

300627
12
26



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM

**EFFECTO GENOTOXICO DE EXTRACTOS
DE PARTICULAS SUSPENDIDAS EN
ATMOSFERAS URBANAS**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N :

**MARIANA GARCIA SERRATO
GABRIELA MEDINA JIMENEZ**

DIRECTOR DE TESIS :

MA. LETICIA LINARES ESTUDILLO

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

Se sabe que los extractos de partículas aéreas orgánicas ambientales poseen actividad mutagénica, así mismo, existen evidencias epidemiológicas que sugieren un incremento en el riesgo de padecer cáncer pulmonar asociado a la exposición a este tipo de partículas. Se ha encontrado una relación entre la mutagenicidad de extractos de partículas suspendidas y la concentración de sustancias contaminantes. En vista de lo anterior consideramos importante determinar la actividad mutagénica de extractos de partículas suspendidas en el aire que respiramos en nuestra ciudad, y, con fines comparativos, decidimos estudiar también extractos de partículas del aire de la Ciudad de Querétaro.

Los extractos obtenidos fueron probados en el Ensayo de Ames, que es una de las pruebas más difundidas para la identificación de mutaciones génicas.

Comprobamos que existe actividad mutagénica en los extractos probados, y que esta actividad es mayor en los extractos de la Ciudad de México que en los de la ciudad de Querétaro.

Con el uso de cepas de Salmonella typhimurium con actividad enzimática modificada, pudimos además determinar la participación de hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados o nitroarenos en la mutagenicidad total de los extractos.

INDICE

INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	7
CAPITULO I. NITROARENOS	8
CAPITULO II. ENSAYO DE AMES PARA LA EVALUACION DE MUTACIONES GENICAS EN <u>S. typhimurium</u>	30
CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS	37
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION	48
CAPITULO V. CONCLUSIONES	87
CAPITULO VI. PERSPECTIVAS	88
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	89

INTRODUCCION

El riesgo derivado de la exposición a contaminantes con actividad biológica, producidos por el hombre, y la cada vez más alta concentración de éstos en las zonas urbanas, implican un problema que requiere de atención especial.

El impacto negativo en la salud humana asociado a los componentes orgánicos suspendidos en el aire se debe específicamente a materia orgánica (moléculas policíclicas e hidrocarburos halogenados) y pesticidas (213); todos ellos presentan problemas ecológicos especiales aunque se ha dado una mayor atención al estudio de moléculas orgánicas policíclicas. Se ha demostrado que algunas de estas moléculas son potentes mutágenos y carcinógenos tales como el benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, criseno, fluoreno, 2-metilfenantreno, pirenos y nitroarenos (5,30,70,214,215,216). Estas sustancias son subproductos de la combustión incompleta de gasolina, diesel, carbón, madera o cualquier otro combustible de origen orgánico o de las reacciones de dichos subproductos con catalizadores gaseosos presentes en aire contaminado, y son fácilmente adsorbidas sobre partículas suspendidas en el ambiente (1,70,71).

Las partículas respirables (de un diámetro $\leq 10 \mu$) son de especial interés ya que tienen una prolongada permanencia en la atmósfera y, por lo tanto, un gran potencial para ser inhaladas (217) y depositadas en el pulmón a nivel alveolar (218), donde permanecen un largo período de tiempo exponiendo a las células a las sustancias adsorbidas en ellas (218,219). Estudios epidemiológicos han demostrado que los sitios donde se depositan las partículas en el pulmón

son también sitios favorables a la inducción de cáncer (221).

La carcinogenicidad de la materia orgánica particulada para animales de laboratorio, se conoce desde hace cincuenta años (220, 222) y había sido atribuida a la presencia de benzo [a] pireno y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos (54, 223 a 226) . Las investigaciones posteriores demostraron que este efecto no podía ser atribuido a la concentración reportada de dichas sustancias; de hecho, había un "exceso de carcinogenicidad" debido a compuestos no identificados que inducían mutaciones por corrimiento de bases y no requerían activación metabólica (70, 79, 222). En estudios subsecuentes se identificaron a estas sustancias como hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados o nitroarenos (1, 2, 30, 67, 227).

Se ha comprobado que los nitroarenos son responsables de un gran porcentaje de la mutagenicidad total debida a materia orgánica particulada (30,33,50,53,67,70,79,227).

Los nitroarenos abundan en el ambiente debido a la facilidad con la que se forman en sistemas de combustión o por las reacciones de sus productos con óxidos de nitrógeno (70). Estas moléculas han sido detectadas en extractos de una gran cantidad de emisiones de contaminantes y en atmósferas urbanas (1,2,3). Además, se sabe que son potentes mutágenos y carcinógenos.

Las pruebas de laboratorio a corto plazo para la detección de la posible actividad mutagénica de mexclas complejas asociada con partículas suspendidas, han sido de gran utilidad en la investigación del riesgo de genotoxicidad ambiental (2, 219). El hecho de que la mayor

parte de los carcinógenos son también mutágenos (203, 228, 229), hacen de estas pruebas una valiosa herramienta para la evaluación de riesgo que implican mezclas complejas, como aire y agua contaminados.

El ensayo de Ames con Salmonella Typhimurium constituye un método *in vitro* para la evaluación de mutágenos confiable, rápido y económico, basado en un sistema genético bien definido (230). Además, existe una correlación entre la mutagenicidad de la sustancias en este sistema y su carcinogenicidad, de más del 80% (231,232).

Este sistema bacteriano ha sido el ensayo de mutagenicidad más utilizado para la evaluación de mezclas ambientales complejas, tales como la caracterización de las principales fuentes de emisión de sustancias genotóxicas (233 a 240), la identificación de los constituyentes atmosféricos con actividad mutagénica (1), la evaluación de parámetros meteorológicos y atmosféricos que influyen en la mutagenicidad (241 a 243) y el monitoreo de áreas industriales y rurales (244 a 246). Además este ensayo ha sido utilizado para correlacionar la mutagenicidad de materia orgánica particulada en la atmósfera urbana y el incremento en las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón (247,248).

La utilización de las cepas de Salmonella typhimurium con actividad enzimática modificada, desarrolladas por Watanabe y col. (207 a 209), ha incrementado la sensibilidad de la prueba a mutágenos específicos como son los nitroarenos.

En virtud de lo anterior, el ensayo de Ames junto con otros ensayos *in vitro*, han demostrado ser herramientas valiosas para establecer lineamientos en la evaluación de riesgo al humano (249), así como para el entendimiento de los mecanismos moleculares de la mutagénesis y el cáncer (219).

OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo probar la actividad mutagénica de extractos de partículas suspendidas en la atmósfera de zonas urbanas de nuestro país, específicamente de la Cd. de México y la Cd. de Querétaro, utilizando para ello el Ensayo de Ames para la evaluación de mutaciones génicas en Salmonella typhimurium.

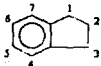

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la participación de hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados o nitroarenos en la mutagenicidad total de dichos extractos.


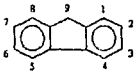
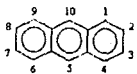
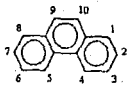
Utilizar cepas de Salmonella typhimurium con producción elevada de las enzimas involucradas en la biotransformación de nitroarenos a intermediarios capaces de interactuar con el ADN (mutagénicos).

NITROARENOS

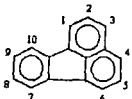
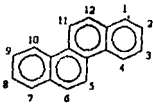
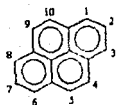
Los hidrocarburos policíclicos aromáticos nitrados o nitroarenos son un grupo de compuestos formados por anillos aromáticos fusionados que contienen uno o más grupos nitro unidos por un enlace covalente a los átomos de carbono del ciclo. La nitración se lleva a cabo en diferentes posiciones de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs), dependiendo del tipo de reacción que tenga lugar.

ESTRUCTURAS DE HAPs Y SUS DERIVADOS NITRADOS		
HAP	ESTRUCTURA	DERIVADOS NITRADOS
Indeno		5-nitroindeno 6-nitroindeno
Naftaleno		1-nitronaftaleno 2-nitronaftaleno 2-metil-1-nitronaftaleno 1-metil-2-nitronaftaleno 3-metil-2-nitronaftaleno anhídrido 3-nitro-1,8-naftalénico 1,3-dinitronaftaleno 1,5-dinitronaftaleno 1,8-dinitronaftol 2,3,5-trinitronaftaleno 1,3,6,8-tetranitronaftaleno

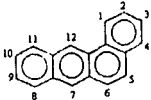
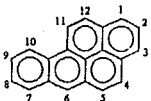
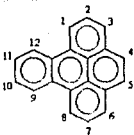
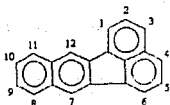
ESTRUCTURAS DE HAPs Y SUS DERIVADOS NITRADOS

HAP	ESTRUCTURA	DERIVADOS NITRADOS
Acenafteno		3-nitroacenafteno 5-nitroacenafteno
Fluoreno		2-nitrofluoreno 2-amino-7-nitrofluoreno 2-acetamido-7-nitrofluoreno 2-hidroxi-7-nitrofluoreno 2-metoxi-7-nitrofluoreno 2-cloro-7-nitrofluoreno 3-nitro-9-fluorenona 2,7-dinitrofluoreno 2,7-dinitro-9-fluorenona 2,4,7-trinitro-9-fluorenona 2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenona
Antraceno		2-nitroantraceno 9-nitroantraceno 9-nitroantraceno-trans-3,4-dihidrodiol 9-nitroantraceno-trans-1,2-dihidrodiol 9-10-dinitroantraceno
Fenantreno		2-nitrofenantreno 9-nitrofenantreno

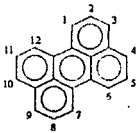
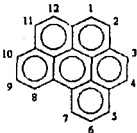
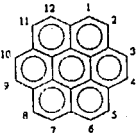
ESTRUCTURAS DE HAPs Y SUS DERIVADOS NITRADOS

HAP	ESTRUCTURA	DERIVADOS NITRADOS
Fluoranteno		1-nitrofluoranteno 3-nitrofluoranteno 7-nitrofluoranteno 8-nitrofluoranteno
Criseno		2-nitrocriseno 5-nitrocriseno 6-nitrocriseno
Pireno		1-nitropireno 1-nitraspireno N-hidroxi-N-acetil-1-aminopireno 10-hidroxi-1-nitropireno 8-hidroxi-1-nitropireno 6-hidroxi-1-nitropireno 3-hidroxi-1-nitropireno 2-hidroxi-1-nitropireno 1-nitro-3-acetoxipireno 1-nitro-6-acetoxipireno 1-nitro-8-acetoxipireno 2-nitropireno 4-nitropireno 1,3-dinitropireno 1,6-dinitropireno 1,8-dinitropireno 1-amino-8-nitropireno 1,3,6-trinitropireno 1,3,6,8-tetranitropireno

ESTRUCTURAS DE HAPs Y SUS DERIVADOS NITRADOS

HAP	ESTRUCTURA	DERIVADOS NITRADOS
Benzo[<i>a</i>]antraceno		7-nitrobenzo[<i>a</i>]antraceno 7-nitrobenzo[<i>a</i>]antraceno-trans-3,4-dihidrodiol 7-nitrobenzo[<i>a</i>]antraceno-trans-8,9-dihidrodiol
Benzo[<i>a</i>]pireno		1-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno 1-nitro-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[<i>a</i>]pireno 3-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno 3-nitro-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[<i>a</i>]pireno 3-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno-trans-7,8-dihidrodiol 3-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno-trans-9,10-dihidrodiol 6-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno 1-hidroxi-6-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno 3-hidroxi-6-nitrobenzo[<i>a</i>]pireno 6-nitro-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[<i>a</i>]pireno 6-nitro-4,5-dihidrobenzo[<i>a</i>]pireno 6-nitro-7-hidroxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[<i>a</i>]pireno
Benzo[<i>e</i>]pireno		1-nitrobenzo[<i>e</i>]pireno 3-nitrobenzo[<i>e</i>]pireno
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno		3-nitrobenzo[<i>k</i>]fluoranteno

ESTRUCTURAS DE HAPs Y SUS DERIVADOS NITRADOS

HAP	ESTRUCTURA	DERIVADOS NITRADOS
Perileno		3-nitroperileno
Benzo[g,h,i]perileno		4-nitrobenzo[g,h,i]perileno 7-nitrobenzo[g,h,i]perileno
Coroneno		1-nitrocoroneno

Los nitroarenos constituyen un grupo de sustancias de gran importancia ecológica debido a su amplio espectro de mutagenicidad y carcinogenicidad y a su amplia distribución en el ambiente. (1 a 11).

La fuente principal de los nitroarenos presentes en la atmósfera son los procesos de

combustión incompleta (3). Esto ha sido confirmado por la detección de los mismos, en extractos de emisiones de motores de diesel y gasolina, emisiones de motor de avión, aceite de motor usado, efluentes de gasolineras, partículas de ceniza, condensados de humo de cigarro, pollo asado, en emisiones que se originan de incineradores, calentadores de keroseno, sistemas de calefacción doméstico, estufas de madera y recientemente en extractos de partículas suspendidas en atmósferas urbanas (12 a 67). También pueden ser el resultado de fenómenos naturales como son los incendios forestales y las erupciones volcánicas, sin embargo esto no ha sido suficientemente documentado.(1)

Con excepción de los fenómenos naturales mencionados, la presencia de nitroarenos en el ambiente parece ser el resultado de las actividades realizadas por el hombre.

Dentro de los procesos de combustión incompleta, los nitroarenos parecen formarse de dos maneras:

- Pueden ser subproductos de las reacciones que tienen lugar en los procesos de combustión en presencia del nitrógeno atmosférico (46)
- Pueden ser producto de reacciones atmosféricas entre los hidrocarburos aromáticos policíclicos producto de los sistemas de combustión a alta temperatura (motores, procesos industriales, etc.), y catalizadores como el ozono, nitrato de peroxiacetilo, radicales libres, óxidos de nitrógeno y trazas de diversos ácidos presentes en atmósferas contaminadas (68 a 72).

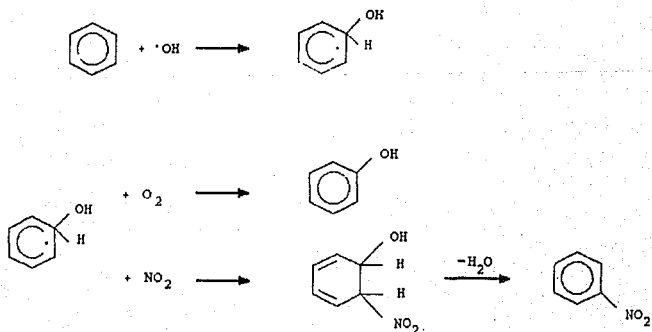
Se han propuesto dos mecanismos de reacción para la formación de nitroareños:

- Sustitución electrofílica aromática catalizada por ácidos (3)



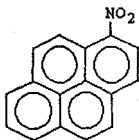
Donde: H₂A: Cualquier ácido
 ArH: Cualquier molécula cíclica aromática

- Reacción de nitración por radicales libres (radical OH), emitidos durante la combustión (73,74)

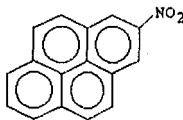


La distribución y cantidad de nitroarenos formados parece ser función del proceso de combustión (temperatura y configuración), y de la naturaleza de los contaminantes presentes en la atmósfera, independientemente del tipo de combustible utilizado (46, 75). El proceso de combustión más estudiado a la fecha es el de motores a diesel, en cuyas emisiones se han encontrado más de 60 moléculas diferentes de nitroarenos (20, 36, 44). Al inicio de la combustión, los compuestos que se producen en mayor grado presentan 1 o 2 anillos fusionados mientras que durante la combustión presentan 3 o 4 anillos (48).

Más de 102 tipos de nitroarenos se han detectado tanto en extractos de emisiones de diesel, como en extractos de emisiones de otros sistemas de combustión, en cenizas y aire contaminado (45, 62, 64, 76). De este grupo, la sustancia más abundante es el 1-nitropireno, mientras que las sustancias con mayor actividad mutagénica son los dinitropirenos (13, 20, 30, 32, 34, 37, 77, 78); siendo éstos unos de los mutágenos más potentes que se conocen. Debido al importante papel que juegan en la mutagenicidad total de extractos de partículas ambientales y de emisiones contaminantes, la mayor parte de los estudios realizados se refieren, particularmente, a los nitropirenos.

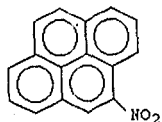


1-Nitropireno

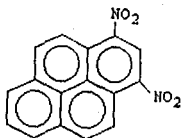


2-Nitropireno

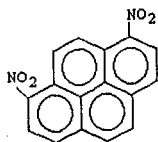
ESTRUCTURAS DE NITROPIRENOS



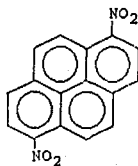
4-Nitropireno



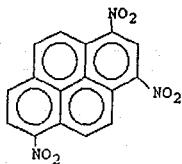
1,3-Dinitropireno



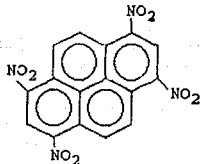
1,8-Dinitropireno



1,6-Dinitropireno



1,3,6-Trinitropireno



1,3,6,8-Tetrinitropireno

ESTRUCTURAS DE NITROPIRENOS

La mutagenicidad de los nitroarenos en bacterias ha sido estudiada con detalle en el ensayo de Ames (con *Salmonella typhimurium*), aunque también existen estudios desarrollados en otros sistemas. La revisión de los resultados reportados ha dado lugar a varias observaciones.

Con respecto a la relación estructura - actividad de los nitroarenos se ha definido que:

- Las sustancias bicíclicas inducen mutaciones de sustitución de bases (e.g. nitronaftalenos y nitroquinolinas), mientras que los nitroarenos que tienen 3 o más anillos fusionados inducen principalmente, mutaciones de corrimiento de bases (e.g. nitropirenos y nitrofluorenos) (3).
- Algunos compuestos con polaridad intermedia como los dinitropirenos y dinitrofluorantenos, muestran una mutagenicidad más alta que los no polares (79).
- Aparentemente, hay un tamaño de molécula y configuración óptimas para máxima mutagenicidad: la actividad se incrementa a medida que aumenta el número de anillos fusionados (de biciclo a tetraciclo), sin embargo las moléculas de cinco ciclos presentan una disminución abrupta de la mutagenicidad (3).
- La posición del o los grupos nitro dentro de la molécula juega un papel importante en la potencia mutagénica del compuesto (3).
- El incremento en el grado de nitración de la molécula es paralelo al incremento en la mutagenicidad (3,79).

Como se mencionó, algunos nitroarenos inducen mutaciones del tipo de sustitución de bases, pero la mayoría inducen mutaciones de corrimiento de bases. Estas no se deben a la

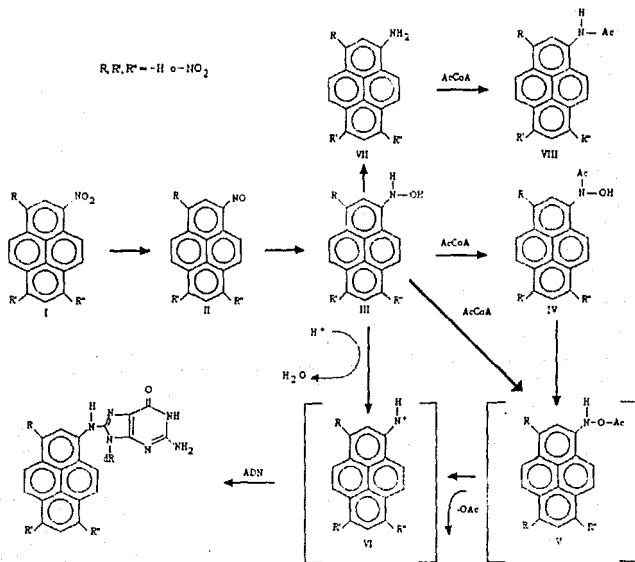
simple intercalación de la molécula entre los nucleótidos, como con la mayoría de este tipo de mutágenos, sino a la formación de aductos con el ADN (83), que se forman por la unión covalente de una especie electrofílica a alguna de las bases de la cadena.

En el ensayo de Ames, los nitroarenos no requieren de activación metabólica exógena por enzimas de mamífero, es decir, no requieren de la adición de S9 (enzimas microsomales de hígado de ratón) para ser mutagénicos (1,3) y por ello puede decirse que son "mutágenos directos". Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los mutágenos directos, los nitroarenos no son electrófilos, de hecho, no son capaces de reaccionar directamente con el ADN purificado (81 a 83). Esto indica que los nitroarenos no son las especies activas y que, por lo tanto, requieren de activación metabólica para ser transformados a moléculas capaces de formar aductos con el ADN.

Esta activación metabólica la realizan las enzimas bacterianas: las bacterias como *S. typhimurium* poseen una familia de nitrorreductasas (3,84 a 87) que transforman a los nitroarenos en los correspondientes N- hidroxiaminoarenos (82,88 a 90), estas enzimas también están presentes en células de mamíferos. Los N-hidroxiaminoarenos, sufren una conversión a iones arilnitrenio, que son las especies mutagénicamente activas (electrofílicas) (1). Para algunos nitroarenos, la conversión a N-hidroxilaminas no es suficiente y requieren de una esterificación posterior catalizada por acetiltransferasas bacterianas, para tener actividad mutagénica (91 a 94).

Frederick A. Beland (95) propone un mecanismo de la activación metabólica que se lleva

a cabo para los nitropirenos y que podría aplicarse a los nitroarenos en general:

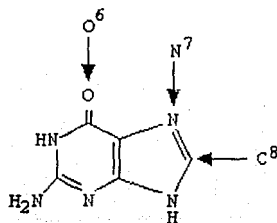


METABOLISMO DE NITROPIRENOS POR ENZIMAS BACTERIANAS

Los nitropirenos (I) sufren una reducción secuencial a nitrosopireno (II) y N-hidroxiaminopireno (III). Con 1-nitropireno, el N-hidroxiamino reacciona directamente con el

ADN, mientras que los metabolitos análogos de los dinitropirenos requieren de una activación posterior por acetilcoenzima A: N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa. Esta activación puede ocurrir a través de la formación de ácido hidroxilamínico (IV) que se convierte en N-acetoxiarilamina (V) por acción de la N,O-acetiltransferasa. Alternativamente la N-acetoxiarilamina puede formarse por una O-acetilación directa del N-hidroxiaminopireno. En todos los casos se obtiene un intermediario arilnitrenio (VI), capaz de reaccionar directamente con el ADN. El metabolito N-hidroxi-amino III también puede ser reducido a aminopireno (VII) y acetilarse posteriormente a N-acetilaminopireno (VIII).

La mutagenicidad de los nitroarenos se debe a la formación de aductos y ésta depende de la capacidad del electrófilo resultante de reaccionar con un sitio nucleofílico adecuado en el ADN. Esto está limitado por factores tanto estéricos como electrónicos (1). La identificación de los aductos del ADN bacteriano (86,95 a 99), indica que el sitio preferencial para la formación de los mismos, es la guanina, que presenta diversos sitios nucleofílicos capaces de interactuar con el electrófilo.



GUANINA

Las energías de interacción de estos sitios indican que la nucleofilidad va en orden decreciente de $N^7 > O^6 > C^8$ (1,100).

Las reacciones en N^7 no resultan en eventos mutagénicos, por lo que pueden ser descartadas; las reacciones en O^6 sólo suceden cuando el electrófilo presenta dos anillos o menos y los impedimentos estéricos que presentan las moléculas de más de dos anillos obligan a que la reacción ocurra en C^8 (1,100,101). Además, la energía de interacción del sitio nucleofílico se ve afectada por el tipo de bases vecinas a la guanina, modificando el grado de reacción entre el nucleófilo y el electrófilo (e.g. secuencias GC alternantes contra no alternantes) (1,100).

También existen datos que sugieren que el C^8 y el N^6 de la adenina pueden ser otros sitios de formación de aductos para los nitroareos (1,101,102).

El grado de mutagénesis se relaciona linealmente con el grado de formación de aductos en el C^8 de la guanina, para el sistema de Ames de Salmonella typhimurium (99,103).

El metabolismo de los nitroareos por células de mamífero se caracteriza por una serie de transformaciones metabólicas que incluyen nitrorreducción, oxidación del anillo, o una combinación de ambas, y esto depende del tipo de tejido utilizado y la especie del animal (1,104). Se observa a simple vista que los patrones metabólicos son complejos y diversos. Esto se ve agravado por el hecho de que los productos de la oxidación anular se forman a partir de intermediarios epóxido, indicando la posibilidad de formación de aductos de otro tipo (105),

además de los aductos formados por los productos de la nitrorreducción.

El hígado de rata lleva a cabo la nitrorreducción, oxidación, acetilación y conjugación del 1-nitropireno y sus metabolitos (2). Sin embargo se ha observado que la nitrorreducción a aminoareno, vía la N-hidroxilamina electrofílica, es la vía principal de biotransformación, sólo si se conserva la anaerobiosis (1,106).

El metabolismo de los dinitropirenos por citosol hepático de rata, produce una mayor formación de aductos cuando existen acetilasas y acetilCoA, sugiriendo que, al igual que en Salmonella, se requiere de una esterificación posterior a la nitrorreducción para formar el intermediario N-acetoxiarilamina activo (93).

Sin embargo, no deben generalizarse este tipo de patrones ya que hay evidencias de que las preparaciones celulares tienen patrones metabólicos únicos y distintos entre sí (1,107).

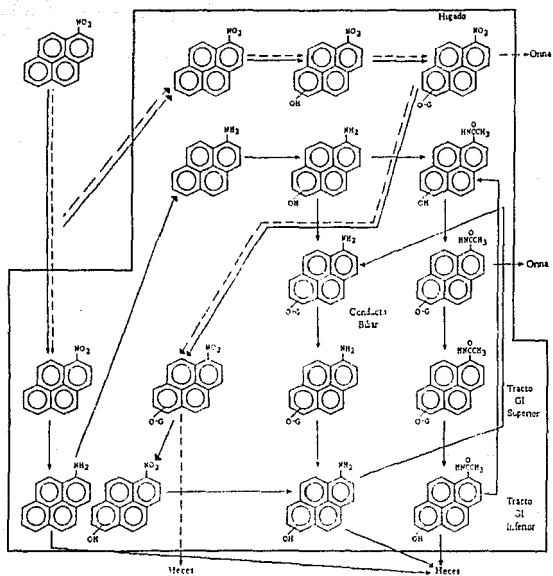
En el caso de animales completos, el metabolismo y biodisposición de los nitroarenos resultan muy complejos ya que están influidos por varios factores tales como la vía de administración y el estado fisiológico del animal (1). La naturaleza de la flora bacteriana, especialmente la anaerobia, es otro factor de gran importancia, debido a que juega un papel importante en la reducción de los nitroarenos (108 a 112), así como en la hidrólisis de O-glucurónidos a especies más activas (113).

También debe considerarse que los nitroarenos están presentes en las fases gaseosa y particulada de las emisiones contaminantes, y se encuentran en diferentes estados moleculares, lo cual influye en la distribución y retención tisular (114,115).

Varios autores han obtenido datos del tipo de metabolitos que se obtienen tras la administración de 1-nitropireno a ratas (116 a 124). Basándose en los datos obtenidos Ohnishi y cols., propusieron una vía metabólica para el 1-nitropireno administrado por vía oral a ratas normales y ratas libres de gérmenes (3).

La circulación enterohepática es la vía más importante para el metabolismo del 1-nitropireno; éste se absorbe en el tracto gastrointestinal alto y es transferido vía la vena portal, al hígado, donde se hidroxila y se conjuga. Los metabolitos se excretan a la bilis y son nitroreducidos y desconjugados en el tracto gastrointestinal bajo por acción de la flora intestinal. La mayor parte de los metabolitos son reabsorbidos y transferidos al hígado, donde son acetilados y conjugados. Estos últimos metabolitos son excretados a orina y bilis.

En la segunda vía, la nitrorreducción del 1-nitropireno en el tracto gastrointestinal bajo, es el primer paso de su metabolismo. El 1-aminopireno resultante de esta reducción, es acetilado y conjugado en el hígado, y posteriormente excretado a bilis y orina.



Línea continua: ratas normales
 Línea discontinua: ratas libres de gérmenes

METABOLISMO DE 1-NITROPIRENO EN RATA

En resumen, la hidroxilación, conjugación y acetilación del 1-nitropireno y sus metabolitos sucede en el hígado, mientras que la nitrorreducción y desconjugación son responsabilidad de la flora intestinal. Los principales metabolitos encontrados e identificados son 1-aminopireno, 1-amino-6-hidroxipireno y 1-amino-8-hidroxipireno en ratas normales (116 a 123) y 1-nitro-3-hidroxipireno, 1-nitro-6-hidroxipireno, 1-nitro-8-hidroxipireno en ratas libres de gérmenes (124); esto confirma el papel de la flora bacteriana en la nitrorreducción de los nitroarenos.

Como se dijo anteriormente, los nitroarenos han sido probados en diferentes sistemas con la intención de determinar su potencial mutagénico, carcinogénico y teratogénico, de modo que se pueda evaluar su nivel de riesgo para la salud humana. También en este caso, y por las razones antes expuestas, las sustancias más estudiadas son los nitropirenos.

A continuación se expone un breve resumen de los resultados obtenidos en los estudios realizados con diversos sistemas, ya sean bacterianos, con líneas celulares o con animales completos.

Mutagenicidad en bacterias

Ensayo de Ames.- La gran mayoría de los nitroarenos que se conocen han sido probados en este ensayo con diversas cepas resultando, en términos generales, positivos. En este ensayo los nitropirenos han resultado ser mutágenos muy potentes. Rosenkranz y col. elaboraron una recopilación de los datos obtenidos en el ensayo de Ames para diferentes nitroarenos (1,3).

Ensayo en E. coli WP2uvrA.- Este ensayo responde sobre todo a mutágenos que inducen sustitución de bases, por lo que la mayoría de los nitroarenos probados dan un resultado negativo (5,125). Sin embargo al incrementarse la permeabilidad de la membrana e incorporar el plásmido pKM101 a la cepa, pudo demostrarse la mutagenicidad (126).

Actividad genética en levadura

La cepa utilizada es Saccharomyces cerevisiae.- Este ensayo mide la capacidad de la molécula para inducir conversiones mitóticas en el genoma. En condiciones de prueba estándar ninguna de las cepas respondió a los nitroarenos (127). Sin embargo se demostró que en condiciones de anaerobiosis existe actividad (128,129). Se atribuye esta actividad a la labilidad de las enzimas nitrorreductasas al oxígeno (130).

Genotoxicidad en bacterias

La genotoxicidad en bacterias se define como la inducción de profagos por una depresión de la función "SOS" de reparación del ADN o la inhibición preferencial del crecimiento de bacterias deficientes en el sistema de reparación del ADN (toxicidad preferencial). Pocos nitroarenos han sido probados en estos sistemas pero en general han resultado genotóxicos. Los sistemas usados son:

- Ensayo en E. coli GY5027 uvrB(lambda) envA para la inducción de profagos (131 a 133).
- Ensayo "rec" en E. coli cepas WP2 (silvestre) y WP100 uvrA recA para toxicidad preferencial (134 a 136).
- Ensayo "rec" en Bacillus subtilis cepas H17 (silvestre) y N145 recA para toxicidad

preferencial (79,137,138).

Mutagenicidad en células de mamífero

La mayoría de los nitroarenos estudiados, son mutagénicos en células de mamífero y presentan un patrón de especificidad celular, que depende de la línea celular que se utilice y no de la especie de origen. Esto se debe a la diferencia en la capacidad metabólica de los diferentes tipos de células (1). Se han utilizado células de linfoma de ratón (114, 139 a 146), de ovario de hámster chino (144, 147 a 152), de fibroblasto pulmonar de hámster chino (153), V79 de hámster chino (154, 155), de xeroderma pigmentoso humano (156), de linfoblastos diploides humanos (157) y células HepG de hepatoma humano (1), con o sin activación metabólica exógena.

Genotoxicidad en células de mamífero

Los nitroarenos estudiados inducen síntesis no programada de ADN (1,13, 143, 144, 158, 159), rompimiento de cadena sencilla y entrecruzamientos del ADN (160); además, aberraciones cromosómicas (142, 161 a 165) e intercambio de cromátidas hermanas (139, 140, 147, 150, 164 a 167) en una gran variedad de células en cultivo. Algunas de las líneas celulares utilizadas son: hepatocitos de rata, ratón, hámster y humano, células bronquiales humanas, células HeLa, células de ovario de ratón chino, linfocitos humanos, células de fibroblasto humano, entre otras.

Genotoxicidad in vivo (con animal completo)

Los nitroarenos probados inducen intercambio de cromátidas hermanas y producción de micronúcleos en hámsters y ratas después de administración intraperitoneal (167 a 169); también se ha encontrado que causan daño en el ADN pulmonar de ratón, después de administración intratraqueal (1).

Transformaciones oncogénicas

Se dice que una sustancia tiene propiedades transformantes cuando al ponerla en contacto con células en cultivo, producen uno de los siguientes efectos: a) son capaces de formar focos de colonias transformadas morfológicamente; b) las células expuestas son capaces de crecer en agar e inducen tumores al ser implantadas en ratón desnudo. Los nitroarenos que han sido probados no muestran actividad transformante en células de ratón Balb3T3 (170); pero sí en células BHK21 de hámster (171), de fibroblasto normal de humano (172) y de embrión de hámster sirio (173).

Carcinogenicidad en animales

Se han realizado un gran número de estudios de carcinogénesis a largo plazo utilizando ratas, ratones, hámsters, monos y perros en los que se ha observado inducción de tumores subcutáneos, pulmonares, hepáticos, de vejiga, mamarios, etc. dependiendo de la vía de administración (6 a 11, 174 a 195). Son de particular importancia los estudios realizados por Takayama y col. (187) y Moon y col. (8), que utilizaron la vía intratraqueal para la administración de nitroarenos (esta vía asemeja a la exposición por inhalación) y obtuvieron carcinomas de pulmón. Estos resultados sugieren el posible aumento en el riesgo de desarrollar

cáncer pulmonar que se deriva de la exposición a estas sustancias por inhalación de aire contaminado.

ENSAYO DE AMES PARA LA EVALUACION DE MUTACIONES GENICAS EN Salmonella typhimurium.

A) GENERALIDADES

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN). Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético o sobre otros componentes celulares funcionalmente ligados a él, ya sean los que participan en la división celular (centríolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina o las enzimas que contribuyen a la replicación o reparación del ADN (196).

Los cambios provocados por los agentes químicos pueden ocurrir a nivel intragénico (unidades de información) o cromosómico.

Las alteraciones intragénicas (en los genes) pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento (frameshift). La primera resulta de una transición (reemplazo de una base por otra del mismo tipo) o de una transversión (sustitución de una base por otra de tipo diferente). El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia nucleotídica por eliminación o adición de bases (197).

Las anomalías que se refieren a los cromosomas pueden deberse a rearrreglos estructurales tales como inversión o translocación, o a anomalías numéricas como eliminación o adquisición de genes, pedazos de cromosomas o cromosomas completos (197).

Las mutaciones pueden ser ventajosas, neutras o tener manifestaciones patológicas entre las que se incluyen padecimientos congénitos y cáncer (198).

En virtud de lo anterior, los experimentos con sistemas biológicos no humanos resultan valiosos para evaluar los efectos genéticos de los agentes químicos por su reproducibilidad, facilidad de realización, relativa economía y corta duración (199).

B) ENSAYO DE AMES

Una de las pruebas más difundidas para la evaluación de mutaciones génicas es la desarrollada por el grupo del Dr. Bruce N. Ames en la Universidad de California, que emplea como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes de Salmonella typhimurium (200).

Las cepas mutantes (auxótrofas his⁻), a diferencia de las silvestres (protótrofas, his⁺), requieren histidina para su crecimiento debido a que presentan una mutación en el operón de la histidina. La prueba se basa en la capacidad del agente químico para actuar sobre dicho operón, revirtiendo el fenotipo, lo que permite a la cepa crecer en medios que carecen del aminoácido o con cantidades limitantes de él (201).

Una de las ventajas de esta prueba es que permite conocer no tan solo si un agente es mutagénico, sino también el tipo de mecanismo a través del cual induce la mutación. Esto es debido a que las cepas de prueba se obtuvieron mediante la inducción de mutaciones del tipo de sustitución de bases o desfaseamiento de la secuencia nucleotídica, lo que implica que su reversión requiere de los mismos mecanismos, es decir sustitución de la base adecuada en el primer caso o eliminación de bases en el segundo para correr la secuencia y restablecer el código genético (202).

El grupo del Dr. Ames (200) ha incrementado la sensibilidad del sistema mediante modificaciones adicionales:

- Reparación deficiente del ADN. Las cepas son deficientes en el sistema de reparación por escisión, como resultado de una delección de la región *uvrB* del cromosoma, lo que permite la detección de mutaciones que normalmente serían reparadas por este sistema (200).
- Alteración de la permeabilidad. Las bacterias permiten el acceso de moléculas de gran tamaño al interior de la célula, ya que presentan un defecto en la capa de polisacáridos de la pared celular (202).
- Introducción de plásmidos. Las cepas que contienen plásmidos de resistencia a antibióticos (plásmido pKM101) resultan más sensibles a los mutágenos (203, 210).
- Biotransformación de agentes químicos. En el mamífero existen sistemas enzimáticos que no están presentes en *Salmonella typhimurium* y que son requeridos para la activación metabólica de ciertos mutágenos llamados indirectos. Estos sistemas enzimáticos pueden

adicionarse a la prueba agregando homogenados de órganos de mamífero (204).

C) CEPAS DE PRUEBA MODIFICADAS

La mayoría de los nitroarenos son dependientes de las enzimas O-acetiltransferasa (acetil-coenzimaA:N-hidroxiaril-amina O-acetiltransferasa) y/o nitrorreductasa para expresar su mutagenicidad. De hecho, se ha demostrado que las cepas de Salmonella typhimurium deficientes en nitrorreductasa (TA98NR) o en acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa (TA98/1,8-DNP,) no son susceptibles a la acción de este tipo de compuestos (3,205,206). En base a estos resultados se sugirió que ambas enzimas son reactivos limitantes de la acción metabólica sobre los nitroarenos y que las cepas sobreproductoras de ellas pudieran ser muy sensibles a la acción de estos mutágenos (207 a 209).

Watanabe y col. desarrollaron dos nuevas cepas de Salmonella typhimurium con actividad enzimática elevada: YG1021 y YG1024.

YG1021. Para construir esta cepa primero se clonó el gen que codifica para la nitrorreductasa "clásica" en el plásmido vector pBR322. El plásmido resultante pYG11 confiere 450% más de actividad de nitrorreductasa "clásica" a la cepa que lo posee (209). Posteriormente se subclonó la porción que contiene al gen de nitrorreductasa "clásica" del plásmido pYG11 al plásmido pBR322 modificado, con lo que se obtuvo el plásmido pYG216, que se introdujo a la cepa TA98 de Salmonella typhimurium. La cepa así obtenida se llamó YG1021 y posee un 62% más de

actividad de nitrorreductasa "clásica" que su predecesora TA98. La cepa resultó ser entre 20 y 70 veces más sensible a la actividad mutagénica de 2-nitrofluoranteno y 1-nitropireno. Sin embargo, la introducción del plásmido no afectó la sensibilidad de la cepa al 1,8-dinitropireno ni a la 4-nitroquinolina-1-óxido. La cepa YG1021 también muestra un incremento de 2 a 3 veces el número de revertantes espontáneas y es resistente a la ampicilina y a la tetraciclina (207).

YG1024. Esta cepa se construyó clonando el gen de acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa de la cepa TA1538 en el plásmido vector pBR322. Las cepas que contienen este plásmido, pYG122, presentan un incremento de 50 veces en su actividad de acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa (209). Posteriormente se subclonó la porción que contiene al gen de acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa al plásmido pBR322 modificado. El plásmido resultante pYG219 se utilizó para transformar a la cepa TA98 de Salmonella typhimurium. La cepa así obtenida se llamó YG1024 y tiene una actividad de acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa 100 veces mayor a la normal. Esta cepa resultó ser 4 a 38 veces más sensible a la actividad mutagénica de diversos nitroarenos, sin embargo no hubo aumento en la sensibilidad a 4-nitroquinolina-1-óxido. La introducción del plásmido pYG219 también dio como resultado un incremento de 1.5 a 3 veces en el número de revertantes espontáneas. Esta cepa es resistente a ampicilina y tetraciclina (208).

Como se observa, ambas cepas fueron creadas a partir de la cepa TA98. Esto se debe a que ésta es una de las cepas más utilizadas en las pruebas de mutagenicidad con el ensayo de Ames y a que contiene el plásmido pKM101 que es absolutamente necesario para la detección

de la mutagenicidad de los nitroarenos (210,211)

El plásmido pKM101 confiere a las cepas que lo contienen un aumento en la resistencia de la cepa a la irradiación UV y un incremento en la susceptibilidad a mutagénesis por UV o sustancias químicas. Para que una sustancia sea mutagénica debe ser capaz de hacer 2 cosas: introducir una lesión premutagénica al ADN y al mismo tiempo encender el sistema que procesará la lesión del ADN de una forma tal que se produzca una mutación. El incremento en la susceptibilidad a mutágenos que proporciona el PKM101 se debe a que codifica para productos celulares análogos a los requeridos para inducir la "reparación propensa a error" y por lo tanto aumenta la capacidad de la célula para llevar a cabo este tipo de procesamiento de ADN dañado (Reparación SOS). (210)

Watanabe y col (207,208). recomiendan el uso de estas cepas para los siguientes propósitos:

1. Detección de nitroarenos mutagénicos.
2. Detección de metabolitos mutagénicos derivados de nitroarenos y determinación de la vía probable por la cual estos mutágenos son activados.
3. Identificación primaria de principios mutagénicos en mezclas complejas que son mutagénicas para Salmonella typhimurium.

También recomiendan el uso de estas cepas en conjunto con las cepas de actividad enzimática normal (TA98 o YG1020) y/o las cepas con actividad enzimática disminuida:

TA98NR. actividad de nitrorreductasa disminuida o TA98/1,8-DNP6. actividad de acetil-coenzimaA:N-hidroxiamilamina O-acetiltransferasa disminuida. Si la mezcla probada contiene nitroarenos activables por alguna de las dos enzimas, habrá diferencias notables de mutagenicidad en los cuatro sistemas (208).

MATERIAL Y METODOS

A) MUESTRAS

Muestreo

Se contactó a la Dirección General de Prevención y Control Ambiental de la Subsecretaría de Ecología de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología y al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental de la Universidad de Querétaro que amablemente nos proporcionaron porciones de los filtros de muestreadores utilizados en las determinaciones de la calidad del aire. Debido a que la formación de nitroarenos se incrementa con la presencia de óxidos de nitrógeno (NO_x), solicitamos que los filtros proporcionados fueran de fechas en que las concentraciones ambientales de NO_x fueran las más altas y las más bajas para el año de 1990. Las características de los filtros se detallan en el siguiente cuadro:

Clave	Filtro	Fecha	Peso (g)	Medida (cm)	Ciudad	Estación
B1	Jul 13-14	13-07-90	0.8372	10.2 x 11.0	Querétaro	Bellas Artes
			0.8338	10.3 x 11.1		
B2	Jul 17-18	17-07-90	0.7652	10.5 x 10.6	Querétaro	Bellas Artes
B3	Jul 25-26	25-07-90	0.7652	10.0 x 10.6	Querétaro	Bellas Artes
			0.7999	10.2 x 11.0		
B4	Ene 13-14	13-01-90	0.8723	10.2 x 11.0	Querétaro	Bellas Artes
B5	Ene 17-18	17-01-90	0.8823	10.2 x 11.2	Querétaro	Bellas Artes
			0.7568	10.4 x 11.2		
X1	6684-19	08-09-90	0.7092	10.7 x 10.2	México	Xalostoc
			0.6946	9.9 x 10.6		
X2	6698-33	14-07-90	0.4007	6.3 x 10.2	México	Xalostoc
			0.3913	6.0 x 10.0		
X3	6712-47	20-70-90	0.6334	8.8 x 10.3	México	Xalostoc
			0.6315	8.6 x 10.2		

Clave	Filtro	Fecha	Peso (g)	Medida (cm)	Ciudad	Estación
X4	6726-61	26-07-90	0.7785 0.7803	9.9 x 10.3 9.8 x 10.4	México	Xalostoc
X5	6740-075	01-08-90	0.7385 0.8250	9.8 x 10.5 10.1 x 10.5	México	Xalostoc
M1	5555	09-01-90	0.7287 0.7972	10.1 x 10.3 10.1 x 10.3	México	La Merced
M2	5589	15-01-90	0.6495 0.7193	9.4 x 10.2 9.0 x 10.3	México	La Merced
M3	5635	21-01-90	0.7065 0.8190	9.7 x 10.2 9.8 x 10.1	México	La Merced

Los filtros utilizados son de acetato de celulosa. La velocidad de flujo de aire en los muestreadores de la Cd. de México, D.F. es de entre 20 y 30 pies³/min. La velocidad de flujo en los muestreadores de la Cd. de Querétaro es de 35 pies³/min. En ambas ciudades el tiempo de muestreo fue de 24 horas.

Extracción

Se realiza la extracción con el fin de obtener las sustancias adsorbidas sobre las partículas depositadas en los filtros.

Se corta el filtro en pequeñas porciones y se pone a remojar en 150 ml. de cloruro de metileno durante 30 min.. Se filtra a través de papel Whatman N° 3 y se lava el residuo con 25 ml. adicionales del solvente. El filtrado se evapora a sequedad en un Rotavapor a 40°C y se resuspende el residuo en 3 ml. de dimetilsulfóxido (DMSO). Los extractos obtenidos se colocan en viales de vidrio con tapón de rosca manteniéndolos a -70°C hasta el momento de su análisis (212).

B) ENSAYO DE AMES PARA EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD (201)

Medios y Soluciones

L-histidina 0.5mM - Biotina 0.5mM

Disolver 0.0077 g de histidina mas 0.0122 g de biotina en 100 ml. de agua destilada. Guardar a 4°C en la obscuridad.

L-histidina 0.1M - Biotina 0.5mM

Disolver 1.5516 g de histidina mas 0.0122 g de biotina en 100 ml. de agua destilada. Esterilizar en autoclave y guardar a 4°C en la obscuridad.

Solución de Sales Vogel-Bonner

En 600 ml de agua destilada se disuelven:

Sulfato de Magnesio heptahidratado	10 g.
Acido Cítrico monohidratado	100 g.
Fosfato de Potasio monobásico anhidro	500 g.
Fosfato de Sodio Amonio tetrahidratado	175 g.

Se filtra la solución y se agrega agua destilada suficiente para completar 1000 ml. Se añade 1 ml. de cloroformo y se almacena a temperatura ambiente.

Solución de Cristal Violeta

Se disuelven 10 mg. de cristal violeta en 10 ml. de agua destilada. Se almacena a 4°C.

Solución de Ampicilina

Se disuelven 0.25 g. de ampicilina en 10 ml. de una solución 0.02 N de hidróxido de sodio. Se almacena a 4°C.

Solución de Tetraciclina

Se disuelven 0.0625 g. de tetraciclina en 10 ml. de una solución 0.02 N de ácido clorhídrico.

Se almacena a 4°C y protegido de la luz.

Agar de Superficie

Componentes:	Bactoagar	0.6 g.
	Cloruro de Sodio	0.5 g.
	Agua destilada	100 ml.
	Sol. Histidina 0.5mM - Biotina 0.5mM	10 ml.

Se pesan con exactitud los ingredientes, se agrega el agua destilada y se añade la solución de histidina 0.5 mM - biotina 0.5mM. Se esteriliza en autoclave y se distribuye en tubos con tapón de rosca estériles a razón de 2.5 ml. por tubo.

Medio Mínimo E de Vogel-Bonner

Componentes:	Bacto agar	7.5 g.
	Dextrosa	10 g.
	Solución de Sales Vogel-Bonner	10 ml.

En un matraz de 1000 ml. se coloca el bacto agar y se añaden 300 ml. de agua. En un matraz de 250 ml. se disuelve la dextrosa en 100 ml. de agua destilada. En otro matraz de 250 ml. se mezcla la solución de sales Vogel-Bonner con 100 ml. de agua. Los tres matraces se esterilizan en autoclave a 121°C por 20 min. Se reúnen las soluciones en el matraz de 1 lt., se mezcla perfectamente y se distribuye en cajas de petri estériles de 15 x 100 (aproximadamente 30 ml. por caja).

Medio Mínimo E Vogel-Bonner complementado con histidina

Agregar 0.1 ml. de una solución estéril de histidina 0.1 M - biotina 0.5 mM. a la superficie del medio mínimo y distribuirlo uniformemente con la ayuda de un triángulo de vidrio estéril hasta que esté seco.

Obtención y mantenimiento de las cepas de prueba

Las cepas utilizadas fueron proporcionadas por el Dr. Takehiko Nohmi: Division of Mutagenesis, Biological Safety Research Center, National Institute of Hygienic Sciences, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan.

CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE PRUEBA UTILIZADAS

CEPA	ACTIVIDAD DE NR	ACTIVIDAD DE OAT	RESPUESTA A NITROARENOS
TA98NR	Reducida	Normal	Baja
YG1020	Normal	Normal	Normal
YG1021	Elevada	Normal	Elevada a mono-nitroarenos
YG1024	Normal	Elevada	Elevada a poli-nitroarenos

Las cepas obtenidas vienen sembradas en agar blando dentro de frascos de vidrio con tapa de rosca. Lo antes posible se toma una asada del cultivo se siembra en 5 ml. de caldo nutritivo estéril y se incuba durante 16 hs. a 37°C con agitación. Los cultivos así obtenidos se someten a las pruebas que se describirán más adelante para verificar la presencia de marcadores genéticos y evaluar la frecuencia reversión espontánea.

Se preparan los Cultivos de Reserva colocando 0.8ml. de la suspensión bacteriana mas 0.07 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelan rápidamente sobre hielo seco para mantenerlos después a -70°C.

Para evitar congelar y descongelar los Cultivos de Reserva se preparan cajas de petri con medio mínimo complementado con histidina en las que se siembra por estría una asada del cultivo y que podrán guardarse a 4°C hasta por 1 o 2 meses. Es de estas cajas de donde se obtendrán los cultivos a utilizar en el protocolo de mutagénesis; se toma una colonia que se siembra en 5 ml. de caldo nutritivo al que se añaden 5 μ l. de cada una de las soluciones de ampicilina (para todas las cepas) y tetraciclina (para las cepas YG1020, YG1021, YG1024) y

se incuban por 16 hs. a 37°C con agitación.

Para obtener nuevos cultivos para las cajas de petri de reserva se recomienda tomar de los Cultivos de Reserva a -70°C y no de las cajas que se van a desechar ya que puede haber pérdida de los marcadores uvrB y plásmidos.

Verificación de la presencia de los marcadores genéticos y determinación de la frecuencia de reversión espontánea

Requerimiento de Histidina

Sembrar por medio de estrías el cultivo de 16 hs. (que se utiliza para las cajas de reserva) sobre cajas que contienen medio mínimo de Vogel-Bonner. Hacer lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina. Solamente debe haber crecimiento en las cajas complementadas con histidina.

Sensibilidad al cristal violeta

Esta prueba se utiliza para verificar la presencia del marcador "rfa" (modificación de la pared celular). En una caja de medio mínimo complementado con histidina se traza una línea con la solución de cristal violeta y se deja secar completamente. Se toma una azada del cultivo y se traza una línea perpendicular a la del cristal violeta. Se incuban a 37°C por 24 hs. Una zona clara de inhibición sobre la línea del colorante indica la presencia del marcador.

Presencia de los plásmidos de resistencia a antibióticos (pKM 101)

Para esta prueba se utilizan dos cajas de medio mínimo complementado con histidina, una para ampicilina y otra para tetraciclina. Se procede de igual manera que en el punto anterior, sustituyendo el cristal violeta por el antibiótico. Las cepas que contienen el plásmido no deben mostrar inhibición del crecimiento.

Sensibilidad a la luz ultravioleta

En una caja de petri con medio mínimo complementada con histidina colocar por medio de estria los cultivos que se van a probar. Irradiar la caja destapada con una lámpara germicida de luz ultravioleta de 15 W a una distancia de 33-35 cm. por 8 segundos. Incubar 24 hs. a 37°C. Si las cepas contienen el marcador *uvrB* no deben crecer.

Frecuencia de reversión espontánea

Colocar 0.1 ml. del cultivo en un tubo de ensayo con tapón de rosca que contiene 2.5 ml. de agar de superficie a 45°C, agitar con ayuda de un vórtex, y vaciar el contenido sobre medio mínimo de Voguel-Bonner, distribuyéndolo uniformemente. Dejar solidificar e incubar a 37°C por el tiempo requerido para cada cepa. Esta prueba se hace por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se cuentan las colonias de revertantes espontáneas que resulten y se comprueba la presencia de una densa capa de pequeñas colonias (con ayuda de un microscopio de disección) que resultan como consecuencia de las trazas de histidina presentes en el agar de superficie. Esta capa de colonias tiende a desaparecer cuando

el compuesto que se prueba es tóxico.

Prueba de Difusión en Agar

Esta prueba tiene como objeto la determinación a grosso modo de la probable actividad mutagénica y la toxicidad del extracto, a fin de definir el rango de volumen que se utilizará en el Protocolo de Mutagenicidad del Ensayo de Ames, así como la sensibilidad de las cepas a las muestras.

A un tubo que contiene 2.5 ml. de agar de superficie a 45°C se añaden 100 μ l. de un cultivo de 16 horas de la cepa de prueba. El contenido se agita con ayuda de un vórtex y se vierte sobre una caja que contiene medio mínimo de Voguel-Bonner. Se espera a que solidifique y, con unas pinzas estériles se coloca en el centro de la placa, un disco de papel filtro estéril de aproximadamente 0.5 cm de diámetro. Se toman 10 μ l. del extracto con una micropipeta y se depositan cuidadosamente sobre el disco. Las placas se incuban invertidas a 37°C durante 72 horas. Cada uno de los extractos debe probarse con las 4 cepas de prueba, YG1020, YG1021, YG1024, TA98NR.

La actividad mutagénica se denota por un crecimiento de colonias revertantes cercano al disco y que disminuye en forma radial. En caso de que el extracto sea tóxico se observará un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Protocolo de mutagénesis

A 2.5 ml. de agar de superficie precalentado a 45°C. se le añaden rápidamente los

componentes según la tabla 1 en el orden especificado. La mezcla se agita con ayuda de un vórtex y se distribuye sobre medio mínimo de Voguel-Bonner, de manera que quede una capa uniforme. Las cajas se dejan solidificar a temperatura ambiente y se incuban invertidas a 37°C por 72 hs. Cada punto se hace por triplicado.

# Caja	Cepa (100 μ l)	DMSO (μ l)	Problema (μ l)	Control (μ l)
1	TA98NR	75	-	-
2	YG1020	75	-	-
3	YG1021	75	-	-
4	YG1024	75	-	-
5	TA98NR	-	10	-
6	TA98NR	-	25	-
7	TA98NR	-	50	-
8	TA98NR	-	75	-
9	YG1020	-	10	-
10	YG1020	-	25	-
11	YG1020	-	50	-
12	YG1020	-	75	-
13	YG1021	-	10	-
14	YG1021	-	25	-
15	YG1021	-	50	-
16	YG1021	-	75	-
17	YG1024	-	10	-
18	YG1024	-	25	-
19	YG1024	-	50	-
20	YG1024	-	75	-
21	TA98NR	-	-	20 4NQO*
22	YG1020	-	-	20 4NQO
23	YG1021	-	-	20 4NQO
24	YG1024	-	-	20 4NQO
25	TA98NR	-	-	30 INP**
26	YG1020	-	-	30 INP
27	YG1021	-	-	30 INP
28	YG1024	-	-	30 INP

Nota: Los resultados obtenidos en los puntos 1,2,3 y 4 con 75 μ l de DMSO representan los datos de reversión espontánea de la cepa.

* Control Positivo, solución de 4-nitroquinolina-1-óxido a una concentración de 30 μ g/ml.

** Control Positivo, 1-nitropireno a una concentración de 1 μ g/ml.

Interpretación de resultados

Un resultado positivo se define como un aumento al doble de la potencia mutagénica con respecto a la del blanco de extracción (extracción realizada a un filtro no expuesto en los muestreadores), y que este aumento esté en función de la concentración del compuesto.

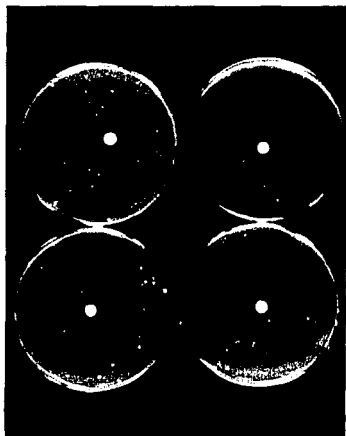
La mutagenicidad de un compuesto puede manifestarse a concentraciones por debajo de su nivel tóxico o muy cercanas a él. El crecimiento de fondo bacteriano que aparece normalmente en las cajas debido a las trazas de histidina presentes en el agar de superficie, tiende a desaparecer en caso de que la muestra resulte tóxica. Para determinar si la ausencia de colonias revertantes se debe a un resultado negativo o a la presencia de toxicidad, se recomienda observar las cajas con un microscopio estereoscópico; si la muestra es tóxica, habrá una diferencia notable en el fondo bacteriano de las cajas control y las cajas con muestra.

RESULTADOS Y DISCUSION

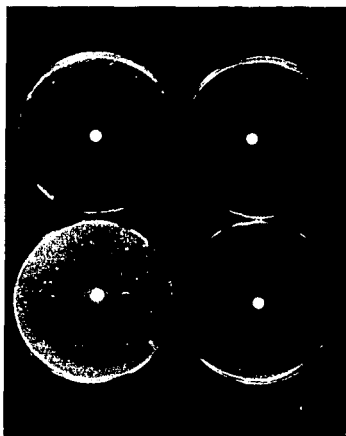
Se empleó la prueba de difusión en agar para probar las 13 muestras obtenidas con la extracción de los filtros, utilizando un volumen de 10 μ l. de extracto. El análisis de estos resultados es visual, por lo que se presentan en fotografía (Figura 1). Se observó que todas las cepas responden a los extractos al volumen empleado, por lo que se definió que el rango de volúmenes que se utilizaría en el protocolo de mutagénesis (ensayo de Ames), tendría como mínimo 10 μ l. y sería de 10, 25, 50 y 75 μ l., y que los datos de reversión espontánea se obtendrían utilizando el volumen de solvente equivalente al máximo volumen de muestra utilizado (75 μ l de DMSO).

Las mismas 13 muestras se probaron con el ensayo de Ames antes descrito, siguiendo el protocolo definido en Material y Métodos. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla I, donde se muestra el número de revertantes obtenido en cada una de las tres cajas, así como su media y desviación estándar.

**FIGURA 1 : RESULTADOS DE LA PRUEBA DE
DIFUSION EN AGAR**



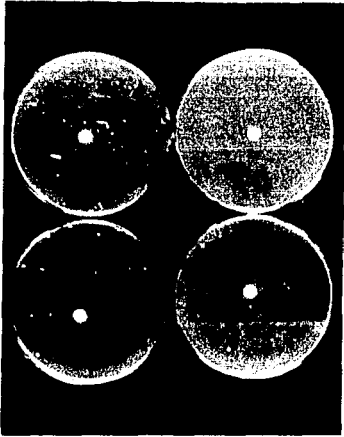
Blanco



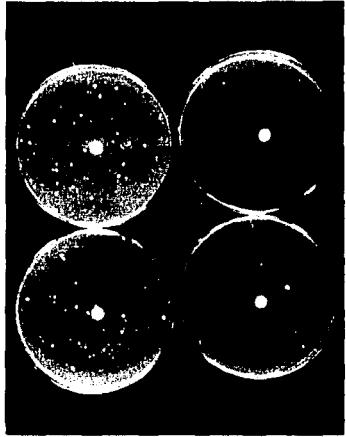
Muestra B1

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



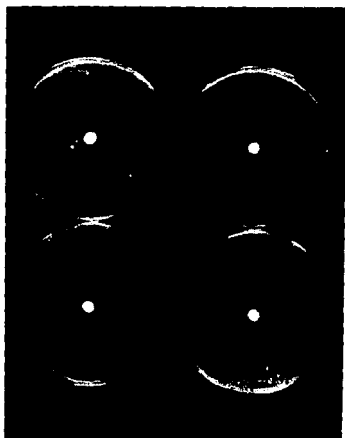
Muestra B2



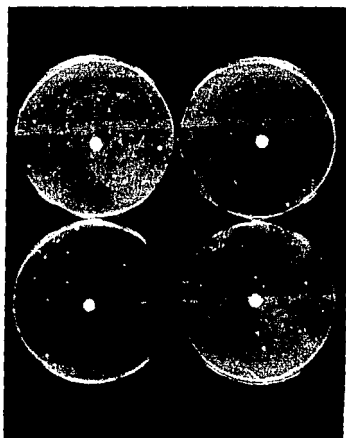
Muestra B3

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



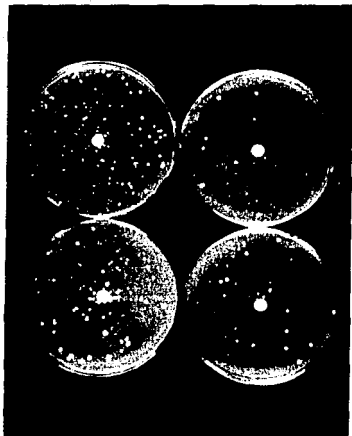
Muestra B4



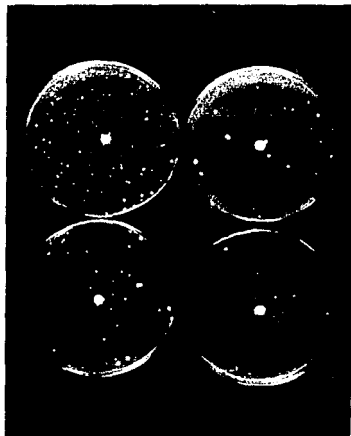
Muestra B5

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



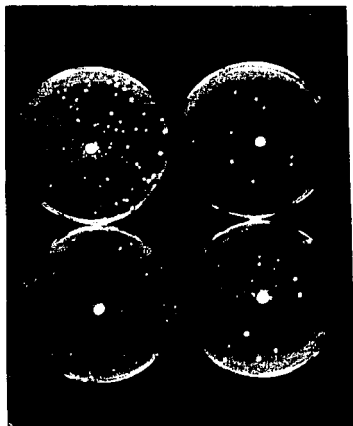
Muestra X1



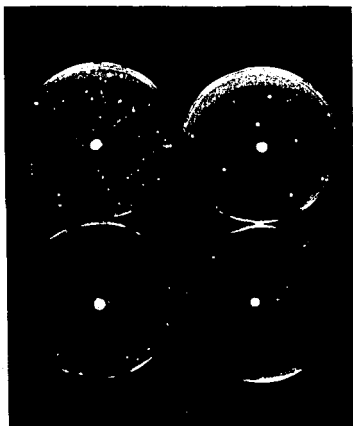
Muestra X2

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



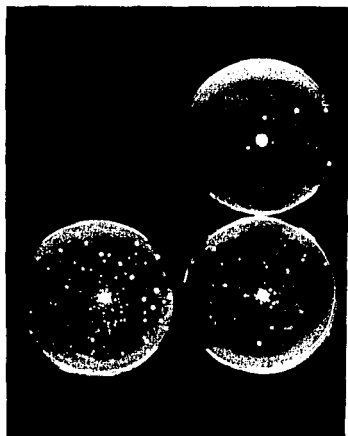
Muestra X3



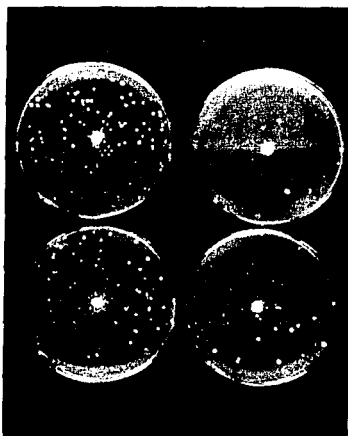
Muestra X4

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



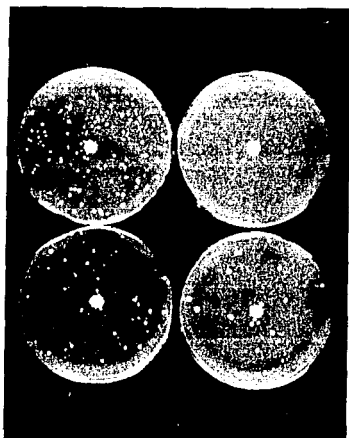
Muestra X5



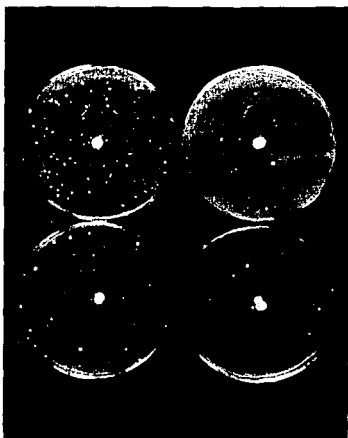
Muestra M1

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020



Muestra M2



Muestra M3

La distribución de las cepas en las fotografías es como sigue:

YG1021	TA98NR
YG1024	YG1020

**TABLA I. RESULTADOS DEL
ENSAYO DE AMES**

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR ^a			Promedio ± D.S. ^b TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	17	19	21	19.0000 ± 2.0000	41	42	47
	10	18	29	23	23.3333 ± 5.5075	35	26	38	33.0000 ± 6.2449
	25	23	24	25	24.0000 ± 1.0000	35	49	48	44.0000 ± 7.8102
	50	28	24	20	24.0000 ± 4.0000	58	73	69	66.6667 ± 7.7674
	75	29	19	28	25.3333 ± 5.5075	71	71	60	67.6667 ± 6.6583

B1	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	101	128	128	119.0000 ± 15.588	87	73	85
	10	112	160	161	144.333 ± 28.006	94	126	121	113.667 ± 17.214
	25	127	133	137	132.333 ± 5.0332	81	168	127	125.333 ± 43.523
	50	176	185	187	182.667 ± 5.8594	243	158	216	205.667 ± 43.432
	75	152	141	154	149.000 ± 7.0000	313	312	256	293.667 ± 32.624

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	8	15	4	9.0000 ± 5.5677	32	32	27
	10	31	39	26	32.0000 ± 6.5574	38	31	34	34.3333 ± 3.5118
	25	30	36	37	34.3333 ± 3.7859	39	45	42	42.0000 ± 3.0000
	50	4	21	6	10.3333 ± 9.2915	32	39	2	30.3333 ± 9.6090
	75	8	30	3	13.334 ± 14.3643	47	48	57	50.6667 ± 5.5075

B2	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	53	43	55	50.3333 ± 6.4291	66	79	90
	10	74	69	72	71.6667 ± 2.5166	78	75	81	78.0000 ± 3.0000
	25	91	59	75	75.0000 ± 16.0000	117	127	106	116.666 ± 10.503
	50	66	49	57	57.0000 ± 8.5440	142	157	127	142.000 ± 15.000
	75	91	89	93	91.0000 ± 2.0000	194	192	196	194.000 ± 2.0000

- ^a Volumen de extracto utilizado
^b Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
^c Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar 58

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR ^b			Promedio ± D.S. ^c TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	29	33		22	33	29	
	0	29	22	33	28.0000 ± 5.5677	22	33	29	29.0000 ± 5.5677
	10	31	31	53	38.333 ± 12.7071	40	30	36	35.3333 ± 5.0332
	25	36	42	36	38.0000 ± 3.4641	31	34	20	28.3333 ± 7.3711
	50	36	45	41	40.6667 ± 4.5092	40	44	41	41.6667 ± 2.0816
	75	58	41	42	47.0000 ± 9.5393	55	36	42	44.3333 ± 9.7125
B3									
	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	122	148	132		77	70	64	
	0	122	148	132	134.000 ± 133.115	77	70	64	70.3333 ± 6.5064
	10	201	229	215	215.000 ± 14.000	92	97	92	93.6667 ± 2.8867
	25	164	145	143	150.667 ± 11.590	108	114	130	117.333 ± 11.372
	50	147	143	175	155.000 ± 17.435	171	180	181	177.333 ± 5.5075
	75	181	164	164	169.667 ± 9.8149	269	267	259	265.000 ± 5.2915

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		4	14	9		5	14	20	
	0	4	14	9	9.0000 ± 5.0000	5	14	20	13.0000 ± 7.5498
	10	13	34	25	24.0000 ± 10.5356	58	54	32	48.0000 ± 14.000
	25	23	30	34	29.0000 ± 5.5677	4	26	22	17.333 ± 11.7189
	50	17	30	35	27.3333 ± 9.2915	19	35	63	39.0000 ± 22.271
	75	11	6	11	9.3333 ± 2.8867	18	11	4	11.0000 ± 7.0000
B4									
	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	72	82	135		0	2	15	
	0	72	82	135	96.333 ± 33.8575	0	2	15	5.6667 ± 8.1445
	10	91	60	76	75.667 ± 15.5026	248	239	119	202.000 ± 72.020
	25	5	27	69	33.667 ± 32.5166	180	288	289	252.333 ± 62.644
	50	28	48	34	36.667 ± 10.2632	114	93	103	103.333 ± 10.504
	75	15	26	8	16.333 ± 9.0737	33	32	18	27.667 ± 8.3864

^a Volumen de extracto utilizado
^b Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
^c Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar 59

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR ^a			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
	0	27	24	11	20.6667 ± 8.5049	30	38	28	32.0000 ± 5.2915
	5	72	69	78	73.0000 ± 4.5825	86	95	85	88.6667 ± 5.5075
	10	86	117	108	103.667 ± 15.948	107	160	129	132.000 ± 26.627
	15	160	160	149	156.333 ± 6.3508	202	148	185	177.667 ± 27.392
	20	178	170	183	177.000 ± 6.5574	179	195	176	183.333 ± 10.214
CONCENTRACIONES REDUCIDAS									
B4	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	139	105	126	123.333 ± 17.156	77	76	84	79.0000 ± 4.3588
	5	166	183	179	176.000 ± 8.8882	203	215	225	214.333 ± 11.015
	10	197	245	220	220.667 ± 24.007	160	241	167	189.333 ± 44.881
	15	264	247	239	250.000 ± 12.767	230	199	247	225.333 ± 24.339
	20	125	205	234	188.000 ± 56.453	296	290	204	263.333 ± 51.417

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
	0	17	20	21	19.3333 ± 2.0816	43	43	26	38.333 ± 10.7857
	10	58	56	60	50.0000 ± 2.0000	158	173	195	175.333 ± 18.610
	25	44	93	68	68.333 ± 24.5017	54	58	48	53.3333 ± 5.0332
	50	6	4	12	7.3333 ± 4.1633	45	32	21	32.667 ± 12.0138
	75	20	18	4	14.0000 ± 8.7178	21	22	20	21.0000 ± 1.0000
B5	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	155	166	168	163.000 ± 7.0000	92	98	94	94.6667 ± 3.0550
	10	200	234	263	217.000 ± 24.041	373	459	394	408.667 ± 44.836
	25	133	125	97	118.333 ± 18.903	258	213	242	237.667 ± 22.810
	50	72	90	50	70.667 ± 20.033	40	100	74	71.333 ± 30.0887
	75	10	10	5	8.333 ± 2.8867	72	69	75	72.0000 ± 3.0000

- Volumen de extracto utilizado
- Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
- Promedio de Revertantes por cepa ± Desviación Estándar 60

Muestra	Vol. (μl)	TA98NR ^a			Promedio ± D.S. ^b TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	13	35	17	21.667 ± 11.7189	24	21	28
	5	32	21	12	21.667 ± 10.0166	99	108	150	119.0000 ± 27.221
	10	38	39	28	35.0000 ± 6.0827	164	140	146	150.0000 ± 12.489
	15	42	46	42	43.3333 ± 2.3094	145	199	198	180.667 ± 30.892
	20	59	60	58	59.0000 ± 1.0000	221	258	202	227.0000 ± 28.478
CONCENTRACIONES REDUCIDAS									
B5	Vol. (μl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	108	103	98	103.000 ± 5.0000	47	52	69	56.000 ± 11.5325
	5	141	206	183	176.667 ± 32.959	260	228	268	252.000 ± 21.166
	10	262	224	228	238.000 ± 20.881	431	451	390	424.000 ± 31.096
	15	303	289	317	303.000 ± 14.000	461	462	518	480.333 ± 32.624
	20	301	318	336	318.333 ± 17.502	650	650	650	650.0000 ± 0.000

Muestra	Vol. (μl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	17	8	11	12.0000 ± 4.5825	34	25	37
	10	25	22	29	25.3333 ± 3.5118	53	62	45	54.333 ± 16.0661
	25	19	15	19	17.6667 ± 2.3094	53	60	77	66.6667 ± 9.0727
	50	28	27	25	26.6667 ± 1.5275	84	75	78	79.0000 ± 4.5825
	75	34	30	17	27.0000 ± 8.8882	98	104	89	97.0000 ± 7.5498
X1	Vol. (μl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
	0	158	126	137	140.333 ± 16.258	97	106	116	106.333 ± 9.5043
	10	175	175	162	170.667 ± 7.5055	122	195	165	160.667 ± 36.692
	25	233	224	222	226.333 ± 5.8594	285	288	231	268.000 ± 32.078
	50	324	362	287	324.333 ± 37.501	463	475	509	482.333 ± 23.861
	75	364	349	324	345.667 ± 20.207	541	567	582	563.333 ± 20.744

^a Volumen de extracto utilizado
^b Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
^c Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar

Muestra	Vol.ª (µl)	TA98NR ^b			Promedio ± D.S. ^c TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	34	17	19	23.3333 ± 9.2915	43	36	42
10	21	22	11	18.0000 ± 6.0827	34	62	47	47.667 ± 14.0119	
25	30	31	26	29.0000 ± 2.6457	60	59	66	61.6667 ± 3.7859	
50	25	29	26	26.6667 ± 2.0816	71	90	65	75.333 ± 13.0511	
75	29	28	31	29.3333 ± 1.5275	72	61	85	72.667 ± 12.0138	

X2	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	136	110	96	114.000 ± 20.297	78	92	64
10	104	128	142	124.667 ± 19.218	120	143	134	132.333 ± 11.590	
25	205	187	180	190.667 ± 12.897	361	264	238	287.667 ± 64.825	
50	242	203	171	205.333 ± 35.557	377	364	426	389.000 ± 32.695	
75	246	267	298	270.333 ± 26.159	510	563	504	525.667 ± 32.470	

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	28	24	15	22.3333 ± 6.6583	47	31	66
10	27	18	35	26.6667 ± 8.5049	57	68	50	58.3333 ± 9.0737	
25	34	31	20	28.3333 ± 7.3711	89	93	113	98.333 ± 12.8582	
50	29	45	3	35.0000 ± 8.7177	136	146	141	141.000 ± 5.0000	
75	27	23	28	26.0000 ± 2.6457	174	178	139	163.667 ± 21.455	

X3	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	167	150	132	149.667 ± 17.502	161	95	148
10	250	161	180	197.000 ± 46.872	250	271	358	295.000 ± 57.262	
25	308	319	338	321.667 ± 15.176	651	459	633	581.00 ± 106.037	
50	451	486	456	464.333 ± 18.929	1061	926	933	973.333 ± 76.002	
75	579	560	573	570.667 ± 9.7125	1545	1212	1211	1322.67 ± 192.547	

Volumen de extracto utilizado
 Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
 Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar 62

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR ^a			Promedio ± D.S. ^c TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	21	12	10	14.3333 ± 5.8594	31	38	46
	10	23	24	19	22.0000 ± 2.6457	58	70	55	61.0000 ± 7.9372
	25	20	15	18	17.6667 ± 2.5166	76	60	59	65.0000 ± 9.5393
	50	27	30	32	29.6667 ± 2.5166	93	87	80	86.6667 ± 6.5064
	75	21	35	23	26.3333 ± 7.5718	107	80	84	90.333 ± 14.5716

X4	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	163	218	185	188.667 ± 27.683	67	80	106
	10	246	203	228	225.667 ± 21.594	145	145	143	144.333 ± 1.1547
	25	221	289	293	267.667 ± 40.463	230	240	226	232.000 ± 7.2111
	50	372	355	332	353.000 ± 20.074	328	178	327	277.667 ± 86.315
	75	439	398	396	411.000 ± 24.269	442	406	463	428.000 ± 19.287

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	19	9	10	12.6667 ± 5.5070	63	43	42
	10	29	34	31	31.3333 ± 2.5166	76	70	79	75.0000 ± 4.5825
	25	35	43	36	38.0000 ± 4.3589	122	102	92	105.533 ± 15.275
	50	69	75	76	73.3333 ± 3.7859	152	153	143	149.333 ± 5.5070
	75	84	87	97	89.3333 ± 6.8068	187	215	228	210.000 ± 20.952

X5	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	145	123	145	137.667 ± 12.701	114	159	137
	10	246	232	240	239.333 ± 7.0237	397	210	199	268.67 ± 111.275
	25	412	326	386	374.667 ± 44.106	733	676	798	735.67 ± 61.0437
	50	598	606	538	580.667 ± 37.166	930	929	931	930.00 ± 1.0000
	75	732	825	778	778.333 ± 46.501	1708	1563	2034	1768.33 ± 241.22

^a Volumen de extracto utilizado
^b Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
^c Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar 63

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR ^a			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		1	1	2		28	17	24	
	0	1	1	2	1.3333 ± 0.5773	28	17	24	23.000 ± 5.5676
	10	1	2	2	1.6667 ± 0.5773	59	56	74	63.0000 ± 9.6436
	25	7	1	6	4.667 ± 3.2145	92	113	101	102.000 ± 10.535
	50	4	3	7	4.6667 ± 2.0816	168	171	141	160.000 ± 16.523
	75	11	12	13	12.0000 ± 1.0000	235	216	212	221.000 ± 12.288
M1									
Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024	
0	83	102	117		52	58	55		
	10	227	247	209	227.667 ± 19.087	196	185	242	207.67 ± 30.2379
	25	308	315	322	315.000 ± 7.0000	245	487	458	396.67 ± 132.145
	50	583	527	517	542.333 ± 35.571	748	803	793	781.33 ± 29.2973
	75	858	784	649	763.67 ± 105.973	1164	1149	1097	1136.67 ± 35.161

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR			Promedio ± D.S. TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	27	25		23	18	33	
	0	27	25	23	25.0000 ± 2.0000	18	33	27	26.0000 ± 7.5498
	10	23	22	18	21.0000 ± 2.6457	64	47	86	65.667 ± 19.5533
	25	31	52	31	38.000 ± 12.1243	86	66	76	76.6667 ± 9.0184
	50	57	62	83	70.667 ± 10.9696	133	128	119	130.000 ± 9.8488
	75	70	61	54	61.6667 ± 8.0208	218	181	199	199.333 ± 18.502
M2									
Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024	
0	80	102	106		55	58	53		
	10	185	160	199	181.333 ± 19.756	375	261	252	296.000 ± 68.563
	25	280	332	312	308.000 ± 26.229	434	594	500	509.333 ± 80.407
	50	370	382	376	376.000 ± 6.0000	1020	812	904	912.000 ± 104.23
	75	510	631	750	630.33 ± 120.001	1024	995	761	926.67 ± 144.202

^a Volumen de extracto utilizado
^b Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
 Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar 64

Muestra	Vol. (µl)	TA98NR*			Promedio ± D.S.* TA98NR	YG1020			Promedio ± D.S. YG1020
		0	38	21	14	24.333 ± 12.3423	40	30	36
10	38	42	44	41.3333 ± 3.0550	544	58	46	52.6667 ± 6.1101	
25	55	39	39	44.3333 ± 9.2376	74	67	82	74.3333 ± 7.5055	
50	49	66	29	48.000 ± 18.5202	133	142	108	127.667 ± 16.616	
75	64	22	43	43.000 ± 21.0000	200	374	198	257.33 ± 101.041	

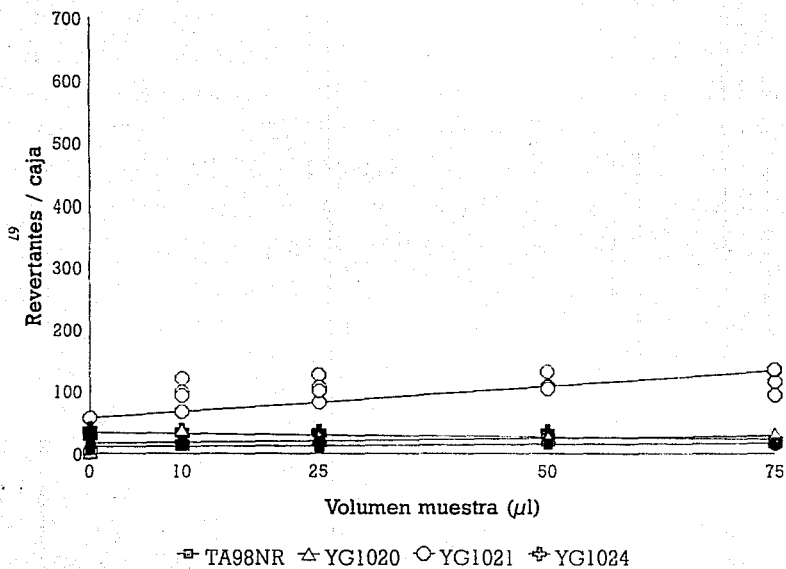
M3	Vol. (µl)	YG1021			Promedio ± D.S. YG1021	YG1024			Promedio ± D.S. YG1024
		0	170	160	120	150.000 ± 26.457	127	92	111
10	233	256	236	241.667 ± 12.503	298	246	247	263.667 ± 29.7377	
25	294	368	268	310.000 ± 51.884	500	510	560	523.333 ± 32.1455	
50	418	489	479	462.000 ± 38.432	879	783	781	793.333 ± 80.9958	
75	598	577	551	575.333 ± 23.544	1117	1149	1062	1109.333 ± 44.003	

* Volumen de extracto utilizado
 Colonias Revertantes por cepa (triplicado)
 Promedio de Revertantes
 por cepa ± Desviación Estándar

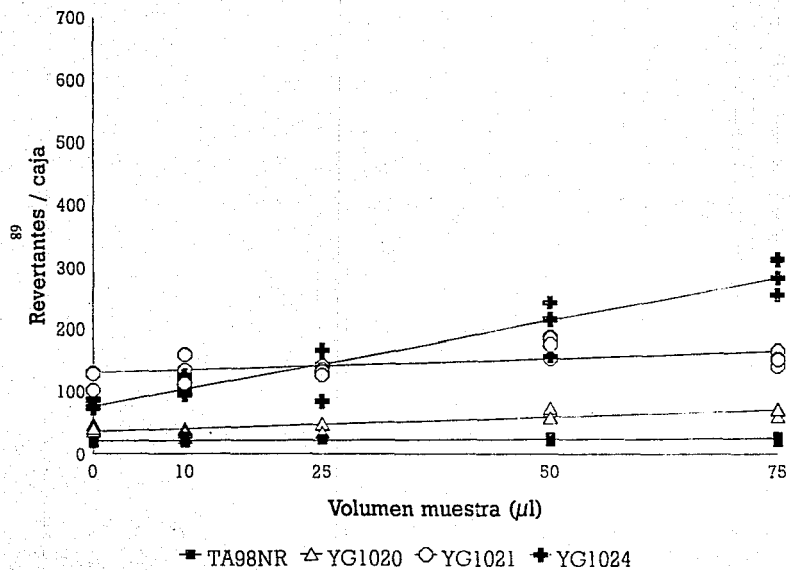
En base a los resultados, se obtuvieron las curvas dosis-respuesta de cada una de las muestras. Las curvas se muestran en la Figura 2. En estas gráficas las curvas trazadas representan los valores obtenidos por el método estadístico de regresión lineal, los valores reales están representados por la marca que define a cada cepa.

FIGURA 2 : CURVAS DOSIS-RESPUESTA

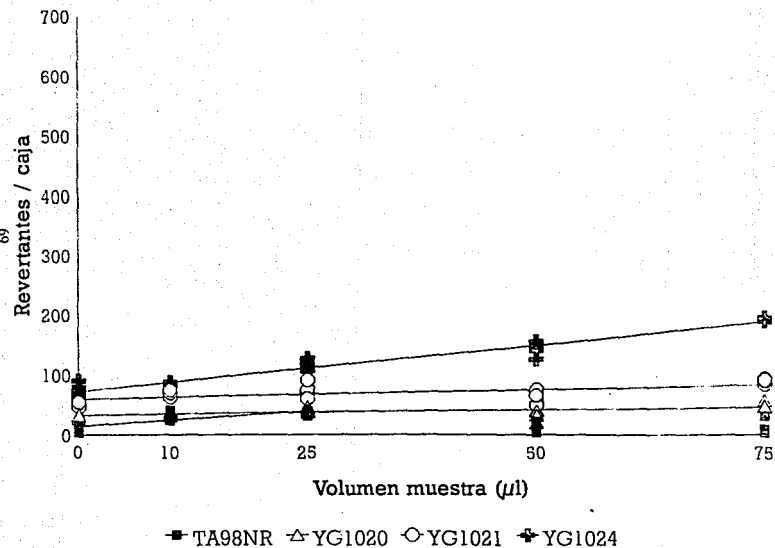
Mutagenicidad del Blanco



Mutagenicidad de muestra B1

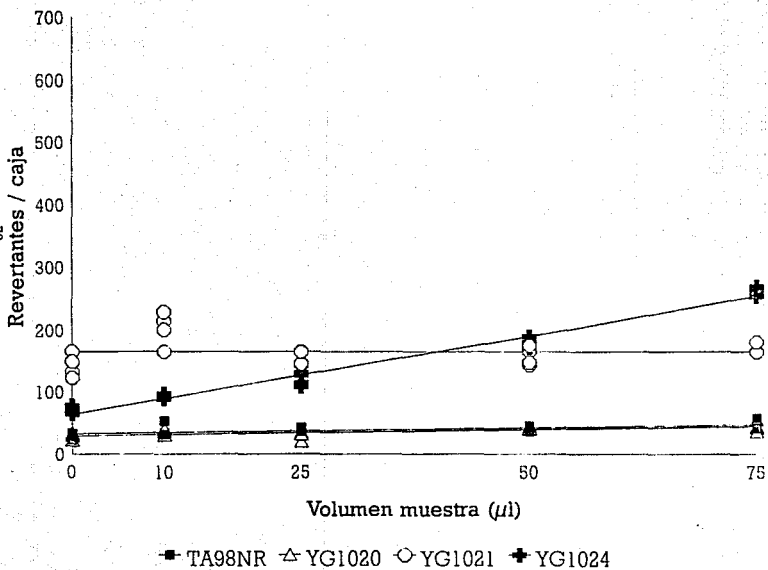


Mutagenicidad de muestra B2

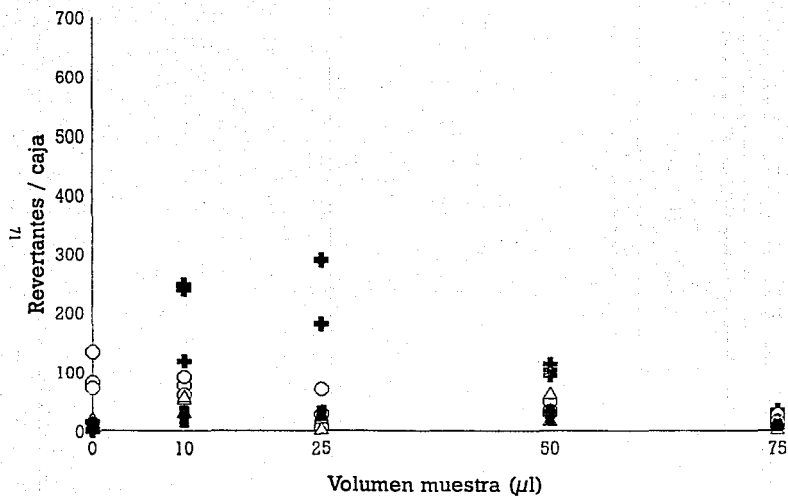


La cepa TA98NR presentó toxicidad en los dos últimos volúmenes.

Mutagenicidad de muestra B3



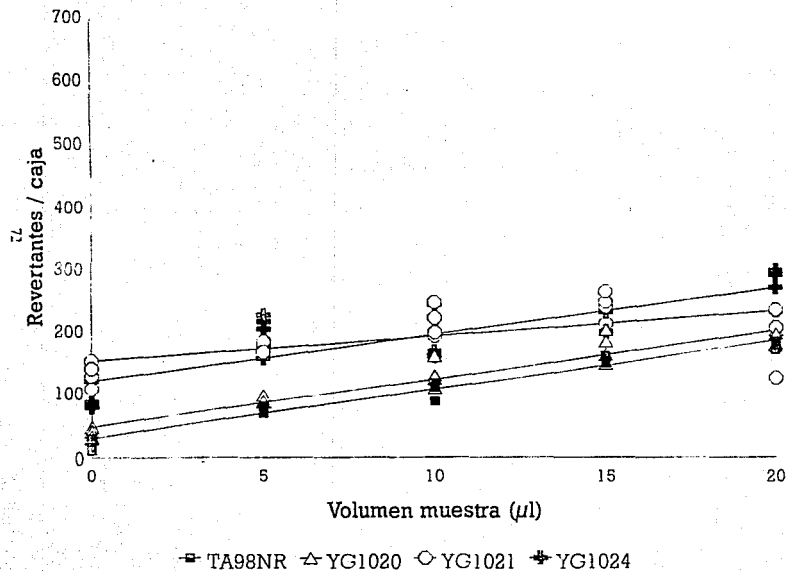
Mutagenicidad de muestra B4



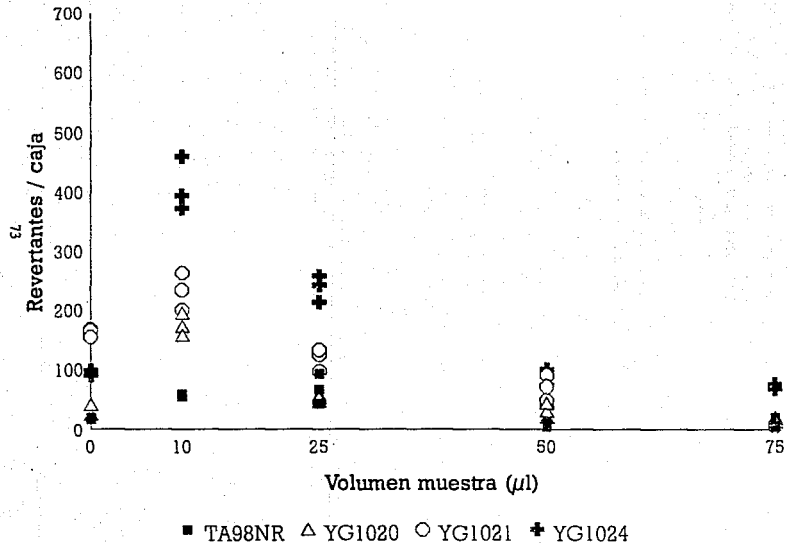
■ TA98NR Δ YG1020 \circ YG1021 + YG1024

Esta muestra resulta tóxica para todas las cepas a las concentraciones usuales

Mutagenicidad de muestra B4, concentraciones reducidas

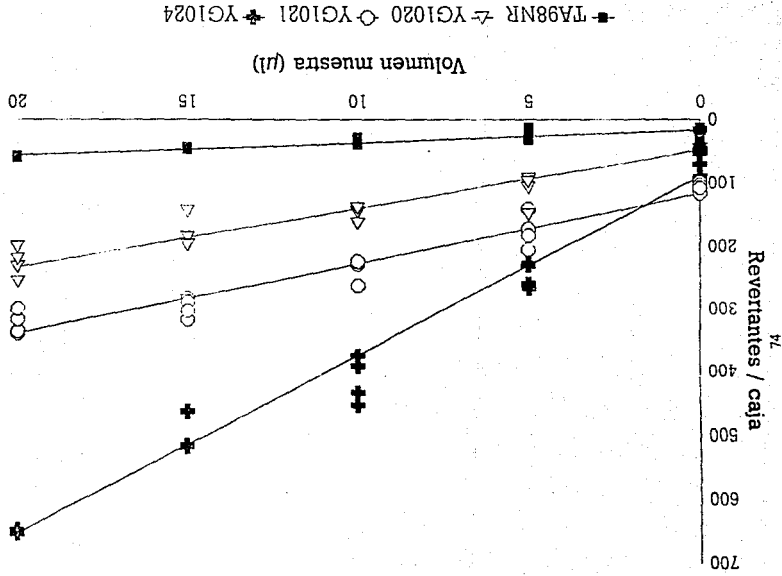


Mutagenicidad de muestra B5

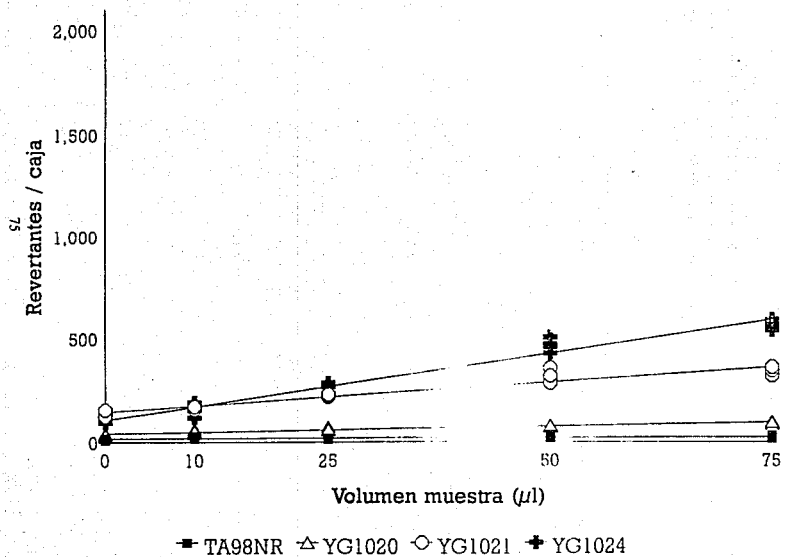


Esta muestra resulta tóxica para todas las cepas a las concentraciones usuales

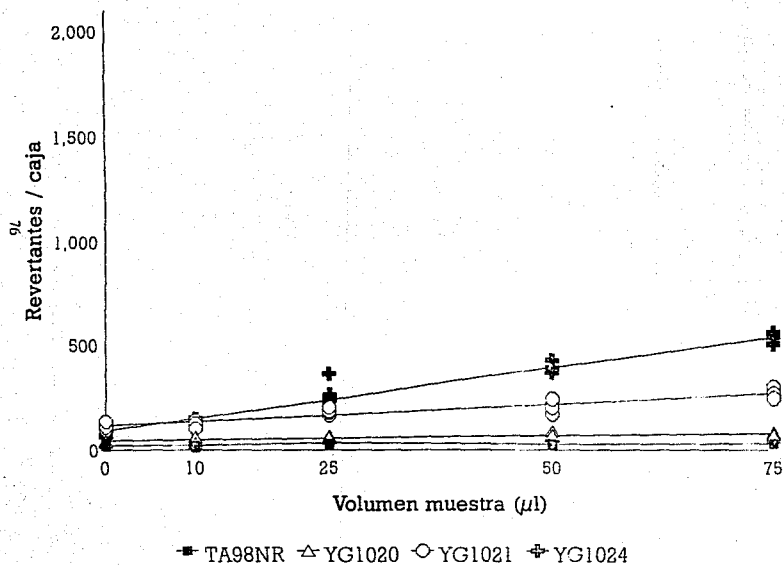
Mutagenicidad de muestra B5, concentraciones reducidas



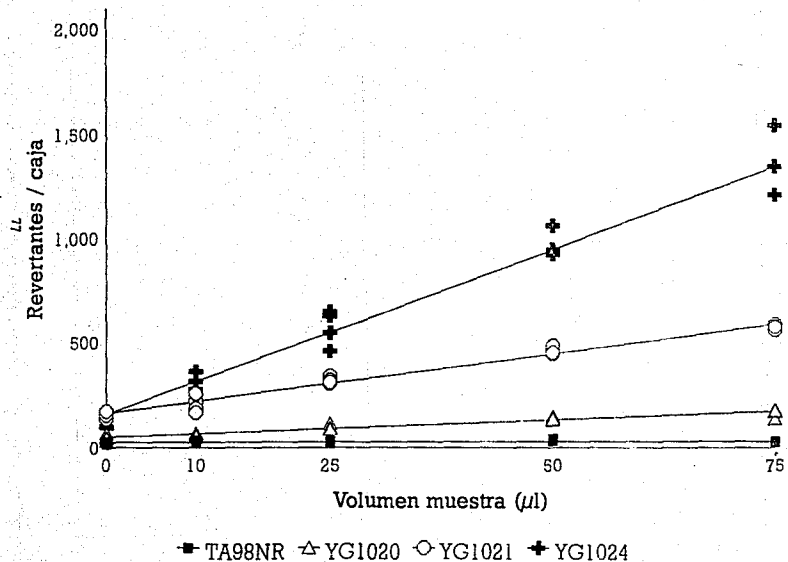
Mutagenicidad de muestra XI



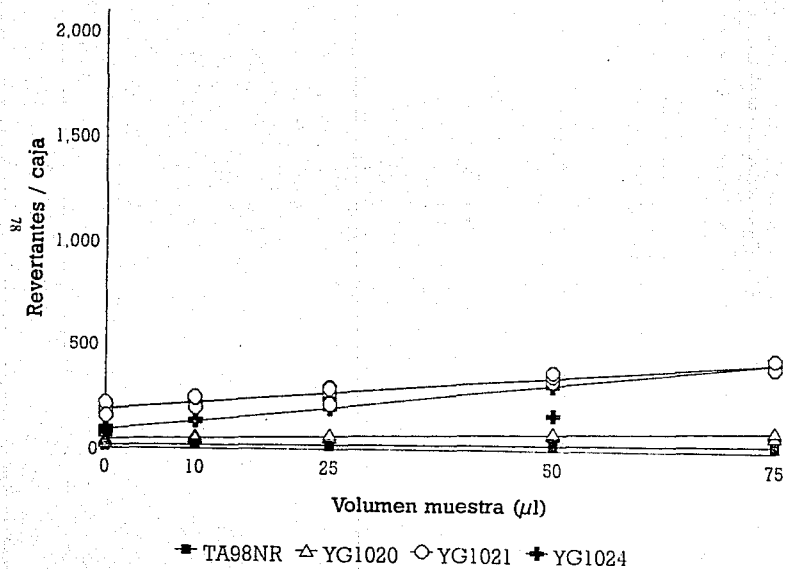
Mutagenicidad de muestra X2



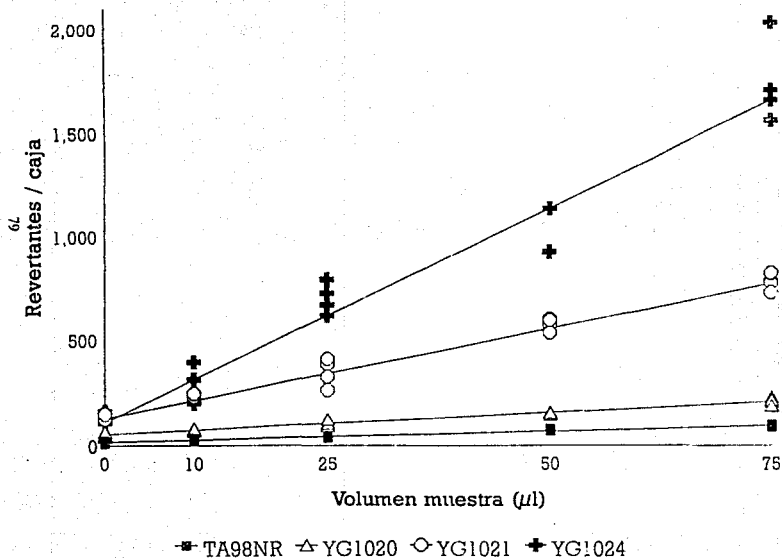
Mutagenicidad de muestra X3



Mutagenicidad de muestra X4

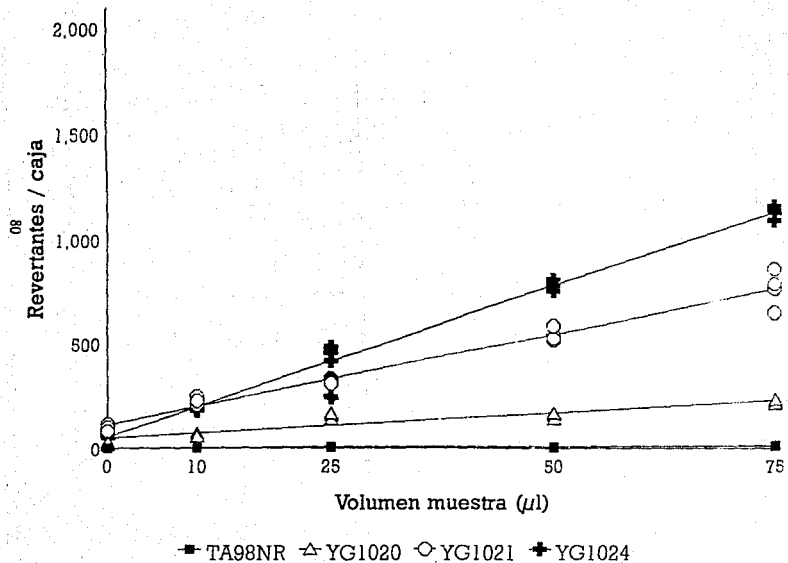


Mutagenicidad de muestra X5

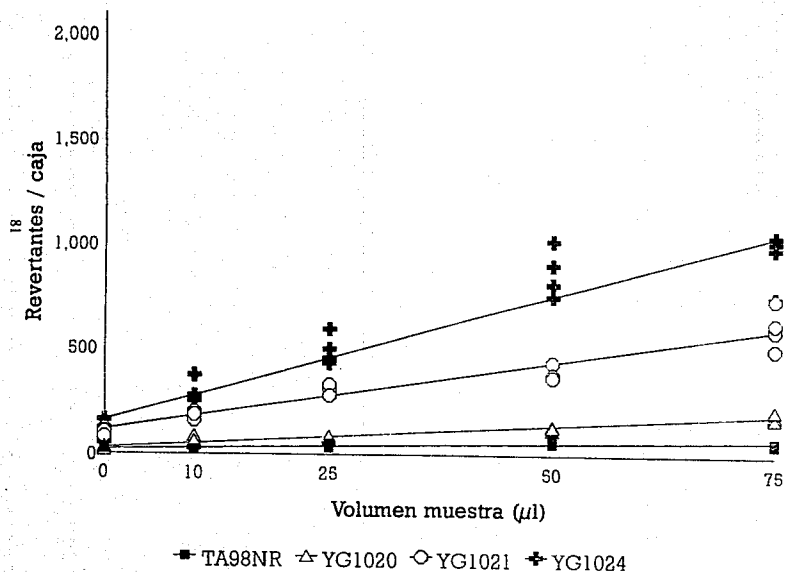


ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

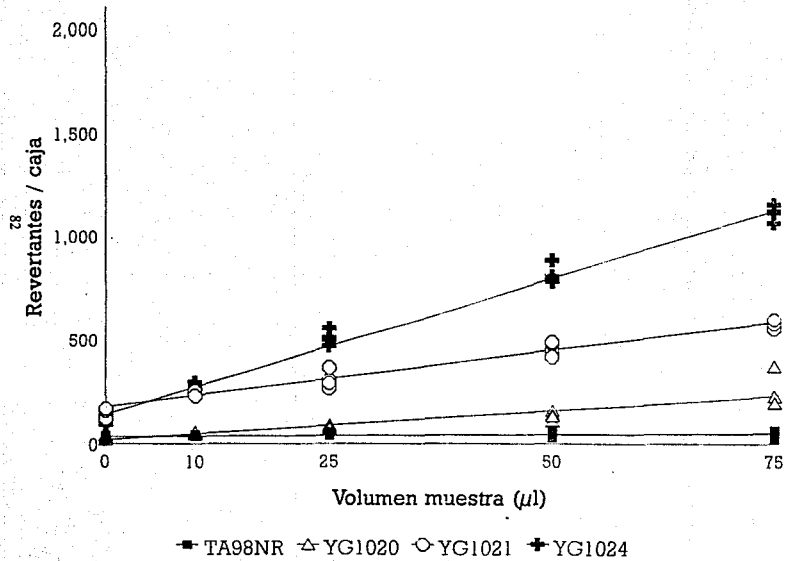
Mutagenicidad de muestra M1



Mutagenicidad de muestra M2



Mutagenicidad de muestra M3



Los valores de pendiente calculados por el método de Regresión Lineal expresan la potencia mutagénica (número de revertantes / μ l de muestra) de cada muestra para cada cepa (Tabla II). Este valor indica el grado en que la muestra provoca eventos mutagénicos en cada cepa.

TABLA II. POTENCIA MUTAGENICA

Muestra	Potencia Mutagénica (Revertantes / μ l)			
	TA98NR	YG1020	YG1021	YG1024
Blanco	0.0822	-0.0714	0.1394	-0.1249
B1	0.0622	0.4528	0.4786	2.7716
B2	0.9456	0.1889	0.3288	1.5707
B3	0.2004	0.2103	0.0035	2.5346
B4	7.9200	7.8333	4.0666	7.5933
B5	1.9266	9.3400	11.1400	28.3266
X1	0.1544	0.7793	2.9147	6.4600
X2	0.1060	0.4583	2.0362	0.9476
X3	0.0665	1.6268	5.7700	15.9711
X4	0.1608	0.6489	2.9896	4.2638
X5	1.0183	2.0783	8.4791	20.7358
M1	0.1318	2.5595	8.6232	14.4330
M2	0.6422	2.1710	6.4442	11.9074
M3	0.1916	2.8294	5.5680	13.2373

La cepa TA98 como se mencionó anteriormente es la más utilizada para pruebas de mutagénesis de extractos de partículas atmosféricas (1,2,3,250) y es la cepa progenitora de las cepas utilizadas en este estudio. La actividad enzimática de nitrorreductasa y acetilcoenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa de la cepa YG1020 no ha sido modificada y

es igual a la de la cepa TA98, por lo tanto esta cepa es la que utilizamos como patrón de comparación para las otras, considerando que su respuesta frente a los nitroarenos es normal, y la más estudiada.

En base a lo anterior, se observa que la cepa TA98NR, que tiene actividad de nitrorreductasa disminuida, muestra una respuesta considerablemente menor a la de la cepa YG1020. La cepa YG1021 con actividad de nitrorreductasa elevada muestra un aumento en la respuesta con respecto a la YG1020. Por último la respuesta de la cepa YG1024 con actividad de acetil-coenzimaA:Nhidroxiarilamina O-acetiltransferasa elevada, es mucho mayor que la de la cepa YG1020 y mayor que la de la cepa YG1021.

Lo antes observado es evidencia de que la respuesta mutagénica se debe principalmente a nitroarenos, que como se expuso anteriormente, requieren de activación metabólica por las enzimas nitrorreductasa y acetil-coenzimaA:N-hidroxiarilamina O-acetiltransferasa para provocar eventos mutagénicos.

En general, si comparamos la actividad mutagénica de las muestras, observamos una actividad considerablemente mayor (aproximadamente el doble de revertantes) en las muestras recolectadas en la ciudad de México que en aquellas recolectadas en la ciudad de Querétaro. Lo anterior nos sugiere que puede existir una relación entre el nivel de contaminación y la mutagenicidad de las muestras.

En un principio se pretendió hacer una comparación entre las muestras recolectadas en invierno, que se supone es una época en la que los niveles de contaminación se elevan dramáticamente, y verano, época en que las condiciones ambientales son más favorables para la dispersión de los contaminantes. Sin embargo, al estudiar los resultados, no se observa un patrón claro de diferencia entre estas épocas. Debido a que no obtuvimos los datos de niveles de contaminantes individuales para cada una de las muestras, no podemos afirmar sin lugar a duda que exista una relación positiva entre actividad mutagénica y nivel de contaminación.

La mutagenicidad de cada extracto para cada cepa se define al comparar el dato de potencia mutagénica del blanco con la potencia de la muestra para la cepa correspondiente. La muestra se considera mutagénica en los casos en los que su potencia mutagénica sea del doble o más que la del blanco. En la tabla III resultados en base a este criterio.

TABLA III. Mutagenicidad de los extractos

Muestra	TA98NR	YG1020	YG1021	YG1024
B1	No Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
B2	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
B3	Mutagénica	Mutagénica	No Mutagénica	Mutagénica
B4	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
B5	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
X1	No Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
X2	No Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
X3	No Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
X4	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
X5	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
M1	No Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
M2	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica
M3	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica	Mutagénica

Como se observa en las tablas II y III, para la cepa TA98NR la mayoría de las muestras

no pueden considerarse mutagénicas o solo levemente mutagénicas, mientras que para las demás cepas casi todas las muestras lo son, en grado menor para la YG1020, mayor para la YG1021 y especialmente alto para la cepa YG1024. Esta respuesta va de acuerdo con la descripción del comportamiento de las cepas frente a sustancias nitroaromáticas.

CONCLUSIONES

Los resultados indican que existen agentes mutagénicos en los extractos de los filtros de aire analizados, además de que los de la Ciudad de México presentan mayor actividad que los de la Ciudad de Querétaro.

La cepa YG1024 resulta ser la más sensible para la detección de compuestos mutagénicos en este tipo de extractos.

Se obtuvieron evidencias que indican la participación de los nitroarenos en la mutagenicidad de los extractos, pero a falta de los medios para llevar a cabo la cuantificación de nitroarenos por los métodos analíticos reportados en la literatura, no fue posible evaluar la participación real de estas sustancias en la mutagenicidad de las muestras. Sin embargo, se obtuvieron evidencias que permiten suponer que la mutagenicidad se debe principalmente a nitroarenos, como es el hecho de que las respuestas de las cepas YG1021 y YG1024 son las más elevadas.

PERSPECTIVAS

Siendo la Ciudad de México la urbe más poblada del mundo, que cuenta con un volumen vehicular elevado, una de las zonas industriales más grandes del país y especiales condiciones geográficas y ambientales, posee un importante problema de contaminación.

Este estudio revela la posibilidad de que la contaminación constituya un riesgo a la salud pública aún más grande de lo que se admite, por lo que consideramos que puede sentar las bases para estudios posteriores en varias áreas de investigación.

Los estudios que nosotros consideramos serían importantes la continuación de este trabajo son, entre otros la evaluación cuantitativa de la participación de los nitroarenos en la mutagenicidad de partículas atmosféricas por los métodos analíticos adecuados, la determinación de la relación entre los niveles de contaminación y la actividad mutagénica, la realización de estudios epidemiológicos con el fin de determinar el riesgo que representan los nitroarenos a la salud, la determinación de posibles sustancias que inhiban la actividad mutagénica de los nitroarenos (anti-mutágenos) para tratar de disminuir el efecto nocivo de estas sustancias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
The genotoxicity, metabolism and carcinogenicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons.
J. Environ. Sci. Health, C3(2) : 221 (1985)
2. Tokiwa H., Ohnishi Y.
Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment.
CRC Crit. Rev. Toxicol., 17 : 23 (1986)
3. Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal.
Mutation Research, 114 : 217 (1983)
4. Tokiwa H., Nakagawa R., Ohnishi Y.
Mutagenic assay of aromatic nitrocompounds with *Salmonella typhimurium*.
Mutation Research, 91 : 321 (1981)
5. Mermelstein R., Kiriazides D.K., Butler M., McCoy E., Rosenkranz H.S.
The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria.
Mutation Research, 89 : 187 (1981)
6. Maeda T., Izumi K., Otsuka H., Manabe Y., Kinouchi T., Ohnishi Y.
Induction of squamous cell carcinoma in the rats lung by 1,6-dinitropyrene.
J. Natl. Cancer Inst., in press
7. Ohgaki H., Matsukura N., Morino K., Sugimura T., Morita K., Tokiwa H., Hirota T.
Carcinogenicity in rats of the mutagenic compounds 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene
Cancer Lett., 15 : 1 (1982)
8. Moon R.C., Rao K.Y.N., Detrisac C.J.
Respiratory carcinogenesis of nitroaromatics.
Health Effects Institute (HEI) Research Report No. 32. Capital City Press, Montpellier VT. (1990)

9. Wolff R.K., Borr E.B., Bond J.A., Eidsen A.F., Griffith W.C. Hahn F.F., Sun J.D., Herkena J.R., Henderson R.F., Mitchell, C.E.
Factors affecting possible carcinogenicity of inhaled nitropyrene aerosols.
Health Research Institute (HEI) Research report No. 19. Prime Communications Inc. (1988)
10. King, C.M.
Metabolism and biological effects of nitropyrene and related compounds.
Health Research Institute (HEI) Research Report No. 16. Prime Communications Inc. (1988)
11. Hecht, S.S.
Potential carcinogenic effects of PAHs and nitroarenes in mobile source emissions.
Air pollution, the Automobile and Public Health. Watson S.D et al., Eds.
National Academy Press, Washington D.C. (1988)
12. Agurell E., Löfroth G.
Presence of various types of mutagenic impurities in carbon black detected by the Salmonella/Microsome assay
Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III.
Waters M.D. et al, Ed. Plenum Press, New York. (1983)
13. Campbell J., Crumplin G.C., Garner J.V. Garner R.C., Martin C.N., Rutter A.
Nitrated Polycyclic aromatic hydrocarbons: potent bacterial mutagens and stimulators of DNA repair synthesis in cultured human cells.
Carcinogenesis, 2 : 559 (1981)
14. Clark C.R., Brooks A.L., Li A.P., Hadley W.M., Hanson R.L., McClelland R.O.
Mutagenicity of fossil fuel combustion products in standard and nitroreductase-deficient Salmonella typhimurium.
Environ. Mutagen., 4 : 333 (1982)
15. Erickson M.D., Newton D.L., Saylor M.C. Tomer K.B., Pellizzari E.D., Zweidinger R.B., Tajeda S.
Fractionation and identification of organic components in diesel exhaust particulate.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract, (1981)
16. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Sanders D.R., Butler M., Kiriazides D.K., Mermelstein R.
Nitropyrenes: isolation, identification and reduction of mutagenic impurities in carbon black and toners.
Science, 209 : 1039 (1980)

17. Ohnishi Y., Kinouchi T., Manabe Y., Tutsui H., Tokiwa H., Otofujii T.
Nitrocompounds in environmental mixture and foods.
Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV.
Waters M.D. et al., Ed. Plenum Press New York (1985)
18. Fukino H., Mimura S., Inoue K., Yamane Y.
Mutagenicity of airborne particles.
Mutation Research, 102 : 237 (1982)
19. Gibson T.L.
Nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne source particulate

Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
20. Hendersson T.R., Sun J.D., Royer R.E., Clark C.R., Harvey T.M., Hung D.F.,
Fulford J.E., Lovett A.M., Davidson W.R.
GC/MS and MS/MS studies of direct-acting mutagens in diesel emissions.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
21. Lewtas J., Austin A., Claxton J.
Diesel bus terminal study : Mutagenicity of the particle-bound organics and organic
fractions.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
22. Lewtas J., Nishioka M.G., Petersen B.A.
The role of nitroaromatics in the mutagenicity of environmental emissions.
Fifth Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) Conference on Toxicology
Abstracts: Toxicity of nitroaromatic compounds : 7. (1982)
23. Li A.P., Clark C.R., Hanon R.L., Henderson T.R., Hobbs C.H.
Coal combustion fly ash extracts as direct-acting mutagen in Salmonella and
promutagen in chinese hamster ovary cells
Environ. Mutagen., 4 : 407 (1982)
24. Löfroth, G.
Comparison of mutagenic activity in carbon black particulate matter and in diesel
and gasoline engine exhaust.
Application of Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental
Mixtures II. Environmental Science Research. Vol. 22 : 319. Waters M.D. et al.,
Eds. Plenum Press, New York. (1981)

25. Löfroth G., Hefner E., Altheim I., Moller M.
Mutagenic activity in photocopies
Science, 209 : 1037 (1980)
26. McCoy E.C., Rosenkranz H.S.
Cigarette smoking may yield nitroarenes
Cancer Lett., 15 : 9 (1982)
27. Mumford J.S., Lewtas J.
Sample collection and preparation factors which affect mutagenicity and cytotoxicity of coal fly ash
Third Symposium on the Application of Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Mixtures. Waters M.D. et al., Ed. Plenum Press, New York (1982)
28. National Academy of Sciences, U.S.
Health effects of exposure to diesel exhaust
The Report of the Health effect Panel of the Diesel Impact Study Committee.
National Research Council-National Academy of Sciences, Washington D.C. (1981)
29. Nishioka M.G., Petersen B.A., Lewtas J.
Comparison of nitro-PNA content and mutagenicity of diesel emissions.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
30. Pederson T.C., Siak, J.S.
The role of nitroaromatic compounds in the direct acting mutagenicity of diesel particle extracts
J. Appl. Toxicol., 1 : 54 (1981)
31. Pederson T.C., Siak, J.S.
The activation of mutagens in diesel particle extract with rat liver S9 enzymes.
J. Appl. Toxicol., 1 : 66 (1981)
32. Petersen B.A., Chuang, C.C., Margard W.L., Trayser D.A.
Identification of mutagenic compound in extracts of diesel exhaust particulates.
Air Pollution Control Association, 74th Annual Meeting Abstracts : 81-57.1 (1981)
33. Pitts J.N.Jr., Harger W., Lokensgard D.M., Fitz G.M., Scorziell G.M., Mejia V.
Diurnal variations in teh mutagenicity of airborne particulate matter in California's southern coast air basin.
Mutation Research. 104 : 35 (1982)

34. Pitts J.N.Jr., Lokengard D.M., Harger W., Fisher T.S., Mejia V., Schuler J.J., Scorziell G.M., Katzenstein Y.A.
Mutagens in diesel exhaust particulate: Identification and direct activities of 6-nitrobenzo[a]pyrene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene and 5H-phenantro[4,5-bcd]pyran-5-one.
Mutation Research, 103 : 241 (1982)
35. Rappaport S.M., Wang Y.Y., Wei E.T., Sawyer R., Watkins B.E., Rappaport H.
Isolation and identification of a direct-acting mutagen in diesel-exhaust particulates.
Science Tech., 14 : 1505 (1980)
36. Riley T., Prater D., Schuetzle D., Harvey T.M., Hunt D.
The analysis of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particles by mass spectrometry/mass spectrometry techniques.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract. (1981)
37. Salmeen I., Dursin A.M., Prater T.J., Reily T., Schuetzle D.
Contribution of 1-nitropyrene to direct-acting Ames assay mutagenicities of diesel particulate extracts.
Mutation Research, 104 : 17 (1982)
38. Schuetzle D., Lee F.S.C., Prater T.J., Tejada S.B.
The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts
Intern. J. Environ. Anal. Chem., 9 : 1 (1981)
39. Schuetzle D., Riley T.L., Prater T.J., Harvey T.M., Hunt D.F.
Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulates.
Anal. Chem., 54 : 265 (1982)
40. Schuetzle D., Riley T.L., Prater T.J., Salmeen I.
The identification of mutagenic chemical species in air particulate samples.
Analytical Techniques in Environmental Chemistry, II : 259. Albaiges, Ed. Pergamon Press, Oxford. (1982)
41. Talcott R.E., Hager W.
Chemical characterization of direct-acting mutagens : The functional group.
Mutation Research, 32 : 55 (1981)

42. Wei C.I., Raabe O.G., Rosenblatt L.S.
Microbial detection of mutagenic nitro-organic compounds in filtrates of coal fly ash.
Environ. Mutagen.. 4 : 382 (1982)
43. Xu X.B., Nachman J.P., Rappaport S.M., Wei E.T., Lewis S., Burlingame B.
Identification of 2-nitrofluorene in diesel exhaust particles.
J. Appl. Toxicol., 1 : 196 (1981)
44. Xu X.B., Nachman J.P., Jin, Z.L., Wei E.T., Rappaport S.M., Burlingame B.
Isolation and identification of mutagenic nitroarenes in diesel exhaust particulates
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
45. Xu X.B., Nachman J.P., Jin, Z.L., Wei E.T., Rappaport S.M.
Isolation and identification of mutagenic nitro-PAH in diesel exhaust particulates.
Anal. Chem. Acta, 136 : 163 (1982)
46. Yergey J.A., Risby T.H., Lestz S.S.
The chemical characterization of diesel particulate matter
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
47. Zwedinger, R.B.
Emission factors from diesel and gasoline powered vehicles: Correlation with the Ames Test.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
48. Tokiwa H., Nakagawa, R., Horikawa K.
Mutagenic / carcinogenic agents in indoor pollutants : the nitropyrenes generated by kerosene heaters and fuel gas and liquified petroleum gas burners.
Mutation Research, 157 : 69 (1985)
49. Hytönen S., Alfheim I., Sorsa M.
Effect of emissions from residential wood stoves on SCE induction in CHO cells.
Mutation Research, 118 : 69 (1983)
50. Tokiwa H., Kitamori S., Nakagawa R., Horikawa K., Matamala L.
Demonstration of a powerful mutagenic dinitropyrene in airborne particulate matter.
Mutation Research, 121 : 107 (1983)

51. Manabe Y., Kinouchi T., Wakisaka K., Tahara I., Ohnishi Y.
Mutagenic 1-nitropyrene in wastewater from oil water separating tanks of gasoline stations and used crankcase oil.
Environ. Mutagen., 6 : 669 (1984)
52. Dennis M.J., Massey R.C., McWeeny D.J., Knowles M.E.
Estimation of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in foods.
Food Additives Contaminants, 1 : 29 (1984)
53. Gibson T.L.
Sources of direct-acting nitroarene mutagens in airborne particulate matter.
Mutation Research, 122 : 115 (1983)
54. Tokiwa H., Kitamori S., Horikawa K., Nakagawa R.
Some findings on mutagenicity in airborne particulate pollutants.
Environ. Mutagen., 5 : 87 (1983)
55. Nakagawa R., Kitamori S., Horikawa K., Nakashima K., Tokiwa H.
Identification of dinitropyrenes in diesel-exhaust particles. Their probable presence as the major mutants
Mutation Research, 124 : 201 (1983)
56. Manabe Y., Kinouchi T., Ohnishi Y.
Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles
Mutation Research, 158 : 3 (1985)
57. Wang C.H., Lee M.S., King C.M., Warner P.O.
Evidence of nitroaromatic as direct-acting mutagens of airborne particles.
Chemosphere, 9 : 83 (1980)
58. Harris W.R., Chess E.K., Okamoto D., Remsen J.F., Later D.W.
Contribution of nitropyrenes to mutagenic activity of coal fly ash.
Environ. Mutagen., 6 : 131 (1984)
59. Sato T., Kato K., Ose Y., Nagase H., Ishikawa T.
Nitroarenes in Suimon river sediment.
Mutation Research, 157 : 135 (1985)

60. Gerner R.C., Stanton C.A., Martin C.N., Chow F.L., Thomas W., Hubner D., Herrmann R.
Bacterial mutagenicity and chemical analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and some nitroderivatives in environmental samples collected in West Germany.
Environ. Mutagen., 8 : 109 (1986)
61. Sasaki Y., Endo R., Kawai T., Oyama K., Nakama A., Ishiguro T., Suga K., Asakuno K.
Mutagenicity and carcinogenicity of extracts from airborne particles.
Mutation Research, 130 : 263 (1983)
62. Li A.P., Clark C.R., Hanson R.L., Henderson T.R., Hobbs C.H.
Comparative mutagenicity of coal combustion fly ash extract in *Salmonella typhimurium* and Chinese hamster ovary cells
Environ. Mutagen., 5 : 263 (1983)
63. Moller M., Alheim L., Löfroth G., Agurell E.
Mutagenicity of extracts from typewriter ribbons and related items.
Mutation Research, 119 : 239 (1983)
64. Claxton L.D.
Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review.
Environ. Mutagen., 5 : 609 (1983)
65. Brooks A.L., Li A.P., Dutcher J.S., Clark C.R., Rothenberg S.J., Kiyoura R., Bechtold W.E., McClellan R.O.
Comparison of genotoxicity of automotive exhaust particles from laboratory and environmental sources.
Environ. Mutagen., 6 : 651 (1984)
66. Kuromoto M., Kitamori S., Nakagawa R., Tokiwa H.
Mutagenicity of combustion products in kerosene heater emissions.
Mutation Research, 130 : 370 (1984)
67. Arey J., Zielinska B., Harger W.P., Atkinson R., Winer A.M.
The contribution of nitrofluoranthenes and nitropyrenes to the mutagenic activity of ambient particulate organic matter collected in Southern California.
Mutation Research, 207 : 45 (1988)

68. Löfroth G., Toftgard R., Caristed-Duke J., Gustafsson J.A., Brorstrom E., Grenafeld P., Lindskog A.
Effect of ozone and nitrogen dioxide present during sampling of genuine particulate matter as detected by two biological systems and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract. (1981)
69. Pitts J.N. Jr.
Photochemical and biological implications of atmospheric reactions of amines and benzo[a]pyrene.
Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. A., 290 : 551 (1979)
70. Pitts J.N. Jr., Van Cauwengergh K.A., Grosejean D., Schmid J.P., Fitz D.R., Belser W.L.Jr., Knudson G.B., Hunds P.M.
Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives.
Science, 202 : 515 (1979)
71. Tokiwa H., Nakagawa R., Morita K., Ohnishi Y.
Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to nitrogen dioxide.
Mutation Research, 85 : 195 (1981)
72. Tokiwa H., Nakagawa R., Ohnishi Y.
Mutagenicity of nitro derivatives induced by exposure of aromatic compounds to gaseous pollutants.
Third International Conference on Environmental Mutagens Abstracts : 79 (1981)
73. Arey J., Zielinska B., Atkinson R., Winer A.M., Ramdahl T., Pitts J.N.Jr.
The formation of nitro-PAH from the gas-phase reactions of fluoranthene and pyrene with the OH radical in the presence of NOx.
Atmos. Environ., 20 : 2339 (1986)
74. Atkinson R., Arey J., Zielinska B., Winer A.M., Pitts J.N.Jr.
The formation of nitropolycyclic hydrocarbons and their contribution to the mutagenicity of ambient air.
Short-Term Bioassays in the analysis of complex environmental mixtures V. Sanhue et al., Ed. Plenum Press, N.Y. (1987)

75. Miltenburger H.G., Klemp H., Stark G.
Investigations on the mutagenic activity of fractions from diesel exhaust particulate matter in the Salmonella typhimurium test system (Ames test).
Mutation Research, 113 : 343 (1983)
76. Schuetzle, D.
Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing.
Environ. Health Perspect., 47 : 65 (1983)
77. Rosenkranz, H.S.
Direct-acting mutagens in diesel exhaust: Magnitude of the problem.
Mutation Research, 101 : 1 (1982)
78. Pederson, T.C. and Siak, J.S.
Dinitropyrenes: their probable presence in diesel extracts and consequent effect on mutagenic activations by NADPH-dependant S9 enzymes.
Environmental Protection Agency (EPA) Diesel Emission Symposium Abstract.
(1981)
79. Tokiwa H., Nakagawa R., Horikawa K., Ohkubo A.
The nature of the mutagenicity and carcinogenicity of nitrated, aromatic compounds in the environment.
Environ. Health Perspect., 73 : 191 (1987)
80. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Mermelstein R.
Microbial assays in research and in characterization of complex mixtures.
Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III.
Waters M.D. et al. Ed. Plenum Press, New York, (1983)
81. McCoy E.C., Rosenkranz E.J., Petruccio L.A., Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Structural basis of mutagenicity in bacteria of nitrated naphthalene and derivatives.
Environ. Mutagen., 2 : 499 (1981)
82. McCoy E.C., Rosenkranz E.J., Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Nitrated fluorene derivatives are potent frameshift mutagens.
Mutation Research, 90 : 11 (1981)

83. Rosenkranz H.S., Karpinsky G.E., Anders M.G., Rosenkranz E.J., Petruzzo F.C., McCoy E.C., Mermelstein R.
Adaptability of microbial mutagenicity assay to the study of problems of environmental concern.
Induced Mutagenesis: Molecular Mechanisms and their Implications for Environmental Protection. Lawrence C.W., et al. Ed. Plenum Press, New York, (1982)
84. McCoy E.C., Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Evidence for the existence of a family of bacterial nitroreductase capable of activating nitrated polycyclics to mutagens.
Environ. Mutagen., 3 : 421 (1981)
85. Rosenkranz E.J., McCoy E.C., Mermelstein R., Rosenkranz H.S.
Evidence for the existence of distinct nitroreductases in *Salmonella typhimurium*: Roles in mutagenesis.
Carcinogenesis, 3 : 121 (1982)
86. Messier F., Ku C., Andrews P., McCarty B.E., Quilliam M.A., McCalla D.R.
Metabolism of 1-nitropyrene and formation of DNA adducts in *Salmonella typhimurium*.
Carcinogenesis, 2 : 1007 (1981)
87. Quilliam M.A., Messier F., Lu C., Andrews P.A., McCarty B.F., McCalla D.R.
The metabolism of nitro-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium*.
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Physical and Biological Chemistry. Cooke M., et al., Eds. Battelle Press, Columbus, Ohio, (1982)
88. Whong W.Z. and Edwards G.S.
Genotoxic activity of nitro aromatic explosives and related compounds in *Salmonella typhimurium*.
Mutation Research, 85 : 335 (1984)
89. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Mermelstein R., Speck W.T.
A cautionary note on the use of nitroreductase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* for the detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhausts.
Mutation Research, 91 : 103 (1981)

90. Fifer E.K., Heflich R.H., Djuric Z., Howard P.C., Beland F.A.
Synthesis and mutagenicity of 1-nitro-6-nitrosopyrene and 1-nitro-8-nitrosopyrene, potential intermediates in the metabolic activation of 1,6- and 1,8-dinitropyrene. *Carcinogenesis*, 7 : 65 (1986)
91. McCoy E.C., Anders M., Rosenkranz H.S.
The basis of the insensitivity of *Salmonella* Typhimurium strain TA98/1,8-DNP to the mutagenic actions of nitroarenes. *Mutation Research*, 121 : 17 (1983)
92. De France B.F., Carter M.H., Josephy P.D., Bryant D.W., McCalla D.R.
Metabolism of mutagens of benzidine in *Salmonella* typhimurium strains TA98 and TA98/1,8-DNP6. *Mutation Research*, 144 : 159 (1985)
93. Djuric Z., Fifer E.K., Beland F.A.
Acetylcoenzyme A-dependant binding in carcinogenic and mutagenic dinitropyrenes to DNA. *Carcinogenesis*, 6 : 941 (1985)
94. McCoy E.C., McCoy G.D., Rosenkranz H.S.
Esterification of arylhydroxylamines: evidence for a specific gene product to mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108 : 1362 (1982)
95. Beland, F.A.
The metabolic activation and DNA adducts of the dinitropyrenes. Health Effects Institute (HEI) Research Report No. 4. Prime Communications Inc. (1986)
96. Beland, F.A.
Computer-generated graphic models of the N-substituted deoxyguanosine adducts of 2-acetylaminofluorene and B[a]P and the O-substituted deoxyguanosine adduct of 1-naphthylamine in the DNA double helix. *Chem.-Biol. Interact.*, 22 : 329 (1978)
97. Kadlubar F.F., Miller J.A., Miller E.C.
Guanyl O-arylamidation and O-arylation of DNA by the carcinogen N-hydroxyl-1-naphthylamine. *Cancer Res.*, 38 : 3628 (1978)

98. Jeffrey A.M., Santella R.M., Wong D., Hsieh L.-L., Heisig V., Doskocil G., Ghayourmanesh S.
Metabolic activation of nitropyrenes and diesel particulate extracts.
Health Effects Institute (HEI) Research Report No. 34. Capital City Press,
Montpellier VT. (1989)
99. Howard P.C., Heflich R.H., Evans F.E., Beland F.A.
Formation of DNA adducts in vitro and in *Salmonella typhimurium* upon metabolic
reduction of the environmental mutagen 1-nitropyrene.
Cancer Res., 43 : 2052 (1983)
100. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Frierson M., Klopman G.
The role of DNA sequence and structure of the electrophile in the mutagenicity of
nitroarenes.
Environ. Mutagen., 7 : 645 (1985)
101. Kadlubar F.F., Unruh L.E., Beland F.A., Straub K.M., Evans F.E.
In vitro reaction of the carcinogen N-hydroxy-2-naphthylamine, with DNA at the C8
and N2 atoms of guanine and N6 atom of adenine.
Carcinogenesis, 1 : 139 (1980)
102. McCoy E.C., Holloway M., Frierson M., Klopman G., Rosenkranz H.S.
Genetic and quantum chemical basis of the mutagenicity of nitroarenes for adenine-
thymine base pairs.
Mutation Research, 149 : 311 (1985)
103. Beranek D.T., Heflich R.H., Beland F.A., Kadlubar F.F., White G.L.
The relationship between arylamine - DNA binding and mutagenicity in *Salmonella*
typhimurium.
Environ. Mutagen., 4 : 297 (1982)
104. El-Bayoumy K. and Hecht S.S.
Identification and mutagenicity of metabolites of 1-nitropyrene formed by rat liver.
Cancer Res., 43 : 3132 (1983)
105. Djuric Z., Fifer E.K., Howard P.C., Beland F.A.
Oxidative microsomal metabolism of 1-nitropyrene and DNA-binding of oxidized
metabolites following nitroreduction.
Carcinogenesis, 7 : 1073 (1986)
106. Djuric Z., Potter D.W., Heflich R.H., Beland F.A.
Aerobic and anaerobic reduction of nitrated pyrenes.
Chem.-Biol. Interact., 59 : 309 (1986)

107. Howard P.C., Flammang T.J., Beland F.A.
Comparison of the in vitro and in vivo hepatic metabolism of the carcinogen 1-nitropyrene.
Carcinogenesis, 6 : 243 (1985)
108. Howard P.C., Beland F.A., Cerniglia C.E.
Reduction of the carcinogen 1-nitropyrene to 1-aminopyrene by rat intestinal bacteria.
Carcinogenesis, 4 : 985 (1983)
109. Ohnishi Y., Kinouchi T., Manabe Y., Wakisaka K.
Environmental aromatic nitrocompounds and their bacterial detoxification. Application of Short-Term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures III. Waters M.D. et al. Ed. Plenum Press, New York. (1982)
110. Karpinsky G.E. and Rosenkranz H.S.
The anaerobic-mediated mutagenicity of 2-nitrofluorene and 2-aminofluorene for *Salmonella typhimurium*.
Environ. Mutagen., 2 : 353 (1980)
111. Kinouchi T., Manabe Y., Wakisaka K., Ohnishi Y.
Biotransformation of 1-nitropyrene in intestinal anaerobic bacteria.
Microbiol. Immunol., 26 : 993 (1982)
112. El-Bayoumy K., Sharma C., Louis Y.M., Reddy B., Hecht S.S.
The role of intestinal microflora in the metabolic reduction of 1-nitropyrene to 1-aminopyrene in conventional and germ-free rats.
Cancer Lett., 19 : 311 (1983)
113. Morotomi M., Nanno M., Watanabe T., Sakurai T., Mutai M.
Mutagenic activation of biliary metabolites of 1-nitropyrene by intestinal microflora.
Mutation Research, 149 : 171 (1985)
114. Sun J.D., Wolff R.K., Aberman H.M., McClellan R.O.
Inhalation of 1-nitropyrene associated with ultrafine insoluble particles or as a pure aerosol: A comparison of deposition and biological fate.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 69 : 185 (1983)

115. Wolff R.K., Henderson R.F., Snipes M.B., Sun J.D., Bond J.A., Mitchell C.E., Mauderly J.L., McClelland R.O.
Lung retention of diesel soot and associated organic compounds.
Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust: 199. Ishinishi N. et al., Ed. Elsevier Science Publishing Co., New York, (1986)
116. Kinouchi T., Morotomi M., Mutai M., Fifer E.K., Beland F.A., Ohnishi Y.
Metabolism of 1-nitropyrene in germ-free and conventional rats.
Jpn. J. Cancer Res., 76 : 400 (1985)
117. El-Bayoumy K. and Hecht S.S.
Metabolism of 1-nitro [U-4,5,9,10-14C]pyrene in the F334 rat.
Cancer Res., 44 : 4317 (1984)
118. Ball L.M., Kohan M.J., Inmon J.P., Claxton L.D., Lewtas J.
Metabolism of 1-nitro[14C]pyrene in vivo in the rat and mutagenicity of urinary metabolites.
Carcinogenesis, 5 : 1557 (1984)
119. Bond J.A. and Mauderly J.L.
Metabolism and macromolecular covalent binding of 14C 1-nitropyrene in isolated perfused and ventilated rat lungs.
Cancer Res., 44 : 3924 (1984)
120. Bond J.A., Mauderly J.L., Henderson R.F., McClellan R.O.
Metabolism of 14C 1-nitropyrene in respiratory tract tissue of rats exposed to diesel exhaust.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 79 : 461 (1985)
121. Bond J.A., Sun J.D., Medinsky M.A., Jones R.K., Yeh H.C.
Deposition, metabolism and excretion of 14C 1-nitropyrene coated on diesel exhaust particles as influenced by exposure concentration.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 65 : 102 (1986)
122. Bond J.A., Sun J.D., Mitchell C.E., Dutcher J.S., Wolff R.K., McClellan R.O.
Biological fate of inhaled organic compounds associated with particulate matter.
Aerosols: 579. Lee S.D., et al., Eds. Lewis Publishers, Chelsea, MI. (1986)
123. Bond, J.A.
Bioactivation and biotransformation of 1-nitropyrene in liver, lung and nasal tissue of rat.
Mutation Research, 124 : 315 (1983)

124. El-Bayoumy K., Reddy B., Hecht S.S.
Identification of ring oxidized metabolites of 1-nitropyrene in the feces and urine of germ-free F334 rats.
Carcinogenesis, 5 : 1371 (1984)
125. McCoy E.C., Rosenkranz E.J., Petrullo L.A., Rosenkranz H.S.
Frameshift mutagens relative roles of simple intercalation and of adduct formation.
Mutation Research, 90 : 21 (1981)
126. McCoy E.C., Anders M., Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Mutagenicity of nitropyrenes for *Escherichia coli*: requirement of increased cellular permeability.
Mutation Research, 142 : 163 (1985)
127. McCoy E.C., Anders M., Rosenkranz H.S., Mermelstein R.
Apparent absence of recombinogenic activity of nitropyrenes for yeast.
Mutation Research, 116 : 119 (1983)
128. Wilcox, P. and Parry, J.M.
The genetic activity of dinitropyrenes in yeast: unusual dose-response curves for induced mitotic gene conversions.
Carcinogenesis, 2 : 1201 (1981)
129. Wilcox P., Danford N., Parry J.M.
The genetic activity of dinitropyrenes in yeast and cultured mammalian cells.
Environ. Mutagen., 4 : 399 (1982)
130. McCoy E.C., Anders M., McCartney M., Hoard P.C., Beland F.A., Rosenkranz H.S.
The recombinogenic inactivity of the 1-nitropyrene for yeast is due to a deficiency in a functional nitroreductase.
Mutation Research, 139 : 115 (1984)
131. Ura T., Kaneko E., Fukazawa Y., Tsushimoto G.
Utility of biochemical induction assay.
Mutation Research, 130 : 383 (1984)
132. Ohta T., Nakamura N., Moriya M., Shirasu Y., Kada T.
The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *E. coli*.
Mutation Research, 131 : 101 (1984)

133. Ho Y.L., Ho, S.K.
Screening of carcinogens with the prophage cts857 induction test.
Cancer Res., 41 : 532 (1981)
134. Rosenkranz, H.S. and Poirier, L.A.
An evaluation of the mutagenicity and DNA-modifying activity in microbial systems of carcin and non-carcinogens.
J. Natl. Cancer Inst., 62 : 873 (1979)
135. McCarroll N.E., Piper C.E., Keech B.H.
An E. coli microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct acting agents on promutagens.
Environ. Mutagen., 3 : 429 (1981)
136. Mamber S.W., Bryson V., Katz S.E.
The Escherichia coli WP2/WP100 "rec assay" for detection of potential chemical carcinogens.
Mutation Research, 119 : 135 (1983)
137. McCarroll N.E., Keech B.H., Piper C.E.
A microsuspension adaptation of the Bacillus subtilis "rec" assay.
Environ. Mutagen., 3 : 607 (1981)
138. Suter, W. and Jaeger, I.
Comparative evaluation of different bacterial DNA repair tests for rapid detection of chemical mutagens and carcinogens.
Mutation Research, 97 : 1 (1982)
139. Sorensen W.G., Whong W.-Z., Simpson J.P., Busick D.J., Tongman O.
Genotoxic properties of 2,4,7-trinitro-9-fluorenone.
Mutation Research, 118 : 167 (1983)
140. Amacher D.E., Paillet S.C., Turner G.N.
Utility of the mouse lymphoma 15178Y/TK assay for the detection of chemical mutagens.
Banbury Report No. 2: Mammalian Cell Mutagenesis: The Mutation of Test Systems: 277. Hsie A.W. et al. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
141. Burrell A.D., Anderen J.J., Jotz M.M., Evans E.L., Mitchell A.D.
Genetic Toxicity of 2,4,7-trinitrofluorene-9-one in the Salmonella Assay, L5178 TK +/- mouse lymphoma mutagenesis assay and sister chromatid exchange assay.
Environ. Mutagen., 3 : 360 (1981)

142. Moore M.M., Clive D., Howard B.E., Batson A.G., Turner N.T.
In situ analysis of trifluorothymidine-resistant (TFTr) mutants of L5178Y TK +/- mouse lymphoma cells.
Mutation Research, 151 : 147 (1985)
143. Puri, E.C. and Muller, D.
Mutagenic properties and carcinogenicity of aristolochic acid.
Mutation Research. 147 : 133 (1985)
144. Ball L.M., Kohan M.J., Claxton L., Lewtas J.
Mammalian activation and metabolism of 1-nitropyrene.
Fifth Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) Conference on Toxicology Abstracts: Toxicity of Nitroaromatic Compounds : 6. (1982)
145. Cole J., Arlett C.F., Lowe J., Bridges B.A.
The mutagenic potency of 1,8-dinitropyrene in cultured mouse lymphoma cells.
Mutation Research, 93 : 213 (1982)
146. Edgar, D.H.
The mutagenic potency of four agents at the thymidinekinase locus in mouse lymphoma L5178Y cells in vitro : Effect of exposure time.
Mutation Research, 157 : 199 (1985)
147. Morris S.M., Heflich R.H., Beland F.A., Kodell R.L.
Sister-chromatid exchange frequency, mutation induction and cell survival in Chinese hamster ovary cells exposed to N-oxidized arylamines.
Environ. Mutagen., 6 : 398 (1984)
148. Heflich R.H., Beland F.A., Fullerton N.F., Hosard P.C.
Analysis of the metabolites, DNA adducts and mutations produced by 1-nitropyrene in Chinese hamster ovary cells.
Environ. Mutagen., 6 : 456 (1984)
149. Li, A.P. and Dutcher S.J.
Mutagenicity of mono-, di- and tri-nitropyrenes in Chinese hamster ovary cells.
Mutation Research Lett., 119 : 387 (1983)
150. Edgar, D.H. and Brooker, P.C.
Induction of 6-thioguanine resistance, chromosomal aberrations and SCE by dinitropyrenes in Chinese hamster ovary cells in vitro.
Mutation Research, 158 : 209 (1985)

151. Chou M.W., Evans F.E., Yang S.K., Fu P.P.
Evidence for a 2,3-epoxide as an intermediate in the microsomal metabolism of 6-nitrobenzo[a]pyrene.
Carcinogenesis, 4 : 699 (1983)
152. Hass B.S., Chou M.W., Casciano D.A., White G.L., Fu P.P., Heflich R.H.
Differences in the mutagenic response of *Salmonella* and CHO cells to nitrobenzo[a]pyrenes.
Environ. Mutagen., 6 : 417 (1984)
153. Nakayasu M., Sakamoto H., Wakabayashi K., Terada M., Sugimura T., Rosenkranz H.S.
Potent mutagenic activity of nitropyrenes in Chinese hamster lung cells with dipterera toxine resistance as a selective marker.
Carcinogenesis, 3 : 338 (1983)
154. Takayama S., Tanaka M., Katch Y., Terada M., Sugimura T.
Mutagenicity of nitropyrenes in Chinese hamster V79 cells.
Gann., 75 : 574 (1983)
155. Manolache M., Gebauer J., Rohrborn G.
Mutagenic activity of aristolochic acid in the V 79/HGPRT point mutation assay.
Mutation Research, 147 : 133 (1985)
156. Arlett, C.
Mutagenicity of 1,8-dinitropyrene in mammalian cells.
The Toxicity of Nitroaromatic Compounds. Rickert F.C., Ed. Hemisphere Press, New York.
157. Sanders D.R., Temcharoen P., Thilly W.G
1,8-dinitropyrene mutagenicity in bacteria and human cells.
Environ. Mutagen., 5 : 457 (1983)
158. Butterworth B.E., Earle L.L., Strom S., Jirtle R., Michalopoulos G.
Induction of DNA repair in human and rat hepatocytes by 1,6-dinitropyrene.
Mutation Research, 122 : 73 (1983)
159. Sugimura, T. and Takayama, S.
Biological actions of nitroarenes in short-term tests on *Salmonella*, cultured mammalian cells and cultured human tracheal tissues : possible basis for regulatory control.
Environ. Health Perspect., 47 : 171 (1983)

160. Moller, M.E. and Thorgeirsson S.S.
DNA damage induced by nitropyrenes in primary mouse hepatocytes and in rat H4-II-E hepatoma cells.
Mutation Research, 151 : 137 (1985)
161. Deanford N., Wilcox P., Parry J.M.
The clastogenic activity of dinitropyrenes in rat-liver epithelial cell line.
Mutation Research, 105 : 349 (1982)
162. Wilcox P., Danford N., Parry J.M.
The genetic activity and metabolism of dinitropyrenes in eucariotic cells.
Progress in Genetic Toxicology. Elsevier North Holland, Amsterdam. (1982)
163. Danford N., Hogan L., Parry J.M.
A modified hypotonic treatment to measure mitotic aneuploidy in a Chinese hamster primary cell line.
Environ. Mutagen., 5 : 948 (1983)
164. Tucker, J.D. and Ong T.
Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes by 2,4,7-trinitro-9-fluorenone.
Mutation Research, 97 : 49 (1982)
165. Abel, G. and Schimmer, O.
Induction of structural chromosomal aberrations and SCEs by aristolochic acid in human lymphocytes in vitro.
Mutation Research. 113 : 329 (1983)
166. Nachtman, J.P. and Wolff S.
Activity of nitro-polynuclear aromatic hydrocarbons in the sister chromatid exchange assay with and without metabolic activation.
Environ. Mutagen., 4 : 1 (1982)
167. Heidemann, A. and Miltenburger H.G.
Investigations on the mutagenic activity of fractions from diesel exhaust particulate matter in mammalian cells in vivo and in vitro.
Mutation Research, 113 : 339 (1983)
168. Neal, S.B. and Probst G.S.
Chemically-induced sister-chromatid exchange in vivo in bone marrow of Chinese hamsters, an evaluation of 24 compounds.
Mutation Research, 113 : 33 (1983)

169. Marshall T.C., Royer R.E., Li A.P., Kusewitt D.F., Brooks A.L.
Acute and genetic toxicity of 1-nitropyrene and its fate after single dose oral doses to rats.
Toxicol. Environ. Health, 10 : 373 (1982)
170. Tu A.S., Sivak A., Mermelstein R.
Evaluation of in vitro transforming ability of nitropyrenes.
Fifth Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) Conference on Toxicology Abstracts: Toxicity of nitroaromatic compounds 8 (1982)
171. Styles, J.A.
Use of BHK21/Cl 13 cells for chemical screening.
Mammalian Cell Transformation by Chemical Carcinogens: 85. Mishara N., et al., Eds. Senate, Princeton Junction, N.J., (1981)
172. Howard P.C., Gerrard J.A., Milo G.E., Fu P.P., Beland F.A., Kadlubar F.F.
Transformation of normal human skin fibroblasts by 1-nitropyrene and 6-nitrobenzo[a]pyrene.
Carcinogenesis, 4 : 353 (1983)
173. Pienta R.J.
Evaluation and relevance of the syrian hamster embryo cell system.
The Predictive Value of Short-Term Screening Tests in Carcinogenicity Evaluation: 149. Williams G.M. et al., Ed. Elsevier/Nort, Holland, Amsterdam. (1980)
174. Morris H.P., Dubnick C.S., Johnson J.M.
Studies of the carcinogenic action in the rat of 2-nitro-, 2-amino-, 2-acetylaminio and 2-diacetylaminiofluorene after injection and after painting.
Natl. Cancer Inst. 10 : 1201 (1950)
175. Miller J.A., Sandin R.B., Miller E.C., Rush H.P.
The carcinogenicity of compounds related to 2-acetylaminiofluorene II. Variations in the bridges and the 2-substituent.
Cancer Res., 15 : 188 (1955)
176. Diechmann W.B., MacDonald W.M., Coplan M.M., Woods F.M., Anderson W.A.D.
Para-nitrobiphenyl, a new bladder carcinogen in the dog.
Ind. Med. Surg., 27 : 634 (1958)

177. Miller E.C., Fletcher T.L., Margreth A., Miller J.A.
The carcinogenicity of derivatives of fluorene and biphenyl: fluoro derivatives as probes for active sites of 2-acetylaminofluorene.
Cancer Res., 22 : 1002 (1962)
178. Conzelman G.M.Jr., Moulton J.E., Flanders I.E.III.
Tumors in the urinary bladder of monkey: induction with 2-nitronaphthalene.
Gann., 61 : 79 (1970)
179. Takemura N., Hashida C., Terasawa M.
Carcinogenicity of 5-nitroacenaphthene.
Br. J. Cancer., 30 : 481 (1974)
180. El-Bayoumy K., Hecht S.S., Hoffmann D.
Comparative tumor initiating activity on mouse skin of 6-nitrobenzo[a]pyrene, 6-nitrochrysene, 3-nitroperylene, 1-nitropyrene and their parent hydrocarbons.
Cancer Lett., 16 : 333 (1982)
181. Hirose M., Lee M.-S., Wang C.Y., King C.M.
Induction of rat mammary gland tumors of 1-nitropyrene, a recently recognized environmental mutagen.
Cancer Res., 44 : 1158 (1984)
182. El-Bayoumy K., Hecht S.S., Sackl T., Stoner G.D.
Tumorigenicity and metabolism of 1-nitropyrene in A/J mice.
Carcinogenesis, 5 : 1449 (1984)
183. Ohgaki H., Negishi C., Wakabayashi K., Kusama K., Sato S., Sugimura T.
Induction of sarcomas in rats by subcutaneous injection of dinitropyrenes.
Carcinogenesis, 5 : 583 (1984)
184. Ohgaki H., Hasegawa H., Kato T., Megishi C., Sato S., Sugimura T.
Absence of carcinogenicity of 1-nitropyrene, correction of previous results, and new demonstration of carcinogenicity of 1,6-dinitropyrene in rats.
Cancer Lett., 25 : 239 (1985)
185. Tokiwa H., Otofujii T., Horikawa K., Kitamori S., Otsuka H., Manabe H., Kinouchi T., Ohnishi Y.
1,6-dinitropyrene: mutagenicity in *Salmonella* and carcinogenicity in BALB/c mice.
J. Natl. Cancer Inst., 73 : 1359 (1984)

186. Ohnishi Y., Kinouchi T., Manabe Y., Tsutsui H., Nishifuji K., Otsuka H., Maeda T., Beland F.A., Morotomi M., Mutai M.
Detection of nitropyrenes in complex mixtures and metabolism of 1-nitropyrene in germfree and conventional rats.
Mutagenesis and Carcinogenesis by 1-nitropyrene and Cancer Chemotherapeutics.
U.S.-Japan Environmental Panel Conference Abstracts. Shimoda, Japan. (1985)
187. Takayama S., Ishikawa T., Nakajima H., Sato S.
Lung carcinoma induction in Syrian golden hamsters by intratracheal instillation of 1,6-dinitropyrene.
Jpn. J. Cancer Res., 76 : 457 (1985)
188. Greisner, R.A. and Cueto C.Jr.
Toward a classification scheme for degrees of experimental evidence for the carcinogenicity of chemicals for animals
Molecular and Cellular Aspects for Carcinogen Screening Tests: 259. Montesano R. et al., IARC Scientific Publication N° 27, Lyon.
189. International Agency for Research on Cancer (IARC)
Some Aromatic Amines and related Nitro Compounds: Hair Dyes, Colouring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals.
IARC Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans Vol. 16. Ed. (IARC), Lyon, France. (1978)
190. Porier, L.A. and Weisburger E.K.
Selection of carcinogens and related compounds tested for mutagenic activity.
J. Natl. Cancer Inst., 62 : 833 (1979)
191. De Serres, F.J. and Matsushima, T.
Mutagenesis and carcinogenesis by nitropyrenes and cancer chemotherapeutics: Meeting report
Mutation Research, 164 : 3 (1986)
192. Wislocki P.G., Bagan E.S., Lu A.Y.H., Dooley K.L., Fu P.P., Han-Hsu H., Beland F.A., Kadalbur F.F.
Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay.
Carcinogenesis, 7 : 1317 (1986)
193. Imaida K., Hirose M., Lee M.-S., Wang C.Y., King C.
Comparative carcinogenicities of 1-, 2- and 4-nitropyrenes (NP) and structurally related compounds for female CD rats following intraperitoneal injection.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 26 : 93 (1985)

194. Wislocki P.G., Bagan E.S., Lu A.Y., Dooley K.L., Fu P.P., Han-Hsu H., Beland F.A., Kadalbur F.F.
Carcinogenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in the newborn mouse liver and lung.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 26 : 92 (1985)
195. Busby W.F.Jr., Garner R.C., Chow F.L., Martin C.N., Stevens E.K., Newbarne P.M., Wogan G.N.
6-nitrochrysene is a potent tumorigen in newborn mice.
Carcinogenesis, 6 : 801 (1984)
196. Trosko J.E., Chang Ch.
Relationship between mutagenesis and carcinogenesis.
Photochem. Photobiol., 28 : 157 (1978)
197. Cortinas C., Ostrosky P., Galvan S
Principios de mutagénesis y su relación con carcionogénesis y teratogénesis.
Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales: 1 Cortinas C., Ostrosky P. Ed. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, México, D.F. (1980)
198. Ramel, C.
The detection and control of mutagenic and carcinogenic compounds in the environment.
AMBIO, 7 : 244 (1978)
199. Bridges, B.A.
Short-term screening tests for carcinogens.
Nature, 261 : 195 (1976)
200. Ames, B.N.
The detection of chemical mutagens with enteric bacteria.
Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection, Vol 1: 267.
Hollaender A., Ed. Plenum Press, New York (1971)
201. Espinosa Aguirre, J.
Método para la evaluación de mutaciones génicas en Salmonella typhimurium.
Manual de Métodos para la Identificación de Mutágenos y Carcinógenos Químicos Ambientales:31. Cortinas C., Ostrosky C. Ed. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, México, D.F. (1980)

202. Ames B.N., Lee F.D., Durston W.E.
An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 70 : 782 (1973)
203. McCann J., Spingar N.E., Kohori J., Ames B.N.
Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 72 : 979 (1975)
204. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D.
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 70 : 228 (1973)
205. Saito K., Yamazoe Y., Kamataki T., Kato R.
Mechanism of activation of proximate mutagens in Ames tester strains: deacetyl-coA dependant enzyme in *S typhimurium* TA98, deficient TA98/1,8DNP6, catalyzes DNA binding as the cause of mutagenicity.
Biochem. Biophys. Res. Comun. 116 : 141 (1983)
206. Saito K., Shinohara A., Kamataki T., Kato R.
Metabolic activation of mutagenic N-hydroxylamines by O-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98.
Arch. Biochem. Biophys., 239 : 286 (1985)
207. Watanabe M., Ishidate M.Jr., Nohmi T.
A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100.
Mutation Research, 216 : 211 (1989)
208. Watanabe M., Ishidate M.Jr., Nohmi T.
Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: New derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels.
Mutation Research, 234 : 337 (1990)
209. Watanabe M., Nohmi T., Ishidate M.Jr.
New tester strains of *Salmonella typhimurium* highly sensitive to mutagenic nitroarenes.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 147 : 974 (1987)

210. Walker, G.C.
Mutagenesis-enhancement by plasmids in mutagenesis tester strains.
Basic and Applied Mutagenesis: with Special References to Agricultural Chemicals in Developing Countries : 11. Mohamed A.E., Von Borstell R.C., Eds. Plenum Press, New York. (1985) [Basic Life Sciences Vol.34]
211. Scribner J.D., Fisk S.R., Scribner N.K.
Mechanisms of action of carcinogenic aromatic amines: an investigation using mutagenesis in bacteria.
Chem.-Biol. Interac., 26 : 11 (1979)
212. Krishna G., Nath J., Ong T., Whong W.-Z.
A simple method for the extraction of mutagens from airborne particles.
Environ. Monit. Assess., 5 : 398 (1985)
213. Fishbein, L.
Atmospheric mutagens.
Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection Vol.4: 219.
Hollaender A., Ed. Plenum Press, New York, 1976
214. Shubick, P. and Hartwell, J.
Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity.
Suppl. 2, Public Health Service Publication 149-2, Washington D.C.: U.S Govt. Printing Office (1969)
215. Hughes T.J., Pellizzari E., Little L., Sparacino C., Kolber A.
Ambient Air Pollutants: Collection, chemical characterization and mutagenicity testing.
Mutation Research, 76 : 51 (1986)
216. Wang Y.Y., Rappaport s.M., Sawyer R.F., Talcott R.E., Wei E.T.
Direct-acting mutagens in automobile exhaust.
Cancer Lett., 5 : 39 (1978)
217. Mercer, T.T.
Properties of aerosols.
Aerosols Technology in Hazard Evaluation: 21. Academic Press, New York (1973)
218. Yeh H.C., Phalen R.F., Raabe O.G.
Factors influencing the deposition of inhaled particles.
Environ. Health Perspect., 15 : 147 (1976)

219. Chrisp, C.E. and Fisher, G.L.
Mutagenicity of airborne particles.
Mutation Research, 76 : 143 (1980)
220. Leiter J., Shimkin M.B., Shear M.J.
Production of subcutaneous sarcomas in mice with tars extracted from atmospheric dusts.
J. Natl. Cancer Inst., 3 : 155 (1942)
221. Schiesinger, R. and Lippmann M.
Selective particle deposition and bronchogenic carcinoma.
Environ. Res., 15 : 424 (1978)
222. Hueper W.C., Kotin P., Tabor E.C., Payne W.W., Falk H., Sawicki E.
Carcinogenic bioassay on air pollutants.
Arch. Pathol., 74 : 89 (1962)
223. Tokiwa H., Kitamori S., Takahashi K., Ohnishi Y.
Mutagenic and chemical assay of extracts of airborne particulates.
Mutation Research, 77 : 99 (1980)
224. Tokiwa H., Morita K., Takeyoshi H., Takahashi K., Ohnishi Y.
Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants.
Mutation Research, 48 : 237 (1977)
225. Daisey, J.M. and Leyko M.A.
Thin-layer gas chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in airborne particulate matter.
Anal. Chem., 51 : 24 (1979)
226. Moiler, M. and Alfheim, I.
Mutagenicity and PAH-analysis of airborne particulate matter.
Atmos. Environ., 14 : 93 (1980)
227. Siak J., Chan T.L., Gibson T.L., Wolff G.T.
Contribution to bacterial mutagenicity from nitro-PAH compounds in ambient aerosols.
Atmos. Environ., 19 : 369 (1985)

228. Hsie A.W., Couch D.B., San Sebastian J.R., Sun W.N.C., Riddle J.C., Brimer P.A., Machanoff R., Forbes N.L., Kenney F.T., Hsie M.H.
Mutagenicity of carcinogens as determined in a quantitative mammalian cell mutation system CHO/HGPRT : Study of 80 agents.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 19 : 93 (1978)
229. Purchase L.F.II., Longstaff E., Ashby J., Styles J.A., Anderson D., Lefevre P.A., Westwood F.R.
Evaluation of six short-term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use.
Nature (London), 264 : 624 (1976)
230. Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian microsome mutagenicity test.
Mutation Research, 31 : 347 (1975)
231. Commoner B.J., Henry J., Gold J., Reding M., Vithayathil A.
Reliability of bacterial mutagenesis techniques to distinguish carcinogenic chemicals.
Environmental Protection Agency (EPA) Publication 600/1-76-022: 1 (1976)
232. Sugimura T., Sato S., Nagao M., Yohghi T., Matsushima T., Serino Y., Takeuchi M., Kawachi T.
Overlapping of carcinogens and mutagens.
Fundamentals in Cancer Prevention: 191. Magee P.N., Ed. University Park Press, Baltimore. (1976)
233. Alfheim I., Löfroth G., Moller M.
Bioassays of extracts of ambient particulate matter.
Environ. Health Perspect., 47 : 227 (1983)
234. Daisey J.M., Kneip T.J., Hawryluk I., Mukai F.
Seasonal variations in the bacterial mutagenicity of airborne particulate organic matter in New York City.
Environ. Sci. Technol., 14 : 1487 (1980)
235. Goto S., Kato Y., Orii A., Tamaka K., Hisamatsu Y., Matsushita H.
Daily variation of mutagenicity of airborne particulates.
J. Jpn. Soc. Air Pollut., 17 : 295 (1982)

236. Huisingsh J., Bradow R., Jungers R., Claxton L., Zweidinger R., Tejada S., Baumgardner J., Duffield F., Waters M., Simmon V.F.
Application of bioassay to the characterization of diesel emissions.
Application of Short-Term Bioassays to the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures II. Waters M.D. et al., Ed. Plenum Press, New York (1979)
237. Lewis C.W., Baumgardner R.E., Claxton L.D., Lewtas J., Stevens R.K.
The contribution of woodsmoke and motor vehicle emissions to ambient aerosol mutagenicity.
Environ. Sci. Technol., 22 : 968 (1988)
238. Moller M., Alfheim I.
Mutagenicity of air samples from various combustion sources.
Mutation Research, 116 : 35 (1983)
239. Mumford J.L., Lewtas, L.
Mutagenicity and citotoxicity of coal fly ash and from fluidized-bed and conventional combustion.
J. Toxicol. Environ. Health, 10 : 565 (1982)
240. Ohnishi Y., Kachi K., Sato K., Tahara I., Takeyoshi H., Tokiwa H. Z
Detection of mutagenic activity in automobile exhaust.
Mutation Research, 77 : 229 (1980)
241. Alfheim I., Moller M.
Mutagenicity of airborne particulate matter in relation to traffic and meteorological conditions.
Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures II. Waters M.D., et al. Ed. Plenum Press. New York, (1981)
242. Claxton L.D., Kleindienst T.E., Perry E., Cupitt L.T.
Assesment of the mutagenicity of volatile organic pollutants before and after atmospheric transformation.
Genetic Toxicology of Complex Environmental Mixtures. Waters M.D. et al., Eds. Plenum Press New York (1990)
243. Van Houdt J.J., Alink G.M., Boleij J.S.M.
Mutagenicity of airborne particles related meteorological and air pollution parameters.
Sci. Total Environ., 61 : 23 (1987)

244. Alink G.M., Smit H.A., van Houdt J.J., Kolkman J.R., Boleij J.S.M.
Mutagenic activity of airborne particulates at nonindustrial locations.
Mutation research, 116 : 21 (1983)
245. Barale R., Migliore L., Cellini B., Francionini L., Giogelli F., Barai I., Lopireno N.
Genetic toxicology of airborne particulate matter using cytogenetic assays and microbial mutagenicity assays.
Genetic Toxicology of Complex Environmental Mixtures. Waters M.D. et al., Eds.
Plenum Press, New York, (1990)
246. de Raat W.K., de Meijere F.A., Kooijman S.A.L.M.
Mutagenicity of ambient aerosol collected in an urban and industrial area of Netherlands.
Sci. Total Environ., 44 : 17 (1985)
247. Mumford J.L., He X.Z., Chapman R.S., Cao S.R., Harris d.8., Li X.D., Xian Y.L., Jiang W.Z., Xu C.W., Chaun J.C., Wilson W.E.
Lung cancer and indoor pollution in Xuan Wei, China.
Science, 235 : 217 (1987)
248. Walker R.D., Connor T.H., Mac Donald E.J., Trieff N.M., Legator M.S., Mac Kenzie K.W., Dobbins J.G.
Correlation of mutagenic assessment of Houston air particulate extracts in relation to lung cancer mortality rates.
Environ. Res., 28 : 303 (1982)
249. Ames, B.N.
Identifying environmental chemicals causing mutation and cancer.
Science, 204 : 587 (1979)
250. Houk V.F., Goto S., Endo O., Claxton L.D., Lewtas J., Matsushita H.
Detection of direct-acting mutagens in ambient air: a comparison of two highly sensitive mutagenicity assays.
Environ. Mol. Mutagen., 20 : 19 (1992)