

1 9 8 6

079546453

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTANDARIZACION DEL ENSAYO DE SALMONELLA-MICROSOMAL
PARA DETERMINAR LA MUTAGENICIDAD DEL
BENZOATO DE SODIO.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

LUZ MARIA PINAL ZUAZO

GUADALAJARA, JALISCO. 1987

AGRADECIMIENTOS

A DIOS GRACIAS

por permitirme alcanzar una de mis metas.

A MI MADRE

Por no escatimar esfuerzo alguno
en la formación de uno mas de sus
hijos.

A MI PADRE

Con respeto.

A MIS HERMANOS

FEDERICO, FAUSTO, LAURA.

LORENA Y LETICIA

Con cariño.

AL BIOLOGO ARTURO MANZO F.

! Mil Gracias !

BIOLOGO GUILLERMO M. ZUÑIGA

Por su apoyo en la realización
de este trabajo.

A todos los compañeros y amigos que de una forma directa u
indirecta intervinieron en la elaboración de la tesis. para
todos ellos mi agradecimiento.

INDICE

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS	4
ANTECEDENTES	5
MEDIOS Y SOLUCIONES	28
METODOLOGIA	44
RESULTADOS	64
DISCUSIONES	77
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUCCION

Actualmente el uso de aditivos alimenticios es indispensable en la elaboración de productos procesados, permitiendo así una prolongación en la conservación de estos.

Uno de los conservadores mas utilizados en el procesamiento de alimentos es el Benzoato de sodio, debido a las propiedades que presenta, como es evitar el enmohecimiento, la putrefacción y el crecimiento de bacterias patógenas. El empleo de dicho aditivo se puede constatar en la mayoría de los alimentos, como son salsas, jugos, embutidos, conservas y otros.

Por lo tanto es de gran interés el estudio de dicha sustancia para que de este modo su utilización sea mas confiable, ya que se

ha encontrado que el uso de este presenta un riesgo potencial de cancer debido a que se acumula en las proteínas del organismo.

La utilización de la prueba de Salmonella/Microsomal o prueba de Ames, es una técnica que permite determinar si una sustancia química es o no mutagénica, ya que es una prueba que presenta gran sensibilidad, dando resultados que se pueden tomar como base para estudios posteriores.

La utilización de esta técnica es de suma importancia para probar un número de sustancias químicas utilizadas como aditivos alimenticios de consumo humano.

OBJETIVOS

El principal objetivo es probar si el Benzoato de Sodio tiene poder mutagénico sobre las cepas TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, de *Salmonella typhimurium*.

Como objetivos secundarios:

Estandarizar las condiciones operativas de la Prueba de *Salmonella/Microsomal*, y dejar esta técnica ya establecida como prueba de control de calidad en la rama alimenticia.

Comprobar la eficacia del método de *Salmonella/Microsomal* para verificación de genotoxicidad en conservadores de alimentos.

HIPOTESIS

El Benzoato de sodio es Mutagénico en el sistema de Salmonella/Microsomal para las cepas TA 97, TA 98, TA 100 y TA 102.

ANTECEDENTES

En la aplicación sistemática de una prueba mutacional para la detección de carcinógenos se empleó *Salmonella typhimurium*. Este trabajo comenzó en 1966 con una publicación de Ames y Whitfield, y llevó a desarrollar lo que es ahora prominentemente conocido como prueba de Ames o prueba de *Salmonella*/microsomal.

Es el método más usado por su validez y su alta eficiencia para detectar carcinógenos como mutágenos, ya que gran porcentaje de compuestos han sido encontrados debido a la sensibilidad que presenta (Maron and Ames, 1983). Además ha sido usada para determinar mutagenicidad de mezclas biológicas y compuestos ambientales (Maron and Ames, 1983).

El ensayo de *Salmonella*/microsomal se basa en las siguientes premisas:

1.- Que los sistemas de ensayos bacterianos proporcionan un

eficiente método para detectar agentes los cuales podrían interactuar con el ADN.

2.- En general, el ADN de los organismos tiene la misma estructura doble helicoidal y los mismos nucleótidos (Auer, 1971).

Por lo tanto la prueba con bacterias es válida para la detección de mutágenos, los cuales tienen la capacidad de alterar el material genético en otras especies incluyendo el hombre (Plewa y Gentile, 1982; Gentile y Plewa, 1982; Freifelder, 1983). además de causar efectos teratógenicos (Luck, 1977), causar mutaciones en células germinales (Plewa y Gentile, 1982; Gentile y Plewa, 1982), inducir enfermedades cardíacas (Plewa and Gentile, 1982; Gentile y Plewa, 1982; Venitt y col., 1986), influir en el proceso de envejecimiento (Plewa y Gentile, 1982; Gentile y Plewa, 1982; Plewa y Gentile, 1983; Kada, 1986; Venitt y col., 1986), e inducir mutaciones en células somáticas que puedan

volverse cancerosas (Ames, 1971; Ames y col., 1973; Sugimura, 1982; Quillardet y Hofnung, 1985; Kier y col., 1986).

La idea de que células cancerosas derivan de células normales a través de mutaciones somáticas tiene una larga historia y fue sugerida desde 1928 por Brawer (Sugimura, 1982). Esta idea se basa en observaciones que muchos mutágenos detectados en sistemas bacterianos han mostrado ser carcinógenos. Además un número considerable de mutágenos detectados primero por la prueba de salmonella/microsomal han mostrado posteriormente ser carcinógenos en pruebas con animales (Ames, 1971; Ames y Yamasaki, 1975; Ames, 1983; Maron y Ames, 1983). La principal limitación de cualquier sistema bacteriano para detectar carcinógenos como mutágenos es que las bacterias no poseen el metabolismo de los mamíferos para la activación de carcinógenos ya que la forma activa de muchos de estos compuestos es formada en el metabolismo de los mamíferos (Ames, 1973). Estudios

realizados dentro de este tipo de trabajos muestran que ciertos carcinógenos pueden ser detectados como mutágenos con gran sensibilidad por incubación de la bacteria en presencia de carcinógenos y homogenado de hígado (Ames, 1973).

Cabe mencionar que en la carcinogénesis se reconocen varios pasos, entre los que destacan la iniciación y la promoción (Suzimura, 1982).

La iniciación está relacionada principalmente en el daño al ADN (Suzimura, 1982).

La promoción no está ligada necesariamente a cambios en el ADN (Suzimura, 1982), y parece involucrar proliferación celular (Ames y col., 1987). Si las células animales han sido iniciadas por mutágenos endógenos o ambientales, la aplicación de un promotor

incrementara la incidencia de tumores. Así, compuestos con actividad promotora y sin actividad mutagénica pueden clasificarse como carcinógenos (Sugimura, 1982).

Las primeras pruebas que Ames utilizó para probar mutágenos consistía en agregar el mutágeno directamente a una capa de bacterias sobre una placa de agar mínimo glucosa utilizando microorganismos que tuvieran más sensibilidad para detectar diferentes clases de mutágenos. La sustancia a prueba era puesta en el centro de la placa de agar que ha sido sembrada con bacterias que no pueden crecer por causa de una mutación (his-) (Ames, 1971; Ames y Yamasaki, 1975). Si el mutágeno puede causar la mutación particular, que provoque una reversión en el genoma bacteriano, eso le dará capacidad a dicha bacteria de crecer y formar una colonia. Así un círculo de colonias (his+) aparecerá alrededor del punto de aplicación del mutágeno después de día y

medio de incubación (Ames, 1971). Se pueden probar de esta manera cientos de compuestos cada día (Ames, 1971). Este método se conoce ahora como prueba puntual (Maron y Ames, 1983).

A partir de entonces diferentes metodologías han sido empleadas para exponer a la bacteria a agentes de prueba y para evaluar una respuesta mutagénica.

En 1973, Ames y sus colaboradores publicaron un protocolo en el que incluían un homogenado de hígado el cual se centrifuga utilizando solo el sobrenadante al que se le conoce como fracción S-9; usando esto como la mejor fuente de activación metabólica para la detección de una gran variedad de carcinógenos que requieren este tipo de activación (Maron y Ames, 1983), ya que ciertas sustancias no son mutagénicas por sí solas y requieren ser activadas para poder expresarse como mutágenos, activando así a un promutágeno en mutágeno (Plewa y Gentile, 1982; Plewa y

Gentile 1983). Haciendo la prueba con y sin la mezcla S-9. Muchos promutagenos no mostraban actividad mutagenica en estudios anteriores, resultando ser positivos con este nuevo metodo de activacion metabolica (Kier y col., 1986).

Una de las modificaciones en la metodologia fue el llamado ensayo de incorporacion en placa el cual consiste en colocar la fraccion S-9, la bacteria y la sustancia a probar en diferentes concentraciones, en un tubo con agar blando al que se le ha añadido trazas de histidina, se mezclan y son puestas en la superficie de la placa de agar minimo conteniendo glucosa (agar base). Las placas son incubadas a 37°C de 2-3 dias. En las primeras horas toda la poblacion de bacterias auxotrofas crece en presencia del compuesto a prueba y de la mezcla S-9 metabolicamente activa hasta que toda la histidina es consumida, despues de esta fase de crecimiento auxotrofico, solamente aquellas celulas que mantuvieron sus mutaciones de reversión a la

mutación existente para histidina continuaron el crecimiento para formar colonias visibles de prototifos (his+) (Maron y Ames, 1983; Kier y col., 1986; Venitt y col., 1986).

En el caso de que se observe en una o dos de las concentraciones de las sustancias de prueba, un doble o un triple de colonias revertantes (las cuales crecen sobre la capa de colonias auxótrotas y sobresalen por su tamaño) que en el control, indica una respuesta mutagénica (Kier y col., 1986; Venitt y col., 1987). Ahora bien en caso de una respuesta positiva o sospechosa (si no el doble o triple de colonias revertantes, que sea un número elevado al rango de revertantes espontáneas de cada cepa) se debe comprobar una relación dosis respuesta con un rango de concentraciones más estrecho (Maron y Ames, 1983). Si no existiera la capa de colonias auxótrotas, esto indicaría un nivel tóxico de la sustancia para la bacteria.

Para darle una mayor sensibilidad a la prueba se hace un pequeño cambio al ensayo anterior, el cual fue descrito por Yahaqi en 1975 y lo denominó ensayo con preincubación (Maron y Ames, 1983). Metodología que ha probado ser de mayor sensibilidad e incluso muchos mutágenos se han detectado solamente con esta modificación (Suqimura, 1982; Ames, 1985). Esta variación radica en la incubación de la bacteria en presencia de la sustancia a prueba y de la mezcla con el agar blando y hacer el vaciado sobre el agar base teniendo de esta manera mejores resultados (Maron y Ames, 1983; Ames, 1985; Kier, 1986; Venitt y col., 1986), siendo esta la técnica utilizada en muchos laboratorios (Suqimura, 1983).

Un paso previo a los dos anteriores es la prueba puntual, la cual sirve para probar varias sustancias en una sola placa haciendo el trabajo más rápido, ya que este ensayo es utilizado para seleccionar a aquellas sustancias que nos hayan indicado un resultado positivo, de esta manera se eliminan las que dan

resultado negativo, pasando a la incorporación en placa con preincubación para así confirmar el resultado que se obtuvo en la prueba puntual por ser esta solo un ensayo de selección del cual el investigador puede presindir de acuerdo a los intereses que se tengan ya que se usa cuando se tienen muchas sustancias para probar.

Tanto la prueba como las cepas han ido evolucionando a lo largo del tiempo.

Al inicio del desarrollo de esta prueba Ames y sus colaboradores en 1971, caracterizaron un gran número de cepas de *Salmonella typhimurium* las cuales fueron seleccionadas por su habilidad para detectar diferentes agentes mutagénicos. Estas cepas tienen diferentes tipos de mutaciones en el operón de histidina (Maron y Ames, 1983; Kier y col., 1986; Venitt y col., 1986).

En 1973 aparecen tres de las cinco cepas que se utilizan en el ensayo, que son la TA 1535, TA 1537, TA 1538 (Ames y col., 1975), posteriormente aparecieron en 1975 las cepas TA 100 y TA 98, derivadas de las cepas TA 1535 y TA 1538.

Tales cepas detectan mutaciones que restablecen la capacidad para sintetizar histidina y permite el crecimiento de revertantes manifestadas como colonias visibles en un medio de crecimiento deficiente de histidina. Dichas mutaciones pueden ser inducidas por agentes capaces de revertir la mutación de histidina original, de este modo estas cepas poseen la habilidad de detectar mutágenos que causan sustitución de pares de bases así como de corrimiento de estructura dependiendo de la cepa que se utilice.

Cabe mencionar que algunos mutágenos afectan solamente a cepas que detectan corrimiento de estructura o bien cambio de bases.

sin embargo muchos mutagenos pueden afectar ambos tipos de cepas
(Ames, 1983; Kier y col., 1986; Venitt y col., 1986).

En adición a la mutación de histidina las cepas contienen otras
mutaciones que aumentan su capacidad para detectar mutagenos.

La mutación rta : radica en la permeabilidad de la pared
lipopolisacarida que recubre la superficie de la bacteria
incrementando la permeabilidad a moleculas de alto peso molecular
que no penetran en una pared celular normal (Maron y Ames, 1983;
Kier y col., 1986).

La otra mutación uvrB: consiste en la incapacidad para reparar
mediante escisiones daños en el ADN, resultando así más sensible
en la detección de muchos mutagenos. Por razones técnicas esta
mutación se extiende hasta el gen Bio por lo que esta bacteria

requiere de biotina para su crecimiento (Maron y Ames, 1983; Ames y Yamasaki, 1975; Kier y col., 1986).

La última modificación que se le hizo al ensayo de Salmonella/microsomal fue la introducción del plásmido pKM101 (factor R), el cual incrementa la mutagenicidad química y espontánea apoyando un sistema de reparación del ADN propenso al error, normalmente presente en estos organismos. Tiene además un gen de resistencia a ampicilina que sirve como marcador.

Posteriormente se desarrollaron dos cepas nuevas, adicionándolas al juego que se tenía; estas cepas son la TA 97 (TA 97a) y TA 102, las cuales son más sensibles para la detección de mutágenos, que anteriormente no se detectaban (Maron y Ames, 1983; Levin y col., 1982a, 1982b, 1984; Kier y col., 1986).

Las mutaciones específicas en el gen marcador de las cepas TA 97a, TA 98, TA 100 y TA 102 son las siguientes:

TA 97a: Esta cepa lleva la mutación his D6610 (Levin y col., 1982), la cual está en el gen hisD, consiste en una mutación de corrimiento de estructura (+4) resultando en una corrida de seis citosinas "como punto caliente" para reversión por mutágenos que muevan la estructura de modo que se establezca la lectura correcta del gen. La cepa tiene un segundo punto caliente de pares alternos -GC-, por lo que también puede revertir por algunos de los mutágenos que reviertan a la cepa TA98 (Maron y Ames, 1983).

TA 98: Tiene la mutación hisD 3052. Es una mutación de corrimiento de estructura (-1) cercana a la secuencia -CGCGCGG-, la

cual sirve como punto caliente para captar las mutaciones de corrimiento de estructura que puedan restablecer la lectura correcta para la síntesis de histidina (Maron y Ames, 1983).

TA 100: Lleva la mutación his G46 en el gen que codifica para la primera enzima en la biosíntesis de histidina: esta mutación consiste en una sustitución de pares de bases AT-GC, cambiando la leucina (CTC) de la cepa silvestre por prolina (CCC) en la cepa mutante. Esta cepa detecta mutágenos que causan sustitución de pares de bases (Venitt y col., 1986; Maron y Ames 1983).

TA 102: Esta cepa lleva la mutación his G428 en el plásmido de multicopia pAQ1. Esta mutación es un cambio de pares de bases de GC-AT (mutación ocre) en el gen mutante (Levin y

col., 1982). Esta cepa detecta principalmente mutagenos oxidativos.

Todas las cepas mencionadas tienen un rango de reversion espontanea que son características de cada una de las cepas y se expresa como el numero de revertantes espontaneas por placa (Maron y Ames, 1983; Kier y col., 1986). Las colonias revertantes resaltan sobre la capa de colonias auxotrofas (visibles solo en el microscopio esteroscopico o como una cierta opacidad en la placa) por su tamaño. Este rango de revertantes debe revisarse continuamente y debe ser mas o menos constante en un mismo laboratorio.

Los rangos que se citan a continuacion se obtuvieron de varias fuentes:

TA 97a, 90-180 (Maron y Ames, 1983); TA 98, 15-60; TA 100, 75-

200 (Kier y col., 1986); TA 102, 240-360 (Ames, 1985).

Estos son rangos de reversión espontánea sin homogenado de hígado de rata y cofactores (mezcla S-9). Los rangos pueden variar un poco al añadirse la mezcla (Maron y Ames 1983). Como punto final cabe mencionar que las pruebas de genotoxicidad en bacterias son útiles para la identificación de posibles carcinógenos del tipo iniciador (Ames, 1971; Maron y Ames, 1983; Quillardet y Hornung, 1985; Venitt y col., 1986), aunque Sugimura (1982) sugiere incluir pruebas de carcinogenicidad utilizando algunas veces promotores de tumores para identificar compuestos como carcinógenos.

BENZOATO DE SODIO.

El presente trabajo se enfocó principalmente en el Benzoato de sodio.

Por definición: Los aditivos alimenticios, son sustancias químicas sin valor nutritivo que se añaden a los alimentos con el fin de modificar sus propiedades (sabor, color, aroma, entre otros) y facilitar el proceso de elaboración. La clasificación general de los aditivos se puede observar en la Tabla No. 1.

Para evitar la alteración microbiana de los alimentos se utilizan sustancias que reciben el nombre general de conservadores.

El Benzoato de sodio es un aditivo, el cual se clasifica dentro de los conservadores y es uno de los mas empleados en una gran variedad de alimentos debido a las diferentes propiedades que presenta, como es detener el proceso de la fermentación, enmohecimiento, putrefacción e inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.

TABLA No. 1. CLASIFICACION GENERAL DE ADITIVOS.

CLASE	EJEMPLOS
Acentuador de sabor	Acido Glutámico. Glutamato monosódico
Acidulante	Acido Acético. Acido Cítrico
Antiaglomerante	Silicato de Calcio. Carbonato de magnesio
Antiespumante	Acido Decanoico. Acidos Grasos
Antioxidante	Acido Ascorbico. Butil hidroxianisol (BHA)
Antisalpicante	Monoestearato de Glicérido. Sal de Sodio
Colorantes	Rouo Eritrosina. Azul Brillante
Conservadores	BENZOATO DE SODIO. Sorbato de Potasio
Emulsivos	Lecitina. Monoalícéridos
Espesantes	Almidones. Feculas
Estabilizadores	Gelatina. Metil-celulosa
Enzimas	Pepsina. Papaina
Espumante	Albuminas. Mucilaos
Gasificantes	Bicarbonato de Sodio. Acido Tartarico
Humectantes	Glicerina. Triacetina
Oxidantes	Bromato de Potasio. Dióxido de Cloro

El Benzoato de sodio es un sólido blanco, cristalino casi inodoro. Su nombre químico: Benzoato sodico, sal sodica del Ac. benencarboxilico, sal sodica del Ac. renilcarboxilico (Windholz, 1976).

Es usado ampliamente en la conservacion de alimentos acidos. En un alimento con pH de 7.0, los benzoatos son menos efectivos que en un alimento acido con un pH cercano a 3.

Actualmente los niveles usados del Benzoato de sodio son maximo 0.1% (Dziedzic, 1986). En cantidades de 0.5 gr por dia no produce manifestaciones toxicas en el hombre (Primo, 1982), sin embargo Freiville (1977), aconseja que por razones genotoxicas sea prohibido, ya que existe un riesgo potencial de cancer, debido a que se fija en las proteinas del organismo.

En la Tabla No 2 podemos observar las aplicaciones que tiene el

Benzoato de sodio en los alimentos.

TABLA No. 2. APLICACIONES DEL BENZOATO DE SODIO EN ALIMENTOS

APLICACIONES	BENZOATO DE SODIO (%)
Bebidas	0.03-0.08
Sidra	0.1
Jarabes	0.2, pH 5.0
Aceitunas	0.3(a)
Frutas	
Jugos, Ensaladas	
Cerezas	0.05-0.1
Ensaladas de Cítricos(b)	0.03-0.08
Productos de Jujo de Naranja(c)	Permisible
Jamones, Gelatinas, Preservados(d)	Requerido
Ensaladas preparadas(e)	0.1
Aderezo para ensaladas	0.1
Salsas	0.05-0.1
Margarinas(f)	0.1
Caldo de pescado(g)	0.15-0.35

- a) Usada en combinacion con una solucion acidulante y en condiciones anaerobicas para almacen libre de sal antes de ser procesadas.
- b) Los benzoatos pueden extender el tiempo de almacenamiento de ensaladas citricas retriğeradas por varios meses cuando son incluidas en la capa de almibar superior.
- c) Permitidos en productos con estandares de identidad de "juco de naranja con preservador", "juco de naranja concentrado con preservador", provisto que la etiqueta incluya la lista de productos, el porcentaje por peso del preservador y el nombre del mismo.
- d) La belatina de frutas preservadas y Jamones que son artificialmente endulzados pueden contener arriba de 0.1% de Benzoato de Sodio.
- e) 0.1% es permitido en productos con un pH menor que 5.0.
- i) El Benzoato de Sodio puede ser usado en margarinas a un nivel que no exceda de 0.1% por peso, expresado como Ac. Benzoico.
- 4) El pescado es inmerso en una solucion de Benzoato de Sodio ajustado a un pH de 4.0 con Ac. Citrico de 30 segundos a 2 minutos, puede prolongar el tiempo de almacenamiento de pescado por varios años.

MEDIOS Y SOLUCIONES

Placas de Agar Nutritivo

Uso: Prueba de Genotipos.

- a).-Sensibilidad a cristal violeta rfa.
- b).-Sensibilidad a la luz UV uvrB.

Componentes	g/litro.
Caldo nutritivo Oxoid No.2	25.0
NaCl	5.0
Agar	15.0

Se agregan los ingredientes a un matraz de 2 litros y se esteriliza por autoclave, 121°C durante 20 minutos. Se vació en las placas de petri. El medio de cultivo fue usado inmediatamente, o bien almacenado a 4°C por varios días.

Agar Blando.

Uso: Confirmación de genotipos y ensayo de mutagenicidad.

Componentes	g/100ml
Agar	0.6
NaCl	0.5

Se esterilizó por autoclave a 120°C 20 minutos. la preparación se realizó justo antes del ensayo.

Cristal Violeta.

Uso: Prueba de confirmación a la mutación rfa.

Componentes	g/100ml
Cristal violeta	0.1

Se disuelve el cristal violeta en agua estéril, se preparan solamente 10ml de la solución de cristal violeta y se almacenaba en botellas de color ambar a 4°C.

Medio Vogel Bonner.

Uso: Agar mínimo glucosa.

Nota: Este medio fue modificado del medio descrito por (Maron y Ames, 1983), el cual presentaba una concentración de 50X, en lugar de la concentración 25X, usada en este trabajo. La razón por la cual se optó por diluir, fue la cristalización que se presentaba al preparar la solución.

Componentes.

Agua 45°C	670 ml
M ₂ SO ₄ .7H ₂ O	5.0 g
Acido Citrico	50.0 g
K ₂ HPO ₄	250.0 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	57.76 g
NH ₄ OH 28 %/25=0.9	58.2 ml

Las sales se disolvieron en el orden citado, en un matraz de dos litros disolviendo uno a uno. Los dos últimos reactivos se mezclan aparte en un poco de agua y después se añaden el resto de la solución aforando a 1 litro.

Una segunda modificación al método, consistió en utilizar 87.5 g de fosfato de sodio y amonio que sustituía a los últimos dos componentes quedando la misma concentración de nutrientes. La solución se esterilizó en autoclave a 121°C 20 minutos.

Glucosa 40Z (Peso/volumen).

Usos:

- a).-Aaar mínimo glucosa
- b).-Placas maestras

Componentes	Para 500 ml
D-glucosa anhidra	200 g
Aqua destilada	300 ml

Se calentó el agua para disolver la glucosa, se aforó entonces a 500 ml con mas agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121oC durante 20 minutos.

Amortiguador Fosfato de Sodio 0.2 M. pH 7.4.

Uso: Mezcla S-9.

Componentes	Para 500 ml
0.2 M Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	
(13.8g/500 ml)	60 ml
0.2 M Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)	440 ml

Las cantidades de cada solución son aproximadas, si el pH era muy bajo, se agregó más 0.2 de fosfato dibásico de sodio hasta un pH de 7.5 y viceversa. Se esterilizó en autoclave 121°C 20 minutos almacenándose después a 4°C.

Placas Agar Mínimo Glucosa.

Uso: Ensayo de mutagenicidad.

Componentes	Por litro
Agar	15 g
Sales VB E25X	40 ml
Glucosa	50 ml

15 gramos de agar fueron disueltos en 930 ml de agua destilada en un matraz de dos litros. Se esterilizó en autoclave a 121°C 20 minutos. Se agregaron las soluciones de sales y glucosa aforando a 1 litro.

Solución de Ampicilina (8 mg/ml NaOH 0.02 N)

Usos:

- a).- Placas maestras para cepas con factor R
- b).- Prueba de resistencia a ampicilina.

Componentes

Ampicilina	0.8 g
Hidróxido de sodio (0.02 N)	100 ml

Se preparaban solamente 10 ml de la solución de ampicilina y se almacenaba en botellas ambar a 4°C.

Solución de tetraciclina (8 mg/ml HCL 0.02 N)

Usos:

- a).-Prueba de resistencia a tetraciclina
- b).-Placas maestras de la cepa TA 102 con el plásmido PAQ1.

Componentes

Tetraciclina	0.8 g
Acido clorhidrico 0.02 N	100 ml

Se preparo de la misma forma que la ampicilina.

Placas de ampicilina y ampicilina/tetraciclina.

Usos:

- a).-Placas maestras para cepas que tienen el plásmido pKM101 y pKM101 mas pA01.
- b).-Prueba para resistencia a ampicilina/tetraciclina.

Componentes	Por litro
Agar	15 g
Sales VB E (25X)	40 ml
Glucosa 40%	50 ml
Histidina HCL.H2O (4.05 g/litro de agua)	10 ml
Biotina 0.5 mM	6 ml
Solución de ampicilina (8 mg/ml NaOH 0.02 N)	3.15 ml
Solución de tetraciclina (8 mg/ml NaOH 0.02 N)	0.25 ml

Nota: Dependiendo de las cepas a replicar se utilizó indistintamente la solución de ampicilina y/o tetraciclina.

Los 15 g de agar fueron disueltos en 910 ml de agua. Se esterilizo por autoclave a 121oC 20 minutos, mezclándose posteriormente con el resto de los componentes. Una vez enfriada la mezcla de componentes se agregaba la solución del antibiótico a usar.

Placas histidina/biotina.

Usos:

- a).-Agar minimo glucosa
- b).-Prueba de requerimiento de histidina

Componentes	Para 1 litro
Agar	15 g
Sales VB E(25X)	40 ml
Glucosa 40%	50 ml
Histidina estéril	10 ml
Biotina 0.5 mM	6.0 ml

El agar se esterilizó por separado en autoclave 121oC 20 minutos agregándose posteriormente el resto de los componentes.

PARA EL ENSAYO DE MUTAGENICIDAD SE UTILIZARON:

- Placas de agar mínimo glucosa
- Agar blando, y las siguientes soluciones.

Solución 0.5 mM Histidina/Biotina.

Uso: Ensayo de mutagenicidad.

Componentes	Para 250 ml
D-Biotina (P.M. 247.3)	30.9 mg
L-Histidina (P.M. 155.20)	19.44 mg

Los componentes se disolvieron en agua a punto de ebullición. Se esterilizo ya fuera por autoclave a 121oC 20 minutos o bien por filtración en membraba millipore 0.45um. Se almacenó en botellas ambar a 4oC.

Solución de sales (1.65 M KCL - 0.4 M MgCl2)

Uso: Preparación de la mezcla 5-9.

Componentes	Para 500 ml
Cloruro de Potasio (KCl)	61.5 g
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ .6H ₂ O)	40.7 g

Se esterilizó por autoclave a 121oC 20 minutos y se almacenó en botellas de vidrio a 4oC.

Solución 0.1 M NADP (Nicotin Adenin Dinucleótido Fosfato)

Uso: Preparación de la mezcla S-9.

Componentes	Para 5 ml
NADP (P.M. 765.4)	383 mg

El NADP fue disuelto en agua estéril y se filtró. se almacenó a -20oC en frasco ambar.

Solución Glucosa-6-Fosfato (G-6-P).

Uso: Preparación de la mezcla S-9

Componentes	Para 10 ml
Glucosa-6-Fosfato	2.82 g

Se preparó de igual forma que la solución NADP. se almacenó en frascos amber a -20°C .

Fosfato amortiguador salino y amortiguador fosfato 0.02 M

Uso: Resuspensión de colonias aisladas para placas maestras

(fosfato amortiguador salino)

Prueba de mutagenicidad con preincubación sin S-9

(Amortiguador fosfato 0.02 M)

Componentes	Para 500 ml
0.02 M fosfato monobásico de sodio	
($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.38 g/500 ml	60 ml
0.02 M fosfato dibásico de sodio	
(Na_2HPO_4) 1.42 g/500 ml	440 ml

Los volúmenes de las soluciones son aproximados. si el pH de la mezcla era muy bajo se añadía mas 0.02 M de fosfato dibásico de sodio y viceversa hasta obtener un pH de 7.4. obteniéndose así la solución amortiguadora de fosfato 0.02 M para la prueba de mutagenicidad sin S9. En el caso del fosfato amortiguador salino (0.02 M fosfato 0.15 M NaCl). las soluciones de cada fosfato se hicieron en 0.15 M de NaCl ajustando el pH despues a 7.4 del mismo modo antes descrito. Se esterilizó en autoclave 121oC 20 minutos.

Caldo Nutritivo

Uso: Crecimiento de cepas para pruebas de genotipos y de mutagenicidad así como para preparar congelados permanentes a -70°C .

Componentes	Para 1 litro
Caldo Nutritivo Oxoid No. 2	25 g

Se esterilizó en autoclave a 121°C 20 minutos. Se utilizó este medio por ser el que recomienda Maron y Ames (1983), preparándose de acuerdo a las instrucciones del paquete (Oxoid nutrient broth No.2).

Preparación de la mezcla S-9 (Sobrenadante de homogenado de hígado centrifugado a 8700 rpm mas cofactores).

Uso: Ensayo de mutagenicidad.

Componentes	Para 50 ml
Amortiguador fosfato 0.2 M	25.0 ml
Sales $MgCl_2-KCl$	1.0 ml
G-6-P 1 M	0.25 ml
NADP 0.1 M	2.0 ml
Fracción S-9	10.0 ml (100ul/placa)
Aqua destilada	11.75 ml

Los componentes se agregaron en orden citado, de modo que la fracción S-9, se agregue a una solución amortiguadora. La mezcla S-9 se preparó en fresco y se mantuvo en hielo antes de cada ensayo de mutagenicidad. Después de cada ensayo los sobrenadantes de la fracción S-9 y de la mezcla S-9 fueron desechados.

METODOLOGIA

CEPAS

Para llevar a cabo la prueba de mutagenicidad con el Benzoato de Sodio, se eligieron las siguientes cepas: TA 97, TA 98, TA 100 Y TA 102, cuyas características aparecen en la Tabla No. 3. Las cepas fueron proporcionadas por el Dr. Bruce N. Ames de la Universidad de California, Berkeley, Calif.

La cepa TA 97a fue enviada en el sitio de la TA 97, por la razón de que la última presentaba problemas de crecimiento por lo que se tuvo que reconstruir asignándose a la cepa obtenida la clasificación de TA 97a, teniendo esta las mismas características de la TA 97 con mejor crecimiento (Levin y col., 1982b).

TABLA No. 3. CARACTERISTICAS GENOTIPICAS DE LAS CEPAS DE PRUEBA DE Salmonella Typhimurium.

CEPA	MUTACION (his -)	FACTOR R	TIPO DE MUTACION	uvrB	rfa
TA 97	D 0010	pKM 101	Corrimiento +4	+	+
TA 98	D 3052	pKM 101	Corrimiento -1	+	+
TA 100	G 46	pKM 101	Cambio AT-GC	+	+
TA 102	G 428	pKM 101 pAQ 1	Cambio GC-AT	-	+

Nota: La mutacion his - se refiere a la posicion especifica del gen estructural (D o G) del operon histidina.

COMPUESTOS ESPECIFICOS

El Benzoato de sodio se obtuvo del Almacén de Drogas S.A. en Guadalajara, Jalisco.

ANIMALES EXPERIMENTALES.

Las ratas para la obtención de la fracción S-9, se adquirieron en el bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente y del bioterio de la Universidad de Guadalajara. Eran ratas de raza Wistar, de aproximadamente 200 g de peso.

Segun especificaciones del Dr. Ames, los genotipos de las cepas deberían ser confirmados: a) inmediatamente después de recibir a los cultivos, b) cuando se prepara un nuevo juego de permanentes congelados o placas maestras, c) cuando el número de revertantes por placa esté fuera del rango normal o d) cuando exista una pérdida de sensibilidad a mutagenos generales.

CONFIRMACION DE GENOTIPOS.

Para la confirmación de genotipos característicos de las cepas con las que se trabajo se siguió la metodología que indica Maron y Ames (1983).

Se utilizan cultivos frescos para realizar las pruebas, y todos los reactivos, material de vidrio, placas petri, forceps, puntas de inoculación y puntas de algodón fueron esterilizados.

Uno de los genotipos a confirmar fue el requerimiento a histidina, el procedimiento para la confirmación fue el siguiente: Se tomo una muestra con un isopo, de un cultivo nocturno de las cepas a prueba, y se hizo un trazo lineal a traves de la placa control, la cual contenía biotina y carecía de histidina asi como en las placas con histidina y biotina. Las cajas fueron incubadas durante una noche a 37oC.

Para la confirmación de la mutación rfa se comprobó mediante el uso de cristal violeta, para visualizar el halo de inhibición.

Para cada cepa se agregó 0.1ml. de cultivo fresco crecido durante la noche anterior, a un tubo que contenía 2 ml. de agar blando a 45°C. se agitó rápidamente y se vació sobre agar nutritivo (ver sección de medios y soluciones), moviendo la placa para distribuir perfectamente el agar blando en toda la superficie del agar base. Se tomaron 10 ul. de una solución de 1 mg/ml de cristal violeta (ver sección de medios y soluciones) y se mojó un pequeño disco de papel filtro, el cual fue puesto en el centro de la placa con la ayuda de un forceps. Las placas fueron incubadas a 37°C. Después de 24 horas de incubación, la respuesta positiva a la prueba, consistió en la aparición de una zona clara de inhibición alrededor del disco, indicando así la presencia de la mutación rfa la cual permite a las moléculas de cristal violeta entrar a la bacteria y producirle un efecto letal.

La mutación uvrb pudo ser confirmada mediante la exposición a la luz UV de las cepas que contienen esta mutación.

Procedimiento:

Del cultivo nocturno se mojó un isopo de algodón y se hizo un trazo lineal sobre la superficie del agar nutritivo. La mitad de la caja fue cubierta con papel aluminio colocándola bajo una lámpara bactericida de luz UV de 15 watts, a una distancia de 33 cm. Las placas fueron incubadas a 37°C por espacio de 12-24 horas. El crecimiento bacteriano en la zona cubierta demostraría la presencia de dicha mutación. Pudiéndose así probar varias cepas, tanto las que contienen el plásmido pKM101 (el cual les da cierta resistencia a la luz UV como aquellas que no lo tengan.

Las cepas que tienen el plásmido fueron irradiadas por 8 segundos y las que no, por 6 segundos.

PRESENCIA DEL PLASMIDO pKM101.

El plásmido p101. contiene el marcador de resistencia a ampicilina. esto fue comprobado de la siguiente manera. La cepa fue sembrada en líneas paralelas sobre agar base que contenía ampicilina. usando el procedimiento descrito anteriormente para la confirmación del requerimiento de histidina.

Una cepa sin el factor-R. se puso en la misma placa. esto como control para la prueba de resistencia a ampicilina. Las cepas fueron incubadas durante 12-24 horas a 37°C.

PRESENCIA DEL PLASMIDO pAQ1.

Este plásmido lleva un marcador de resistencia a tetraciclina. además tiene integrado en su genoma un gen multicopia. La cepa FA 102 portadora de este plásmido. se prueba en placas con ampicilina y tetraciclina la cepa FA 98 fue utilizada como

control (ya que carecia de este plasmido).

PRUEBA DE REVERSION ESPONTANEA.

Para probar si las cepas a utilizar están dentro del rango de revertantes espontaneas caracteristico de cada cepa. se hizo lo siguiente:

Se tomaron 0.1 ml de cultivo de 12 horas de crecimiento en caldo nutritivo de cada cepa reaislada. y se añadió a un tubo que contiene 2 ml. de agar blando enriquecido con solución de histidina/biotina (ver sección de medios y soluciones). se agitó y se vació sobre una placa de agar mínimo glucosa (ver sección de medios y soluciones) y se dejó solidificar. incubándose 48 horas a 37°C. despues de esto se hizo el conteo de revertantes espontaneas confirmandose también la presencia de la capa de microcolonias.

ALMACENTAMIENTO DE LAS CEPAS.

El almacenamiento prolongado de las cepas bacterianas se lleva a cabo de la siguiente manera:

Las cepas se crecieron en caldo nutritivo Oxoid No. 2. a 37°C y 210 rpm durante 12 horas aproximadamente. Se combinaron 850 ul del cultivo nocturno de la cepa con 150 ul de glicerol y almacenados en viales de 2ml. a -70°C. Estas muestras pueden durar aproximadamente 3 años sin gran perdida de viabilidad.

PLACAS MAESTRAS.

Las placas maestras son usadas rutinamente en el laboratorio como fuente de bacteria para inocular los cultivos nocturnos de las cepas con que se va a trabajar mas frecuentemente. Las cepas almacenadas a -70°C fueron previamente descongeladas. de estos cultivos se tomo una gota. la cual fue colocada en la superficie de placas de agar minimo glucosa con histidina y biotina.

sembrando por estrias para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 37°C por 48 horas. Una vez mostrado el crecimiento se tomó una colonia aislada con una asa bacteriológica estéril y se suspendió en 0.3 ml o menos de amortiguador de fosfatos de sodio contenido en pequeños tubos. Con un isopo estéril inmerso en la suspensión bacteriana se trazaron 4 o 5 líneas paralelas sobre la superficie de las placas de agar mínimo glucosa, y se incubaron toda la noche a 37°C. Las placas maestras fueron guardadas a 4°C descartando estas después de dos meses o antes, si el rango de reversion espontánea se apartaba del rango de reversion específico para cada cepa. Las placas maestras de TA 102 se descartaban después de 2 semanas, ya que la reversion espontánea se incrementa debido a la tetraciclina añadida a la placa para la retención del plasmido pAQ1. Por esta razón se utilizaron las copias permanentes congeladas, como fuente de inoculación de cultivos líquidos para la TA 102.

COPIAS CONGELADAS PERMANENTES.

A partir de las placas maestras, se obtuvieron colonias aisladas por siembra en estrias con asa bacteriológica en placas de ampicilina, ampicilina/terciciclina de acuerdo a la cepa. Se inoculó con estas un cultivo nocturno para cada cepa. Una vez crecido el cultivo nocturno (en caldo nutritivo Oxoid No. 2), se mezcló con glicerol (Maniatis y col., 1982), congelándose en viales a -70°C.

OBTENCION DE LA FRACCION S-9 NO INDUCIDA.

Para los ensayos de mutagenicidad se recomienda utilizar algunas sustancias que induzcan una mayor concentración de enzimas microsomales en el hígado de las ratas (Maron y Ames, 1983). Una de las sustancias que se recomienda como inductor es Aroclor 1254, el cual es un potente carcinógeno de gran estabilidad y puede ser de gran peligro para los trabajadores del laboratorio.

(Matsushima, 1976; Maron y Ames, 1983). por esta razon se decidio usar la fraccion S-9 sin inducir, utilizando la concentracion normal de enzimas.

REMOCION DEL HIGADO DE LAS RATAS.

Se utilizaron ratas macho de 4-5 semanas de edad con un peso de 200gr cada uno. El animal a sacrificar se mantuvo con una dieta de alimento balanceado. 12 horas antes de ser sacrificado se le retiro el alimento mas no el agua.

Procedimiento:

Las ratas fueron sacrificadas por dislocacion cervical. El area de corte fue esterilizada con etanol al 70-95 %. Al hacer el corte de la capa muscular se tuvo cuidado de no cortar el esofago o los intestinos, ya que esto tendria como resultado una contaminacion del homogenado de higado.

PREPARACION DEL HOMOGENEADO DE HIGADO (FRACCION S-9).

Todos los pasos se llevaron a cabo a -4°C usando soluciones frías y estériles así como el material. Los hígados recién extraídos fueron puestos en recipientes ya pesados que contenían aproximadamente 1ml de KCL al 0.15M. por gramo de hígado húmedo.

Un hígado de rata pesa aproximadamente 10-15 gr. después de pesados los hígados se lavaron varias veces en KCL 0.15 M. Los lavados sucesivos en KCL son esenciales para asegurar una preparación estéril y para remover la hemoglobina, la cual puede inhibir la acción de las enzimas principalmente citocromo P450. Los hígados lavados fueron transferidos a un recipiente con 3 volúmenes de KCL 0.15 M (3 mg/gr de hígado húmedo) y se cortaron con tijeras estériles. Se utilizaron homogenizadores de vidrio Thomas con mano de teflón. El homogenado fue centrifugado por 10 minutos 9000 \times (8700 rpm) en el rotor Sorvall SS-34. y el

subrenadante (fracción 5-9) se extraio en porciones de 1-3 ml y fue almacenado a -70°C.

PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR PREINCUBACION.

La técnica utilizada para la prueba de mutagenicidad del Benzoato de sodio es la llamada prueba con preincubación. Se eligió esta técnica por reportarse como más sensible o al menos igual que la técnica general de vaciado directo en placa (Maron y Ames, 1983; Levin y col., 1984), además de que muchas sustancias han resultado positivas solo con el paso de la preincubación (Sugimura, 1982; Ames, 1985). Las pruebas se realizaron de acuerdo con Maron y Ames (1983) utilizando cultivos frescos de las cepas de prueba con 12 horas de crecimiento con una población de 1-2 E9 células/ml en caldo nutritivo a una temperatura de 37°C, 210 rpm. los tubos se colocan en forma inclinada para así asegurar la aereación, estos con 10 ml de caldo nutritivo.

SOLUCION DEL BENZOATO DE SODIO.

Para la prueba general de mutagenicidad, se recomienda utilizar un amplio rango de concentraciones (Kier y col., 1986), cubriendo al menos un rango trilogaritmico (Maron y Ames, 1983). Las dosis no deben separarse por mas de un factor de 5 (v.g. dos dosis por intervalo logaritmico) (Kier y col., 1986). En caso de encontrarse un resultado positivo o cuestionable, debe confirmarse demostrando una relacion dosis respuesta utilizando un rango mas estrecho (Maron y Ames, 1983).

Las distintas diluciones del Benzoato de sodio se prepararon frescas para cada ensayo. Se preparó una solución madre de 100 mg/ml de solución de Benzoato de sodio en agua destilada. Se esterilizó por filtración a través de un filtro millipore de 0.45 μ m. En seguida se prepararon diluciones en agua estéril a partir de la solución madre para obtener concentraciones finales

de 10 000, 5 000, 1000, 500, 100 y 10 ug /placa.

PRUEBA POR PREINCUBACION SIN SISTEMA DE ACTIVACION.

La prueba de mutagenicidad de Benzoato de sodio sin sistema de activación (mezcla S-9), se llevó a cabo de acuerdo con Maron y Ames (1983) y Levin y col. (1984).

A un volumen de 100 ml de agar blando se le agregaron 10 ml de una solución L-histidina HCL 0.5 mM/biotina 0.5 mM (ver sección de medios y soluciones), el cual se mantuvo en agua caliente para evitar su gelificación. En tubos esteriles de 13 x 100 mm se añadieron 0.5 ml de amortiguador fosfato 0.02 M, 0.1 ml de cultivo bacteriano y 0.1 ml de las concentraciones correspondientes del Benzoato de sodio, se incubó a 37°C durante 20 minutos a 120 rpm, inmediatamente despues se agregaron 2 ml del agar blando que se ha mencionado anteriormente. La mezcla y

el agar se vaciaron sobre una placa de agar minimo glucosa. Cada concentracion se probó por triplicado y se incluyeron placas con 0.1 ml de agua destilada, 0.1 ml de cultivo bacteriano y 0.5 ml de amortiguador fosfato 0.02 M. usando el agua como control negativo. se incubaron a 37°C durante 48 horas. Una vez asegurandose de que existe la capa de colonias auxótrofas se hace el conteo de las colonias revertantes.

PRUEBA CON SISTEMA DE ACTIVACION (MEZCLA S-9).

En esta prueba se hace exactamente lo mismo que en la anterior con la única excepcion de la sustitución del amortiguador fosfato por la mezcla S-9. La concentracion de fracción S-9 utilizada fue en base a los resultados que se obtuvieron en la prueba de actividad de la fracción S-9.

PRUEBA DE ACTIVIDAD DE LA FRACCION S-9.

Para probar la actividad enzimática del hígado no inducido se usaron diferentes concentraciones de S-9 para observar en cual de ellas daba mejor resultado y usar esa concentración en la mezcla S-9 para la prueba de mutagenicidad. Las concentraciones utilizadas de la fracción fueron de 50, 100, 150 y 200 μ l/0.5 ml de mezcla en base a los antecedentes bibliográficos (Maron y Ames, 1983), incluyendo posteriormente la concentración de 0 μ l/0.5 ml de mezcla. La técnica empleada es la misma que se usaria en una prueba de mutagenicidad como es la prueba de incorporación en placa con preincubación.

Existen algunas sustancias conocidas como promutágenos o sea que requieren activación metabólica para dar lugar a mutágenos, entre estas sustancias se encuentra la benzidina, la cual se utilizó en una concentración de 50 μ g/placa, en donde se espera se active

enzimáticamente a su forma mutagenica y sea detectada en la prueba. La actividad de la fracción S-9 se mide por el numero de revertantes por placa. Cada concentración de fracción S-9 debe llevar un control con agua y la contraparte con 50ug de benzidina. La actividad se compara al ver que concentración de S-9 dió mayor numero de revertantes con benzidina contra el respectivo control. Ames y col. en 1973 menciona que la cepa TA 1538 tiene la misma mutacion marcadora que la TA 98. por lo cual se optó por utilizar esta ultima.

Preparación.

Todas las soluciones se mantuvieron en hielo. En un tubo se agregaron 0.28 ml de solución $MgCl_2-KCl$, 0.07ml de Glucosa-6-fosfato 0.1 M, 0.56 ml de NADP 1 M, y 7.00 ml de amortiguador fosfato 0.2 M dando un volumen final de 7.91 ml. aforando con agua estéril a 8.00 ml.

A continuación se repartieron porciones de 2ml de la mezcla anterior, en cuatro tubos a los que se les agregaron fracciones de S-9 y agua en las porciones que se muestran en la siguiente Tabla.

Concentración de S-9 (ul/placa)	0	50	100	150	200
Ingredientes (ml)					
Aqua esteril	1.5	1.15	0.80	0.45	0.10
S-9	0	0.35	0.70	1.05	1.40

De las diferentes concentraciones de la mezcla S-9 se tomaron 0.5ml para sustituir el amortiguador utilizado en la prueba de mutagenicidad, además de 0.1 ml de cultivo bacteriano y 0.1 ml de benzidina. la prueba se realizó por triplicado para cada concentración.

RESULTADOS

CONFIRMACION DE GENOTIPOS

Prueba de requerimiento de histidina.

La prueba fue realizada en todas las cepas mostrando crecimiento en las placas que contenian biotina/histidina a diferencia del crecimiento nulo en las placas de biotina. En el caso de la cepa TA 100 se crecio en placa de vidrio mostrando también resultados satisfactorios.

Confirmación de la mutación rfa.

En todas las cepas se presentaron resultados confirmativos, mostrándose claramente el halo de inhibición.

Confirmación de la mutación uvrB.

Las cepas mostraron una respuesta positiva (crecimiento nulo en la parte expuesta a la radiación).

Presencia del plásmido pKMI01.

Se observó un crecimiento en las cepas que presentaban el factor R incubadas en un medio que contenía ampicilina a diferencia de la cepa que se usó como control y que carecía de dicho factor.

Presencia del plásmido pAQ1.

La cepa utilizada en esta prueba fue la TA 102 la cual presentó crecimiento en el medio empleado que contenía ampicilina/tetraciclina, confirmandose la presencia del plásmido en la cepa. La cepa TA 97a utilizada como control no mostró crecimiento.

Prueba de revertantes.

Como puede observarse en la Tabla No.4. los valores obtenidos de revertantes de las cepas probadas caen dentro del rango de revertantes esperadas, reportadas por (Maron y Ames, 1983; Kier y col., 1986). Con esta prueba se afirmó que las cepas tenían los rangos de reversión característico para cada una de ellas, asegurando así su uso en las posteriores pruebas de mutagenicidad.

Prueba de actividad de la fracción S-9.

Los resultados obtenidos en esta prueba determinaron que la concentración de 100 ul de S-9 por placa, fue la que presentó mayor actividad enzimática interpretada esta por el número de revertantes obtenidos tanto para la prueba con Benzidina como con Dicloruro de Benzidina (Tablas Nos. 5 y 6; Gráficas Nos. 1 y 2).

TABLE No. 4. NIVELES DE REVERSION ESPONTANEA OBTENIDAS DE COLONIAS AISLADAS PARA CADA UNA DE LAS CEPAS DE PRUEBA.

CEPA <i>Salmonella Typhimurium</i>	REVERTANTES OBTENIDAS			REVERTANTES ESPONTANEAS ESPERADAS
TA 97a	155	166	174	90 - 180(a)
TA 98	29	22	34	15 - 60(b)
TA 100	124	136	112	75 - 200(b)
TA 102	304	308	275	240 - 360(c)

a) Maron y Ames. 1983.

b) Kier y col., 1986.

c) Ames. 1985.

TABLA No. 5. PROMEDIO DE REVERTANTES POR PLACA EN LA PRUEBA DE ACTIVIDAD CON LA CEPA TA 98 DE *Salmonella Typhimurium*.

MUESTRA	ul DE 5-9 POR PLACA			
	50	100	150	200
CONTROL	34.7	24.0	27.3	24.3
BENZIDINA DICLORURO	72.7	104.3	71.0	72.0

El promedio de revertantes aquí presentado fue el resultado de tres placas para cada una de las concentraciones de 5-9.

TABLA No. 6. PROMEDIO DE REVERTANTES POR PLACA EN LA PRUEBA DE ACTIVIDAD CON LA CEPA TA 98 DE *Salmonella Typhimurium* UTILIZANDO BENZIDINA.

MUESTRA	ul DE 5-9 POR PLACA			
	50	100	150	200
CONTROL	48.7	37.7	43.7	52.0
BENZIDINA	56.0	243.3	369.7	283.7

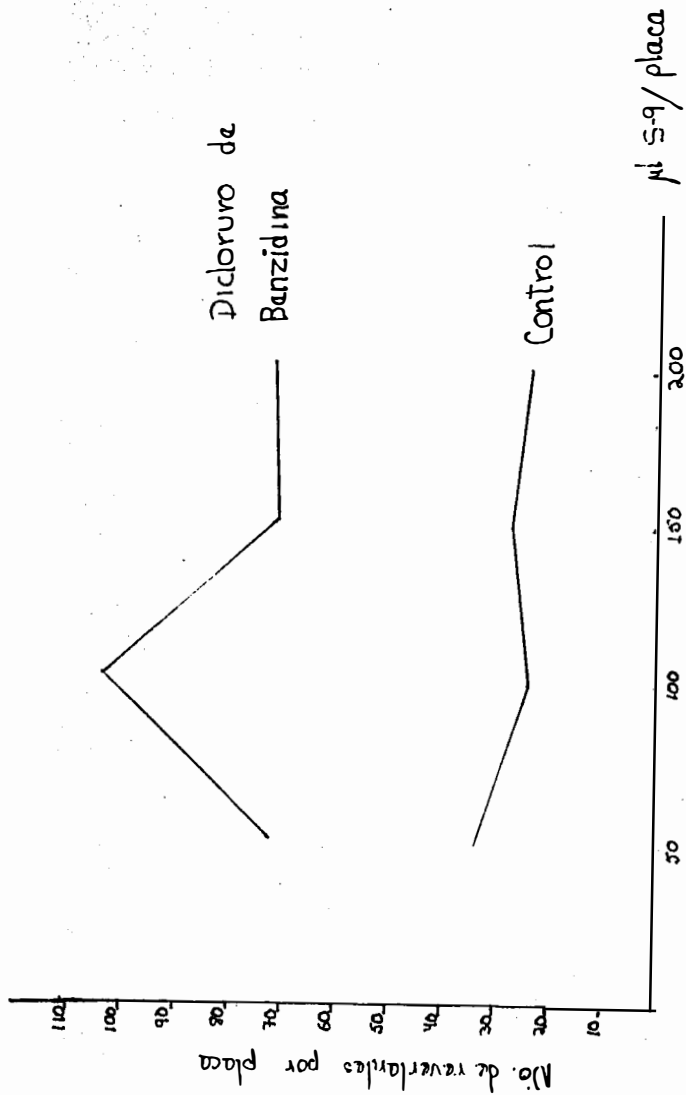
El promedio aquí presentado es el resultado de tres placas para cada una de las concentraciones de 5-9.

Prueba de incorporación en placa con preincubación, sin activación enzimática.

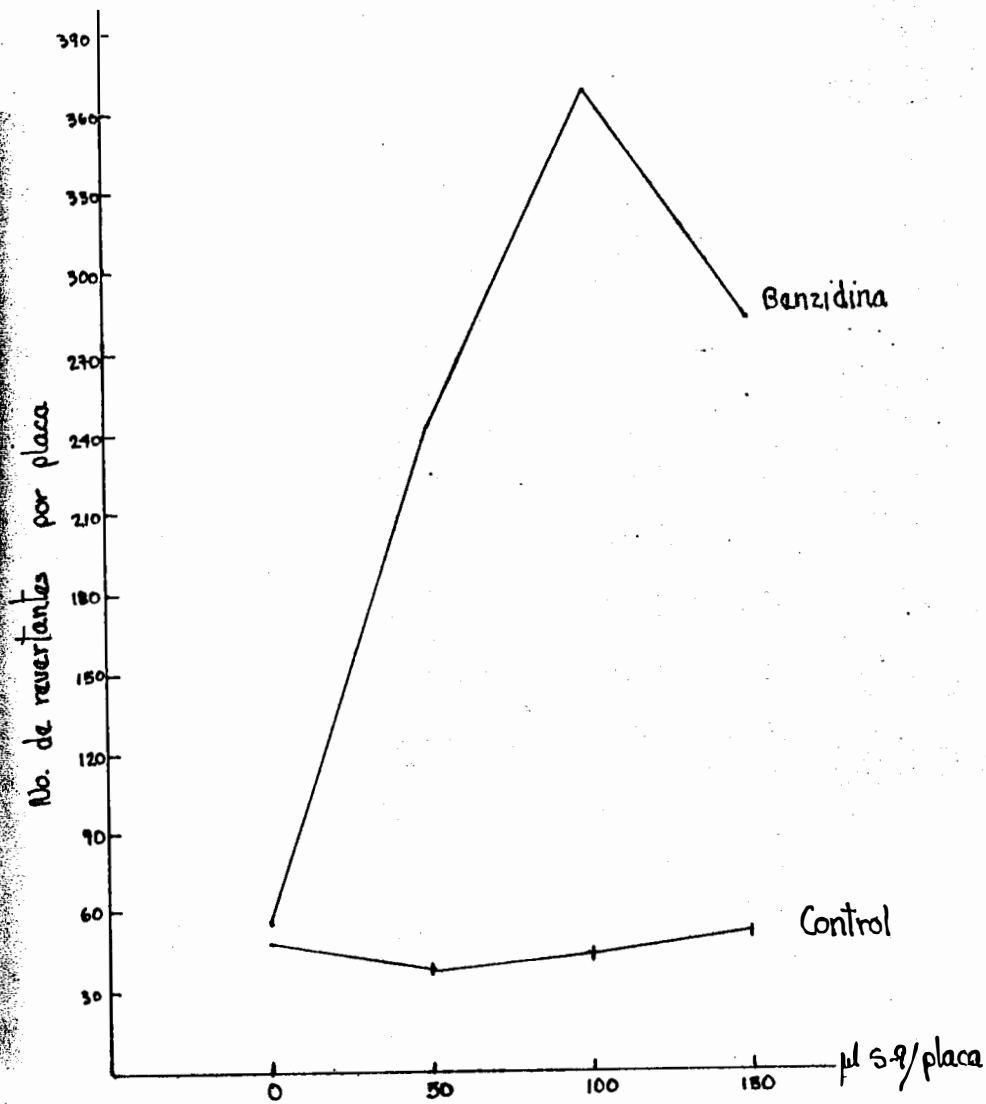
Segun (Maron y Ames, 1983; Kier y col., 1984), la aparición de un doble o un triple de colonias revertantes en una o dos de las concentraciones usadas, de la sustancia a prueba con respecto a las colonias revertantes en la placa control (sin sustancia de prueba en donde las revertantes son espontáneas), indica una probable respuesta mutagénica. Primero se procedió a comprobar la presencia de la capa de colonias de contraste (his-), pues si no existiera se indica un nivel muy tóxico para la bacteria y las colonias que aparecen, no se pueden contar como revertantes, pues su crecimiento se debe a la falta de competencia por la histidina existente en el medio. (Maron y Ames, 1983).

En base a esto los resultados aquí obtenidos muestran un resultado negativo Tabla No. 7 ya que se alcanza un grado de

CURVA DOSES RESPUESTA



CURVA DOSIS RESPUESTA



toxicidad visible en la disminución del número de revertantes en las concentraciones más altas y nunca un resultado mutagénico.

Prueba de incorporación en placa con preincubación con activación enzimática.

En la Tabla No. 8 se pueden observar los resultados obtenidos en esta prueba en la cual no se mostró un efecto mutagénico en ninguna de las concentraciones para las cepas TA 97a, TA 100 y TA 102, no así para la cepa TA 98 la cual muestra que en la concentración de 5000 μ g de Benzoato de sodio se obtuvo un incremento en la reversión de colonias. 78.7 revertantes por placa, con respecto a las obtenidas en el control 28.7 revertantes por placa, esto es más de dos veces la cantidad de reversión espontánea.

Para comprobar el posible efecto mutagénico del Benzoato de sodio

TABLA No. 7. REVERTANTES OBSERVADAS EN LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR INCORPORACION EN PLACA CON PREINCUBACION SIN ACTIVACION ENZIMATICA UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BENZOATO DE SODIO.

CEPA	CONCENTRACIONES DE BENZOATO DE SODIO ($\mu\text{g/placa}$)						
	0	10	100	500	1 000	5 000	10 000
Salmonella Typhimurium							
TA 97a	109.0	116.7	141.3	117.7	108.7	41.7	8.7
TA 98	28.3	25.3	25.0	27.0	28.0	27.5	22.0
TA 100	89.7	99.3	78.3	94.3	77.0	48.0	27.3
TA 102	270.3	181.0	171.0	225.3	184.3	72.3	15.0

El promedio de revertantes aquí presentado fue el resultado de tres placas para cada una de las concentraciones.

TABLA No. 8. REVERTANTES OBSERVADAS EN LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR INCORPORACION
 EN PLACA CON PREINCUBACION UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BENZOATO DE
 SODIO CON ACTIVACION ENZIMATICA.

CEPA	CONCENTRACIONES DE BENZOATO DE SODIO (ug/placa)						
	0	10	100	500	1 000	5 000	10 000
Salmonella Typhimurium							
TA 97a	170.6	171.3	175.0	138.0	144.3	21.0	1.3
TA 98	28.7	24.3	30.7	31.3	36.0	78.7	28.7
TA 100	44.0	48.0	51.3	50.0	42.0	48.0	5.5
TA 102	210.3	178.3	173.7	109.3	102.0	0.0	0.0

El promedio de revertantes es el resultado de tres placas para cada concentración.

en la cepa TA 98 en dicha concentración, se procedió a realizar una prueba con rangos de concentración mas estrecho para evaluar el resultado mediante una curva de dosis respuesta (Tabla No. 9).

Prueba de incorporacion en placa con activacion enzimática, utilizando concentraciones mas estrechas.

Maron y Ames (1983) Recomiendan confirmar un resultado sospechoso o positivo con un rango menor de concentraciones.

En este caso al observar los resultados mostrados en la Tabla No.9 se comprueba que no hay un efecto mutagenico del Benzoato de sodio en la cepa en que el resultado fue sospechoso (Gráfica No. 3).

TABLA No. 9. REVERTANTES OBTENIDOS DE LA COMPROBACION DE LA PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR INCORPORACION EN PLACA CON PREINCUBACION CON ACTIVACION ENZIMATICA UTILIZANDO RANGOS MENORES DE CONCENTRACION DE BENZOATO DE SODIO.

CEPA	ug POR PLACA DE BENZOATO DE SODIO				
	0	1 000	3 000	5 000	7 000
<i>S. typhimurium</i>					
TA 98	44.7	54.3	35.3	37.3	23.3

El promedio aqui presentado es el resultado de tres placas para cada una de las concentraciones de Benzoato de Sodio.

DISCUSION

Requerimiento de histidina.

Una de las características importantes de estas cepas es la mutación (his-), lo cual indica una ineficiencia de la bacteria para crecer en un medio carente de histidina (Maron y Ames, 1983; Venitt y col., 1986). Un mutágeno es capaz de causar un daño a nivel ADN, provocando una reversión de este carácter. Esta característica es importante ya que permite detectar mutágenos que restauren su capacidad para sintetizar histidina. Una vez realizada esta confirmación genotípica se pudo comprobar la presencia de dicha mutación, en las cepas utilizadas en esta prueba.

En el caso de la cepa FA 100, se creció en placas de vidrio debido

a que en ciertas ocasiones, mostraba crecimiento en las placas con biotina. Es importante aclarar que se utilizaron placas de vidrio debido a que habia un incremento de revertantes como consecuencia del Etilen Oxido, utilizado en la esterilizacion de placas de petri desechables, segun indicaciones de Maron y Ames (1983) y que fue comprobado en forma practica.

Una vez realizada esta modificacion se obtuvieron resultados satisfactorios.

Mutacion rfa.

La importancia de esta mutacion radica en la permeabilidad de la pared lipopolisacarida que recubre la superficie de la bacteria, incrementando asi el paso de sustancias de alto peso molecular, que no penetran en una pared celular normal y como consecuencia aumentando la sensibilidad a mutagenos (Maron y Ames, 1983; Kier

y col., 1966).

La utilización de un compuesto de alto peso molecular como es el cristal violeta, indica la presencia de esta mutación ya que sus cristales logran penetrar a la bacteria produciendo un efecto letal. Este comportamiento se expresa presentando en las placas el halo de inhibición de crecimiento, alrededor del punto en donde se añadió el reactivo.

Mutación uvrB.

(Kier y col., 1986; Venitt y col., 1986), han mencionado que esta mutación contiene más sensibilidad en la detección de mutágenos.

Esta mutación consiste en la incapacidad, para reparar mediante escisiones daños en el ADN. Esta prueba ratificó la presencia de esta mutación en las cepas TA 97a, TA 98, TA 100, al no mostrar

crecimiento en las zonas expuestas a la radiación UV. del cultivo. Solamente la cepa TA 102, la cual carece de esta mutación presenta un crecimiento normal en ambas zonas.

Plasmido pKM101.

La presencia de este plasmido incrementa la sensibilidad a mutágenos químicos y radiación UV (Kier y col., 1986; Venitt y col., 1986). Este plasmido presenta una región de resistencia a ampicilina. El antibiótico permite determinar la presencia del plasmido en la bacteria mediante una prueba bioquímica. Según los resultados aquí obtenidos comprobaron la presencia del plasmido pKM101 en las cepas probadas.

Plasmido pAQ1.

Finalmente se confirmó la presencia del plasmido pAQ1, en la cepa TA 102, su importancia radica en ser un plasmido multicopia que acarrea la mutación hisG428 y aunado a el plasmido pKM101 le

confiere a las cepas mayor sensibilidad a mutagenos (Kier y col., 1986; Maon y Ames, 1983). Su presencia fue confirmada mediante el ensayo bioquimico con ampicilina/tetraciclina (regiones de resistencia que presenta el plásmido).

En algunas ocasiones se tuvo el problema de que se habia perdido el plásmido en algunas de las cepas congeladas y lo que se hizo en este caso fue volver a reanclar colonias.

Prueba de revertantes.

Maron y Ames (1983) y Kier y col. (1986), sostienen que la reversión espontanea de las cepas utilizadas para este ensayo es de suma importancia ya que dicha característica diferencia a células auxotrotas a histidina con aquellas que carecen de tal deficiencia. esta característica es vital para cualquier ensayo de mutagenicidad.

Para ello el ensayo realizado en este proyecto fue para comprobar que nuestras cepas tenían este carácter genotípico, deficiencia o auxotrofia a histidina.

Los resultados obtenidos muestran claramente que las cuatro cepas probadas se encontraron dentro del rango citado por (Haron y Ames, 1983).

Uno de los problemas más delicados con el que se encontró es que muchos de los reaislados que se hacían, salían del rango de reversión espontánea normal de la cepa a la que pertenecían, por lo que se tuvieron que hacer numerosos reaislados para obtener uno que presentara el rango de reversión espontánea satisfactorio.

Prueba de incorporación en placa con preincubación sin activación

enzimática.

Como se puede observar en la tabla No. 7. en ninguna de las concentraciones. del Benzoato de sodio. probadas en las cuatro cepas. mostraron un resultado mutagenico positivo ya que la incidencia de reversion en cada una de las concentraciones son semejantes en magnitud al control (concentracion 0). De igual forma puede notarse que a medida que las concentraciones de Benzoato de sodio aumenta. el numero de revertantes disminuye. esto sugiere que hay un grado de toxicidad para la bacteria.

Actividad enzimática.

Como se puede observar en las tablas No. 5 y 6. la concentracion de 100 ul de S-9 por placa fue la que mostro los rangos de reversion mayores aunque con una variacion en su numero siendo mayor en la prueba con Benzidina. Esto permitio utilizar la concentracion enzimatica normal y prescindir asi del uso de carcinogenos como inductores como era el caso del Aroclor 1254 el

cual es un potente carcinogeno de gran estabilidad y de alto riesgo en su manipulacion.

Prueba de incorporacion en placa con preincubacion y con activacion enzimatica.

En esta prueba la incidencia de reversion mostro un cambio ligeramente significativo para la cepa TA98 en la concentracion de 5000 uq por placa de Benzoato de sodio. esto es un promedio de revertantes de 18.7 contra 28.7 revertantes espontaneas del testigo tabla No 8.

Las otras cepas no mostraron un aumento significativo en la incidencia de reversion. Al igual que en la prueba anterior se observo un efecto toxico para la bacteria en las maximas concentraciones utilizadas.

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados de las pruebas de confirmación de genotipos nos dan suficientes datos para asegurar el buen estado de las cepas en la realización de cualquier prueba de mutagenicidad en la técnica descrita. Una vez obtenidos estos resultados las cepas se almacenan a -70°C .
- 2.- Las cepas utilizadas en el ensayo, presentaron un rango de reversion espontanea normal.
- 3.- La prueba de actividad enzimática mostro un promedio de reversion bacteriana significativo para prescindir del uso de un carcinógeno como inductor.

4.- El Benzoato de sodio probado en diferentes concentraciones en la prueba de incorporacion en placa por preincubacion sin activacion enzimatica no mostro resultado mutagenico.

5.- En la prueba de incorporacion en placa por preincubacion sin activacion enzimatica el Benzoato de sodio presento un efecto toxico en concentraciones de 5000 y 10 000ug/placa para las cepas TA 97a, TA 100 y TA 102.

6.- Para el caso especifico de la cepa TA 98 aparentemente el Benzoato de sodio necesita de ser activado para expresarse como posible mutageno utilizando la mezcla S-9 como activador enzimatico.

7. En la prueba de incorporacion en placa por preincubacion con activacion enzimatica el Benzoato de sodio mostro tener un

efecto tóxico en concentraciones de 5 000 y 10 000ug/placa para todas las cepas probadas.

8.- El Benzoato de sodio en las concentraciones probadas no mostro efecto mutagenico para las cepas TA 97a, TA 98, TA 100 y TA 102 de Salmonella typhimurium en la prueba de Ames.

9.- El reaslamiento de las cepas utilizadas en la prueba de Ames es uno de los procedimientos de mayor problema debido a la delicadeza genetica que presentan.

10.- Una vez montada la prueba de Ames se podrian realizar ensayos de mutagenicidad en corto plazo dando resultados que sirvieran como base para saber si una sustancia podria ser un carcinogeno de tipo iniciador.

BIBLIOGRAFIA

Ames. B.N. and H.J. Withfield, Jr. 1966. Frameshift Mutagenicity in Salmonella. In: "Microbial Test for Mutagenicity/Carcinogenicity" 1985. Karl A. Traul Editor, Van Nostrand Reinhold Company, New York. C.8. 69-73.

Ames. B.N. 1971. The detection of Chemical Mutagens whit Enteric Bacteria. In: "Microbial Test for Mutagenicity/Carcinogenicity" 1985. Karl A. Trul Editor, Van Nostrand Reinhold Company, New York. C. 12. 113-128.

Ames. B.N., et al 1973. Carcinogens Are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. In: "Microbial Test for Mutagenicity/Carcinogenicity" 1985. Karl A. Traul Editor, Van

Nostrand Reinhold Company. New York, C. S. 69-73.

Ames, B.N., J McCann, and E. Yamasaki 1975. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mut. Res. 31. 347-364.

Ames, B.N. 1983. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens Science 221. 1256-1263.

Ames, B. N.; R. Magaw and L. S. Gold 1987. Ranking possible Carcinogenic hazards. Science 236. 271-280.

Dziedzic, J.D. 1986. Antimicrobial Agents. Food Technology Sep. 40. 104-111.

FAO/OMS 1973. Lista de aditivos evaluados en cuanto a su inocuidad en el uso alimenticio. Comisión del Codex

alimentarius primera serie. 45-77

Frejaville. I.P. 1977. Les Dangers des produits domestiques.

Editions du Seuil.46-50.

Freifelder. D. Molecular Biology: A Comprehensive Introduction to
Prokaryotes and Eukaryotes. Jones and Bartlett Publishers, Inc.
Boston Ma (USA). 1983. 979.

Gentile. J.M., Plewa. 1982. Plant Dependent Mutation Assays. In
Fleck R.A. Hollander A (eds): "Genetic Toxicology: An
Agricultural Perspective" New York: Plenum Press. 327-352.

Kada. T., Inoue. K. Morita. and M. Namiki 1986 Dietary
Desmutagens. In Knudsen. Ib (Ed): "Genetic Toxicology of the
Diet: Proceedings of a Satellite Symposium Conference on
Environmental Mutagens Held in Copenhagen. Denmark, June 19-22.

1985" New York: Alan R. Liss. Inc., 245-253.

Kier. L.D. et al. 1986. The Salmonella typhimurium/Mammalian
Microsomal Assay. A Report of the U.S. Environmental Protection
Agency Gene-Tox Program. Mut. Res. 168, 69-240.

Levin. D.E., E.Yamasaki and B.N. Ames 1982. A New Salmonella
Tester Strain. TA 97. for the Detection of Frameshift Mutagens.
Mut. Res. 94. 315-330.

Levin. D.E., et al 1982. A New Salmonella Tester Strain
(TA 102) with A.T Base Pairs at the Site of Mutagens. Proc.
Natl. Acad. Sc. (USA). 79. 7445-7449.

Levin. D.E., M. Hollstein, M.F. Christman, and B.N. Ames 1984.
Detection of Oxidative Mutagens with a New Salmonella Tester
Strain (TA 102). Methods in Enzimology. 105. 249-254.

Luck, E. 1977. Conservación química de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza (España) 243.

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. Molecular Cloning (A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory 1982. New York. (USA). 545

Maron, D.M. and B.N. Ames 1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mut. Res., 113. 173-215.

Plewa, M.J. and J.M. Gentile 1982. The Activation of Chemicals into Mutagens by Green Plants. In Hollander, A., F.J. de Serres (Eds): "Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection. Vol. VII". New York: Plenum Press, 401-420.

Plewa, M.J., D.L. Weaver, L.C. Blair, and J.M. Gentile 1983. Activation of 2-Aminofluorene by Cultured Plant Cells. Science, 219. 1427-1429.

Primo. E.Y. 1982. Química Agrícola III: Alimentos. Editorial

Alhambra S.A. Madrid. 683.

Quillardet. P. and Hofnung. M. 1985. The SOS Chromotest. a

colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mut.

Res. 147. 65-78.

Suzimura. T. 1982. Mutagens, Carcinogens and Tumor Promotes in

Our Daily Food. Cancer 49 (May 15). 1970-1984.

Venitt. S. et al.. 1986 Short-term Assays Using Bacteria. In

Montesano. R. et al. (Eds): "Long-Term and Short-Term Assays

for Carcinogens A Critical Appraisal". Iarc Scientific

Publications. No. 83. International Agency for Research on

Cancer. Lyon. 1986. 143-161.

Windholz. M. 1976. The Merck Index. Merck and Co., Inc, 9th Ed.

1109.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....
Número...1364/S7...

SRITA. LUZ MARIA PINAL ZUAZO
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "ESTANDARIZACION DEL ENSAYO DE SAL MONELLA/MICROSOMAL PARA DETERMINAR LA MUTAGENICIDAD DEL BEN ZOATO DE SODIO, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Biol. Guillermo -
Zuñiga González.

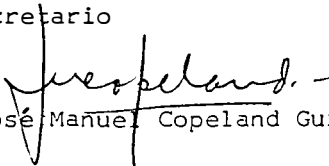


FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Noviembre 10 de 1987
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario


Dr. José Manuel Copeland Gurdíel

c.c.p. El Biol. Guillermo Zuñiga González Pte.-
c.c.p. El Expediente del Alumno

CAO/JMCG/gpg

Guadalajara, Jal; Noviembre 26 de 1987

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Presente.

Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la srta. Luz Maria Pinal Zuazo, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulada: ESTANDARIZACION DEL ENSAYO DE SALMONELLA/MICROSOMAL PARA DETERMINAR LA MUTAGENICIDAD DEL BENZOATO DE SODIO, realizado en el CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA TECNICA DEL ESTADO DE JALISCO.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Biol. GUILLERMO M. ZUÑIGA GONZALEZ.
Director de tesis.