: TRANSICIONES, ELIMINACIONES, DESFASAMIENTOS CROMOSOMICAS: ABERRACIONES ESTRUCTURALES	ACIDO NITROSO
PRODUCTORES DE RADICALES LIBRES Y PEROXIDOS	ADN	SUSTITUCION DE CITOSINA POR TIMINA, POSIBLE FORMACION DE N-6 HIDROXIADENINA	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES	GENICAS: TRANSICIONES CROMOSOMICAS: ABERRACIONES	HIDROXILAMINA

M A T E R I A L E S

ORIGENES DE LAS CEPAS DE PRUEBA Y SUS CARACTERISTICAS.

Las cepas bacterianas para la prueba de mutagénesis fueron donadas por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California Berkeley. Estas diferentes mutaciones, una de las cuales ha provocado un requerimiento a histidina. La cepa bacteriana TA1535 sirve para detectar mutágenos que causan sustituciones de pares de bases y otras dos cepas, TA1537 y TA1538, detectan mutaciones por corrimiento de fases (frameshift) (11).

La cepa TA1538 tiene una secuencia repetitiva C-G-C-G-C-G-C -G cercana al sitio de mutación de histidina y es revertida particularmente por algunos carcinógenos tales como 2-nitrosofluoreno (11).

La cepa de prueba TA1537 parece tener un corrimiento de citosinas en el sitio de la mutación y es revertida por carcinógenos como la 9-aminoacridina.

En adición a la mutación de histidina cada cepa tiene dos - mutaciones adicionales que incrementan la sensibilidad a mutágenos, una es la que causa pérdida del sistema de reparación por - escisión y la otra causa una modificación en la barrera de lipopolisacáridos que cubren la superficie de la bacteria.

Otras dos cepas de prueba son la TA100 y TA98 que fueron obtenidas de las cepas TA1535 y TA1538 respectivamente. Estas dos cepas llevan un plásmido (factor R) que les da la característica de detectar mutágenos que no fueron detectados por las cepas ori

ginales o que la respuesta fué débil. Estos carcinógenos incluyen aflatoxina B_1, esterigmatocistina, furilfuramida y otros nitrosofuranos carcinógenos, diarilcarbamatos acetilénicos,metil - metano sulfonato, N-óxidonitroquinolina, Benzo-a-Pireno, 7,12- - dimetilbenzantraceno, cloruro de bencilo y gran variedad de hi-- drocarburos policíclicos (11) (39).

GENOTIPO DE LAS CEPAS TA PARA LA PRUEBA DE MUTAGENESIS+

MUTACION DE HISTIDINA			MUTACIONES ADICIONALES			USO
his G46	his C3076	his D3052	LPS	REPARACION	R	
TA1535	TA1537++	TA1538	rfa	uvrB		Cepas estándares y con factor R para mutagénesis.
TA100		TA98	rfa	uvrB	R	

Todas las cepas se derivan originalmente de S.typhimurium LT2. - la deleción a través de la región uvrB también incluye genes de la nitrorreductasa (chl) y biotina. Las cepas rfa tienen una deleción simple a través del gal chl bio uvrB. El factor R es el- plásmido pKM 101.
++Una nueva cepa de prueba está bajo desarrollo la cual bien puede reemplazar a la cepa TA1537, con su derivado del factor R (11)

EQUIPO Y MATERIAL.

Seis tubos de ensaye de vidrio de 15ml con tapón estériles.

Pipetas de vidrio graduadas de 10 ml estériles.

Pipetas de vidrio graduadas de 1 ml estériles.

Pipetas de vidrio graduadas de 0.1 ml estériles.

Frascos de vidrio de 5 ml con tapón de rosca, estériles.

Cajas de petri desechables estériles

Asa y porta asa

Un refrigerador

Un ultracongelador

Un incubador con agitación constante

Un mechero

Hielo seco

Una gradilla

MEDIOS Y SOLUCIONES

Caldo nutritivo

Medio completo

Solución de ampicilina 800 mcg/ml

COMPROBACION DE CEPAS DE PRUEBA.

Cajas de petri desechables estériles

Tubos de ensayo de aproximadamente 5 ml con tapón de rosca-estériles

Pipetas graduadas de vidrio de 10 ml estériles

Pipetas graduadas de vidrio de 1 ml estériles

Pipetas graduadas de vidrio de 0.1 ml estériles

Discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro estériles

Asa y porta asa

EQUIPO

Lámpara germicida UV GE-15 wats

Estufa para incubar a 37°C

Cuenta colonias

Gradilla

Mechero

MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio mínimo "E"

Medio completo

Solución histidina-biotina 0.5 mM

Solución de histidina 0.1 M y biotina 0.5 mM

Agar de superficie

Solución de cristal violeta 1 mg/ml

Solución de ampicilina 8 mg/ml

PREPARACION DEL HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA

Cuatro ratas macho cepa CDI con un peso aproximado de 200 g

Aroclor 1254

20 ml de aceite de maíz

Jeringas desechables de 1 ml por cada rata

Cinco vasos de precipitados de 250 ml estériles

Veinte pipetas de pipetas de vidrio de 10 ml estériles

Dos probetas de vidrio graduadas de 50 ml estériles

tres tijeras de cirugía estériles

Un homogenizador de 50 ml con émbolo de teflón

Una centrífuga

Cuarenta frascos de vidrio de 5 ml con tapón de rosca estériles

Quinientos ml de una solución de KCl 0.15 M estéril

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE PROTEINAS TOTALES EN EL HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA. (32).

1 microjeringa

7 tubos de ensayo de vidrio de 6 ml

7 pipetas de vidrio graduadas de 2 ml

1 pipeta graduada de vidrio de 10 ml

1 pipeta graduada de vidrio de 1 ml

2 matraces aforados de 100 ml

1 espectrofotómetro de barrido

SOLUCIONES

Solución de albúmina sérica bovina 1 mg/ml

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7

PRUEBA DE MUTAGENESIS

Mechero

Cuenta colonias

Cajas petri desechables estériles

Pipetas de vidrio graduadas de 1 ml estériles

Pipetas graduadas de vidrio de 0.1 ml estériles

Pipetas graduadas de vidrio de 5 ml estériles

Pipetas desechables de 1 ml

Pipetas desechables de 5 ml

Pipetas desechables de 10 ml

Tubos de ensayo de vidrio de 13X100 mm con tapón de rosca - estériles.

Tubos de ensayo desechables de 15 ml

Guantes desechables

Baño de agua a 45°C

Estufa a 37°C para la incubación de las cajas

Incubador con agitación

Tubos de ensayo de 13 ml estériles

Tubos de 13 ml con tapón de rosca estériles

Un agitador tipo Vortex

Dos filtros membrana, uno con prefiltro y otro sin él

MEDIOS Y SOLUCIONES EMPLEADOS

Agar de superficie

Medio mínimo "E"

Caldo nutritivo

Soluciones de mutagénos conocidos

Soluciones de la sustancia a probar

Solución amortiguadora pH 7.4

Dimetil sulfóxido (DMSO)

Agua.

DETECCION DE METABOLITOS MUTAGENICOS EN ORINAS

Treinta ratones macho cepa CDI de un peso aproximado de 20- a 25 g

Cinco cajas metabólicas

Hielo y el material mencionado para la prueba de mutagénesis

Filtros membrana con y sin prefiltro

Probetas de 50 ml

SOLUCIONES

Suspensión del fármaco a probar

2-acetilaminofluoreno

beta-glucuronidasa tipo VA 6500 U/ml.

M E T O D O S

PREPARACION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS DE PRUEBA

Las cepas obtenidas por conducto del Dr. Bruce N. Ames se encontraban en pequeños cojincillos impregnados con cultivos recientes de cada una. Estos cojincillos se sumergieron, por separado, en 5 ml de caldo nutritivo contenidos en tubos de ensayo de 15 ml. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante 16 hrs, transcurridas las 16 hrs. de incubación se tomaron alícuotas de 0.8 ml de cada cultivo y se pusieron en frascos de vidrio de 5 ml con tapón de rosca estériles y se añadió 0.07 ml de DMSO, se agitaron y se congelaron rápidamente en hielo seco para guardarse a -70°C en un ultracongelador. De cada cepa se hicieron dos réplicas (11).

Para evitar el congelamiento y descongelamiento frecuente de los cultivos de reserva se hicieron placas maestras para cada una de las cepas de prueba. En cajas de medio completo se sembró en estría una asada del cultivo de la cepa de prueba, una cepa en cada caja, para las cepas que llevan el plásmido de resistencia se esparce en las cajas 800 mcg de ampicilina y se dejan que se absorban en la superficie de la caja. Todas las cajas se incubaron por 24 horas a 37°C y se guardaron en el refrigerador para ser usadas en la preparación de nuevos cultivos. Para esto se tomó una colonia y se suspendió en 5 ml de caldo nutritivo, se puso a incubar a 37°C y 200 rpm durante 16 horas. Se hicie--

ron periódicamente las pruebas de marcadores que a continuación-se describen.

COMPROBACION DE LAS CEPAS DE PRUEBA (11)

1.- Para verificar el requerimiento de histidina en las cepas:

Se sembró una asada de cada una de las cepas bacterianas en cajas de petri con medio mínimo "E" y en cajas - petri con medio mínimo "E_1".

2.- Colonias mutantes espontáneas.

A un tubo con tapón de rosca conteniendo 2 ml de agar - de superficie se agregó 0.1 ml del cultivo a probar, se agitó con ayuda de un agitador vortex y se virtió sobre el medio mínimo "E" distribuyendolo uniformemente. Se-dejo solidificar y se incubó a 37°C por 48 horas.

El número de colonias mutantes espontáneas reportadas - por Ames para cada una de las cepas fué: para TA1535 -- cerca de 20, TA100 160, TA1537 7, TA1538 25, TA98 40. Además de las revertantes espontáneas en las cajas petri de medio mínimo se debe revisar el crecimiento de - colonias microscópicas conocidas como crecimiento de -- fondo (background) que resulta de las trazas de histidina presentes en el agar de superficie pero que conservan su carácter his⁻.

3.- Verificación de la deficiencia de lipopolisacáridos en la pared celular, mutación rfa.

Se probó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Se inoculó una caja con medio mínimo "E_1" con 0.1 ml del cultivo de bacterias y se extendió en la superficie de la caja, se dejó secar y se colocó un disco de papel filtro estéril sobre la superficie del agar al cual se adicionaron 50 microlitros de una solución de cristal violeta (1mg/ml) y se incubó de 18 a 24 hrs. a 37°C. Después de la incubación una zona muy clara de inhibición es observada alrededor del disco, indicando la presencia de mutación rfa. Esta mutación permite que las grandes moléculas, como es el cristal violeta, entren a la bacteria e inhiban el crecimiento. La cepa de tipo silvestre no tiene esta mutación por lo que no es inhibida por el cristal violeta.

4.- Resistencia a ampicilina.

Se realizó una estría en el centro de una caja petri (con medio mínimo "E_1")con 10 microlitros de una solución de ampicilina (8mg/ml), se dejó secar y se adicionó una asada de cada una de las cepas bacterianas atravezando la zona en la que se encuentra la ampicilina, se dejó secar y se incubó a 37°C por 12 a 14 horas.

Después del tiempo de incubación se observó que la cepa TA98 y TA100 no se inhiben con la ampicilina mientras las otras cepas TA1535 TA1537 y TA1538, y la cepa sil-

vestre mostraron inhibición del crecimiento en la línea de ampicilina.

5.- Verificación de la mutación que altera las enzimas encargadas de la reparación del daño causado por la luz ultravioleta.

Se sembró en una caja, conteniendo medio mínimo "E_1", una asada de cada una de las cepas. Se tapa la mitad de la caja con papel aluminio y se irradia el resto de ella con una lámpara germicida GE-15W a 35 cm de distancia durante 6 seg para las cepas TA1535, TA1537, TA1538 y 8 seg para la TA98 y la TA100. Se quita el papel aluminio y se incuba durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación se observa inhibición del crecimiento en la zona expuesta a la luz ultravioleta.

La cepa silvestre no exhibe zona de inhibición.

B) METODO DE PREPARACION DEL HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA

Este homogenado se preparó del modo siguiente:

A cada rata se le aplicó una sola dosis de 500 mg por Kg de peso de una suspensión de Aroclor 1254 en aceite de maíz (200mg/ml) por vía intraperitoneal.

Cinco días después de la inyección, las ratas fueron sacrificadas por un golpe en la cabeza y posterior dislocación cervical.

Los hígados fueron extraídos asépticamente y colocados en vasos de precipitados tarados, estériles conteniendo 15 ml de

solución de KCl 0.15 M. El peso de los hígados se determinó por diferencia. Estos fueron transferidos a un vaso de precipitados conteniendo 3 ml de solución de KCl 0.15 M por gramo de peso de hígado de rata. Ahí mismo se fraccionaron con unas tijeras estériles y después se homogenizaron en un homogenizador de vidrio - con émbolo de teflón.

El homogenado se centrifugó por 10 minutos a 9000 g y el sobrenadante obtenido es llamado fracción S-9. La fracción S-9 se decantó y se distribuyó en porciones de 1 a 2 ml en frascos de - 5 ml estériles los cuales fueron congelados en hielo seco, para- ser guardados a -70°C en un ultracongelador.

C) METODO PARA LA DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DEL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES DEL HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA.

Para este efecto se utilizó el método de Groves (32). Se - preparó una curva patrón de albúmina usando el protocolo presentado en la siguiente tabla.

TUBO	CONCENTRACION FINAL	ALBUMINA*	H_2O mcl	AMORTIGUADOR
1	20 mcg/ml	40 mcl	160	1.8 ml
2	40 mcg/ml	80 mcl	120	1.8 ml
3	60 mcg/ml	120 mcl	80	1.8 ml
4	80 mcg/ml	160 mcl	40	1.8 ml
5	100 mcg/ml	200 mcl	--	1.8 ml

* Solución de albúmina 1 mg/ml

Se hicieron las diluciones del homogenado de hígado de rata como se presenta a continuación.

Se tomó 1 ml de la fracción S-9 y se aforó a 100 ml con solución amortiguadora de fosfatos pH 7 (solución 1); dilución -- 1:100

Se tomaron 10 ml de la solución 1 y se aforaron a 100 ml -- con solución amortiguadora de fosfatos pH 7, teniendo así una dilución 1:1000.

Se leyeron los tubos de la curva patrón y el problema en el espectrofotómetro de barrido a dos diferentes longitudes de onda.

Longitud de onda 1) 224 nm

Longitud de onda 2) 233.3 nm

Se restaron las D.O. a 224 nm de las D.O. a 233.3 nm y se - construyó una gráfica de esadiferencia contra concentración; en- esta gráfica se extrapoló la lectura de D.O. del homogenado (cuyas lecturas recibieron el mismo tratamiento) para obtener la -- concentración proteíca final del homogenado de hígado de rata -- (cantidad de proteínas totales por ml de homogenado de hígado de rata).

Nota: al efectuar los cálculos se consideraron las diluciones hechas del homogenado que se estaba probando.

D) PRUEBA DE MUTAGENESIS

16 horas antes del experimento se sembró la cepa de prueba en - 5 ml de caldo nutritivo y se incubó a 37°C con agitación de 200- rpm.

Se marcaron las cajas de petri con medio mínimo "E" de acuerdo a la planeación del experimento.

Después de transcurridas las 16 horas de incubación se sacaron las cepas del incubador y se les determinó la absorbancia a 450 nm para verificar que correspondiera a: 0.7 para las cepas - TA1537 y TA1538 y 0.8 para las cepas TA1535, TA98 y TA100, trasde lo cual se colocó a los tubos en un baño de hielo.

La mezcla S-9 se preparó inmediatamente antes de usarla y - se mantuvo a una temperatura de 0 a 4°C durante todo el experimento.

El experimento se dividió en dos partes: La primera en la - cual se probó la sustancia sin el sistema de activación metabólica (fracción S-9) y la segunda parte que consistió en probar la- sustancia en presencia de este.

Los tubos conteniendo el agar de superficie se colocaron en un baño de agua hirviente hasta fundirlo y enseguida se colocaron en un baño de agua a 45°C, cuidando que la temperatura se -- mantuviera constante durante todo el experimento.

En los tubos de agar de superficie a 45°C se añadieron 0.1- ml de cultivo fresco de bacterias y enseguida se adicionaron 0.1 mlde la solución del compuesto de prueba y 0.5 ml de solución -- amortiguadora de fosfatos pH 7.4. En el caso de la prueba con - activación metabólica se agregaron 0.5 ml de la mezcla S-9.

Una vez añadidos todos los componentes se agitó rápidamente por rotación entre las palmas de las manos y se vertió el contenido del tubo sobre la superficie del agar de medio mínimo "E".

En el caso de la prueba de transformación metabólica, dadoque la mezcla S-9 es sensible al calor, este paso se hizó lo más

rápidamente posible y se acompañó de una rotación suave de la caja para asegurar una distribución rápida y uniforme del agar de-superficie.

Una vez que se terminaron de sembrar todas las cajas, estas se incubaron a 37°C durante 48 horas al cabo de las cuales se -- cuantificaron las colonias revertantes.

En todos los experimentos se incluyeron cajas control en -- las que las bacterias se expusieron al solvente empleado para disolver los fármacos. En estas cajas se determinó la frecuencia-de reversión espontánea y que la presencia del solvente no aumentara el número de revertantes espontáneas.

E) CONTROLES POSITIVOS

Para todas las pruebas de mutagénesis con y sin el sistema-de transformación metabólica, se incluyeron controles en los que sustancias mutagénicas confirmaron el manejo adecuado del ensayo.

MUTAGENOS QUE NO REQUIEREN ACTIVACION METABOLICA.

Nitrosoguanidina.- para las cepas TA1535 y TA100, a una concentración de 10 mcg/ml.

Acido Picrolónico.- Para las cepas TA1538 y TA98, a una concentración de 1 mg/ml

9-Aminoacridina.- para la cepa TA1537, a una concentración-de 100 mcg/ml

MUTAGENOS QUE REQUIEREN ACTIVACION METABOLICA

N-acetilaminofluoreno.- para las cepas TA1537, TA1538 y -- TA98 a una concentración de 100 microgramos por mililitro.

Ciclofosfamida.- para las cepas de prueba TA1535 y TA100, a una concentración de 5 mg/ml.

F) DETECCION DE METABOLITOS MUTAGENICOS GENERADOS " IN VIVO " EN RATONES EXPUESTOS A LOS FARMACOS

7 días antes de recolectar las orinas para este estudio, se distribuyeron los ratones por el método de culebra japonesa en 6 lotes de 6 ratones cada uno.

Un lote correspondió al control, al cual se le administró - por vía oral el vehículo siguiendo el mismo esquema de tratamiento que para los demás lotes de ratones. Al segundo lote se le - administró una dosis diaria de niclosamida, la primera dosis -- 0.307 g/Kg de peso y los siguientes seis días 0.1538 g/Kg de peso. Al tercer lote se le administró una dosis de 0.0307 g/Kg de peso el primer día y los seis siguientes 0.01538 g/Kg de peso. Al cuarto lote se les administró una dosis de 0.00307 g/Kg de peso el primer día y 0.001538 g/Kg de peso de ratón los siguientes seis días. Al lote cinco se les administró por vía intraperitoneal una suspensión de 2-acetilaminofluoreno un día antes de recolectar las orinas. El último lote se utilizó de control del - control.

Inmediatamente después de la aplicación de la última dosis,

cada grupo de ratones se colocó en cajas metabólicas recolectando las orinas de las siguientes 24 horas.

Una vez colectadas las orinas se procedió a esterilizar por filtro membrana y congelar a -4°C hasta su utilización en la -- prueba de mutagénesis.

La prueba se realizó siguiendo el protocolo que a continuación se presenta:

Cultivo de bacterias (0.1ml)

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.2 ml de orina.

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.1 ml de beta-glucuronidasa

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.5 ml de mezcla S-9

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.2 ml de orina + 0.1 ml de beta -glucuronidasa.

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.2 ml de orina + 0.5 ml de mezcla S-9.

Cultivo de bacterias (0.1 ml) + 0.2 ml de orina + 0.1 ml de beta -glucuronidasa +0.5 ml de mezcla S-9.

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

I.- DETERMINACION DEL CONTENIDO EN PROTEINAS Y ACTIVIDAD METABOLICA DE LOS HOMOGENADOS HEPATICOS.

Se prepararon a lo largo de los experimentos dos homogenados de hígado de rata, determinándose en cada ocasión el contenido de proteínas totales. El resultado de estas determinaciones fué: de 43 mg/ml para el primer homogenado y 36 mg/ml para el segundo, como se indica en las gráficas I y II y tabla I, lo cual concuerda con lo reportado por Ames en 1975 (11), quien menciona que la fracción S-9 deberá contener alrededor de 40 mg/ml de proteínas totales.

Cuando se probó la actividad de cada homogenado con mutágenos conocidos (tabla II), se observó que a pesar de que la concentración de proteínas totales en dichos homogenados es aproximadamente igual, la respuesta es cuatro veces superior para el segundo homogenado en cuanto a la frecuencia de mutación de la cepa TA98 que se obtuvó bajo la acción del 2-acetilaminofluoreno pero se observa que su comportamiento es muy semejante ya que se encontró un máximo de actividad cuando se usaron 10 microlitros de ambos homogenados.

Es importante hacer notar que la cantidad de homogenado requerida para que 2-acetilaminofluoreno induzca la frecuencia máxima de mutación fué de 10 microlitros, mientras que lo que se necesitó para obtener el máximo de actividad del Benzo-a-Pireno fué de 100 microlitros; (Ver tabla II y gráficas III, IV, V y VI)

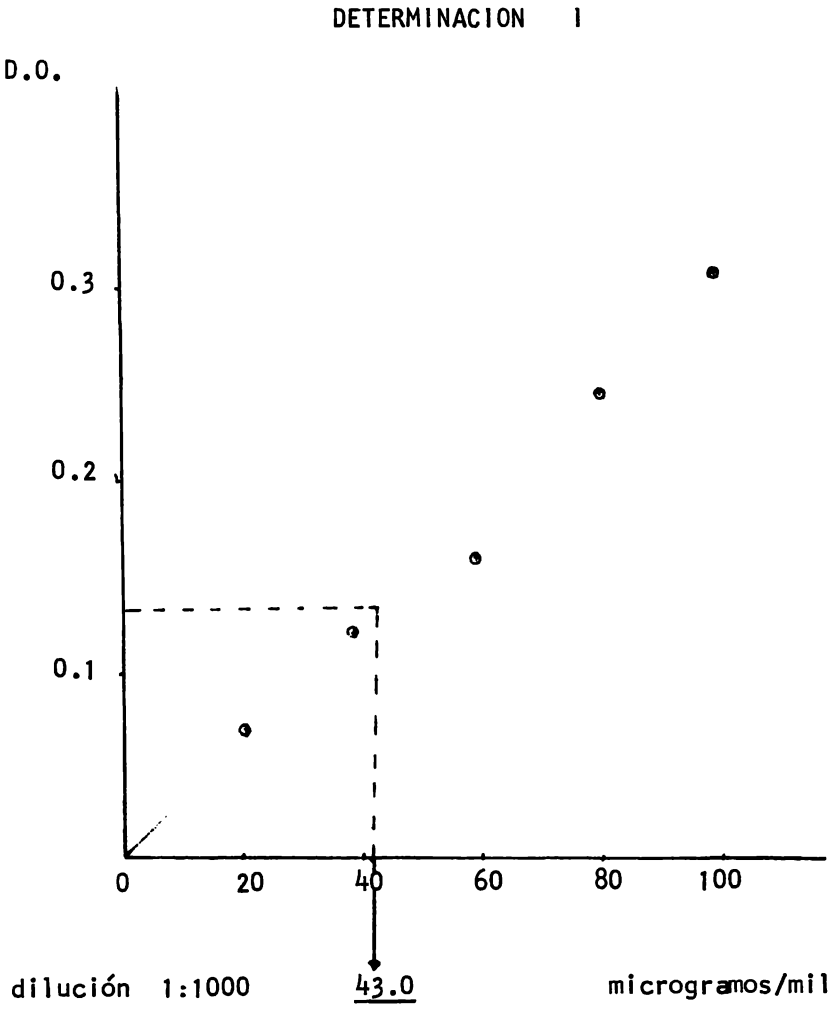
TABLA I. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES EN EL HOMOGENADO DE HIGADO DE RATA

	DETERMINACION I			DETERMINACION II		
Concentración de albúmina	D.O*a 224 nm	D.O.a 233 nm	D.O.a 224 nm / D.O. a 233 nm	D.O. a 224 nm	D.O.a 233 nm	D.O.a 224 nm / D.O a 233 nm
20 mcg/ml	0.122	0.066	0.066	0.174	0.076	0.098
40 mcg/ml	0.32	0.19	0.13	0.34	0.16	0.18
60 mcg/ml	0.438	0.302	0.136	0.505	0.23	0.275
80 mcg/ml	0.618	0.375	0.243	0.67	0.30	0.370
100 mcg/ml	0.78	0.475	0.305	0.82	0.375	0.445
Homogemado de hígado de rata	0.475	0.343	0.132	0.485	0.325	0.160

D.O. = densidad óptica.

Las gráficas correspondientes a los datos anteriores en donde se han extrapolado las lecturas de D.O. para obtener las concentraciones de proteínastotales en los homogenados de hígado de rata se muestran a continuación.

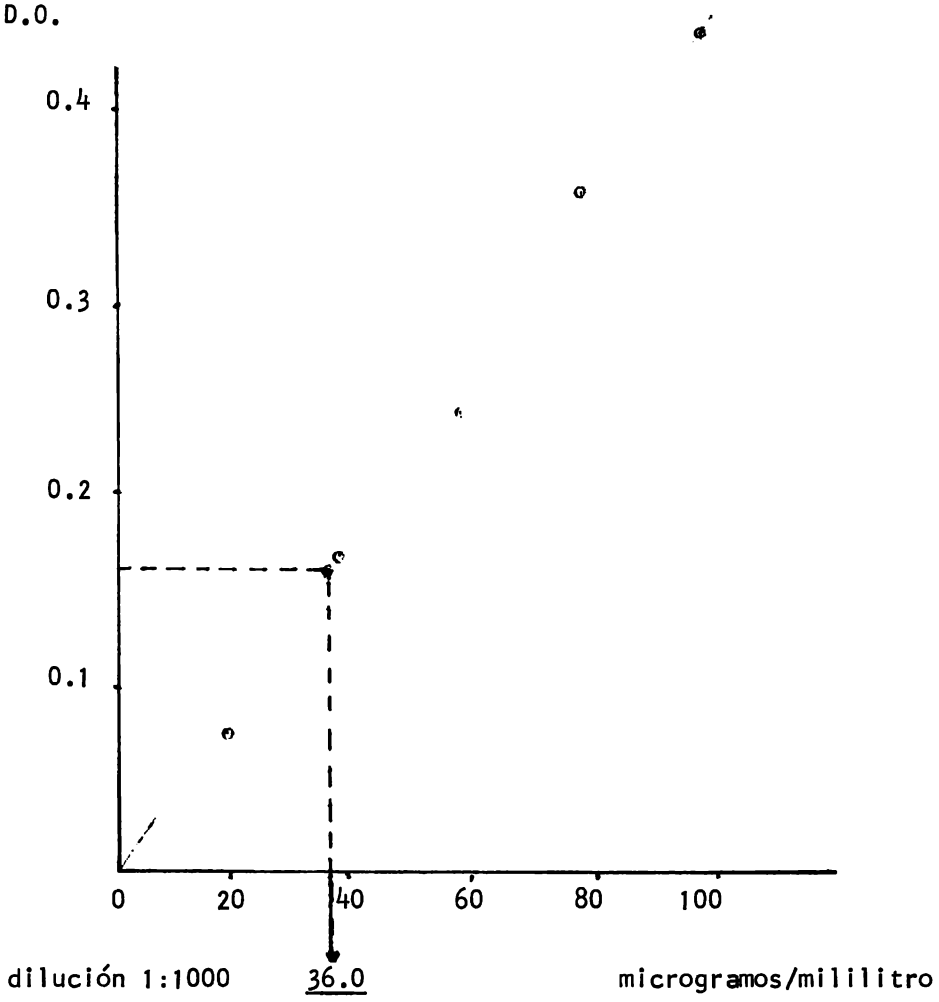
GRAFICA (I) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES



La gráfica anterior nos da la concentración de la última dilución del homogenado. Tomando el factor de dilución encontramos que la concentración de proteínas totales en el homogenado es de 43 mg/ml.

GRAFICA (II) DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS TOTALES

DETERMINACION II



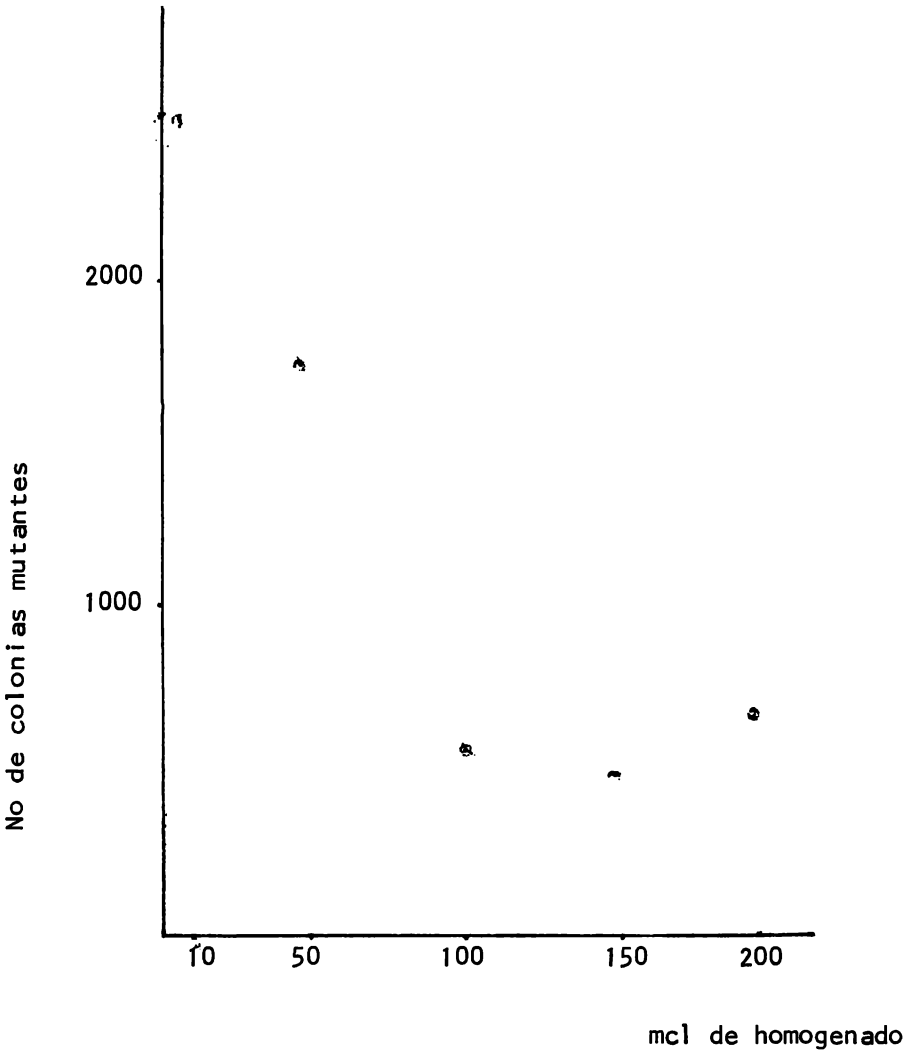
Por interpolación en la gráfica anterior encontramos que la concentración de proteínas en la última dilución del homogenado es de 36 mcg/ml. Tomando el factor de dilución encontramos que la concentración de proteínas totales en el homogenado es de 36 mg/ml.

TABLA II DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD METABOLICA DE LOS HOMOGENADOS *

	1er HOMOGENADO		2° HOMOGENADO	
	2-acetilaminofluoreno cepa TA98	Benzo(a)pireno cepa TA100	2-cetilaminofluoreno cepa TA98	Benzo(a)pireno cepa TA100
Bacteria + 200 mcl de S-9 °	24 ± 6.82	214 ± 9.25	107 ± 6.37	190 ± 11.81
Bacteria	49 ± 3.66	250 ± 2.88	68 ± 4.78	191 ± 4.99
10 mcl de S-9	2532 ± 211.9	428 ± 13	10586 ± 352.76	445 ± 12.83
50 mcl de S-9	1756 ± 252.7	852 ± 24	5164 ± 31.11	840 ± 34.41
100 mcl de S-9	574 ± 16.6	1088 ± 8	1843 ± 216.9	953 ± 50.52
150 mcl de S-9	488 ± 28.29	918 ± 15.8	995 ± 46.16	821 ± 4.32
200 mcl de S-9	653 ± 6.72	1044 ± 28.26	896 ± 62.87	467 ± 22.88

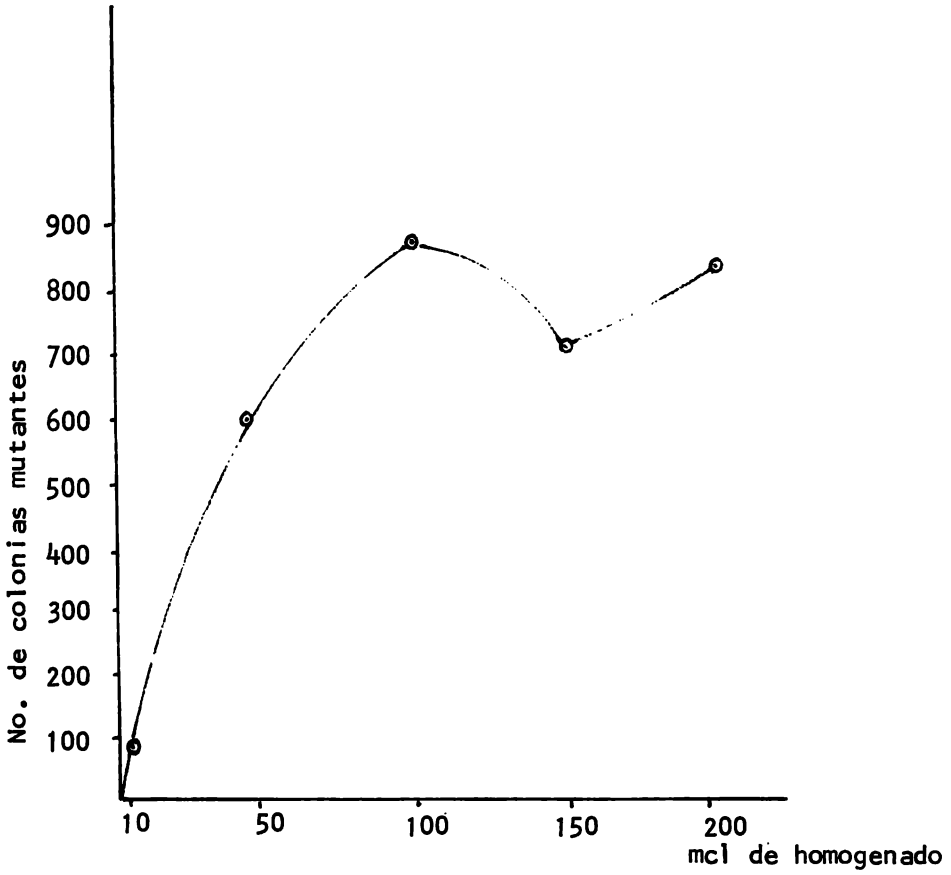
* Los datos de la tabla muestran el promedio del número de colonias mutantes ± error estándar.

GRAFICA III



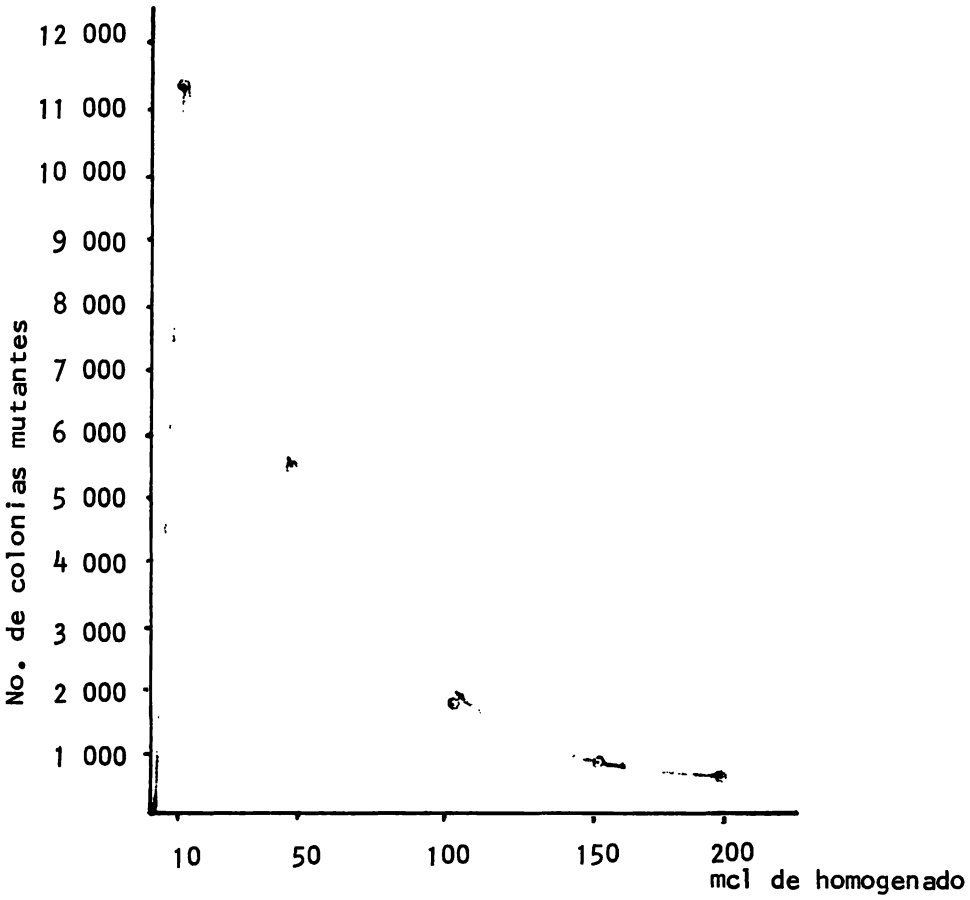
Curva dosis respuesta del primer homogenado con 2-acetilaminofluoreno, utilizando la cepa TA98.

GRAFICA IV



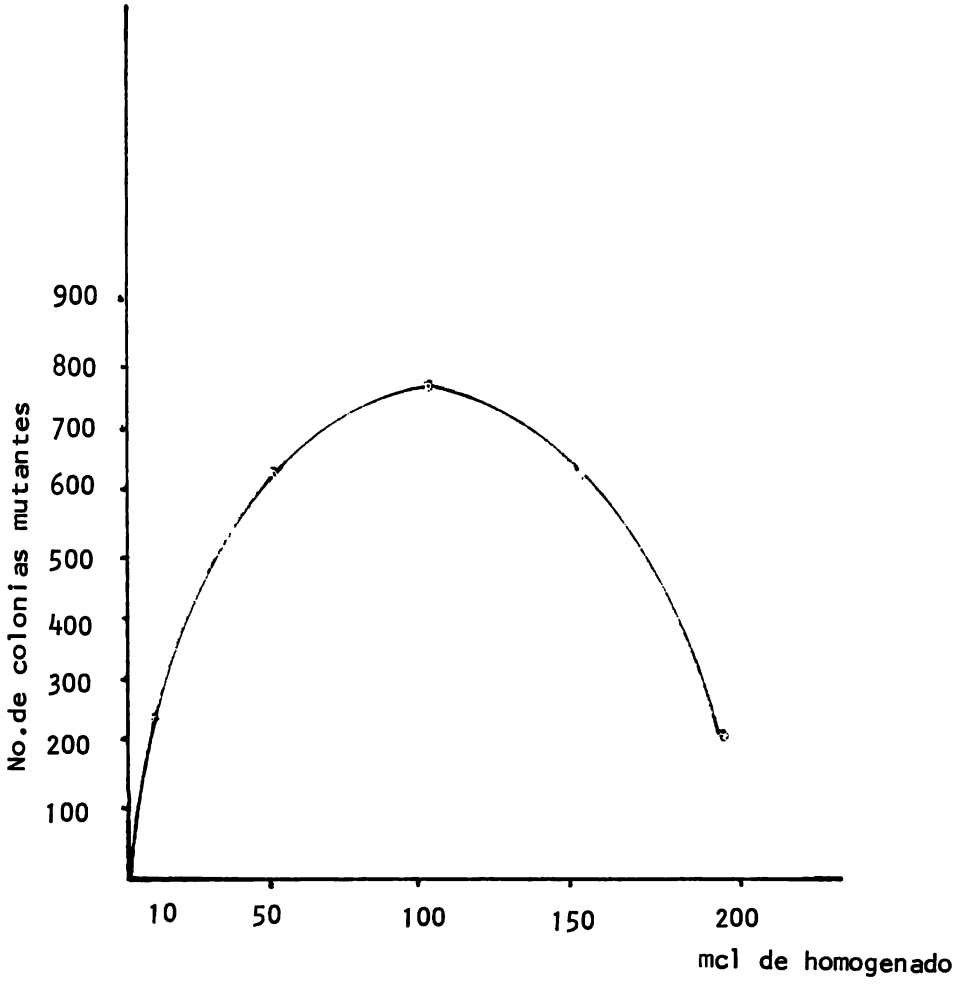
Curva dosis respuesta del primer homogenado con benzo(a)pireno,utilizando la cepa de prueba TA100.

GRAFICA V



Curva dosis respuesta del segundo homogenado con 2-acetilaminofluoreno, utilizando la cepa de prueba TA98

GRAFICA VI



Curva dosis respuesta del segundo homogenado con Benzo(a)pireno, utilizando la cepa de prueba TA100.

Esto plantea que dependiendo del tipo de compuesto el requeri -- miento enzimático para lograr su transformación metabólica sería diferente. Por ello y desconociendo el comportamiento de los fármacos antiparasitarios se optó por emplear en los ensayos una -- concentración intermedia de homogenado hepático equivalente a -- 100 microlitros para el primero y 60 microlitros para el segundo.

II DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE MEDICAMENTOS -- ANTIPARASITARIOS.

Las soluciones de los fármacos en estudio se hicieron usando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente ya que fué en éste en donde se observó la mayor solubilidad. La cantidad de DMSO empleada no incrementa la frecuencia de mutación espontánea (11).

Las concentraciones que se probaron de cada compuesto fueron, la máxima soluble y diluciones hasta mil ó diez mil veces - por debajo de esta como en los casos de Mebendazol, Niclosamida - y Pamoato de Pirantel.

Cuando se hicieron pruebas preliminares con las diluciones de la concentración máxima posible, se observó que la diyodohidroxiquinolina y la Yodoclorohidroxiquinolina (Vioformo)tuviéron un índice de toxicidad elevado, por lo que para el presente estudio se tomó la dilución que tenía una toxicidad mínima escogiendose un rango de concentraciones en el cual la última proporcionaba un número de colonias mutantes, dicho fenómeno era aproximadamente igual al número de colonias que mutaron espontáneamente.

Las cepas bacterianas usadas para detectar la actividad mu-

tagénica de los compuestos probados fueron TA1535, TA1537, TA1538 TA98 y TA100.

En las tablas III, IV, V, VI, y VII, se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de mutagénesis efectuados con: Diyodohidroxiquinolina, Vioformo, Mebendazol, Pamoato de Pirantel y Niclosamida. Solamente se observó una respuesta mutagénica con la niclosamida en las cepas TA1538 y TA98, mientras que los demás fármacos no dan respuesta mutagénica alguna.

Si se considera el número de colonias mutantes espontáneas - obtenidas en los diferentes experimentos sin homogenado hepático- se obtuvieron en promedio los siguientes valores:

CEPA	TA1535	TA1537	TA1538	TA98	TA100
PROMEDIO	38	15	20	49	177
RANGO	18-72	10-33	17-23	20-60	113-258
VALORES REPORTADOS POR AMES.	20	7	25	40	160

En el caso de la Diyodohidroxiquinolina y del Vioformo tablas III y IV, la concentración máxima empleada fué de 30 microgramos por placa ya que a dicha concentración hay una mortalidad elevada, especialmente en el caso de Vioformo ya que en todas las cepas sin activación metabólica la mortalidad fué del 100 %. Esto no sucedió en las placas en los cuales se adicionaron los microsomas hepáticos lo que sugiere detoxificación metabólica.

En el caso del Mebendazol(Tabla V), en un primer experimen-

to con la cepa TA1535 se obtuvo un incremento de más del doble - en la frecuencia de mutación espontánea en ausencia de homogenado hepático. Sin embargo estos datos no se pudieron confirmar en un- segundo experimento con la misma cepa ni en dos experimentos con- la cepa TA100 que es similar a la cepa TA1535 salvo que posee un- plásmido que incrementa su sensibilidad a los mutágenos.

En cuanto al Pamoato de Pirantel se refiere se puede obser-- var que fué el fármaco en el que se utilizó la mayor concentraci- ón sin obtener respuesta tóxica significativa.

La concentración más alta dentro de la series de diluciones- de Pamoato de Pirantel, usada en el experimento, fué la permitida por las condiciones del fármaco ya que al aumentarla se presenta- ba problemas de solubilidad. En estas condiciones el compuesto no mostró actividad mutagénica alguna. En cuanto a la Niclosamida, - se observó respuesta mutagénica con la cepa TA1538 en presencia - de activación metabólica con el lote I, tabla VII.

Cuando se utilizó la cepa de prueba TA98 con activación meta bólica se obtuvo una respuesta mutagénica con los dos lotes del - fármaco siendo cuantitativamente más alta la respuesta mutagénica del lote uno que la del lote dos.

De acuerdo a lo postulado por Ames (11) para la confirmación de la mutagenicidad del compuesto se realizó una curva dosis-res- puesta. Los rangos de concentración usados para realizar estos ex perimentos se determinaron observando que la concentración diez - veces arriba de la que da respuesta mutagénica es tóxica para las bacterias y que la concentración diez veces abajo de la que da -- respuesta mutagénica empieza a manifestar el efecto. Estas concen

traciones fueron: 1, 5, 10, 25 y 50 microgramos por placa, los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla VIII y su comportamiento en la gráfica VII.

En el estudio para detección de metabolitos mutagénicos "in-vivo" muestran que:

A) A la dosis diez veces menor a la equivalente usada en terapéutica humana, la orina de ratones, no dió resultados positivos.

B) A la dosis equivalente a la terapéutica humana se encontraron mutágenos conjugados con glucurónidos que incrementaron el número de colonias mutantes.

C) A la dosis diez veces superior a la terapéutica se detectaron mutágenos no conjugados que elevaron más de tres veces el número de colonias mutantes espontáneas. (Ver tabla IX).

Revisando la literatura encontramos que tres de los compuestos probados en este trabajo ya habían sido estudiados.

Niclosamida y Pamoato de Pirantel en Australia por MACPHEE y col. en 1977 usando el sistema de prueba de Ames modificado(45) en el cual se horadaban las cajas que ya estaban inoculadas con bacterias, se sellaba la parte baja de los pozos hechos y en éstos se adicionaban la solución del compuesto y la mezcla S-9. La respuesta se obtiene observando un halo de crecimiento alrededor de los pozos. Y el Vioformo en Italia por Margherita Bingnam y col. en 1974 en el sistema de prueba Aspergillus nidulans (46) quienes reportaron una respuesta positiva para este compuesto.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo. Sólo el pirantel coincide con lo ya reportado.

En lo que se refiere al Vioformo, encontramos que, en primer lugar el sistema de prueba empleado no es el mismo, y el daño genético medido es diferente, es decir, en el sistema de prueba bacteriano de Ames se miden mutaciones puntuales mientras que en el de Aspergillus nidulans mide daño genético a nivel cromosómico (no disyunción).

Podemos pensar que en el sistema de prueba bacteriano Salmonella/microsomas hepáticos no hay expresión de la actividad mutagénica debido a toxicidad elevada. Por lo tanto, en caso de que este fármaco tuviera alguna actividad mutagénica, a concentraciones muy cercanas a la tóxica, el efecto mutagénico no se va a poder expresar debido a que el microorganismo es seriamente dañado ocasionando su muerte. A concentraciones menores del fármaco -- puede suceder que no se alcancen los niveles adecuados de concentración dentro de la célula bacteriana, para que se produzca una mutación (23) (36) (60).

Como el trabajo donde se reportó que el Vioformo era positivo concluyen que su actividad se debe a la quinolina, entonces - la misma explicación puede aplicarse a los resultados obtenidos- para la diyodohidroxiquinolina.

Con respecto a las diferencias en los resultados presentados en este trabajo y los reportados para la Niclosamida los cuales no son definitivos posiblemente debido a:

1° no dan un rango de concentraciones utilizadas. Esto nos lleva a pensar que pueden presentarse tanto dosis tóxicas como dosis en las cuales no se produzca respuesta mutagénica.

2° La modificación que le hicieron a la prueba de Ames (45) impide que el fármaco este en contacto directo con la -- bacteria desde el inicio de la prueba. Y la respuesta - dependerá del grado de difusión del fármaco.

3° Al adicionar la mezcla S-9 puede haber asociación con -- proteínas que impidan la difusión del metabolito y en con secuencia el resultado obtenido puede ser poco confiable

La comparación de los resultados del Pamoato de Pirantel con los trabajos ya mencionados (45) no pueden hacerse debido - a las consideraciones anteriores.

Con respecto al mebendazol y al pamoato de pirantel creemos que los resultados obtenidos se deben a su escasa solubilidad en agua y tendencia a precipitar en el agar semisólido impidiendo - su acceso a la célula bacteriana, lo que se vera apoyado por la- ausencia de toxicidad.

Estos dos compuestos presentan estructuras químicas que han sido identificadas como cancerígenas y mutagénicas (heteroátomo arómatico y fenilo) (63), lo que implica que este estudio no es- definitivo para establecer un criterio en relación del potencial mutagénico de estos compuestos.

Tratando de encontrar si la actividad mutagénica "in vitro" de la Niclosamida, es la misma "in vivo" se hizó el estudio en - orina de ratones, este nos demostró la presencia de mutágenos en la orina de los ratones a los que se les administró Niclosamida, tanto libres como conjugados en forma de beta-glucuronidos. La- concentración de metabolitos mutagénicos producidos en el ratón-

TABLA III DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LA DIYODOHIDROXIQUINOLINA *

FARMACO PROBADO	mcg/placa	CEPAS									
		TA1535		TA1537		TA1538		TA98		TA100	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
DIYODOHIDRO-XIQUINOLINA (A)	0	45	373	33	15	18	40	54	69	112	155
	DMSO	43	337	38	15	19	37	57	60-	182	178
	0.3	22	346	36	17	18	32	51	66	57	155
	1.5	47	29 1	41	13	20	33	6	67	155	158
	3.0	53	319	40	10	20	31	54	64	187	162
	9.0	54	230	12	15	14	29	60	65	229	204
	30	39	32	1	12	8	27	36	55	17	175
DIYODOHIDRO-XIQUINOLINA (B)	0	N . D .		11	13	N . D .		26	43	177	235
	DMSO			10	21			18	40	192	203
	0.3			13	16			20	53	184	212
	1.5			9	11			22	41	188	248
	3.0			8	12			23	46	176	237
	9.0			8	17			15	34	191	247
	30			6	14			5	36	132	203

* El número de colonias mutantes corresponde a el promedio de tres cajas.

(B) Se refiere a un segundo experimento

N.D. No se determinó .

TABLA IV DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DEL VIOFORMO *

FARMACO PROBADO	mcg/placa	CEPAS									
		TA1535		TA1537		TA1538		TA98		TA100	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
VIOFORMO (A)	0	28	16	13	----	27	---	33	44	143	164
	DMSO	26	19	18	23	19	47	42	48	220	154
	0.03	24	14	15	19	23	44	30	56	202	142
	0.3	28	13	17	27	25	40	36	42	175	137
	3.0	23	22	18	28	27	40	27	41	186	139
	30	0	4	0	11	0	11	0	37	0	0
(B)	0	N. D.		11	14	17	38	31	54	194	194
	DMSO			19	15	15	37	31	54	192	174
	0.03			15	19	17	26	33	55	186	160
	0.30			12	8	13	38	31	57	170	173
	3.00			5	14	7	21	26	49	201	179
	30.0			0	6	0	11	0	24	13	0

* El número de colonias mutantes corresponde al promedio de tres cajas.

(B) Se refiere a un segundo experimento.

N.D. No se determinó .

TABLA V DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DE MEBENDAZOL*

FARMACO PROBADO	mcg/placa	CEPAS									
		TA1535		TA1537		TA1538		TA98		TA100	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
MEBENDAZOL (A)	0	18.0	43.0	10.0	12.0	23.0	51.0	57.0	73.0	258.0	248.0
	DMSO	28.0	59.0	7.0	11.0	23.0	38.0	61.0	73.0	271.0	267.0
	0.15	56.0	39.0	12.0	15.0	15.0	46.0	57.0	77.0	215.0	193.0
	1.50	75.0	59.0	9.0	19.0	13.0	35.0	53.0	55.0	218.0	232.0
	15.0	45.0	42.0	8.0	16.0	22.0	54.0	55.0	77.0	237.0	196.0
	150	37.0	67.0	12.0	15.0	17.0	45.0	55.0	72.0	256.0	195.0
MEBENDAZOL (B)	0	38.0	20.0	13.0	14.0	18.0	42.0	31.0	51.0	224.0	201.0
	DMSO	28.0	23.0	13.0	19.0	18.0	44.0	24.0	41.0	172.0	201.0
	0.15	28.0	17.0	13.0	15.0	22.0	47.0	28.0	45.0	111.0	207.0
	1.50	37.0	18.0	15.0	18.0	16.0	48.0	27.0	40.0	107.0	196.0
	15.0	34.0	19.0	12.0	20.0	22.0	29.0	24.0	36.0	111.0	191.0
	150.0	37.0	22.0	11.0	18.0	20.0	33.0	22.0	47.0	98.0	197.0

* El número de colonias mutantes corresponde al promedio de tres cajas.

(B) Se refiere a un segundo experimento.

TABLA VI DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA DEL PAMOATO DE PIRANTEL

FARMACO PROBADO	mcg/placa	C E P A S									
		TA1535		TA1537		TA1538		TA98		TA100	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
PAMOATO DE PIRANTEL (A)	0	26	57	17	21	19	46	66	56	467	399
	DMSO	26	54	8	23	21	28	55	56	520	459
	0.75	20	67	14	16	18	36	52	49	259	334
	7.5	20	74	14	20	17	38	55	54	261	466
	75	20	72	16	22	20	30	48	57	187	464
	750	14	41	12	19	18	23	53	53	270	486
	7500	12	21	16	17	22	18	62	43	325	403
(B)	0	N . D .		12	14	23	57	40	47	136	130
	DMSO			12	18	23	51	45	49	136	133
	0.75			15	18	17	57	38	43	132	112
	7.50			13	16	17	68	40	50	125	123
	75.0			15	19	15	54	42	53	117	131
	750			12	19	14	40	48	46	143	129
	7500			12	18	15	21	41	35	---	-----

* Los números de colonias mutantes corresponde al promedio de tres cajas

(B) Se refiere al segundo experimento.

N.D. No se determinó.

TABLA VII ACTIVIDAD MUTAGENICA DE DOS LOTES DE NICLOSAMIDA DE DIFERENTES * CASAS COMERCIALES

FARMACO PROBADO	mcg/placa	C E P A S							
		TA1538		TA98		TA100		TA1535	
		-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9
NICLOSAMIDA LOTE I	0	19	35	47	39	256	291	N . D .	
	DMSO	27	33	31	43	262	318		
	0.1	25	41	36	55	386	332		
	1.0	28	7	37	84	323	371		
	10.0	3	<u>379</u>	37	<u>352</u>	378	5		
	101	0	0	0	1	0	135		
NICLOSAMIDA LOTE II	0	N .D .		32	32	256	202	72	76
	DMSO			43	48	219	170	74	62
	0.1			53	50	189	190	47	55
	1.0			28	62	213	162	74	56
	10.0			18	<u>192</u>	116	232	0	45
	101			0	0	0	0	0	0

* El número de colonias mutantes corresponde al promedio de tres cajas.

Los resultados subrayados corresponden a la respuesta positiva de la Niclosamida.

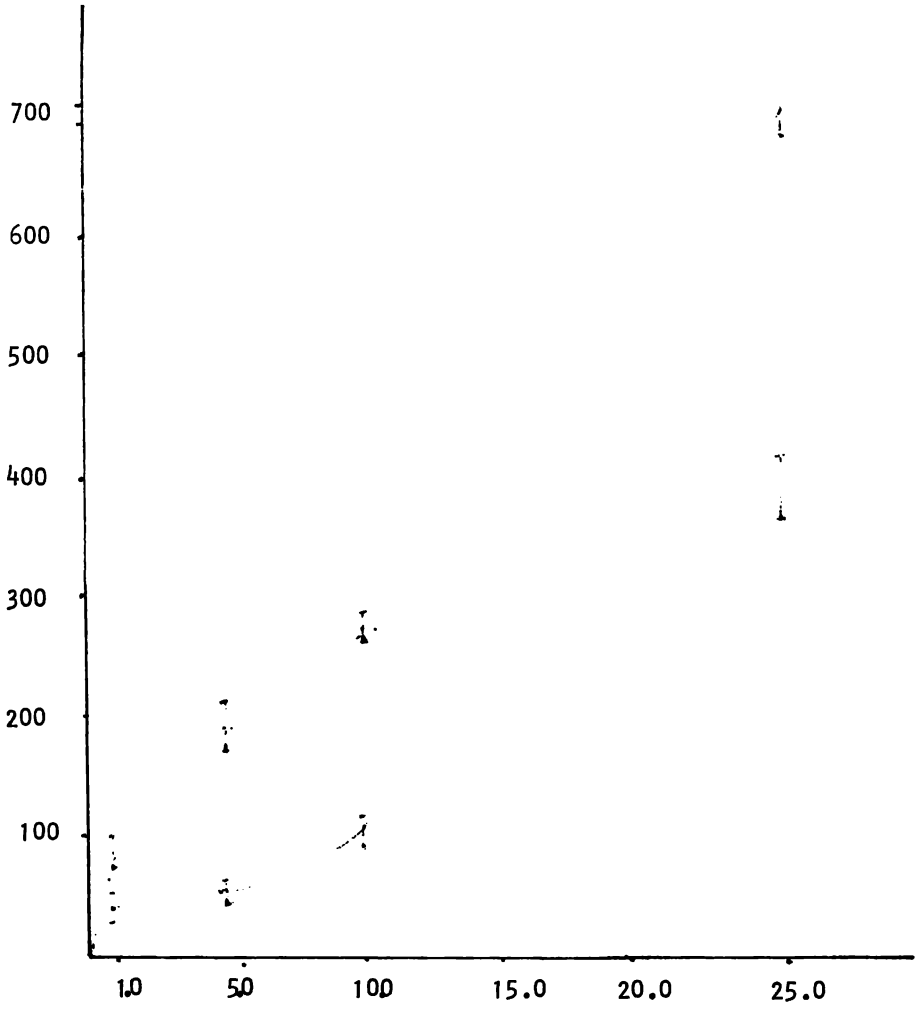
N.D. No se determinó.

TABLA VIII ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LA NICLOSAMIDA EN FUNCION DE LA DOSIS

	mcg/placa	C E P A TA98	
		-S-9	+S-9
EXPERIMENTO # 1	0	54 ± 6.82	68 ± 4.67
	DMSO	52 ± 3.21	69 ± 2.6
	1	46 ± 8.04	96.6± 3.31
	5	20.3 ± 7.21	189 ± 20.35
	10	10 ± 1.46	278 ± 6.94
	25	5 ± 0	394 ± 26.5
	50	8 ± 4.3	4.6 ± 2.37
EXPERIMENTO # 2	0	20 ± 2.49	25 ± 3.55
	DMSO	15 ± 1.51	21 ± 0.72
	1	20 ± 3.14	41 ± 12
	5	11 ± 2.17	55 ± 4.38
	10	12 ± 2.12	102 ± 11.46
	25	7 ± 1.65	709 ± 26.34
	50	0	56 ± 0

Los números de revertantes corresponden al promedio de tres cajas ± el error estándar
En la gráfica que se presenta a continuación se ha sustraído el número de colonias mutantes del control de bacterias más DMSO.

GRAFICA VII



Curva dosis respuesta de la niclosamida con activación metabólica,utilizando la cepa TA98 con base en los datos de la tabla VIII.

-.-.-.-.-.-.-.-. Experimentó número I. Realizado con el homogenado número I

_____ Experimento número II. Realizado con el homogenado número II

TABLA IX DETERMINACION DE METABOLITOS MUTAGENICOS DE NICLOSAMIDA IN VIVO

	LOTE I CONTROL	LOTE II 0.307 g/Kg 0.1538 g/Kg	LOTE III 0.0307 g/Kg 0.01538 g/Kg	LOTE IV 0.00307 g/Kg 0.001538 g/Kg	LOTE V CONTROL POSITIVO 2-acetilaminofluoreno
BACTERIAS*	45 ± 3.4	---------	----------	----------	----------
BACTERIAS + * GLUCURONIDASA	46 ± 3.0	----------	----------	----------	----------
BACTERIAS + ORINA	47 ± 3.4	151 ± 5.5	66 ± 2.16	55 ± 4.3	93 ± 4.24
BACTERIAS + ORINA + GLUCURONIDASA	49 ± 5.1	43 ± 3.48	126 ± 9.0	48 ± 5.75	103 ± 9.5°

LOTE = grupo de seis ratones

* controles

° los datos mostrados en la tabla se refieren al No de revertantes espontáneas ± error estándar . Los datos subrayados corresponden a las respuestas positivas.

parece ser proporcional a la dosis administrada y se sospecha -- que son toxicos para las bacterias del sistema de prueba a la -- concentración más alta cuando se adiciona beta-glucuronidasa.

Todos los resultados anteriores estan sujetos a las siguientes consideraciones:

a) La toxicidad de las sustancias puede enmascarar su mutagénicidad. En otras palabras el daño ocasionado al organismo de prueba por el fármaco puede ser tan severo - que impida que lleguen a expresarse como mutaciones.

b) Los sistemas de activación metabólica varían entre especies y aun dependiendo de los tejidos de origen afectando la actividad mutagénica de los fármacos. Otro problema es el reproducir totalmente la activación enzimática "in vitro" (15) (19) (25) (26) (51), así como la- imposibilidad de determinar la cantidad exacta de los - cofactores necesarios para la biotransformación óptima- de cada sustancia química que va a ser probada (23).

Además, hay que considerar que durante el proceso de la obtención de la fracción S-9 puede haber una inactivación de elementos del conjunto enzimático que se encuentra en la fracción microsomal. Otra consideración es que la respuesta obtenida va a- depender de la estructura química de las sustancias, así vemos - que los compuestos nitroarómaticos probados en Salmonella typhimurium todos han dado respuesta positiva (63); mientras que al - probar derivados hormonales solamente se han obtenido respuestas negativas (11)

Como se esta usando un sistema microsomal de mamíferos no se puede decir con absoluta confianza que esto se deba a que no son metabolizados, ya que algunos de ellos tienen probada su actividad cancerígena, por lo tanto, lo que podemos pensar es que no existen sitios receptores en las celulas bacterianas (11), para queeste tipo de sustancias puedan ejercer su actividad; además para estos compuestos incluso puede haber problemas de transporte a - nivel de membrana celular.

Se ha reportado a sí mismo que agentes no cancerígenos pueden dar una respuesta positiva en el sistema de Ames lo que puede deberse a que en las bacterias existen sistemas enzimáticos - no presentes en mamíferos, que transforman a ciertos agentes enmetabolitos mutagénicos que obviamente no se han detectado en -- sistemas que hayan usado microsomas hepáticos de mamíferos. Esposible pensar que en el sistema bacteriano existen sitios en el genoma suceptibles de mutación que no esten presentes en los mamíferos y visceversa por lo que esto sea una causa de variación- en la respuesta comparada con otros sistemas.

Además la pérdida del mecanismo de reparación por escisión- puede conducir a una respuesta falsa positiva ya que el grado de mutación que sufren estas bacterias es más alto que el de las cepas silvestres. Es decir, la actividad mutagénica de algunas -- sustancias químicas se amplifica si la eliminación de la alteración producida por esta sustancia es dependiente del sistema de- reparación por escición.

Otro punto a considerar es la presencia de contaminantes en

las sustancias que se esten probando que puedan eventualmente -- ser las responsables de provocar una respuesta falsa positiva -- (23) (27).

Por último consideraremos que la concentración de la sustancia de prueba dentro de la célula debe alcanzar niveles que permitan su interacción con el material genético para producir una- respuesta positiva. La asociación del fármaco o de sus metabolitos con proteínas, ya sea de la mezcla S-9 o de la misma bacteria puede a su vez alterar sus propiedades fisicoquímicas, (6) y disminuir su accesibilidad al ADN.

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

De los cinco compuestos probados solo uno, la Niclosamida - resultó ser un agente mutagénico que actúa mediante el mecanismo de corrimiento fuera de fase. Esta actividad mutagênica no se - debe al fármaco como tal sino que sufre una biotransformación co mo se demostró en los experimentos hechos tanto "in vitro" como- "in vivo".

Al analizar la estructura química de la Niclosamida se en-- contró que presenta grupos funcionales (nitroarómaticos, aminas- arómaticas, fenilo) que han sido considerados como altamente can cerígenos.

Como ya se ha mencionado todos los fármacos probados en este trabajo poseen estructuras que hacen sospechar su capacidad de - producir daño genético por lo que su estudio se deberá continuar en otros sistemas de prueba.

Tomando en cuenta la correlación mutagénesis-carcínogénesis señalados en los trabajos de Ames podemos concluir que esta prue ba nos sirve como ayuda para la evaluación del riesgo potencial, del consumo de fármacos que presenten actividad mutagênica.

Aunque los resultados obtenidos no se pueden extrapolar di- rectamente al hombre, se deben tomar precauciones en el manejo - de estos fármacos dada la universalidad del material genético, - hasta que no sean completados los estudios en otros sistemas.

De acuerdo a los análisis anteriores la prueba de Ames es - útil, rápida y económica por lo que proponemos que se realice co mo un elemento más para la evaluación de la inocuidad de los -- fármacos a los cuales la población esta expuesta continuamente.

A P E N D I C E

1.- Caldo Nutritivo para cultivos

Contiene:

Caldo nutritivo Bacto		8.0 g
NaCl		5.0 g
Agua destilada	cbp	1.0 litros

Los ingredientes se disuelven en el agua destilada, y a continuación se reparte a razón de 100 ml en frascos de 125 ml con-tapón de rosca; estos se esterilizan en una autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Una vez esterilizados se guardan en un refrigerador a 4°C ó a temperatura ambiente.

2.- Medio Vogel-Bonner "E" (50X)

Contiene:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10.0 g
Acido cítrico.H_2O	100.0 g
K_2HPO_4 (anhidro)	500.0 g
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	175.0 g

Los componentes se disuelven sucesivamente, en el orden indicado arriba, en 500 ml de agua, cuando todos esten disueltos - se ajusta el pH a 7 y se afora a 1 litro. A este medio se le -- agrega 1 ml de cloroformo para evitar contaminaciones.

3.- a) Medio Mínimo "E"

En un matraz erlenmeyer de 1000 ml se ponen 7.5 g de bacto-agar y agua destilada hasta 300 ml. Por otro lado en matraces - erlenmeyer de 125 ml se ponen 10 g de glucosa y agua destilada - hasta 100 ml. En otra serie dc matraces de 125 ml se pipetean- 10 ml de medio Vogel-Bonner "E" (50X) y adiciona agua hasta 100- ml. Todos los matraces se esterilizan en una autoclave a 121°C- durante 20 minutos. Cuando ha concluido el tiempo de esterilización y la temperatura es de aproximadamente 60°C se mezclan; 1 - matraz con bacto agar, 1 matraz con glucosa y 1 matraz con Vogel -Bonner "E" (50X) y se reparten en cajas petri estériles desechables de tal manera que a cada una le toque de 25 a 30 ml de me-- dio aproximadamente.

b) Medio Mínimo "E_1"

Es el medio mínimo "E", al cual se le adicionan 10 ml de - solución de Histidina 0.1M-Biotina 0.5mM por cada 100 ml de me-- dio "E".

4.- Agar de Superficie

Contiene por cada 100 ml.

Bacto agar		0.6 g
NaCl		0.5 g
Agua destilada	cbp	100.0 ml

En frascos con tapón de rosca de 125 ml se colocan 0.6 g de bacto agar y 0.5 g de NaCl, agua destilada cuanto baste para 100 ml, estos frascos se esterilizan a 121°C por 20 minutos en una - autoclave y cuando se enfrían se guardan a temperatura ambiente.

Cuando se vaya a utilizar el agar de superficie, se funde y se adicionan 10 ml de solución de clorhidrato de L-histidina 0.5 mM-Biotina 0.5mM, esterilizada por filtración en membrana; este-agar de superficie se reparte en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca, de tal manera que cada tubo contenga 2 ml de agar de su-- perficie.

SOLUCIONES

5.- Solución de Histidina 0.1M-Biotina 0.5mM

Clorhidrato de L-histidina		2.1 g
Biotina		0.0122 g
Agua destilada	cbp	100.0 ml

Disolver en agua destilada y esterilizar usando filtro membrana de 0.2 micras de porosidad y guardar a 4°C y en la oscuridad.

6.- Solución de Histidina-Biotina 0.5 mM

L-histidina•HCl		0.11 g
Biotina		0.0122 g
Agua destilada	cbp	100.0 ml

Disolver y esterilizar usando filtro membrana de 0.2 micras de porosidad. Guardar en la oscuridad a 4°C

7.- Mezcla S-9

Cada mililitro de mezcla S-9 contiene:

Fracción S-9	0.1 a 0.4 ml
$MgCl_2$	8 micromoles de una solución 0.4M
KCl	33 micromoles de una solución 1.65M
NADP	4 micromoles
Glucosa-6-fosfato	5 micromoles
buffer de fosfatos	cbp 1 ml pH 7.4 0.2M

Solución de cofactores $MgCl_2$ 0.4M-KCl 1.65M

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	40.66 g
KCl	61.5078 g
Agua destilada	cbp 500.0 ml

Se prepara la solución de sales y se toman 0.2 ml de solución para cada ml de mezcla S-9

Solución Amortiguadora de fosfatos pH 7.4 0.2M

Para hacer este amortiguador se preparan dos soluciones:

Solución (A)

Na_2HPO_4 0.2M ó	28.36 g/1000ml
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 0.2M	71.64 g/1000ml

Solución (B)

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 0.2M	27.60 g/1000ml

Una vez preparadas estas soluciones, se mezclan 81 ml de la solución (A) con 19 ml de la solución (B) para obtener la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (ajustar pH)

De acuerdo con la composición de la mezcla S-9, ésta se prepara de la siguiente manera:

Se pesa la glucosa-6-fosfato y el NADP de acuerdo a las siguientes equivalencias y cantidad de mezcla S-9 que se quiera preparar:

NADP 4 micromoles/ ml	0.0029736 g
Glucosa-6-fosfato 5 micromoles/ ml	0.0013 g

Las sustancias pesadas se disuelven en solución amortiguadora, se adiciona la cantidad necesaria de solución de $MgCl_2$-KCl y enseguida se agrega la fracción S-9, por último la mezcla S-9 se esteriliza por filtro membrana con prefiltro y se pone en baño de hielo.

Para determinar la cantidad de fracción S-9 que se requiere por mililitro de mezcla S-9 se hace una curva dosis-respuesta usando mutágenos conocidos para las cepas TA98 y TA100.

8.- Solución de Aroclor 1254 200mg/ ml

Aroclor 1254		1 g
Aceite de maíz	cbp	5 ml

9.- Solución de KCl 0.15 M

KCl	5.6 g

H_2O destilada	cbp	500 ml

10.- Solución de cristal violeta

Cristal violeta		1 mg
Agua destilada	cbp	1 ml

11.- Solución de albúmina sérica bovina

Albúmina		10 mg
Agua desionizada	cbp	10 ml

Se disuelve la albúmina en el agua desionizada evitando que se produzca espuma.

12.- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.0

NaH_2PO_4		4.259 g
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$		5.1299 g
Agua destilada	cbp	500.0 ml

Se disuelven las sales en el agua destilada y se ajusta el pH se afora a 500 ml.

SOLUCIONES DE MUTAGENOS PARA CONTROLES POSITIVOS

NITROSOGUANIDINA

Se pesaron 10 mg de nitrosoguanidina y se disolvieron en 10 ml de agua destilada SOL A

Se tomó un mililitro de la solución A y se llevó a 10 ml con agua destilada. SOL B

Se tomó un mililitro de solución B y se llevó a 10 ml con agua destilada, teniendo una concentración final de 10 microgramos por 0.1 ml

AMINOACRIDINA

Se pesaron 10 mg de aminoacridina y se disolvieron en 10 ml de etanol SOL A.

Se tomo un mililitro de solución A y se aforó a 10 ml con etanol. Teniendo una concentración de 100 microgramos/ml.

ACIDO PICROLONICO

Se pesaron 10 mg de ácido picrolonico y se disolvieron en 10 ml de etanol, teniendose una concentración de 100 microgramos/0.1 ml.

N-ACETIL AMINO FLUORENO

Se pesaron 10 mg de N-acetilaminofluoreno y se disolvieron en 10 ml de DMSO SOL A.

Se tomó un mililitro de solución A y se aforó a 10 ml- obteniendo una concentración de 100 microgramos/ml

CICLOFOSFAMIDA

Se pesaron 10 mg y se disolvieron en 2 ml de agua destilada, obteniendose una concentración de 5mg/ml.

BENZO (a) PIRENO

Se pesaron 10 mg y se disolvieron en 10 ml de DMSO -- SOL A.

Se tomó 1 ml de la solución A y se aforó a 10 ml con - DMSO obteniendo una concentración de 100 microgramos/ml.

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

1.- Advice on screening of Chemicals for mutagenicity
ICPEMC Publication N° 2
Mutation Research 64 (1979) 155-158

2.- ALBERT L. LEHNINGER
Bioquímica
6ª reimpresión 1976
Ed. Omega.

3.- ARTHUR KORNBERG
Síntesis del DNA
Ed. Blume 1978

4.- AVRAM GOLDSTEIN, LEWIS ARONOW, SUMMER M. KALMAN
Farmacología
Ed. Limusa, México 1979.

5.- BARRY COMMONER; ANTHONY J.V. THAYATHIL
Detection of metabolic carcinogen intermediates in urine of carcinogens-fed rats by mean of bacterial mutagenesis.
Nature, vol 249 Jun 28 (1974) 850-853.

6.- E.J. BARRY AND H.R. GUTMANN
Interaction of aromatic amines with rat liver proteins "in vivo".
Journal of Biological Chemistry, vol 241 (1960) 1600-1609

7.- Biosíntesis de Proteínas y el Código Genético
Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico
Dpto. de Asuntos Científicos
Secretaria General de la O.E.A.
Serie de Biología Monografía 10

8.- M BORSONYI, A. FERENCZ, A. SURJAN, A. PINTER, L. NADASDI
P.P. ROLLER, G. TOROK and K. KISS
Mutagenicity of N-nitrosopiridinol carbamate with the
Salmonella/mammalian microsome test.

9.- BRITISH PHARMACOPEIA 1973
London Her Masestys

10.- BRUCE N. AMES
The detection of carcinogens as mutagens the Salmonella/microsome test.

11.- BRUCE N. AMES and JOYCE Mc. CANN
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the
Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test.
Mutation Research 31 (1975) 347-364.

12.- CHANG CHIU CHENW
Mutagenicity testing with Salmonella typhimurium strains
II the efect of unusual phenotypes on the mutagenic response.
Mutation Research vol 28 (1975) 31-35

13.- CHUNG S. YANG

Interactions between solubilized Cytochrome P-450 and Hepatic Microsomes.

Journal of Biological Chemistry N°1 issue of January 10 (1977) 293-298

14.- E.G.C. CLARKE

Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and post mortem

vol 1 y 2

The Pharmaceutical Press London 1974 y 1975.

15.- A.H. CONNEY

Pharmacological implication of microsomal enzyme induction

Pharmacological Reviews vol 19 N°3 (1967) 317-366.

16.- CHRISTIAN MALAVEILLE

Some factors determining the concentration of liver proteins for optimal mutagenicity of chemical in the Salmonella/ /microsome assay

Mutation Research 63 (1979) 245-258

17.- CRISTINA CORTINAS DE NAVA, PATRICIA OSTROSKY, SILVIA C. GALVAN.

Principios de Mutagénesis y su relación con carcinogénesis y Teratogénesis

Instituto de Investigaciones Biomédicas

U.N.A.M. 1979.

18.- CRISTINA CORTINAS DE NAVA, R. ALVAREZ CHACON
Posibles fuentes de riesgo en el consumo de Amebicidas y Antihelmínticos
Instituto de Investigaciones Biomédicas
U.N.A.M. 1980

19.- M. DANNY BURKE
Metabolism of Benzo (a) Pyrene with insolated hepatocytes and the formation an degradation of DNA bindings derivates
Journal of Biological Chemistry vol 252 N°18 issue of September 25 (1977) 6424-6431

20.- DAVID B. COUCH and M.A. FRIEDMAN
Suppression of dimethyl nitrosamine mutagenicity by sodium nitrite
Mutation Research 26 (1974) 371-376

21.- J. DAYAN Mc. CRAJER
Aplication of the Salmonella typhimurium microsome test to study of 25 drugs belonging to 5 chemical series
Mutation Research 77 (1980) 302-306

22.- DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS
26ª Edición Mexicana 1980
Editorial PLM

23.- DIETHER NEUBERT
The toxicological evaluation of mutagenic event.

24.- EDITH YAMASAKIO and BRUCE N. AMES
Concentration of mutagens from urine by adsorption with the non polar resin XAD-2 cigarette smokers have mutagenic urine
Proc. Nat. Acad. Sci. vol 174 N°8 (1977) 3555-3559

25.- ERROL ZEIGER, R. AJENDRAS CHHABRA
Effects of hepatics S-9 fraction from aroclor 1254 treated-rats on the mutagenicity of Benzo (a) pyrene and 2-amino an tracene in the Salmonella/microsome assay
Mutation Research 64 (1979) 379-389.

26.- First Annual Course in the Principles and Practices of Gene tic Toxicology
University of Texas Medical Branch Galveston Texas.

27.- FLANM MEHLMAN
Advances in Modern Toxicology vol 5
John Wiley & Sons N.Y. London 1978.

28.- D. FLORA and V. BOIDO
Effects of human gastric juice on the mutagenicity by chemi cals.
Mutation Research 77 (1980) 307-315

29.- FREDERIK J. de SERRES
The Salmonella mutagenicity assay recomendations
Science vol 203, 9 february 1979 563-565.

30.- FREDERICK J. de SERRES and M.D. SHELBY
Recomendations on data production and analysis using the --
Salmonella/microsome mutagenicity assay
Mutation Research 64 (1979) 159-165

31.- GOODMAN and GILMAN
Bases Farmacológicas de la Terapéutica
5ª Edición, Editorial Interamericana.

32.- W.E. GROVES, FRANCIS C. DAVIS, Jr., and BRUCE H. SELLS
Spectrophotometric Determination of microgram quantities --
of protein without Nucleic Acid interference
Analytical Biochemistry 22 (1968) 195-210

33.- HEALT WATSON WINSTEIN
Origens of Human Cancer
Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation Vol 4
book B Mechanism of Carcinogenesis (1977)

34.- HEALT WATSON WINSTEIN
Origens of Human Cancer
Cold Spring Harbor conferences on cell proliferation Vol 4
book C Human Risk assessment (1977).

35.- T.A. HINCE and S. MEALE
Phisiologycal modification of alkylating-agent induced mu-
tagenesis and effect of growth rate and repair capacity on
nitroso methylurea induced mutation of Escherichia coli.

Mutation Research 46 (1977) 1-10

36.- INA E. MATTERN
Report of Workshop on bacterial "in vitro" mutagenicity tester systems.
Mutation Research 53 (1978) 369-378

37.- Informe Epidemiológico Anual
S P M vol XXI N°Sep-Oct 1979

38.- JORGE TAY, PAZ Ma SALAZAR
Frecuencia de las Parasitosis intestinales en México
S P M Epoca V vol XX N°3 May-Jun 1980

39.- JOYCE Mc CANN, NEILE SPINGARN
Detection of carcinogens as mutagens; bacterial tester --- strains with factor plasmids
Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 72 N°3 (1975) 979-983.

40.- JULIAN A. PETERSON, RONALD E. WHITE.
Evidence that purified liver microsomal cytochrome P-450 is a one electron aceptor
Journal of Biological Chemistry vol 252 N°13 issue 01 July 10 (1977) 4431-4434

41.- R.F. KIMBALL
The relation of repair phenomena to mutation induction in -

bacteria.
Mutation Research 55 N°2 (1978) 100-104

42.- LA DU, MANDEL WAY
Fundamentals of drug metabolism and drug dispotition
Williams & Wilkins Company, Baltimore 1972.

43.- LEGATOR MARVIN, S. MARIE STOECKEL
Techniques for isolating mutagenic substances from urine -- and bloob of treated mammals using histidine auxotropha of- Salmonella typhimurium as the indicator organism.

44.- LITTER MANUEL
Farmacología experimental y Clínica
5ª Edición, Ed. Ateneo 1975

45.- D.G. MACPHEE and D.M. PODGER
Mutagenicity test on antihelmintics: Microsomal activation of viprinium embonate to mutagen
Mutation Research 48 (1977) 307-312

46.- MARGHERITA BIGNAM, GIORGIO MORPUGO ...
Non-disjuntion and crossing-over induced by pharmaceutical-drugs in Aspergillus nidulans.
Mutation Research 26 (1974) 159-170

47.- MARINEL AMMENHEUSER

Detection of mutagens in the urine of rats following topical aplication of hair dyes.
Mutation Research 66 (1979) 241-245

48.- MARTINDALE the EXTRA PHARMACOPEIA
27th Edition, Edited by Ainley Wade London
The Pharmaceutical press June 1977

49.- MICHAEL P. MARIEITA, ELLIOTS VESELL
Characteritation of cytochrome P-450 dependent aminopyrine-n-demethylase in rat brain: Comparison with hepatic aminopirine n-demetilation
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics--Vol 208 N° 2 (1979)

50.- MOSHE BRACHA
Mutagenicity of p-nitrophenyl guanidinibenzoate on Salmonella typhimurium strain 98
Mutation Research 67 (1979) 81-83

51.- D. MULLER, J. NELLES E. DEPARADE
The acitvity of S-9 liver fractions from seven species in the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test.
Mutation Research 70 (1980) 270-300

52.- OMS INFORME TECNICO
Principios Aplicables a la Investigación experimental de la

acción Teratogénica de los Medicamentos.
N° 364 (1967)

53.- OMS INFORME TECNICO
Principios y Problemas de Evaluación y ensayo de la acción mutagénica de los Medicamentos
N° 482 (1971)

54.- PAUL R. ORTIZ DE MONTELLANO
Self Catalized inactivation of hepatic Cytochrome P-450 -- byphenyl substrates.
Journal of Biological Chemistry vol 225 N°12 Jun 25 (1980) p.p. 5578-5585.

55.- RANER R.C.E. MILLER and J.A. MILLER
Liver microsomal metabolism of aflatoxin B_1 to a reactive - derivate toxic to Salmonella typhimurium TA 1530
Cancer Research 32 (1972) 2058-2066

56.- REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES
Arthur Asoc. Charman Co. 15ª Edition 1975
Mc. Publishing Company

57.- ROBERT E. Mc. MAHON
Assay of 855 test chemicals in the tester strains using a - new modification of the Ames test for bacterial mutagens.
Cancer Research 39 March (1979) 682-693.

58.- ROHAN H. WICKRAMASINGHE
Short-term mutagenicity test systems for detecting carcinogens.
Interciencia vol 5 N°4 (1980) 239-241

59.- SAED HUSSAIN and LARS ENRENBERG
Mutagenicity of primary amines combined with nitrite
Mutation Research 26 (1974) 419-422

60.- Second European Workshop on Bacterial "in vitro"
Mutagenicity test systems (Ames Test meeting 1979)
Mutation Research 74 (1980) 71-75

61.- SERRES, HOLLANDER
Chemicals Mutagens, Principles and methods of their detection Vol 6 Plenium Press N.Y. and London 1980.

62.- F.J. de SERRES, J.R. FOUNTS, J.R. BEND
In vitro metabolic activation in Mutagenesis Testing
North Holland Publishing Co. 1976.

63.- STEPHEN J. RINKUS and MARVIN LEGATOR
Chemical characterization of 465 known or suspected carci - nogens and their correlation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system.
Cancer Research 39 Sep (1979) 3289-3318

64.- TSUNEO OMURA and RYO SATO
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes
Journal of Biological Chemistry Vol 239 N° 7 July 1964

65.- UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP)
XIX Edition, 1975
United States Pharmacopeial Convention Inc.

66.- VIRGINIA MINNISH MSC.
Detection of mutagenic activity in human urine using mutant strains of Salmonella typhimurium.
Cancer Research Vol 38 (1976) 1253-1258.

67.- J.D. WATSON
Biología Molecular del Gen
Fondo Interamericano S.A. 1970

68.- WILLIAM E. DURSTON and BRUCE N. AMES
A simple method for detection of mutagens in urine: Studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA vol 171 N°3 March 1974 737-741

69.- WILLIAM LIJINSKY
Nitrosamines as enviromental Carcimogens
Nature vol 225 January 3 (1970)

70.- WILLIAM LIJINSKY

Reactions of drugs with nitrous acids as a source of carcinogenic nitrosamines.

Cancer Research 34 255-258 January (1974)

71.- WILLIAM T. SPECK

Base substitution mutation induced in Salmonella strains - by visible light.

Photochemistry and Photobiology vol 21 (1975) 369-371

72.- WILLIAM T. SPECK

Mutagenicity testing with Salmonella typhimurium strains- Inusual phenotipes of tester strains

Mutation Research 28 (1975) 27-30

73.- D. YOSHIDA and T. MATSUMOTO

Changes in mutagenicity of protein pirolizate by reaction- with nitrite.

Mutation Research 58 (1978) 35-40.