



# Ensayo de mutación inversa bacteriana

<b>Apellidos, nombre</b>	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de Alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

La prueba de mutación inversa bacteriana o *test de Ames* es el método más utilizado para evaluar el potencial mutagénico de todo tipo de sustancias químicas. Se trata de un ensayo *in vitro* rápido, barato y fácil de realizar, basado en la capacidad que presentan diferentes cepas bacterianas para revertir mutaciones en presencia de agentes mutágenos. En concreto, en este ensayo se utilizan cepas de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* que contienen mutaciones en varios genes del operón de la histidina (*his*-) y del triptófano (*trp*-), respectivamente. Estas mutaciones impiden que las bacterias puedan sintetizar estos aminoácidos esenciales y que puedan crecer si estos no se encuentran presentes en el medio de cultivo. Solo aquellas bacterias que sufran una mutación puntual que les permita restaurar la capacidad de sintetizar estos aminoácidos, podrán formar colonias en medios con bajas concentraciones de histidina (*S. typhimurium*) o triptófano (*E. coli*) y ser contadas. La cantidad de colonias observadas en las placas de cultivo será proporcional al potencial mutagénico de la sustancia en estudio.

## 2 Objetivos

El objetivo de este artículo es que el estudiante sea capaz de:

- Preparar el material necesario para llevar a cabo la determinación del potencial mutagénico de un compuesto mediante el ensayo de mutación inversa bacteriana.
- Realizar la determinación del potencial mutagénico de un compuesto empleando el ensayo de mutación inversa bacteriana mediante el método de preincubación.
- Calcular el potencial de mutagenicidad de una sustancia química.

## 3 Introducción

La **mutagenicidad** se define como la capacidad de un agente biológico, químico o físico para inducir cambios heredables, relativamente estables, en el material genético de una célula (Repetto-Jiménez y Sanz, 1995). Estos cambios pueden ser debidos a una transformación química de un gen individual que altera su función (mutación génica o puntual), o al reordenamiento, ganancia o pérdida de un cromosoma o parte de él (mutación cromosómica).

Las mutaciones génicas son la causa de muchas enfermedades genéticas en el ser humano, y su aparición en oncogenes y genes supresores de tumores de células somáticas, se ha relacionado con la formación de tumores y el desarrollo de cáncer (Erickson, 2010; Tate et al., 2019). Además, este tipo de mutaciones pueden dañar la línea germinal, lo que puede ocasionar problemas de fertilidad y enfermedades en la descendencia (Tejs, 2008). La exposición a una gran variedad de sustancias químicas por inhalación, ingestión o absorción a través de la piel incrementa la frecuencia de aparición de mutaciones, aumentando la probabilidad de padecer este tipo de enfermedades. Es por ello, que la evaluación mutagénica, como parte de la evaluación de la



genotoxicidad, es uno de los requisitos fundamentales en la caracterización toxicológica de las sustancias químicas (CE, 2008).

A diferencia de las mutaciones cromosómicas, que se pueden detectar con la ayuda de un microscopio óptico, el análisis de la capacidad de las sustancias para producir mutaciones génicas se lleva a cabo mediante diferentes métodos *in vitro* e *in vivo*.

Este ensayo está basado en la capacidad que presentan para responder a los agentes mutágenos, diferentes cepas de las bacterias *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* que contienen mutaciones en varios genes en el operón de la histidina (*his-*) y el triptófano (*trp-*), respectivamente. Estas mutaciones impiden que las bacterias sintetizen estos aminoácidos esenciales y, por tanto, que puedan crecer y formar colonias en su ausencia. Nuevas mutaciones sobre las mutaciones preexistentes pueden restaurar la función de estos genes, lo que les permitirá formar colonias sin una fuente externa de estos aminoácidos. De este modo, las colonias revertidas se identifican como aquellas que crecen en presencia de niveles bajos de histidina, en el caso de *S. typhimurium*, y de triptófano, en el caso de *E. coli*. La cantidad de colonias observadas en las placas de cultivo será proporcional al potencial mutagénico de la sustancia en estudio.

Diferentes compuestos, como las aminas aromáticas o los hidrocarburos aromáticos policíclicos, solo presentan capacidad mutagénica al ser metabolizados a su forma activa. En mamíferos y otros vertebrados, el sistema de citocromos P450 es un sistema de oxidación metabólica que está presente principalmente en el hígado y en menor medida en los pulmones y los riñones, y que es capaz de metabolizar un gran número de sustancias químicas (Tejs, 2008). Debido a que las bacterias son incapaces de metabolizar los compuestos, el ensayo de mutación inversa bacteriana se lleva a cabo poniendo en contacto las cepas bacterianas *his-* o *trp-* con diferentes concentraciones de la sustancia química de estudio, en presencia y ausencia de un extracto de hígado de mamífero que contiene enzimas del citocromo P450 (fracción S9). La inclusión de este activador metabólico permite simular el metabolismo de los xenobióticos en el organismo humano y detectar compuestos que solo son mutagénicos tras ser metabolizados en el hígado.

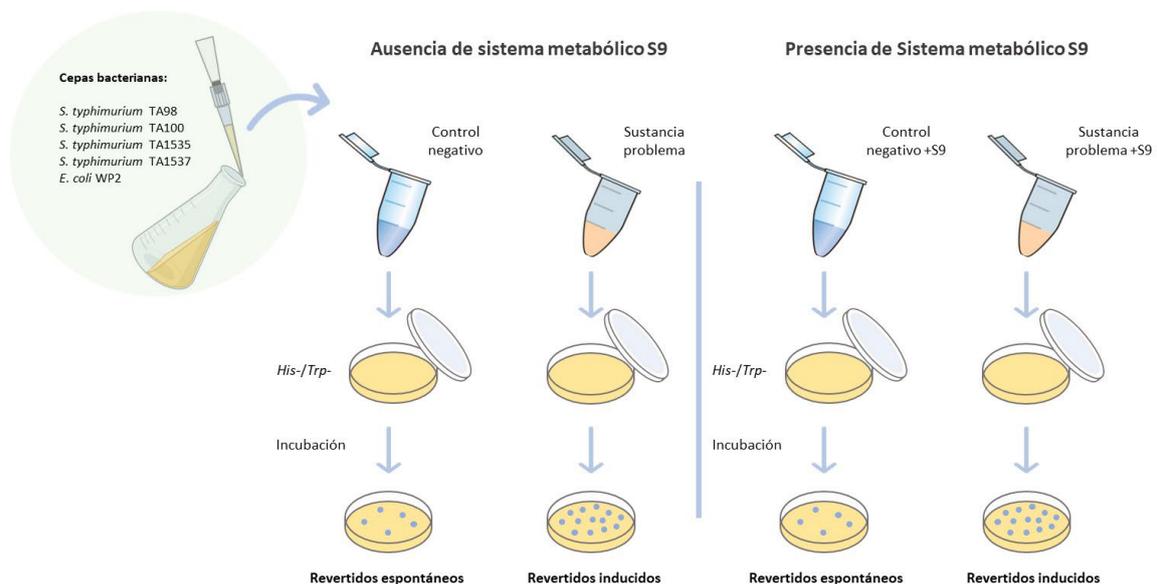
Se han descrito diferentes procedimientos para realizar el ensayo de mutación inversa bacteriana. Entre ellos, destaca el método de preincubación debido a su elevada sensibilidad en experimentos con y sin activación metabólica. En este método la suspensión bacteriana se incuba junto con la sustancia problema y el tampón o el sistema de activación metabólico (fracción S9). De esta manera se favorece la interacción entre los metabolitos, las células bacterianas y el extracto enzimático, lo que permite una detección más eficiente de los compuestos mutagénicos.

## 4 Desarrollo

En primer lugar, detallaremos la preparación de las diferentes cepas bacterianas y de los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo de mutación inversa bacteriana. A continuación, describiremos el procedimiento experimental utilizado para llevar a cabo el análisis del potencial mutagénico de un compuesto mediante este ensayo. Por último, veremos un ejemplo práctico del cálculo del potencial de mutagenicidad de una sustancia química como es el caso de la azida sódica.

## 4.1 Fundamento

En el ensayo de mutación inversa bacteriana mediante el método de preincubación, las suspensiones de células bacterianas se exponen a la sustancia problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica exógeno (S9) durante un corto periodo de tiempo (20 min). A continuación, se añade agar que contiene trazas de histidina y/o triptófano, y la mezcla se siembra sobre la superficie de placas de agar de medio mínimo. Transcurridas de 48 a 72 h de incubación, se cuentan las colonias revertidas en las placas del potencial mutágeno y se comparan con el número de colonias revertidas espontáneas en las placas de control de disolvente (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama del ensayo de mutación inversa bacteriano mediante el método de preincubación.

## 4.2 Materiales y reactivos

### Material e instrumentación:

- Cabina de seguridad biológica clase II
- Autoclave
- Baño termostatado o placa calefactora
- Estufa de incubación (37 °C)
- pHmetro
- Balanza analítica
- Agitador Vórtex
- Micropipetas
- Tubos de ensayo de vidrio



- Microtubos de centrifuga tipo Eppendorf de 1,5 y 5 mL

#### **Reactivos:**

- Caldo nutritivo
- Agar bacteriológico
- NaCl
- $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- MgCl
- KCl
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- L-Histidina
- D-Biotina
- L-Triptófano
- D-glucosa-6-fosfato
- NADP
- D-(+)-Glucosa
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Ácido cítrico monohidrato ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 2-Aminoantraceno
- 2-Nitrofluoreno
- Azida sódica
- 2-Aminoacridina
- Mitomicina C
- DMSO
- $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril

#### **Cepas bacterianas:**

Se deben utilizar al menos cinco cepas de bacterias. Estas deben incluir cuatro cepas de *S. typhimurium* (TA1535; TA1537, TA97a o TA97; TA98 y TA100) que contienen pares de bases GC en el sitio de reversión primaria, y una cepa de *E. coli* WP2 o *S. typhimurium* TA102, que presentan un par de bases AT en el sitio de reversión primaria y permiten detectar mutágenos oxidantes, agentes de reticulación e hidrazinas (OCED, 2020). Por lo tanto, la combinación recomendada de cepas es:

1. *S. typhimurium* TA1535
2. *S. typhimurium* TA1537 o TA97
3. *S. typhimurium* TA98
4. *S. typhimurium* TA100
5. *E. coli* WP2 *uvrA*, *E. coli* WP2 *uvrA* ( $\rho\text{KM101}$ ) o *S. typhimurium* TA102

### **4.3 Preparación de material y reactivos**

#### *Preparación de los inóculos*

Antes del ensayo, se inocula una sola colonia fresca de las cepas de *S. typhimurium* o *E. coli* en matraces Erlenmeyer con caldo nutritivo. Los matraces se incuban a 37 °C, en agitación (120 rpm) durante 10-12 h para garantizar una aireación suficiente para obtener  $1 \times 10^8$ - $1 \times 10^9$  UFC.

#### *Preparación de medios y reactivos*

- *Disolución de glucosa (40%) estéril.*
- *Medio Vogel-Bonner E (VB 50X) estéril:* 1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10%  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 17,5%  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .
- *Placas de agar de Medio Mínimo Glucosa:* preparar el agar estéril (7,5 g agar y 465 mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Añadir al agar caliente gradualmente y en agitación 10 mL de sales VB 50X estériles. A continuación, agregar 25 mL de disolución de glucosa estéril y agitar durante 1 min. Se realizan las placas empleando este agar.



- *Disolución de Histidina/Biotina/Triptófano 0,5 mM estéril* (12,36 mg D-Biotina, 9,6 mg L-Histidina y 10,25 mg L-triptófano en 100 mL H<sub>2</sub>O destilada).
- *Top agar: preparar el agar estéril* (1,35 g agar, 0,45 g NaCl y 90 mL H<sub>2</sub>O destilada). Añadir al agar caliente 10 mL de una disolución estéril de 0,5 mM histidina/biotina/triptófano. El día del ensayo fundir el agar en un baño o microondas y añadir la disolución de aminoácidos antes de distribuir. Mantener el agar a 45 °C durante el ensayo.
- *Disolución tampón fosfato salino (0,2 M, pH 7.4) estéril.*
- *Disolución KCl 1,65 M estéril.*
- *Disolución de MgCl<sub>2</sub> 0,4 M estéril.*
- *Disolución de NADP (Nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato) 1 M.*
- *Disolución glucosa 6-fosfato 1 M.*
- *MIX S9 10% (enzimas microsomales de hígado de rata + cofactores):* 15,75 mL H<sub>2</sub>O destilada estéril, 25 mL tampón fosfato 0,2M, 2mL NADP 1M, 0,25 mL glucosa 6-fosfato 1M, 1 mL MgCl<sub>2</sub> 0,4M, 1 mL KCl 1,65 M y 5 mL Fracción S9. Adicionar los reactivos en el orden dado. Preparar en el momento y mantener en hielo. Los restos de S9 o de mix S9 deben desecharse.

#### Preparación de controles

##### Controles positivos

Cepa	Control sin S9		Control con S9	
	Compuesto	C (µg/p)	Compuesto	C (µg/p)
<i>S. typhimurium</i> TA98	2-Nitrofluoreno	1	2-Aminoantraceno	2,5
<i>S. typhimurium</i> TA100	Azida de sodio	1	2-Aminoantraceno	2,5
<i>S. typhimurium</i> TA1535	Azida de sodio	1	2-Aminoantraceno	2,5
<i>S. typhimurium</i> TA1537	2-Aminoacridina	50	2-Aminoantraceno	2,5
<i>E. Coli</i> WP2	Mitomicina-C	1	2-Aminoantraceno	20

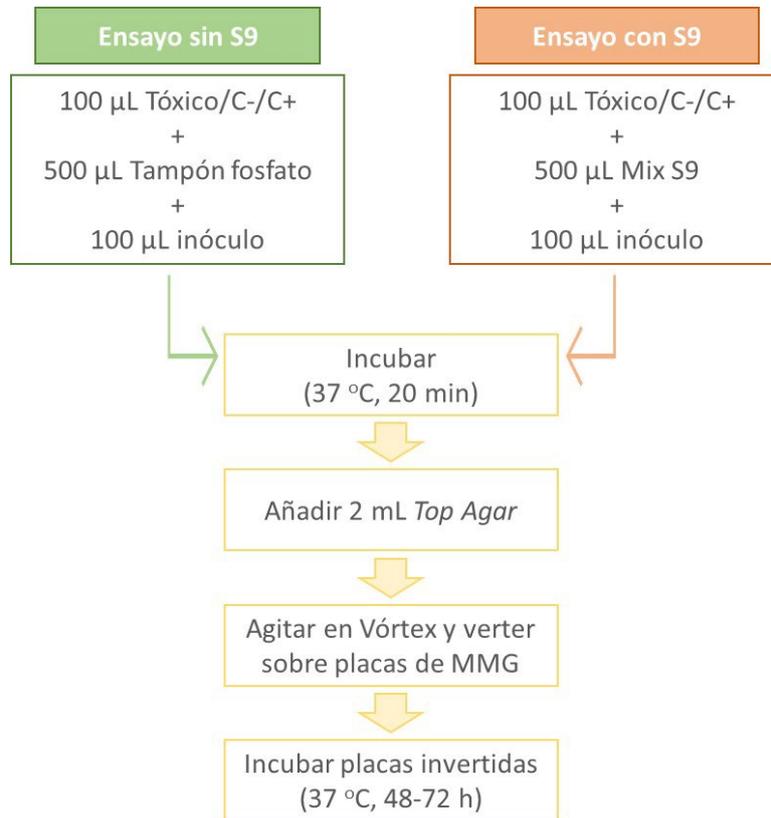
\*Para la preparación de los controles, disolver a cantidad necesaria de cada compuesto en DMSO, tomar una alícuota para preparar 1 mL de la disolución control en tampón fosfato.

**Control negativo:** 1% DMSO en tampón fosfato

## 4.4 Procedimiento experimental

1. Mezclar en un tubo de ensayo 100 µL del compuesto tóxico o control, con 500 µL de tampón fosfato o de S9 Mix, y 100 µL del inóculo bacteriano.
2. Incubar las muestras a 37 °C durante 20 min.
3. Añadir 2 mL de *Top agar* a los tubos, agitar en un agitador Vórtex y verter el contenido sobre placas de agar de *Medio Mínimo Glucosa* (MMG).

4. Incubar las placas a 37 °C durante 48-72 h.
5. Realizar el recuento de colonias y expresar los resultados como número de colonias revertidas por placa.



**Figura 2.** Procedimiento experimental del ensayo de mutación inversa bacteriana mediante el método de preincubación en ausencia y presencia del sistema de activación metabólico S9.

#### 4.5 Cálculos y expresión de los resultados

El índice de mutagenicidad (IM) se calcula a partir del número de colonias revertidas por placa en la sustancia problema frente a un control negativo, utilizando la siguiente fórmula descrita por Maron y Ames (1983):

$$\text{Índice de mutagenicidad} = \frac{\text{Colonias revertidas espontáneas + inducidas}}{\text{Colonias revertidas espontáneas (control negativo)}}$$

En función del índice de mutagenicidad obtenido en este ensayo, las sustancias químicas pueden clasificarse en 5 categorías (Tabla 1).



**Tabla 1.** Clasificación del efecto mutagénico de las sustancias

Índice de mutagenicidad	Clasificación
IM < 2,5	No mutagénico
IM = 2,6-3,5	Mutagénico muy débil
IM = 3,6-5,5	Mutagénico débil
IM = 5,6-10,5	Mutagénico
IM > 10,5	Mutagénico alto

#### 4.6 Caso práctico

Vamos a ver como ejemplo el potencial mutagénico de la azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) sobre la cepa de *S. typhimurium* TA1535. Este compuesto se utiliza como control positivo en el ensayo en ausencia del sistema de activación metabólico S9.

Para la realización del ensayo se ponen en contacto 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana, con 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de  $\text{NaN}_3$  en tampón fosfato (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para conseguir una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{placa}$ , o con 100  $\mu\text{L}$  del tampón como control negativo. El análisis de la muestra y de los controles se realiza por triplicado. El número de colonias en cada réplica para  $\text{NaN}_3$  y el control negativo se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Número de colonias por placa del control negativo y de la disolución de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ , 1 $\mu\text{g}/\text{placa}$ ). Valores promedio (M) y desviación estándar (SD).

Número de colonias	
Control negativo	$\text{NaN}_3$ (1 $\mu\text{g}/\text{placa}$ )
32	746
35	780
34	754
<b>M = 34</b>	<b>M = 760</b>
<b>SD = 1,2</b>	<b>SD = 1,2</b>

De acuerdo a los resultados obtenidos, el índice de mutagenicidad (IM) de la azida sódica es:

$$\text{IM} = \frac{760}{34} = 22,4$$



Por tanto, la azida sódica es clasificada como una sustancia altamente mutagénica.

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto cómo llevar a cabo la evaluación del potencial mutagénico de una sustancia química mediante el ensayo de mutación inversa bacteriana. Para ello, en primer lugar, hemos detallado la preparación de los reactivos y de las diferentes cepas bacterianas. A continuación, hemos descrito el procedimiento experimental utilizado para llevar a cabo el análisis del potencial mutagénico de un compuesto mediante el método de preincubación. Finalmente, y con ayuda de un ejemplo, hemos calculado el potencial de mutagenicidad de una sustancia química como es la azida de sodio.

## 6 Bibliografía

- Erickson, R.P., 2010. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705, 96–106. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2010.04.002>
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113, 173–215. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- OCED, 2020. Test Guideline No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test Section 4 Health effects OECD/OCDE 471 OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS Bacterial Reverse Mutation Test.
- Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión, de 30 de mayo de 2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH).
- Repetto-Jiménez, M., Sanz, P., 1995. Glosarios de términos toxicológicos IUPAC (Duffus y cols. 1993). Asociación Española de Toxicología, consultado: <https://www.aetox.es/glosario-toxicologico>.
- Tate, J.G., Bamford, S., Jubb, H.C., Sondka, Z., Beare, D.M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C.G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S.C., Kok, C.Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C.C., Rye, C.E., Speedy, H.E., Stefancsik, R., Thompson, S.L., Wang, S., Ward, S., Campbell, P.J., Forbes, S.A., 2019. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47, D941–D947. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1015>
- Tejs, S., 2008. The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology* Vol. 4, No, 7–14.