

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD INDUCIDA POR CONCENTRADOS
ORGANICOS DERIVADOS DE AGUAS DE CONSUMO PUBLICO POR MEDIO
DEL TEST DE AMES

ROMANA ALBALADEJO VICENTE

MADRID, 1993



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Medicina Preventiva y Salud Pública

MANUEL DOMINGUEZ CARMONA, Catedrático Emérito de Medicina Preventiva y Salud Pública del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública e Historia de la Ciencia, y **MARGARITA ROMERO MARTIN**, Profesora Titular del mismo Departamento.

HACE CONSTAR

Que D^a Romana Albaladejo Vicente ha realizado su tesis doctoral titulada:
**EVALUACION DE LA MUTAGENICIDAD INDUCIDA POR
CONCENTRADOS ORGANICOS DERIVADOS DE AGUAS DE CONSUMO
PUBLICO POR MEDIO DEL TEST DE AMES**, bajo nuestra dirección.

Y para que así conste lo firmo en Madrid a 5 de Octubre de 1993

Fdo.: M. Dominguez Carmona

Fdo.: M. Romero Martín

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

La memoria Académica que lleva por título "Evaluación de la mutagenicidad inducida por concentrados orgánicos derivados de aguas de consumo público por medio del Test de Ames" presentada por Dña. ROMANA ALBALADEJO VICENTE para la obtención del Título Académico de Doctor en Medicina y Cirugía, ha sido realizada en el Dpto. de MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PUBLICA E HISTORIA DE LA CIENCIA, bajo nuestra dirección.

El mencionado trabajo cumple los requisitos del método científico y sus contenidos son adecuados a los objetivos planteados.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.:

El Director de la Tesis

Fdo.: M. Domínguez Carmona

Fdo.: M. Romero Martín
(fecha y firma)

D.N.I.:

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Reunida la Comisión de Doctorado del Departamento de MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PUBLICA E HISTORIA DE LA CIENCIA, y una vez analizados los contenidos y metodología del trabajo de investigación que para optar al Grado de Doctor ha realizado D^a ROMANA ALBALADEJO VICENTE, informa favorablemente la presente "admisión a trámite"

Fecha reunión
Consejo Departamento

28 de Septiembre de 1993

El Director del Departamento

Fdo.: Dr. GRACIA GUILLEN
(fecha y firma)

INDICE

A.	INTRODUCCION.....	1
I.	EL PROBLEMA DEL CANCER.....	2
II.	MUTAGENESIS Y CARCINOGENESIS.....	4
	2.1. MUTACIONES ESPONTANEAS.....	4
	2.2. MUTACIONES INDUCIDAS.....	6
	2.3. MECANISMOS DE CARCINOGENESIS.....	7
III.	CARCINOGENESIS AMBIENTAL.....	12
	3.1. PREVENCIÓN DE LA CARCINOGENESIS AMBIENTAL.	13
IV.	TEST BACTERIANOS.....	18
	4.1. TEST DE AMES.....	20
V.	ESTRATEGIAS PARA LA EVALUACION DEL RIESGO CANCERIGENO DE LOS PRODUCTOS QUIMICOS.....	26
VI.	EL PROBLEMA DE LA CLORACION DE AGUAS DE CONSUMO PUBLICO.....	28
	6.1. Generalidades del suministro de agua potable.....	28
	6.2. Consideraciones Históricas.....	31
	6.3. El concepto de barrera múltiple.....	32
	6.4. El problema de los derivados clorados.....	33
	6.5. Estudios epidemiológicos.....	41
B.	OBJETIVOS.....	47
C.	MATERIAL Y METODOS.....	49
I.	MATERIAL BIOLOGICO.....	50
	1.1. Cepas de ensayo.....	51
	1.2. Fracción microsomal.....	54
II.	METODOS.....	55
	2.1. Obtención y conservación de las cepas.....	55
	2.2. Verificación de las características genotípicas de las cepas.....	56
	2.3. Obtención del cultivo en fase estacionaria	60
	2.4. Ensayo de mutagenicidad.....	61
III.	MATERIAL DE LABORATORIO.....	66
	3.1. Reactivos y soluciones.....	66
	3.2. Medios.....	68
	3.3. Material e instrumentos de laboratorio....	69

IV.	MUESTRAS DE AGUA.....	71
4.1.	Preensayo.....	71
4.2.	Preparación de las muestras.....	74
V.	CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO.....	77
5.1.	Método basado en el cálculo del índice de mutación.....	77
5.2.	Método estadístico basado en el análisis de la varianza.....	77
D.	RESULTADOS.....	79
I.	RESULTADOS DEL PREENSAYO.....	80
II.	RESULTADOS DEL ENSAYO.....	82
E.	DISCUSION.....	131
I.	EVALUACION MUTAGENICA.....	132
II.	TECNICAS DE MUTAGENESIS.....	135
III.	METODOS DEL ENSAYO.....	139
IV.	REPRODUCIBILIDAD DE LOS ENSAYOS.....	141
V.	CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO.....	145
VI.	FORMACION DE MUTAGENOS EN AGUAS CLORADAS.....	148
VII.	ANALISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	153
F.	CONCLUSIONES.....	157
G.	BIBLIOGRAFIA.....	159

INTRODUCCION

I. EL PROBLEMA DEL CANCER

Durante los últimos años, el mundo occidental ha ido controlando prácticamente las enfermedades infecciosas como causa de mortalidad significativa.

La mayoría de las muertes, en nuestro medio, ocurren ahora en la vejez y pueden atribuirse a enfermedades que son propias de la edad avanzada, crónicas o de larga duración (Cairns, 1986).

En éste contexto, el cáncer se ha convertido en la entidad más importante, siendo responsable de alrededor del 20% de la mortalidad absoluta en los países desarrollados (Axtell y col., 1972).

Dejando a un lado la importancia cuantitativa de la enfermedad, no debemos perder de vista sus connotaciones psico-sociales; de todos es sabido que la gente se comporta de muy distinta manera ante un cáncer que ante otra entidad independientemente de la gravedad de ésta última.

Incluso entre gentes cultivadas, se considera al cáncer como una enfermedad imprevisible, que ataca indiscriminadamente a ricos y pobres, obesos y delgados, ancianos y hombres en la plenitud de su vida como si no guardase relación con causa externa alguna.

A pesar de este concepto tan extendido, actualmente conocemos que la mayoría de las neoplasias se deben a factores ambientales y, como quiera que en gran manera podemos modificar el ambiente, éstos cánceres pueden ser en gran parte potencialmente evitables (Murray y Axtell, 1974).

Se han propuesto varios modelos de carcinogénesis (Axtell, 1972). Según uno de los más aceptados, la célula dispone de varios genes cada uno de los cuales le impide el desarrollo de un determinado tipo de tumor, y no dará origen a ninguno de ellos hasta que cada gen no quede inactivado por una mutación.

La probabilidad de que la célula presente mutaciones en los "n" genes protectores, se eleva a la enésima potencia con la edad. Así podríamos afirmar que el logaritmo de la incidencia de cáncer debe guardar una relación lineal con el logaritmo de la edad. La teoría suele ir en perfecto acuerdo con la distribución observada en las gráficas estadísticas de la incidencia del cáncer por edades (Peto, 1985).

Suponiendo que el modelo sea correcto, puede calcularse, a partir de la pendiente de la relación logarítmica lineal, el número de mutaciones necesarias para dar origen a un cáncer. En un cáncer típico como es el de intestino grueso, el número adecuado de mutaciones parece ser de aproximadamente cinco (Cairns, 1986).

Se considera pues a cada tipo de cáncer, cómo el resultado final de la acción de distintas mutaciones que pueden haber ocurrido en cualquier momento en la vida del paciente. Por lo tanto, el período de incubación de cualquier tipo de cáncer se remonta al momento en que tuvo lugar la primera mutación, de modo que cubre a menudo gran parte de la vida del paciente.

Muchos estudios en poblaciones nómadas muestran que la incidencia de muchos tipos de cánceres comunes, se debe parcialmente al ambiente en el que discurre la juventud de éstos sujetos (Peto, 1985).

De forma parecida, los tumores profesionales inducidos por la exposición a ciertos productos químicos industriales, pueden tardar en aparecer hasta diez o veinte años después de que el individuo hubiese abandonado el trabajo, y por tanto la exposición al agente nocivo.

De todo ello se deduce que cuando indagamos las causas de un tipo particular de cáncer, no debemos polarizar exclusivamente la atención en el pasado reciente del paciente. A la inversa, si una población se expone, sin conciencia de ello, a un agente cancerígeno, pueden transcurrir muchos años antes de que afloren las primeras manifestaciones de la enfermedad y puede ser entonces demasiado tarde para hacer frente a la ola de tumores que se avecina.

El conocimiento de la relación entre la edad y la tasa de muertes por cáncer no precisa las causas que lo determinan, informando sólo de que los pasos que a él conducen probablemente se han ido acumulando durante muchos años (Peto, 1985).

La principal cuestión que se plantea, es saber si las causas o factores más importantes son ambientales, y por lo tanto potencialmente evitables. Habría que conocer también, si las mutaciones que jalonan la formación de una célula cancerosa vienen inducidas por mutágenos externos, ambientales o bien se deben a un error espontáneo en la replicación del ADN.

Para ahondar en esta cuestión, resulta útil observar el influjo de las migraciones de una comunidad de un país a otro en la incidencia del cáncer. Cuando un japonés emigra a Estados Unidos las diferencias en la incidencia de cáncer de estómago (mucho más frecuente en el Japón) se pierde en una o dos generaciones (Murray y Axtell, 1974). Dado que los japoneses tienden a casarse dentro del propio grupo, el cambio en la incidencia del cáncer de estómago debe atribuirse a factores ambientales más que a factores genéticos.

Más aun, dado que la frecuencia de los distintos tipos de cáncer tarda más de una generación en alcanzar los niveles típicos de Estados Unidos, algunos agentes causales serán factores dietéticos que tienden a persistir como parte de una herencia cultural y no los contaminantes atmosféricos que tienden a ser idénticos para toda la población que convive en un determinado lugar (Axtell, 1972).

Por supuesto, al demostrar la influencia del ambiente de ninguna forma excluimos la contribución de los factores genéticos que siempre deben tenerse presentes en el origen del cáncer.

II. MUTAGENESIS Y CARCINOGENESIS

2.1. MUTACIONES ESPONTANEAS

La mutagénesis es la parte de la Genética que estudia las mutaciones en relación con su génesis, transmisión y detección. Consecuentemente, los mutágenos son los agentes físicos o químicos capaces de inducir, directa o indirectamente, mutaciones (Velazquez, 1987).

Considerando el gen como la información hereditaria contenida en un segmento determinado del ADN, y por tanto con una estructura lineal definida por la secuencia de pares de bases que lo componen, una mutación puntual o intragénica puede considerarse como un cambio en la secuencia de pares de bases que alterando la expresión del gen da lugar a un individuo mutante (Auerbach y Kilbey, 1971).

El cambio más pequeño sería el correspondiente a un par de bases, pero la expresión "mutación puntual" que a veces se utiliza, se refiere también a un cierto número de pares de bases adyacentes o incluso a pérdida o intercalación de bases (OPS/OMS, 1980).

La alteración en la secuencia de bases de un gen da lugar a la alteración en la secuencia de bases del ARN-m, que se transcribe en el punto o región del ADN afectado y por lo tanto en la proteína traducida.

La estabilidad de las moléculas hereditarias, que significamos como un requisito necesario para hacer frente a su papel biológico, es sin embargo relativa. El gran despliegue de formas biológicas que existen y han existido, y la variabilidad y diversidad de formas de vida originadas a partir del primer ser vivo, han surgido gracias a la aparición de errores sistemáticos que han permitido una diversificación de las moléculas hereditarias autoduplicables (Auerbach y Kilbey, 1971).

Las mutaciones aparecen espontáneamente con una frecuencia relativamente baja. Así se estima que la frecuencia de mutación de un locus por gameto y por generación, en un eucarionte superior es, por término medio, de 10^{-5} a 10^{-6} . En un gameto de un eucarionte superior que tuviese del orden de unos 500.000 genes, habría una media de 0,5 a 5 mutaciones repartidas aleatoriamente por el genoma (Miller y Miller, 1981).

Conviene distinguir las mutaciones espontáneas que tienen lugar ocasionalmente en la naturaleza, de aquellas que son producidas por el efecto de agentes inductores o mutágenos físicos y químicos. Los mecanismos moleculares productores del cambio de la secuencia de bases pueden ser muy diferentes según los casos.

2.2. MUTACIONES INDUCIDAS

Son numerosos los agentes inductores de mutaciones génicas o cromosómicas tanto físicos como químicos. Entre ellos deben destacarse la radiación UVA (ultravioleta) y los mutágenos químicos.

Los mutágenos químicos pueden causar alteraciones en la secuencia de bases del ADN de tres formas principalmente (Sugimura, 1982):

- a. Reaccionando y alterando directamente las bases del ADN. Este sería el caso del ácido nitroso, la hidroxilamina y los agentes alquilantes.
- b. Sustituyendo a una o más bases durante la replicación (análogos de bases). Por ejemplo, 5-bromouracilo y 2-aminopúrica.
- c. Distorsionando las moléculas de ADN por introducirse en ellas, causando consecuentemente pérdida o adición de bases. Así actuarían las acridinas y las moléculas aromáticas.

De acuerdo con la naturaleza del gen al que afectan, las mutaciones pueden tener distinta repercusión. Hablamos pues de mutaciones en genes estructurales, que se transcriben y traducen, y en el otro caso de genes que se transcriben pero no se traducen.

Estas mutaciones podrían transmitirse a la progenie de los individuos afectados a través de las células germinales (mutación germinal), o podrían aparecer en individuos expuestos a mutágenos y ser transmitidas de una generación celular a otra, dentro del mismo individuo (mutación somática) (OPS/OMS, 1980).

Además es bien conocida la estrecha relación existente entre los mecanismos de mutación y reparación, y el hecho de encontrar mutantes "mutadores" y mutantes "antimutadores". Estos últimos son variantes génicas que tienen aumentada la capacidad de reparación e indirectamente causan un aumento de la estabilidad del ADN (Peto, 1985).

El gran interés derivado del descubrimiento de estos genes, encargados de garantizar la reparación de la moléculas de ADN, radica en que con ello se demuestra que la tasa de mutación es dependiente del propio genotipo de las especies. Es decir, existe un equipo más o menos complejo de genes que garantizan una determinada frecuencia de mutación.

Cada especie está por tanto sometida a la selección natural que para cada sistema biológico le proporciona el nivel más adecuado de variabilidad genética respetando los requerimientos adaptativos propios de especie.

En función de ello podemos entender la mayor tasa de mutación observada en los eucariontes (10^4 a 10^5) con relación a los procariontes (10^9) (Sugimura, 1982).

2.3. MECANISMOS DE CARCINOGENESIS

Numerosas lesiones en el ADN que podían producir mutaciones pueden quedar anuladas y restauradas mediante una eficaz reparación (Taylor, 1982).

Por otro lado, el fallo en el mecanismo de reparación de una lesión del ADN puede conducir a la implantación de la secuencia de bases diferente a la original durante el proceso de replicación, lo que si bien puede dar continuidad física a la molécula, puede sin embargo generar la producción de la mutación. A este último fenómeno se le denomina mutagénesis indirecta, para distinguirlo de la que se produce por acción inmediata de un agente mutagénico sobre la molécula de ADN o mutagénesis directa (Bartsch y col., 1980).

Los avances en los últimos decenios permiten examinar paralelamente ciertos aspectos de la mutagénesis y la carcinogénesis. En otras palabras se tiene ahora creciente evidencia de que, en la mayoría de los casos, intervienen mutaciones somáticas en la conversión de células normales en células neoplásicas (Jenner y Testa, 1981).

El cáncer en definitiva, consiste en una alteración del ciclo de las células que pasan a dividirse de forma incontrolada y adquieren ciertas transformaciones que pueden conducir al establecimiento de linajes celulares que invaden y alteran regiones y órganos del cuerpo (OCDE, 1986).

El cáncer se produce como consecuencia de una perturbación en el funcionamiento de ciertos genes y esta perturbación puede tener diversos orígenes.

En realidad el cáncer no es una única enfermedad, sino un grupo complejo de enfermedades, existiendo varios cientos de tipos y múltiples agentes productores.

La cancerogénesis así vista es un complejo proceso biológico que puede desencadenarse al menos por dos mecanismos: genético y epigenético (OPS/OMS, 1980).

2.3.1. MECANISMOS GENETICOS

Algunos cancerígenos químicos pueden ser responsables de solamente una pequeña parte de los procesos que desencadenan el cáncer y no se consideran carcinógenos completos. Así por ejemplo, algunos agentes interactúan con el ADN e inician el proceso por el cual se induce la lesión primaria y éstos son los llamados iniciadores (Rinkus y Legator, 1979).

Otros compuestos favorecen la progresión del cambio inicial del ADN y son por tanto los llamados promotores tumorales.

Un tercer grupo incluye a los agentes químicos conocidos como carcinógenos completos y que son descritos como genotóxicos (Giner-Sorolla, 1986).

El término genotoxicidad, que literalmente significa "toxicidad del genoma", denota un concepto y no una consecuencia. Los efectos tóxicos producidos por un agente genotóxico incluyen entre otros: mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis, retraso celular, inducción de fagos y roturas cromosómicas. Cada una de estas consecuencias puede servir de indicador de genotoxicidad de un determinado compuesto (Velazquez, 1987).

Los mecanismos genéticos de carcinogénesis se basan en una alteración del material genético, es decir en una mutación (acción genotóxica).

Estos son probablemente los responsables de la mayoría de los cánceres observados en el hombre, y se derivan del establecimiento de un enlace covalente entre el agente cancerígeno y el ADN celular. De esta alteración derivaría una mutación somática que daría

lugar a la formación de un clon de células transformadas (Ames y col, 1989).

El mecanismo mutágeno de la carcinogénesis, también conocido como teoría de la mutación somática, o inducción del cáncer, gira en torno a la interacción del agente con el ADN.

Los oncólogos afirman que este mecanismo implica un proceso con varios estadios, incluyendo iniciación (reacción con el ADN), promoción y finalmente progresión del tumor (Boutwell 1974).

Los ensayos de carcinogenicidad en animales son capaces de detectar tanto los iniciadores como los promotores. Los tests de mutagenicidad deberían ser teóricamente capaces de detectar carcinógenos iniciadores (Ames y col., 1973a).

Además de mutaciones puntuales, ciertos tests de mutagenicidad detectan también otros tipos de daños genéticos, incluyendo alteraciones cromosómicas, mutaciones múltiples específicas de locus y recombinaciones.

Así podemos establecer dos tipos fundamentales de daño genético: mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas. Los tests bacterianos de mutagenicidad detectan sólo mutaciones genéticas.

Los cancerígenos genotóxicos constituyen un conjunto de sustancias carentes, en su mayoría, de una característica estructural común. Sin embargo, se sabe que las formas reactivas últimas de muchos carcinógenos químicos son reactivos electrofílicos que interaccionan con macromoléculas celulares críticas, alterándolas de tal modo que, en algunos casos, podría llegar a desarrollarse un proceso canceroso (Miller y Miller, 1981).

Estos agentes genotóxicos pueden afectar tanto al material genético de las células germinales como al de las somáticas. Las mutaciones a nivel de las células germinales no dan lugar a cánceres más que muy raramente (retinoblastoma).

Por el contrario las mutaciones que afectan a las células somáticas son responsables de la mayoría de los cánceres en el hombre.

La primera etapa de la carcinogénesis llamada iniciación, comienza después de una mutación inducida por una sustancia cancerígena. Los estudios en animales han demostrado que una sola administración de la sustancia puede ser suficiente para iniciar un cáncer. No obstante, parece que la iniciación no es adquirida definitivamente o fijada mas que después de algunas divisiones celulares que dan nacimiento a varias células hijas a partir de las cuales se desarrolla el tumor (Cairns, 1986).

Los mecanismos moleculares de iniciación son pues relativamente complejos y pueden diferir de un cancerígeno a otro, por lo que un mismo test reacciona con diferente precisión ante sustancias químicas de distinta naturaleza.

La segunda etapa de la cancerogénesis, la promoción, corresponde a la expresión de la mutación a nivel de la célula inicial. La experimentación animal ha demostrado que la promoción puede inducirse por la repetida administración de sustancias que se llaman promotores (Land y col., 1983). Estas son sustancias desprovistas de actividad cancerígena intrínseca, pero que aumentan considerablemente la formación de tumores después de la administración de un cancerígeno iniciador.

Pero la realidad es que la mayor parte de los cancerígenos son a la vez iniciadores y promotores, y por lo tanto, pueden inducir por si solos el proceso de cancerogénesis.

Contrariamente a la iniciación la promoción no es el resultado de modificaciones en el material genético, lo cual no significa que no se produzcan más mutaciones durante el transcurso de la fase de promoción; muy al contrario, el genoma de la célula cancerosa continúa desorganizándose, como consecuencia de la actividad genotóxica de algunos promotores o del cancerígeno iniciador, si es que se mantiene la exposición a éste (Bartsch y col., 1980).

Por otro lado, se piensa que un efecto genotóxico es responsable de la transición entre la etapa de promoción y la etapa de progresión. Esta tercera y última etapa de la cancerogénesis se caracteriza por la aparición de metástasis a distancia.

2.3.2. MECANISMOS EPIGENETICOS

El cáncer de origen epigenético es el resultado de la interferencia del agente cancerígeno con los procesos que controlan la división y la diferenciación celulares, y todo ello sin modificaciones del material genético.

Es probable que la mayoría de los mecanismos epigenéticos descritos hasta hoy, procedan sólo de la experimentación animal, puesto que la dosis que requieren para su inducción son elevadas y sin comparación posible con la exposición humana (Ames y col., 1973b).

Entre las sustancias que actuarían por estos mecanismos estarían: los pesticidas organoclorados, el fenobarbital, el tetracloruro de carbono, o sustancias hormonales como el dietilbestrol.

Se puede concluir diciendo que la cancerogénesis es un proceso multifásico en el que se pueden distinguir la iniciación, la promoción y la progresión. La cancerogénesis es además multifactorial, determinada por factores endógenos y exógenos. Por último la cancerogénesis también es multigénica. Si el cáncer puede ser iniciado por una sola mutación, se manifiesta no obstante por un caos genético creciente que caracteriza a la célula cancerosa, animando la activación o la inactivación de un gran número de genes, de los que algunos como los protooncogenes o los anti-oncogenes, pueden acelerar la activación neoplásica (OPS/OMS,1980).

Además es importante también subrayar, que el proceso de cancerogénesis normalmente es muy largo. Las células iniciadas pueden permanecer durmientes durante muchos años y entre la iniciación y la aparición clínica del cáncer, puede transcurrir como media, un período de tiempo que se puede estimar entre 15 y 20 años.

III. CARCINOGENESIS AMBIENTAL

El efecto cancerígeno de determinados productos químicos presentes en el medio ambiente se ha ido apreciando lentamente, aún cuando se conozcan desde hace mucho tiempo ejemplos de cáncer causados por lo que podríamos llamar una exposición profesional.

Ya en 1.775, el médico británico Sir Percival Pott, correlacionó la incidencia de cáncer de escroto en los deshollinadores con la acumulación de hollín en la ingle, ocurrida muchos años antes .

Los descubrimientos sobre carcinógenos químicos se remontan al menos a 1915 año en que Yamagiwa y Itchikawa en japonés y en 1918 en inglés, publicaron que "la repetición de una continua irritación crónica causa cáncer", tras comprobar que las aplicaciones repetidas de alquitrán de hulla sobre la piel de la oreja de los conejos provocaba cáncer; a partir de este momento, se puede considerar que comienza la cancerogénesis química experimental (Laborda y De La Peña, 1982).

El progreso hacia la comprensión de la carcinogénesis química ha sido sin embargo lento, debido al menos a tres razones (OMS, 1978).

Primero, la mayoría de los carcinógenos químicos no son biológicamente activos en su forma original, de manera que al analizar dicho estado, no se descubre su naturaleza cancerígena.

Recientemente ha quedado claro cómo resultado de las investigaciones de James A. Miller y Elizabeth C. Miller, de la Universidad de Winsconsin, que los procesos metabólicos normales que transforman los alimentos en sustancias que el organismo puede absorber y eliminar, y convierten los compuestos dañinos en inofensivos, también transforman ciertas sustancias químicas del medio ambiente en metabolitos cancerígenos. Había pues que conocer éstos metabolitos antes de poder considerar como una amenaza los productos de los que provienen (Laborda y de la Peña, 1982).

Una segunda causa de retraso fué que la función clave que desempeña la lesión del ADN en la carcinogenesis por productos químicos se ha descubierto recientemente y los ensayos con bacterias han proporcionado una prueba contundente, aunque indirecta, de dicho mecanismo.

Finalmente la comprensión de la carcinogénesis química ha estado enmascarada por el hecho de que la lesión del ADN, aún siendo esencial en la iniciación de la carcinogénesis, no provoca normalmente por sí sola la transformación cancerosa; se requieren unos factores adicionales para promover la compleja secuencia de acontecimientos celulares que culminan en la transformación cancerosa. Los agentes que dañan el ADN son por tanto cancerígenos únicamente en potencia (McCann y Ames, 1978).

3.1. PREVENCIÓN DE LA CARCINOGENESIS AMBIENTAL

Desde 1973 el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente tiene como objetivos (OMS, 1980):

- a. Evaluar la información disponible sobre la relación entre la exposición a los agentes del medio y la salud del hombre y establecer las pautas para fijar límites de exposición compatibles con la protección de la salud
- b. Identificar riesgos nuevos o posibles de origen químico mediante un examen preliminar de las sustancias químicas de las que puede preverse una utilización cada vez mayor en la industria, la agricultura o el medio doméstico.

La prevención de la carcinogénesis está estrechamente relacionada con nuestra capacidad para valorar la posible actividad cancerígena en el hombre de las sustancias químicas.

Para ello se pueden utilizar distintos tipos de estudios que a continuación comentamos.

3.1.1. OBSERVACIONES EN EL HOMBRE

Los estudios epidemiológicos sobre el cáncer chocan con muchas dificultades. Ante todo, dado el largo período de latencia de estos procesos, estos estudios no son a veces concluyentes, necesitando incluso 20-30 años después de la exposición para que se desarrolle el tumor (McCann y Ames, 1977).

Además la exposición con frecuencia es múltiple y está mal caracterizada lo que complica la identificación del agente causal.

En base a esto, está claro que el número de sustancias reconocidas como cancerígenos para el hombre en base a las observaciones epidemiológicas, estaría claramente subestimando la realidad (Devoret, 1979).

3.1.2. ENSAYOS A LARGO PLAZO EN ANIMALES

Los ensayos se efectúan en laboratorios especializados según un protocolo bien definido y deben utilizarse al menos dos especies de animales, por regla general ratas y ratones.

Actualmente más de 800 sustancias se han ensayado con esta metodología y el 65 % se han mostrado como cancerígenas para al menos una especie (IARC, 1986).

Esta tasa tan elevada se debe a que se ensayan prioritariamente las sustancias más sospechosas de ser cancerígenos, y también a que se utilizan dosis muy elevadas de las mismas lo cual produce una saturación de las vías de inactivación y de reparación del organismo y favorece los mecanismos epigenéticos de cancerogénesis y consiguientemente ésto lleva a una sobreestimación del número de sustancias cancerígenas para el hombre.

La extrapolación de datos de los animales al hombre es además incierta. También es incierta la extrapolación a las dosis débiles mucho más acordes con la verdadera exposición en el hombre.

El punto más delicado es la existencia de un umbral por debajo del cual, no existe riesgo. Algunos autores consideran que efectivamente existe un umbral, por debajo del cual los procesos de inactivación y de reparación están progresivamente saturados, lo que se traduce en una elevación proporcional del riesgo de iniciar un cáncer.

Pero por contra otros autores (IARC, 1975 y 1986) defienden que, en función de la ley de acción de masas, siempre existe la posibilidad de que una molécula del carcinógeno escape de esos mecanismos de defensa e induzca un cáncer ya que éste en teoría puede desarrollarse por una sola mutación. Según esta segunda teoría no existe umbral para los cancerígenos genotóxicos.

Por último los ensayos en animales presentan el inconveniente de ser largos y costosos. Esto hace que solo una pequeña fracción del total de sustancias químicas introducidas anualmente en el ambiente puedan ser estudiadas a través de los ensayos convencionales en animales (Laborda y De La Peña, 1982).

3.1.3. TEST RAPIDOS "IN VIVO" E "IN VITRO"

El número de sustancias químicas aisladas o sintetizadas supera los cuatro millones de los que más de 10.000 productos están presentes en nuestro ambiente, 1.500 como plaguicidas, más de 4.000 medicamentos, 2.000 excipientes y 5.000 aditivos (OMS, 1978).

Además cada año se sintetizan unas 2.000 sustancias nuevas. Todo ello ha conducido al desarrollo en las últimas décadas, como procedimiento alternativo para la detección de sustancias químicas nuevas con potencial poder carcinógeno, de un grupo de ensayos rápidos, que ofrecen resultados en días o semanas y son mucho más baratos, ya que utilizan sistemas biológicos en lugar de mamíferos completo. Existen una centena de tests rápidos o a corto plazo, para el cribado de sustancias potencialmente cancerígenas, que se pueden clasificar como test "in vitro" y test "in vivo" (OMS, 1978; IARC, 1975 y 1986).

Los tests "in vivo" investigan por ejemplo, mutaciones cromosómicas en los animales tratados con un determinado agente.

Los test "in vitro", se llevan a cabo en bacterias, hongos levaduras y cultivo de células de mamíferos, y son los de más fácil realización y los más sensibles.

Son numerosas las publicaciones sobre este tema entre otras las de organismos tales como : OMS 1964; 1969; 1971 y 1974; UICC 1969 y IARC 1980.

3.1.3.1. ENSAYOS MUTAGENICOS CON BACTERIAS

- a. Test de Ames, con *Salmonella typhimurium*, para la detección de mutaciones estructurales o de sustitución de pares de bases, con distintas cepas y con y sin fracción microsomal.
- b. *Escherichia coli* K-12 en mutación reversa, dependiente de arginina (Mohn 1973) y de triptófano (Green 1976); en mutación directa, el 5 metiltryptófano o la estreptomicina (Mohn 1973, Wild 1973).

3.1.3.2. ENSAYOS MUTAGENICOS CON CELULAS DE MAMIFEROS

Varios sistemas experimentales han sido desarrollados para medir mutaciones en locus específicos en cultivos celulares de mamíferos. El más usado es el marcado genéticamente resistente al B-azaguanina en U79 y células de hamster chino CHO y células de ratones L5178Y (Abbondalo 1977).

3.1.3.3. ENSAYOS MUTAGENICOS CON MOHOS Y LEVADURAS

- a. *Sacharomices cerevisiae*: normalmente la cepa utilizable es D-7 (Zimmermann et al. 1975).
- b. *Schizosaccharomyces pombe*: las cepas más utilizadas son P1, P2, P3 y DC (Loprieno 1973 y 1974).
- c. *Neurospora crasa* (Ong and De Serres, 1972).
- d. *Aspergillus nidulans* (Baranowska et al., 1973).

3.1.3.4. ENSAYOS MUTAGENICOS CON *DROSOPHILA*

Este ensayo representa un sistema indicador "in vivo" que permite simultanear y probar eficientemente varios tipos de daños genéticos a nivel molecular y nivel cromosómico (Vogel and Sobels, 1976).

3.1.3.5. TRANSFORMACION EN CULTIVOS CELULARES

Este sistema es muy utilizado por la respuesta a los procesos de transformación neoplásica "in vivo". La transformación puntual más frecuente es el crecimiento de un grupo de células con una menor inhibición de la célula. Existe una buena correlación entre los cancerígenos conocidos y la capacidad para producir una transformación (Benedict et al. 1977, Borek 1979).

3.1.3.6. DAÑO Y REPARACION DEL ADN

El efecto tóxico y heredable de los productos químicos para el material genético se ha descrito como genotoxicidad (Brookes et al. 1973). Los efectos genotóxicos son detectados por su interacción con el ADN y por las consecuencias de esta interacción tales como alteración cromosómica, mutagénesis, inhibición de la síntesis y reparación del ADN (Brookes, 1977).

3.1.3.7. DAÑOS CITOGENETICOS

Gran proporción de agentes interactúan con el ADN celular y son extremadamente potentes para inducir daño cromosómico que detecta citológicamente (Miller, 1978; Holstein et al. 1979). Los diferentes tipos de daño son: aberraciones cromosómicas en células en metafase; cambios en las cromátidas hijas; fragmentos en células en anafase; y micronúcleos en células en interfase.

3.1.3.7. ENSAYOS MUTAGENICOS CON MAMIFEROS

- a. Letal dominante (Bateman 1977).
- b. Traslocación heredable (Eicher 1970).
- c. Disminución y no disyunción del cromosoma sexual (Russell, 1976).

- d. Locus específico (Russell, 1951).

IV. TESTS BACTERIANOS

Ya hemos visto que el hecho de que ciertos agentes físicos y químicos presentes en el medio ambiente, aumenten la incidencia de cáncer ha cobrado gran interés, y por ello, es inmediato que una adecuada limitación de la exposición del hombre a sustancias cancerígenas salvaría muchas vidas.

Se hace pues urgente, identificar que sustancias del medio ambiente son potencialmente carcinógenas.

En lo que se refiere a los carcinógenos químicos, ya hemos visto que no se trata de una labor fácil. Se calcula que más de 500 o 1.000 nuevos productos químicos distintos irrumpen cada año en el mercado (Devoret, 1979).

Dado que los ensayos habituales efectuados en animales de experimentación, requieren mucho tiempo y dinero, se hace necesario otra alternativa.

Afortunadamente, podemos sacar provecho de la profunda unidad de la materia viva, recurriendo a las bacterias como organismos de ensayo (Ames y col, 1980; Maron y Ames, 1983).

El cáncer es una enfermedad propia de organismos pluricelulares muy evolucionados, como el hombre, mientras que las bacterias, en el otro extremo de la escala evolutiva, son diminutos seres unicelulares; pero la paradoja no es más que aparente.

Se tiende a imaginar el cáncer, cómo un tumor que puede extenderse por todo el cuerpo, formando múltiples colonias tumorales o metástasis. Es ésta una visión clínica, macroscópica del cáncer en un estudio pluricelular, puesto que un solo gramo de tumor contiene hasta un millón de células cancerígenas (Purchase, 1982).

Pero no hay que olvidar que el cáncer comienza a nivel de una sola célula.

Ciertos agentes ambientales provocan el cáncer dañando el ADN, el material hereditario de las células. La lesión del ADN inicia el complejo proceso que en las células de los mamíferos, puede conducir con el tiempo, a un estado canceroso. Los agentes que lesionan el ADN, son por tanto cancerígenos en potencia (Ames y McCann, 1981).

Ahora bien, dado que el ADN es común a todas las células vivas y, tanto las lesiones del ADN como los procesos de reparación del mismo son notablemente similares en las bacterias y en las células humanas: lo que perjudica al ADN bacteriano, daña igualmente al ser humano. Esta es la justificación teórica que permite sustituir las células de los mamíferos por bacterias en la detección de lesiones del ADN. La justificación teórica se apoya en resultados experimentales y prácticos. Además los ensayos bacterianos, al ser mucho más rápidos y económicos, hacen de la detección de carcinógenos a gran escala un objetivo alcanzable (Devoret, 1979).

Otra de las grandes ventajas de los análisis efectuados en bacterias es la enorme amplificación biológica implícita en toda manipulación bacteriana. Es sencillo hacer crecer unos mil millones de bacterias (10^9) por ml de medio de cultivo (Ames y col, 1975).

Una mutación, como el cambio de un solo par de bases en el ADN bacteriano, que es imposible de detectar mediante los métodos bioquímicos al uso, quedaría puesta de relieve en forma de una bacteria mutante.

Esta puede ser seleccionada entre las 10^9 células hijas, y solo ellas, pueden proliferar y dar lugar a una colonia apreciable a simple vista en una placa de agar nutritivo. Dado que una colonia consta de alrededor de un millón de bacterias, una mutación poco frecuente que tenga una probabilidad de uno entre 100 millones, quedaría amplificada por un factor de 10^{14} (cien billones).

4.1. TEST DE AMES

4.1.1. FUNDAMENTOS DEL TEST DE AMES

El descubrimiento de la mutagénesis inducida, primero física y luego química, sirvió de punto de partida para la búsqueda de métodos sensibles capaces de detectar la presencia de mutaciones.

Así, M. Demerec en 1956, plantea la detección de mutágenos ambientales mediante el desarrollo de sistemas bacterianos y centra toda su investigación en *Salmonella* como organismo a utilizar. Posteriormente Hartman y Ames, en 1971, desarrollaron una técnica de mutación con *Salmonella*.

En ese mismo año, Malling verificó la formación de compuestos mutagénicos a partir de otros no mutagénicos por interacción con microsomas hepáticos de ratón, y sugirió que la incubación de las bacterias con un sistema metabolizante de mamíferos podría tener gran valor a la hora de evaluar la mutagenicidad de los productos químicos.

En 1975, Ames y col., en la Universidad de Berkeley, desarrollaron el ensayo *Salmonella*/hígado de mamífero, más conocido hoy en día como test de Ames, que es normalmente el tomado como criterio y el más usado por los laboratorios de todo el mundo (Ames y col., 1975; Ames y McCann, 1976).

El organismo utilizado en la prueba, son distintas cepas derivadas de *Salmonella typhimurium* LT₂, una bacteria del colon portadora de una mutación (his-) que le impide fabricar uno de los enzimas requeridos para la síntesis del aminoácido histidina, un componente esencial de las proteínas.

A consecuencia de la mutación, la bacteria no puede crecer en un medio nutritivo mineral, a menos que el medio sea complementado con una fuente externa de histidina.

En muy raras ocasiones la mutación his- sufre una reversión: una mutación reversa restaura la secuencia normal en el código de ADN para el enzima requerido y con ello devuelve el suministro interno de histidina. La reversión se descubre ya que solo las bacterias

devuelve el suministro interno de histidina. La reversión se descubre ya que solo las bacterias que la han sufrido pueden formar colonias en un medio sin histidina.

Obviamente la tasa de mutación reversa, que ordinariamente es muy baja, se incrementa considerablemente si la bacteria his- es expuesta a un producto que provoque mutaciones. Esta es la base teórica del test de Ames.

Posteriormente Ames y col., introdujeron tres modificaciones importantes en la cepa original his- para hacerla más sensible y adaptable a las condiciones experimentales.

La *S. typhimurium* tiene una cubierta bastante impermeable que reduce e incluso impide la penetración de muchos productos químicos en la célula. Ames y cols. superaron esta barrera introduciendo en ella una mutación que provocaba defectos en la pared.

En segundo lugar, lograron hacer la cepa más sensible a los agentes que dañan el ADN, eliminando su capacidad de llevar a cabo el proceso de reparación por escisión, de manera que la mayor parte de las lesiones originales no fuesen reparadas.

Por último introdujeron un plásmido, un elemento genético externo que hace la duplicación del ADN más propensa a errores.

Por medio de estas tres modificaciones crearon una cepa en la que tan sólo unas pocas moléculas de carcinógeno eran capaces de provocar lesiones en el ADN y por tanto, dar lugar a mutaciones: de estas algunas podrán restaurar el suministro interno de histidina.

Ahora bien, lo verdaderamente importante, lo que hizo realmente eficaz el test de Ames, fué la ocurrencia del autor de mezclar las bacterias del ensayo con un extracto de hígado de rata (S9 mix), y así someter al producto químico analizado a los procesos metabólicos de los mamíferos, dado que como ya comentamos, normalmente no son las formas originales de los compuestos químicos los que son carcinógenos activos, sino sus metabolitos.

En la práctica el test de Ames se efectúa añadiendo el producto a analizar a las

bacterias his- inmersas en un extracto de hígado de rata y, posteriormente sembrando la mezcla en un medio nutritivo carente de histidina.

Trás dos días de incubación, cualquier célula que haya sufrido la mutación reversa dará lugar a colonias. El número de colonias proporciona una estimación de la capacidad mutagénica del producto.

Aunque el protocolo experimental, utilizado comunmente, es básicamente el descrito por Ames en 1975, a lo largo de los años se han introducido mejoras en el mismo. Así, se han añadido más cepas a las utilizadas inicialmente, aumentando la posibilidad de detectar un mayor número de mutágenos.

A las cepas primitivas TA1535, TA1536, TA1537 y TA1538 (Ames y col., 1973), se añadieron TA98 y TA100 (Ames y col., 1975), TA97 (Levin y col., 1982), TA102 (Levin y col., 1984) y la TA104 (Ames comunicación personal). Además, se han realizado distintos tipos de modificaciones al protocolo, dando lugar a varios métodos de ensayo, cada uno de los cuales es válido dependiendo del tipo de información que se desee obtener y de la naturaleza del compuesto a ensayar.

4.1.2. CORRELACION CARCINOGENICIDAD-MUTAGENICIDAD

Una de las cuestiones más importantes que se nos plantea, es si los carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos, demostrados por el test de Ames y otros test bacterianos, presentan riesgos comparables para el hombre (Purchase, 1982).

Pudo obtenerse una respuesta a esta cuestión comparando la genotoxicidad de las sustancias reconocidas como cancerígenas para el hombre (grupo 1 de la Agencia Internacional del Cáncer, I.A.R.C) por medio de dos test, un test "in vivo" que busque las aberraciones cromosómicas en animales y un test "in vitro".

Con este protocolo, con algunas excepciones como por ejemplo el asbesto, todos los productos cancerígenos para el hombre son positivos en al menos un test, y la mayor parte lo son en los dos. De aquí se deduce que las sustancias cancerígenas que presentan riesgo

para el hombre pueden ser despistadas por un adecuado test de mutagénesis.

La más extensa validación de los ensayos bacterianos, fué la llevada a cabo por Ames y Mc Cann (1975 y 1976), quienes llevaron a cabo un estudio en el que se incluyeron más de 300 productos químicos nuevos, que habían sido probados previamente en animales para ver su poder carcinógeno, o bien que eran conocidos carcinógenos en humanos.

Es bien conocida la gran incertidumbre que existe sobre la extrapolación de los datos de carcinógenos animales al hombre. En general podemos decir que las sustancias químicas que son carcinógenas para una especie lo son también para otras, aunque la potencia cancerígena, puede variar considerablemente dependiendo de la especie animal en la que se ensaya y de la forma de administración usada (McCann y col, 1984).

Por otro lado, clasificar a una sustancia como no carcinógena, también entraña dificultades. Se exige el uso de un test de duración adecuada, en al menos dos especies de animales, a varios niveles dosis y los controles positivos deberían ser del mismo grupo químico que el agente a ensayar.

La potencia mutagénica de cada agente químico se calcula en base a la tasa de reversión de la cepa más sensible, teniendo en cuenta que las tasas pueden variar dentro de un rango de 10^9 : así puede ser de 7.057 revertantes/nmol para la Aflatoxina B1, y solo de 0,02 revertantes/nmol en el caso del benzil cloruro (OMS, 1980).

Hay que tener en cuenta además, que agentes químicos de diferente estructura pueden diferir mucho en la tasa de mutagenicidad y por lo tanto, en la potencia cancerígena.

McCann et al. en 1.975 obtuvieron en su estudio de más de 300 productos químicos por medio del test de Ames, una sensibilidad del 90% (157/175) y una especificidad del 87% (94/108); en el mismo estudio, el 10% (18/175) de los carcinógenos fueron no mutagénicos o falsos negativos, y muchos de ellos se comprobó más tarde que producían metabolitos que sí eran mutagénicos en el test de Ames .

Por otro lado, el 13% (14/108) de los no carcinógenos fueron falsos positivos, al

mostrar algún grado de mutagenicidad en el test.

Purchase et al. en 1978, seleccionaron cuidadosamente 120 productos químicos y los investigaron en una serie de test a corto plazo. El análisis de éstos y otros estudios ha mostrado que el éxito de los test bacterianos para detectar carcinógenos, está influido por el tipo o la clase de agente químico que se estudia y por los criterios bajo los cuales se juzga la actividad carcinogénica en los animales.

Rinkus y Legator(1979), revisaron los datos de diversos test bacterianos realizados sobre 465 carcinógenos conocidos o sospechados; los compuestos se dividieron según su estructura química en categorías separadas. Las sustancias que mostraron mejor correlación (94 %) entre actividad mutagénica y carcinogénica, fueron aquéllas que podían reaccionar directamente con el ADN, o que podían ser activadas por enzimas metabólicas reactantes con el ADN.

Las sustancias que por su estructura parecían no ser adecuadas para reaccionar con el ADN, mostraron una pobre relación entre actividad carcinógena y mutagenicidad; estas últimas sustancias producirían cáncer por un mecanismo diferente, posiblemente no genotóxico.

En España, Laborda y cols. 1981, han realizado a su vez una evaluación de la carcinogenicidad y mutagenicidad de 99 plaguicidas, obteniendo una sensibilidad del 51 % y una especificidad del 67 %, con un 49 % de falsos negativos y 33 % de falsos positivos.

Pero el más ambicioso ejercicio de validación de éstos test realizado hasta la fecha, ha sido el Programa Internacional para la Evaluación de Test de Mutagenicidad a corto plazo (De Serres y Ashby, 1981), en el que participaron más de 50 laboratorios y en el cual se evaluaron más de treinta ensayos "in vivo" e "in vitro", con el fin de determinar su capacidad para discernir entre compuestos carcinógenos y no carcinógenos.

Se llegó a la conclusión de que los ensayos son válidos en su mayoría, proporcionando resultados fidedignos en gran número de laboratorios, y se han confirmado como la primera

opción a la hora de iniciar un estudio de evaluación de un nuevo producto.

4.1.3. USOS DEL TEST DE AMES

El test de Ames puede jugar un importante papel dentro de cualquier programa de prevención del cáncer, tendente a identificar y minimizar la exposición humana a carcinógenos ambientales y mutágenos. Es un complemento a los tests en animales.

Los tests de mutagenicidad son de gran utilidad para industrias químicas y compañías farmacéuticas, que los utilizan de forma rutinaria para detectar precozmente la posible mutagenicidad de sus nuevos productos, sustituyéndolos por otros en el caso de que puedan ser peligrosos para el hombre.

Tanto las sustancias químicamente puras como las mezclas complejas, pueden estudiarse por medio del test de Ames y otros tests bacterianos, para tratar de aislar los productos mutagénicos, por ejemplo: componentes del tabaco, contenido del colon, heces humanas y orina; gran variedad de sustancias ambientales a las que están expuestos los seres humanos (fuentes de agua, contaminantes ambientales, tintes y cosméticos, aditivos alimentarios, pesticidas, etc) (McCann y Ames, 1976).

Además, el test puede servir para hallar el metabolito activo de los carcinógenos químicos, así como para clarificar cuáles son los mecanismos básicos de mutagénesis de estos productos.

De esta manera, se vió que muchos carcinógenos aromáticos son mutágenos "frameshift" (una modificación del ADN que consiste en añadir o deleccionar una base) con una particular secuencia de bases, y el papel de diferentes sistemas de reparación en la mutagenicidad inducida por algunos carcinógenos (Rosenkranz y col, 1980).

El daño al ADN por mutágenos ambientales puede ser una importante causa de mortalidad y morbilidad en sociedades avanzadas. Este daño acumulado durante la vida del individuo, inicia muchos cánceres y defectos genéticos.

Por medio de la identificación de estos mutágenos ambientales y disminuyendo o haciendo desaparecer la exposición a los mismos, se puede prevenir este daño. El test de Ames juega por tanto un papel trascendental en la consecución de este objetivo (Devoret, 1979).

V. ESTRATEGIAS PARA LA EVALUACION DEL RIESGO CANCERIGENO DE LOS PRODUCTOS QUIMICOS

El grado de estudio de un compuesto químico no depende sólo del nivel de utilización del mismo, de tal forma que para un determinado producto químico pueden existir estudios epidemiológicos, de carcinogenicidad en animales y de mutagenicidad utilizando diferentes tipos de ensayos (Laborda y De La Peña, 1982).

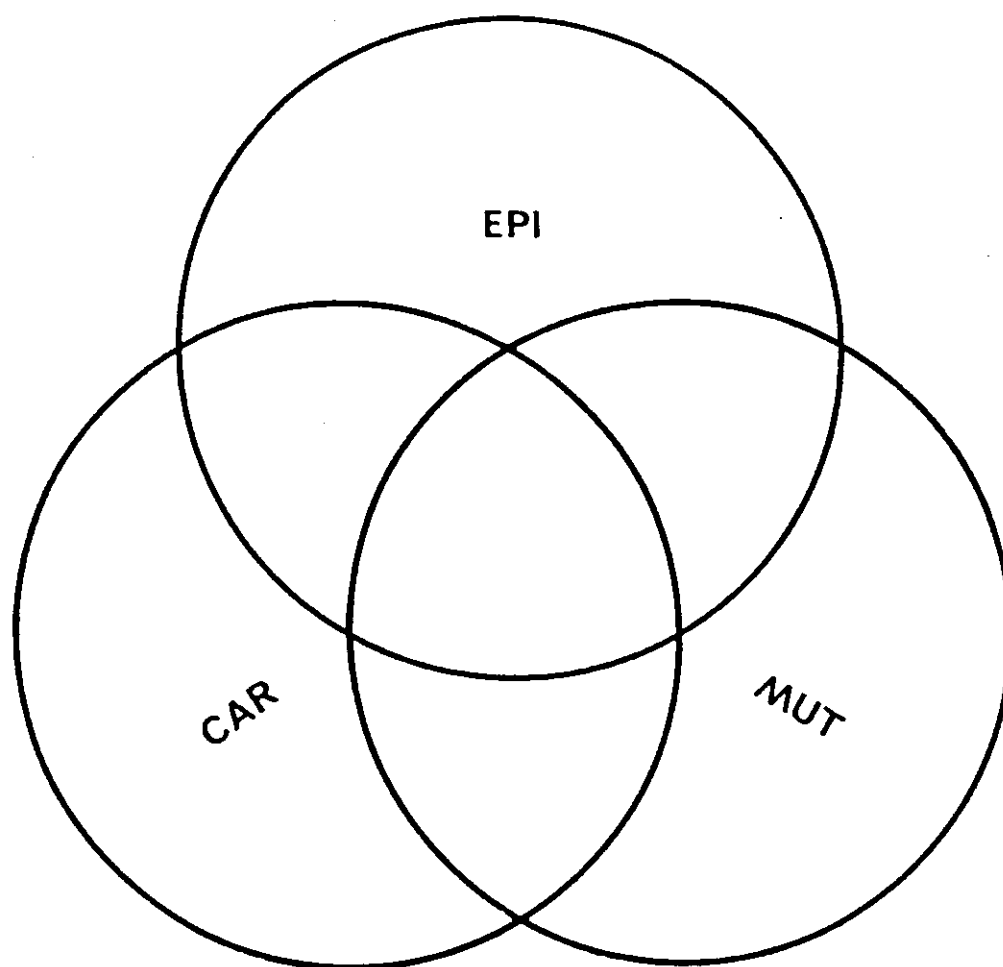
Por todo ello la situación de los estudios actuales de un producto químico en uso se podría representar como se muestra en la Figura 1, en donde puede ocurrir que sobre un producto químico existan:

- a. Estudios epidemiológicos prospectivos y retrospectivos sobre poblaciones que han estado expuestas al mismo.
- b. Pruebas de carcinogenicidad en animales, con diferentes especies y cepas.
- c. Ensayos mutagénicos con diferentes microorganismos, con o sin activación metabólica.

Se estima de máxima prioridad la evaluación mutagénica de los productos químicos atendiendo al interés de la CEE en los programas plurianuales de investigación y desarrollo en el ámbito del medio ambiente, (86/234/CEE), donde el punto tercero del contenido científico del programa está dedicado a la evaluación de los productos químicos, bajo los aspectos siguientes: desarrollo y evaluación de los procedimientos de prueba; sustitución de los vertebrados en pruebas de toxicidad; relación estructura/actividad; y evaluación de los productos químicos.

FIGURA 1

PRODUCTOS QUIMICOS EN USO



EPI - Estudios epidemiológicos
CAR - Pruebas de carcinogenicidad
MUT - Ensayos de mutagenicidad

En suma, ello implica la integración de todos estos estudios para realizar una adecuada prevención de la carcinogénesis química.

Por otro lado, cuando se trata de productos nuevos o en vías de utilización la estrategia es muy diferente, siendo recomendable realizar los estudios comenzando con una preselección mediante diferentes tipos de ensayos de mutagenicidad, eliminando aquellos que fuesen positivos. En aquellos que diese negativo se continuaría con las experiencias sobre animales decidiendo posteriormente en función de los resultados obtenidos; y finalmente su uso debería ser controlado estableciendo un seguimiento epidemiológico que permitiera detectar el más mínimo riesgo (Figura 2) (Hofnung y col., 1986).

En definitiva, podemos concluir que el estudio de carcinogénesis química debe hacerse con todos los medios a nuestro alcance, es decir mediante ensayos de mutagenicidad, pruebas de carcinogenicidad en animales, así como por medio de los estudios epidemiológicos retrospectivos y prospectivos, que nos permiten conocer el riesgo potencial que todos estos productos pueden representar para la salud del hombre.

VI. EL PROBLEMA DE LA CLORACION DE AGUAS DE CONSUMO PUBLICO

6.1. GENERALIDADES DEL SUMINISTRO DE AGUA POTABLE

Los ríos, torrentes, lagos y embalses, son las más importantes reservas de agua dulce. En el pasado era muy frecuente que estas fuentes tuviesen un alto nivel de contaminación como consecuencia de las descargas de aguas residuales, y constituían un factor importante en la transmisión de enfermedades infecciosas tales como el cólera o el tifus.

Con la mejora de los sistemas de alcantarillado, el desarrollo y protección de las fuentes acuíferas y el tratamiento del agua de consumo, cada vez es menor el número de brotes de enfermedades transmitidas por el agua (Craun, 1988).

FIGURA 2

MEDIDAS A CONSIDERAR DE ACUERDO CON LAS EVIDENCIAS DEL RIESGO CARCINOGENICO DE LOS PRODUCTOS QUIMICOS PARA EL HOMBRE

PRODUCTOS QUIMICOS						
Existentes y/o Utilizados					Nuevos y/o en vias de utilización	Nivel
Ensayos de carcinogenicidad en Animales	Estudios epidemiológicos	Ensayos de mutagenicidad	Ensayos de mutagenicidad			A
Positivo Negativo	Positivo Negativo	Positivo Negativo	Positivo Negativo		Positivo Negativo	
▲ ○ ●	●	△	●		●	
					Ensayos de carcinogenicidad en animales	B
		Ensayos de carcinogenicidad en animales	Ensayos de carcinogenicidad en animales		Ensayos de carcinogenicidad en animales	
		Positivo Negativo	Positivo Negativo		Positivo Negativo	
		▲ ○ ●	●		●	
					Estudios epidemiológicos Positivo	C
Estudios epidemiológicos Positivo		Estudios epidemiológicos Positivo	Estudios epidemiológicos Positivo		Estudios epidemiológicos Positivo	
●		●	●		●	

Progreso Prioritario de las Experiencias
 Progreso de las Experiencias

△ - medidas de precaución
 ▲ - reducción o recomendaciones de sustitución
 ● - eliminación

La tradición jurídica española en materia de aguas es fuertemente intervencionista por parte de los poderes públicos. Sus orígenes se remontan al Derecho romano (El agua en España, Instituto Tecnológico Geominero, 1992).

La Real Orden de 1860 declara del dominio público las aguas que discurren por los "ríos, riachuelos, rieras, arroyos o cualquiera otra clase de corrientes naturales, sea cual fuere su denominación. Este principio se recogió en la Ley de Aguas de 1866 y en la de 1879, que iba a tener una vigencia de 107 años.

La actual Ley de Aguas de 2 de agosto de 1985, publicada en el BOE 189 de 8 de agosto de 1985, está vigente desde el 1 de enero de 1986, e incorporó al dominio público todas las aguas continentales, superficiales o subterráneas, así como los cauces públicos, riberas, márgenes, lechos de lagunas y lagos situados en cauces públicos, y los acuíferos subterráneos.

En Estados Unidos las fuentes de agua de superficie son utilizadas en la actualidad por unos 155 millones de personas en 6000 sistemas de agua comunitarios, de los cuales alrededor del 23% proporcionan agua no depurada a unos 21 millones de personas (National Academy of Sciences, 1977).

La mayoría de estas comunidades son pequeñas, pero 15 ciudades con poblaciones superiores a los 100.000 habitantes siguen suministrando agua de superficie no filtrada a unos 16 millones de consumidores.

Aunque muchas de estas poblaciones utilizan recursos acuíferos protegidos, en alguna medida de la contaminación producida por las descargas de aguas residuales humanas, se confía únicamente en la desinfección para evitar la transmisión de agentes infecciosos a través del agua, haciéndose necesario valorar si sólo con la desinfección se puede esperar la protección necesaria frente a los agentes vehiculados por él.

Además debe tenerse muy en cuenta otra cuestión relacionada con los sistemas acuíferos de superficie: el efecto potencialmente adverso que puede tener para la salud el

consumo prolongado de cloro o derivados clorados, utilizados como desinfectantes (Anderson y col, 1987).

Abel y Wolman (Wolman, 1986) nos recuerdan que la cloración del agua ha salvado muchas vidas y que los riesgos potenciales de la misma deben contraponerse a sus demostradas ventajas.

Este tema es de especial importancia, en comunidades que continúan surtiéndose de agua de superficie no filtrada. En estos casos resulta necesario aumentar las dosis de cloro para garantizar la desactivación de los quistes de protozoos más resistentes; pero el hecho de reducir el riesgo de aparición de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua, puede traer como consecuencia el aumento de los niveles de derivados clorados (De Greffy col., 1980).

A este respecto, son muchos los informes epidemiológicos (Craun, 1984; Davis y col., 1984; Crump, 1981) que apuntan el aumento de riesgo de padecer cáncer en las poblaciones que consumen aguas cloradas, confirmando la necesidad de profundizar en el tema desde múltiples vertientes, para aclarar las dudas existentes en la actualidad sobre los riesgos y beneficios potenciales que la desinfección con cloro puede llevar consigo.

6.2. CONSIDERACIONES HISTORICAS

A principios de siglo, la protección de los recursos acuíferos de los vertidos de aguas residuales de origen humano, la filtración del agua de superficie y la desinfección por cloro, fueron factores fundamentales que determinaron la drástica reducción de las enfermedades transmitidas por el agua tales como las fiebres tifoideas y el cólera (Craun, 1988).

En 1893 Mills y Reinke (Craun, 1988), advertían sobre la mejoría de la salud general de una comunidad, una vez que el suministro de agua contaminada había sido sustituido por otro libre de contaminación.

En 1903, Hazen relacionó la mejora general de la salud con el tratamiento del agua de consumo; observó que cuando el suministro de agua recibía el adecuado tratamiento la

mortalidad en esa comunidad se reducía.

La filtración lenta de arena del suministro municipal para aguas de consumo se aplicó por primera vez en Estados Unidos en Albany, Nueva York, en 1889, y el primer filtro rápido o mecánico de arena se instaló en 1893 en Lawrens, Massachussets. Tras la filtración el índice de mortalidad provocada por fiebre tifoideas se redujo en ambas ciudades.

En 1908 Whipple advertía que "la filtración proporciona la mayor seguridad para aguas de superficie frente a los agentes que se transmiten por el agua" (Craun, 1988).

La primera aplicación del cloro para la desinfección se produjo en 1908 en Estados Unidos, en Nueva York, y el agente utilizado fue el hipoclorito sódico.

Georges Johnson, al proponer la cloración como método de desinfección en 1911, afirmaba que la filtración era inadecuada como método único de tratamiento del agua contaminada.

La rápida aceptación del cloro como salvaguarda de la salud pública y el desarrollo de los equipos necesarios para la aplicación de cloro gaseoso en las estaciones depuradoras de agua, ha contribuido a la rápida expansión de este sistema de desinfección.

6.3. EL CONCEPTO DE BARRERA MULTIPLE

Tanto la filtración del agua de superficie como la desinfección, se consideran parte esencial del concepto de barrera múltiple, que ha ido evolucionando basándose en las prácticas del suministro de agua y en la experiencia adquirida.

De acuerdo con este concepto, la confianza se deposita en el conjunto de los tratamientos destinados a proteger el agua de la transmisión de enfermedades (Clark, 1987 y 1982).

Ningún tratamiento es infalible por lo que las barreras múltiples deben mantenerse siempre que sea posible.

La desinfección con cloro u otro agente alternativo constituye la última línea de defensa o la barrera final. Para que la desinfección sea una última barrera eficaz, las barreras anteriores deben haber reducido la población biológica y eliminado el mayor número de sustancias que interfieran facilitando la acción del desinfectante.

Los procesos de clarificación del agua bien pensados y llevados a cabo, constituyen barreras efectivas que reducen el número de microorganismos que quedan en el agua.

En las plantas convencionales de depuración, la sedimentación es la primera línea de tratamiento; la segunda la proporciona la filtración. La última barrera, la desinfección, desactiva los microorganismos restantes.

Un problema adicional lo constituyen los protozoos (Haas, 1987) . El ciclo de vida de los protozoos incluyen la fase de quiste, durante la cual estos organismos son especialmente resistentes a concentraciones bajas de cloro y a los tiempos de contacto que normalmente se aplican en las prácticas de desinfección del agua potable.

Para eliminar los quistes de protozoos, tales como la *Giardia* y el *Cryptosporidium* del agua es necesario el adecuado funcionamiento de los filtros, así como un pretratamiento adecuado anterior que incluya coagulación, floculación y sedimentación (Clark, 1992).

La inactivación de los quistes con un clorógeno, hace necesario el uso de altas dosis de cloro y aumentar el tiempo de contacto: por ejemplo a una temperatura de 5°C y con un pH de 6.0, son necesarios 2.0 mgr de HOCL/L durante 40 minutos, o de 1.0 mgr de HOCL/L durante 80 minutos, para inactivar el 99% de los quistes de *Giardia lamblia* (Haas, 1987).

6.4. EL PROBLEMA DE LOS DERIVADOS CLORADOS

El cloro es, desde hace 60 años, el desinfectante químico más utilizado en el mundo occidental para desinfectar el agua de consumo público.

Se ha comprobado en la rata, que el cloro no es un tóxico agudo, tras administración oral de una dosis de 850 mgr/Kg(DL50), de hipoclorito de calcio (Orme y col., 1987).

En estudios de toxicidad a corto plazo, el hígado y el riñón, parecen ser los órganos diana. En este sentido, dosis pequeñas de 143 mgr/Kg de hipoclorito de sodio administradas a ratas dieron lugar a cambios morfológicos y bioquímicos en el hígado, en un período de dos días.

Cunningham (Cotruvo, 1981) afirma que en ratas que recibieron 200 mgr/Kg y día de hipoclorito de sodio, se vió aumento del aclaramiento renal, disminución de la tyroxina y aumento del colesterol en plasma y del volumen cardíaco, en animales que consumieron de 2 a 15 mgr/L de cloro en forma de hipoclorito de sodio en agua de bebida durante tres meses.

No se han visto sin embargo, efectos clínicos en voluntarios humanos que han consumido 24 mgr/L de cloro durante 18 días.

Se necesitan nuevos estudios que confirmen la potencial carcinogenicidad del cloro para poder así determinar de forma más estricta el máximo nivel admisible del mismo.

El uso del cloro como desinfectante genera una serie de compuestos orgánicos clorados en el agua potable. Bajo determinadas condiciones, el cloro libre reacciona con determinados precursores en el agua potable produciendo un grupo de compuestos de carbono simple y halógeno sustituido que se conocen generícamente como tihalometanos totales (THMs) (Coopery col., 1987; Jolley, 1987; Oliver y col., 1981; Pereira, 1981; Scully y col., 1987).

Los THMs incluyen carcinógenos humanos sospechosos y las normativas internacionales exigen su control. El hígado y riñon se han identificado como órganos diana para los THMs en ratas ratones y perros expuestos a dosis de 60 mgr/Kg o mayores (Jolley, 1987).

Estos THMs, cloroformo, bromoformo, bromodictlorometano y dibromoclorometano, se originan por la reacción del cloro con la materia orgánica del agua en el proceso de

desinfección.

La concentración de los THMs va a depender de la presencia y concentración de los precursores, de las dosis de cloro y del tiempo de contacto, de la temperatura del agua y del pH.

En la mayoría de los casos los THMs se producen sobre todo, en aguas de superficie cloradas, pero en algunas zonas las aguas subterráneas son capaces de producir altos niveles de los mismos. Dado que los precursores importantes que reaccionan con el cloro libre se derivan de las sustancias acuáticas húmicas, es indudable que los THMs han estado presentes en los suministros de agua siempre que se ha utilizado cloro como desinfectante.

La toxicidad de los THMs no está clara del todo, pero en general es similar a la del cloroformo (Monarca y col., 1985). El efecto más notorio de la exposición a los THMs y en particular del cloroformo, es la carcinogenicidad.

El National Cancer Institute de Estados Unidos, denota un aumento de la incidencia de tumores renales en ratas macho y hepáticos en machos y hembras, cuando se les administró cloroformo por vía oral en vehículo aceitoso. Además el cloroformo ha sido implicado en la aparición de cáncer de vejiga y recto en humanos, pero los estudios a este respecto no son aún concluyentes (Murphy y Craun, 1987).

El Acta de Aguas de Bebida Seguras (Safe Drinking Water Act), promulgada por la U.S. Environmental Protection Agency (EPA), especifica los contaminantes que pueden tener un efecto adverso para la salud pública, y para cada uno de ellos, establece un máximo nivel contaminante (MCL).

En este sentido y en relación a los THMs, y especialmente al cloroformo, la EPA estableció un MCL de 100 microgramos/l, en el año 1979. Este valor no es definitivo, sino que deberá ser revisado periódicamente.

En España los parámetros de calidad del agua potable de consumo público, vienen recogidos en el Real Decreto 1138/1990 de 14 de Septiembre, publicado en el BOE 226 de

20 de Septiembre de 1990, donde se detalla la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público.

6.4.1. MUTAGENOS EN AGUAS CLORADAS

En la última década han aparecido en la literatura científica numerosas publicaciones que tratan de la presencia de actividad genotóxica en los concentrados orgánicos derivados de las aguas potables (Meier, 1988 y 1990; Cheh y col., 1980; Kool y col., 1984; Rapson y col., 1980).

Esta actividad mutagénica y genotóxica ha sido demostrada "in vitro" en los tests bacterianos.

Sin embargo, se han realizado pocos estudios para confirmar la existencia de daño genotóxico "in vivo", no teniendo evidencia o evidencias muy pequeñas, de genotoxicidad en ensayos en animales de experimentación.

Existen una serie de fuentes potenciales de mutágenos en el agua de bebida (Meier 1990); pero la cloración del agua parece ser el principal responsable de la aparición de estos compuestos en el agua potable.

Los distintos tipos de agentes mutágenos presentes en fuentes de agua contaminada son sustancialmente diferentes de aquellos que se forman por la cloración de aguas no contaminadas (Meier y col., 1982 y 1983).

Loper en 1984, sugirió que la mutagénesis derivada de fuentes de aguas contaminadas con residuos industriales o de la agricultura (Heartlein y col., 1981), depende de la activación microsomal, mientras que aguas no contaminadas y por lo tanto no mutagénicas en principio, muestran actividad mutagénica directa tras la cloración, la cual disminuye en presencia de S9 mix (fracción microsomal de hígado de rata) utilizado como cofactor enzimático en el test de Ames.

Dada la preocupación existente sobre la presencia de mutágenos considerados como posibles carcinógenos y como agentes inductores de mutaciones hereditarias, ha surgido una importante cuestión sobre si la exposición crónica a lo largo de la vida a los mutágenos químicos contenidos en el agua de consumo, supone un riesgo para la salud (Crump, 1981; Glatz y col., 1978).

Otra pregunta todavía sin respuesta es si los promutágenos en fuentes de agua contaminadas, los cuales son activados por las enzimas hepáticas, plantean un mayor riesgo que los mutágenos directamente activos, formados durante la cloración, y que son inactivados por las preparaciones enzimáticas hepáticas.

Como un primer paso hacia un mejor conocimiento del riesgo para la salud de estos agentes, un grupo de investigadores (Meier y col., 1982) se han propuesto identificar cuáles son los agentes químicos responsables de la actividad mutagénica observada en los concentrados de aguas de consumo público.

Desafortunadamente, la tarea de atribuir niveles mutagénicos a contaminantes químicos específicos se ha mostrado muy dificultosa.

Dada la amplia variación en la potencia mutagénica de las distintas sustancias químicas, la actividad mutagénica del agua potable puede ser debida a la acción acumulada de un gran número de compuestos, o puede atribuirse principalmente a unos pocos compuestos pero de gran potencia (Meier, 1990).

Una confirmación de la última posibilidad, ha venido tras la identificación en los últimos años del 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)furanona (MX), como un importante componente mutagénico del agua potable desinfectada con cloro (Kromberg y col., 1987 y 1988; Backlund y col., 1989; Holmbom y col., 1987).

El MX es un potente y directo mutágeno en el test de Ames, que no necesita activación metabólica, produciendo una respuesta de alrededor 13000 his+ revertantes/nmol con la cepa TA 100 del test de Ames (Meier, 1990).

En tres estudios distintos en USA en fuentes de agua potable, se ha estimado que la contribución a la actividad mutagénica del MX fue del 15%, 33% y 34% respectivamente, aunque los niveles de hecho de MX presentes en el agua problema fueron sólo de entre 2 a 34 ngr/L (Tabla I) (Meier, 1990).

Incluso con un protocolo de aislamiento y fraccionamiento adecuado, el MX resultó ser un componente minoritario al final del proceso de fraccionamiento con HPLC.

A pesar de las dificultades analíticas, el MX ha sido identificado y cuantificado en un total de 37 muestras de agua potable en los Estados Unidos, Finlandia y Gran Bretaña, a las que nos hemos referido y que vienen recogidas en la Tabla I.

Se estima que esta sustancia es responsable de entre el 5 y el 60% de la mutagenicidad total con un valor medio del 30% en el estudio de Kromberg y Vartianen (Kromberg y Vartianen, 1988).

Por otro lado, Kromberg y col.(1984 y 1988), han puesto de manifiesto la existencia del isómero E-2-cloro-3-(diclorometil)-4-ácido oxobutenoico (E-MX) en fracciones mutagénicas de aguas de bebida cloradas, así como de otros isómeros de MX (formas abiertas y cerradas Z y E), los cuales todos juntos contribuyen a menos del 10% de la actividad mutagénica total.

Todas estas formas isoméricas tienen diferentes actividades mutagénicas y diferente estabilidad química, y pueden interconvertirse dependiendo del pH, lo cual podría explicar los patrones de estabilidad-inestabilidad observados.

La cuestión de si el MX o cualquier otro derivado clorado representa un riesgo real para la salud permanece sin resolver. En general la hipótesis que emerge de estudios con concentrados de agua de bebida, materiales húmicos clorados y varias clases de productos desinfectantes, es que estas sustancias son genotóxicas de acción directa (in vitro) pero no genotóxicas para animales tras su administración oral (Christman y col., 1980; Coleman y col., 1980; Dolara y col, 1981; Eriksson y col., 1979; Glaze y col., 1979; Horth y col.,

ESTUDIO	PAIS	Nº MUESTRAS AGUA	CONCENT. MX (ng/l)	% CONTRIBUCION MUTAGENICIDAD*
HEMING et al 1986	FINLANDIA	2	20-61	5-20
MEIER et al 1987	USA	3	2-33	15-34
KROMBERG et al 1988	FINLANDIA	26	5-67	15-57
HORTH et al 1989	GRAN BRETAÑA	8	2-29	30-60

* Basado en resultados con la cepa TA100 (-S9) de *S. typhimurium*

TABLA I. CONTRIBUCION DEL MX A LA MUTAGENICIDAD DE AGUA DE CONSUMO.

1987; Kopfler y col., 1984; Oliver, 1988).

Lo que si parece claro, es que a temperatura y pH similares a los del tratamiento del agua, la vida media de MX y otros mutágenos, puede ser de hasta 4,6 días. Por lo tanto una parte importante de estos compuestos va a persistir a través del sistema de distribución.

La cloración a altas concentraciones de aguas de bebida genera también compuestos del tipo de los ácidos di y tricloroacético, y del cloroformo, que no parecen ser genotóxicos pero que sin embargo se ha visto que inducen tumores hepáticos en el ratón en estudio de carcinogenicidad a largo plazo (Loper y col., 1987).

Thompson (1985) ha recopilado datos de 216 agentes con test tanto "in vivo" como "in vitro", que indican que una respuesta negativa "in vitro" es altamente predictiva de la respuesta "in vivo"; de la misma manera que una respuesta positiva "in vitro" es altamente predictiva de lo que ocurrirá "in vivo".

Las diferencias entre los resultados "in vitro" e "in vivo", pueden explicarse de varias maneras: uno de los factores, la activación metabólica es una posibilidad altamente probable para explicar la falta de respuesta genotóxica en médula espinal de ratones, por productos derivados de la cloración (Tikkanen y Kromberg, 1990).

Muchos estudios han mostrado que los mutágenos directos se inactivan de forma sustancial por el S9. La metabolización por la fracción microsomal puede prevenir que la forma activa del compuesto se distribuya por el organismo y alcance a diferentes tejidos corporales.

Estudios "in vitro" han demostrado que el MX puede inactivarse como mutágeno por el glutatión y esto puede ser de interés para su detoxificación "in vivo"(Meier et al. 1989).

Wilcox y Williamson (1986) han encontrado que la presencia de suero en el medio de tratamiento, disminuye la actividad clastogénica de extractos de agua de bebida sobre cultivos de células de mamífero.

Esto puede querer decir que aparte de la ingestión, los compuestos mutagénicos pueden relacionarse con los constituyentes del suero durante el transporte y la distribución por el organismo.

Las células del tracto gastro-intestinal, son el primer contacto con estas sustancias, pero probablemente tienen mayor tropismo por las células de la médula ósea, ocasionando en ellas daño genotóxico inducido por los derivados clorados.

Recientes trabajos han demostrado así mismo, que MX provoca daños en las células del estómago de ratas e inducen anomalías nucleares en células duodenales del ratón (Loper y col., 1979).

Los resultados positivos de los estudios "in vitro", la evidencia limitada de estudios de carcinogenicidad en animales de experimentación, la demostración de actividad genotóxica de un número de agentes derivados de la cloración por productos, y los resultados de estudios epidemiológicos, tienden en conjunto a sugerir que la exposición a productos clorados en aguas de bebida debería controlarse y en lo posible minimizarse.

6.5. ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

Desde 1974 se han llevado a cabo en EEUU y en otras naciones, una serie de estudios epidemiológicos destinados a evaluar la relación existente entre el cáncer y la calidad del agua potable de consumo público (Craun, 1984).

Dado lo extendido de la exposición a derivados clorados y que las investigaciones experimentales apuntan hacia la posible acción carcinogénica de los mismos, la mayoría de de los estudios se centran en la cloración del agua de bebida (Peto, 1977; Roberts, 1987; Stevens y col., 1978).

Como medida de la exposición a los derivados clorados, fundamentalmente THMs, se ha utilizado la información histórica sobre fuentes de agua y prácticas de desinfección, así como también los niveles actuales de THMs en las poblaciones de estudio.

6.5.1. ESTUDIOS ECOLOGICOS

La mayoría de los primeros estudios epidemiológicos que se realizaron sobre aguas potables, eran estudios ecológicos, ya que solamente disponían de información sobre cáncer y uso de aguas cloradas globalmente para grupos de población.

El subcomité de epidemiología del Comité de Agua Potable Segura de la Academia Nacional de Ciencias de EEUU, revisó los estudios descriptivos de tipo ecológico realizados hasta 1978. Nueve de diez estudios de este tipo, encontraron asociaciones entre el consumo de aguas cloradas y , o bien la incidencia de cáncer o la mortalidad por esta causa, mientras que tres estudios encontraron asociación entre los niveles de THMs y la mortalidad por cáncer (Craun, 1984).

Sin embargo, estos estudios tienen un valor limitado porque al ser estudios ecológicos no es posible interpretar si la relación observada es el resultado de la exposición al agua clorada o bien a otros agentes que no han sido valorados.

La revisión efectuada por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos llegó a la conclusión de que la vejiga, el estómago, el intestino grueso y el recto, fueron los órganos diana para la aparición del proceso canceroso.

Dicha entidad exige además un estudio más profundo y recomendó que se realizaran estudios epidemiológicos analíticos.

6.5.2. ESTUDIOS ANALITICOS

Tanto los estudios de casos y control como los estudios longitudinales o de cohortes relativos a la asociación entre la exposición a agua clorada y la aparición de un proceso tumoral, exigen una valoración de las exposiciones previas a lo largo de la vida del individuo dado el largo período de latencia necesario para el desarrollo del cáncer.

Wilkins y Comstock (Craun, 1984) estudiaron tres cohortes históricas cada una de ellas con un grado diferente de exposición al cloroformo y a otros derivados clorados. La

incidencia del cáncer de vejiga y de hígado en la cohorte expuesta resultó ser prácticamente el doble con respecto a los sujetos que consumían agua de bebida no clorada. No obstante, los resultados no fueron concluyentes dado que las cohortes no eran del todo homogéneas y la pequeña tasa de incidencia de cáncer en estas poblaciones.

La revisión de cinco estudios de casos y control realizada en 1981 (Craun, 1984), llegaba a la conclusión de que la información aportada por estos reforzaba la asociación postulada entre el cáncer de recto, colon y vejiga y la cloración del agua de consumo. No se pudo sin embargo establecer relación causal entre consumo de agua clorada y cáncer.

Dos estudios recientes han utilizado la metodología de casos y control para investigar dicha asociación. Cragle (Cragle y col., 1987) realizó un estudio sobre cloración de agua y cáncer de colon en Carolina del Norte, con 200 enfermos y 407 controles sin historia familiar de pólipos, colitis ulcerosa o cualquier otra enfermedad intestinal crónica. Tanto los casos como los controles habían residido en el mismo Estado durante al menos 10 años. Se tuvieron en cuenta además otras variables potencialmente confusoras como consumo de alcohol, dieta, región geográfica, educación etc.

Se concluyó que la asociación existente entre consumo de agua clorada y cáncer de colon tenía una gran relación con la edad (mayor riesgo relativo en aquellos que consumieron dicho agua durante 16 años o más). Pero sólo se comprobó asociación estadísticamente significativa, controlando los posibles factores de confusión, para aquellas personas con edades superiores a los 60 años.

Cantor et al. (Craun, 1984) informaron de los resultados de un estudio realizado por USEPA (Agencia de protección del Medio Ambiente) y el Instituto Nacional del Cáncer, sobre la asociación existente entre la cloración de agua y el cáncer de vejiga.

El estudio incluyó a 2982 casos que residían en 10 Estados de los Estados Unidos y 5782 controles emparejados con los casos teniendo en cuenta sexo, edad, y zona de estudio. Se realizó además, análisis de regresión logística para controlar los posibles factores de

confusión.

El riesgo relativo sólo fue estadísticamente significativo para los no fumadores que habían residido 60 años o más en la zona de estudio y había consumido agua clorada. En este caso el riesgo de cáncer de vejiga resultó ser más del doble ($RR=2,3$) respecto de aquellos que residían en áreas abastecidas por agua no clorada.

Recientemente Cantor (Cantor y col., 1981 y 1984) ha informado de otros análisis realizados a nivel nacional por USEPA-NCI, en los que se mantiene la asociación para aquellos consumidores de agua desinfectada con cloro durante al menos 40 años y la aparición del cáncer de vejiga.

Para confirmar la asociación entre consumo de agua clorada y cáncer de vejiga y colon, la Universidad de Iowa junto con el NCI iniciaron un estudio de casos y controles apareados, en 1986. Como parámetros de valoración de la calidad del agua desinfectada con cloro se midieron los THMs, el carbono orgánico total, el pH, la temperatura, los sólidos disueltos totales y los nitratos. Dicho estudio continúa realizándose en la actualidad (Isacson y col., 1981).

Lynch y col. (Craun, 1984) realizó un análisis por separado de los datos proporcionados por el Estado de Iowa y observó mayores RR de cáncer de vejiga cuando el análisis comparaba sólo a poblaciones que consumían agua potable que había sido clorada antes de ser filtrada, con respecto a aquellas poblaciones que consumían agua no clorada. Por supuesto, se trata de aguas en las que los THMs suelen ser superiores.

Young y col.(1981), informaron de la asociación entre la mortalidad originada por cáncer de colon en Wisconsin y la exposición a THMs secundaria cloración del agua, estimada ésta por la dosis media diaria de cloro en el agua durante un período de 20 años.

Dado que no se dispuso de datos sobre los niveles pasados de THMs, y estos se estimaron utilizando un modelo estadístico predictivo basado en los niveles cuantitativos actuales de THMs no se puede establecer la responsabilidad directa de los mismos en la

aparición del cáncer de colon.

Dado que los niveles de THMs en estos suministros de agua de Wisconsin eran en el momento del estudio generalmente bajos (un 98% de las muestras tenían concentraciones de THMs inferiores a 100 gr/l) y dado que las aguas estudiadas han podido estar contaminadas con compuestos orgánicos volátiles sintéticos se realizó un nuevo estudio para examinar las exposiciones de la población a estos contaminantes orgánicos. Los datos preliminares muestran riesgos relativos estimados superiores ($RR=1,6-2,4$) de incidencia de cancer de colon en poblaciones expuestas al tetracloroetileno, tricloroetileno y 1,1,1- tricloroetano de las aguas municipales (Craun, 1988).

Por otro lado dado que la desinfección del agua por medio de la utilización de cloraminas ha probado no producir THMs se ha realizado un estudio en Massachussetts donde desde 1938 se utiliza la combinación de cloro y amoníaco para desinfectar el agua de superficie suministrada a la mayoría de las comunidades de la zona metropolitana de Boston (Flanagan y col., 1979).

Una valoración realizada recientemente sobre mortalidad por cáncer de vejiga mostró un ligero aumento de éste en la población de Massachussetts que consumió agua de superficie desinfectada con cloraminas en comparación con poblaciones que no usaron este medio de desinfección. Al comparar los resultados de este estudio con respecto a los realizados entre sujetos que consumen agua clorada se comprobó que el riesgo de mortalidad por cáncer de vejiga entre los consumidores de agua clorada era el triple que el de los consumidores de agua desinfectada con cloraminas (Craun, 1988).

Estos hallazgos sugieren una posible asociación de los THMs con el cáncer de vejiga, pero no proporciona una evidencia directa de ello. Sin cálculos exactos de exposiciones previas a THMs y a otros contaminantes del agua, los resultados obtenidos hasta la fecha deben interpretarse sólo en términos de exposición global al agua clorada. Aunque los THMs puedan estar asociados, con los datos que tenemos hasta ahora también podrían estarlo otros subproductos clorados o contaminantes del agua (Buncher y col., 1977).

Ante todos estos hallazgos, la pregunta que cabe hacerse es ¿qué proporción de cánceres podría atribuirse a la exposición al agua potable desinfectada con cloro si la relación fuese causal?. La respuesta depende de la conclusión de los estudios en realización y del inicio de trabajos futuros más detallados y estrictos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El propósito de esta Tesis es:

1. Comprobar la existencia de actividad mutagénica en muestras de aguas de consumo público de una comunidad mayor de 100.000 habitantes, por medio del test de Ames.
2. Valorar, en caso de comprobarse que existe dicha actividad, si esta mutagenicidad se debe a los concentrados orgánicos clorados, generados en el proceso de desinfección del agua.
3. Evaluar si dicha mutagenicidad depende o no, de la presencia o ausencia de la activación microsomal (S9).
4. Determinar los índices de mutagenicidad correspondientes.

MATERIAL Y METODOS

PROCEDIMIENTOS DEL TEST DE AMES

I. MATERIAL BIOLOGICO

1.1. CEPAS DE ENSAYO

En el test de mutagénesis se usa una colección de cepas de *Salmonella* histidina dependientes. Todas ellas derivan originalmente de *Salmonella typhimurium* LT2 y poseen un tipo de mutación distinto en el operón histidina, de forma que requieren histidina en el medio de crecimiento porque son incapaces de sintetizarla.

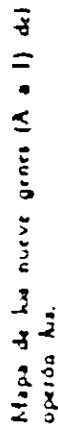
Las diferencias específicas entre las cepas viene marcada por la mutación en el operón de la histidina (Maron y Ames, 1983) (Figura 3).

Además de esta mutación, las cepas de ensayo poseen otras que aumentan su eficacia para detectar mutágenos.

Una de ellas, es la **rfa**, que causa pérdida parcial de la barrera de polisacáridos que protegen la superficie de la bacteria, causando un aumento de la permeabilidad para las moléculas voluminosas que normalmente no podrían atravesar la pared celular normal.

La mutación **uvrB**, causa la delección de un gen que codifica el sistema de escisión repair para DNA. Puesto que esta región es necesaria para que se pueda dar la reparación por escisión, la eliminación de la misma implica la desaparición de este mecanismo de reparación en las cepas mutantes, confiriéndoles un aumento de sensibilidad para detectar agentes mutagénicos.

Por razones técnicas esta delección se extiende al "bio" gen y como consecuencia estas cepas necesitan biotina para su crecimiento. Por último, algunas cepas poseen el plásmido **factor R pKM 101**, el cual les confiere resistencia al antibiótico Ampicilina y aumenta la mutación espontánea e inducida al incrementar el sistema de reparación con error, normalmente presente en estos organismos. Estas cepas con factor R revierten mejor que las cepas de las cuales proceden, detectando mejor los factores mutagénicos.



Ames and Hartman, 1974

FIGURA 3. MAPA GENETICO DEL OPERON DE LA HISTIDINA

En la Tabla II, se indican los genotipos de las cepas de *Salmonella* diseñadas para el test de mutagénesis.

Todas las cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en este ensayo, han sido cedidas por el Dr. B.N. Ames, Department of Biochemistry, University of California.

En este ensayo se han utilizado las cepas recomendadas por Ames para ensayos generales de mutagenicidad, TA98, TA100, TA1535 y TA1538.

1.1.1. *Salmonella typhimurium* Cepa TA 98

Características: his D3052, rfa, uvrB⁻, R.

Es un mutante his D3052, con las mismas características genotípicas de la cepa TA 1538 de la que deriva, diferenciándose en la presencia del plásmido PKM 101 (factor R), que le confiere resistencia a la ampicilina y aumenta la probabilidad de error durante la duplicación del ADN. Es un mutante sensible a los mutágenos "frameshift" (una base es añadida o deleccionada, causando un desplazamiento en el marco de lectura o desfase genético).

1.1.2. *Salmonella typhimurium* Cepa TA 100

Características: his G46, rfa, uvrB⁻, R.

Es un mutante G46, con las mismas características genotípicas de la cepa TA 1535 de la que procede, diferenciándose en la presencia del plásmido PKM 101 (factor R).

Es una cepa sensible a los mutágenos que causan sustituciones de bases.

1.1.3. *Salmonella typhimurium* Cepa TA 1535

Características: his G46, rfa, uvrB⁻.

Es un mutante his G46, que presenta una sustitución de una base haciendo imposible la biosíntesis del aminoácido histidina.

Esta cepa se utiliza para detectar mutágenos que produzcan sustituciones de pares de bases, como son los agentes alquilantes.

CEPA	MUTACION OPERON HISTIDINA	TIPO MUTACION DETECTADA	SISTEMA REPARACION	LPS	PLASMIDO
TA1535	hisG46	Sustitución pares bases (G-C)	Δ uvrB	rfa	-
TA1538	hisD3052	Desplazamiento lectura afecta dos pares bases (G-C)	Δ uvrB	rfa	-
TA100	hisG46	Sustitución pares bases (G-C)	Δ uvrB	rfa	pkM101
TA98	hisD3052	Desplazamiento lectura afecta dos pares bases (G-C)	Δ uvrB	rfa	pkM101

TABLA II. CARACTERISTICAS GENETICAS DE LAS CEPAS DE *S. typhimurium*.

Es además una cepa deficiente en el mecanismo de escisión a reparación (uvrB), y posee una mutación rfa que hace a las bacterias más permeables a las macromoléculas.

1.1.4. *Salmonella typhimurium* Cepa TA 1538

Características: his D3052, rfa, uvrB.

Es un mutante his D3052, resultado de la delección de un par de bases, cuya reversión al fenotipo salvaje his+, la efectúan mutágenos que deleccionan dos pares de bases adyacentes, situadas en una zona próxima a la mutación que posea una secuencia repetitiva -C-G-C-G-C-G-, de forma que queda restaurado el marco de lectura original.

Se trata por tanto de una mutación "frameshift".

1.2. FRACCION MICROSOMAL DE HIGADO DE RATA (S9)

1.2.1. Fracción S9

Esta preparación se obtuvo de IFFA CREDO, que la comercializa como "S9 Fraction". Tanto el transporte como la conservación ulterior debe hacerse sin que las cepas pierdan la temperatura adecuada.

Se utilizan ratas macho "SD-OFA", con un peso medio de 200 gramos, mantenidas con pienso y agua "ad libitum".

Como inductor enzimático se emplea Aroclor, administrado a una concentración de 500 mg por Kg de peso, durante la semana anterior al sacrificio.

Una vez sacrificados los animales se extraen los hígados y se centrifugan 10 minutos a 9.000 revoluciones. El sobrenadante se decanta y es lo que se denomina fracción S9.

Las fracciones S9 frescas se distribuyen en viales de plástico de 1 ml y se congelan rápidamente a -80°C.

1.2.2. S9- mix (S9+)

La solución se prepara inmediatamente antes de su uso. Se añaden por orden, las siguientes preparaciones:

* Fracción Microsomal S9	3,0 ml
* NADP (0,1 M)	0,4 ml
* G-6-P (0,1 M)	0,5 ml
* Cl ₂ Mg (0,1 M)	0,5 ml
* ClK (0,33 M)	1,0 ml
* Cl ₂ Mg (0,1 M)	0,5 ml
* Buffer Fosfato (0,2 M)	4,6 ml

II. METODOS

2.1. OBTENCION Y CONSERVACION DE LAS CEPAS

Trás la recepción de la cepas se procede inmediatamente a efectuar subcultivos, para su almacenamiento y posterior aplicación en el método operatorio rutinario.

Las líneas microbianas utilizadas no son salvajes. Poseen varias mutaciones para hacerlas más sensibles, con vistas a evaluar posteriores mutaciones.

Como resultado de lo anterior, no son cepas estables, y los métodos de almacenaje convencionales en microbiología no son los más adecuados.

En éste caso, lo que se hace es obtener subcultivos en fase estacionaria en caldo nutritivo, a 37°C durante 24 h, en baño con agitación. Estos subcultivos se reparten alícuotamente en tubos estériles Nunc, a los que previamente se les a añadido 0,09 ml de DMSO, por ml de cultivo, que actúa como agente crioprotector.

Después los criotubos se etiquetan indicando cepa y fecha de preparación y se mantienen en hielo picado, hasta su congelación; después se conservan en arcón congelador, a -80°C hasta su utilización (aunque teóricamente pueden mantenerse así viables durante años, se recomienda no pasar de 2 años).

Al mismo tiempo que se preparan los congelados permanentes, y para la obtención de "stocks" bacterianos, se rayan placas de agar nutritivo a partir de un cultivo en fase estacionaria. Estas placas llamadas placas "master", se incuban en estufa a 37° durante 24h.

Después se guardan en el frigorífico a 4°C, donde pueden conservarse hasta un mes. Una sola colonia de estas placas puede servir para obtener nuevos subcultivos.

2.2. VERIFICACION DE LAS CARACTERISTICAS GENOTIPICAS DE LAS CEPAS

Es esencial verificar periódicamente que las características de las cepas no han sufrido modificaciones, es decir, realizar un control de calidad de las bacterias, para lo cuál se efectúan los siguientes controles:

- a. Inmediatamente después de recibir las cepas
- b. Cuando se preparan congelados permanentes
- c. Cuando aumenta el número de revertientes espontáneas
- d. Cuando hay pérdida de sensibilidad a los mutágenos estandar

2.2.1. CONCENTRACION CELULAR

Se diluye un cultivo en fase estacionaria (obtenido por incubación en caldo nutritivo durante 12-16 h en oscuridad), usando pasos de dilución de 1 en 10 en tampón salino o en caldo nutritivo; se agitan los tubos diluídos en todos los pasos para evitar el agrupamiento de células.

Se vierten 0,1 ml de la dilución 10^{-6} en placas de agar nutritivo vehiculados en 2 ml de agar blando de superficie. Las placas posteriormente se incuban durante 24h en estufa a 37°C.

Dado que se considera que un cultivo de noche tiene aproximadamente 1-2 por 10^9 células/ml, transcurrido el período de incubación habrá aproximadamente 100- 200 colonias por placa y no debería existir contaminación alguna.

2.2.2. FRECUENCIA DE REVERSION ESPONTANEA

Existen unos intervalos estandard de mutación espontánea y un experimento solo será aceptable si los valores de control negativo están dentro de éstos límites (Maron y Ames, 1983).

La reversión espontánea de las cepas independientes frente a la histidina, se expresa por el número de colonias revertidas espontáneamente por placa. Estas colonias se ven claramente, ya que asientan sobre el fondo opaco producido por el crecimiento de las bacterias auxotrofas.

Cada cepa revierte espontáneamente con unas frecuencias características, que según De Serres y Shelby (1979), son:

- Cepa TA 1535: entre 5 y 50
- Cepa TA 1538: entre 5 y 40
- Cepa TA 98: entre 15 y 75
- Cepa TA 100: entre 60 y 220

Una desviación que esté obviamente fuera del rango aceptable, indicará la necesidad de comprobar las características genéticas de la cepa cuestionada.

Una tasa muy elevada indica contaminación o acumulación de retromutantes, en cuyo caso la cepa debe reaislarse del cultivo permanente.

La tasa de reversión espontánea viene también influenciada por la concentración de histidina y por tanto, fluctuaciones en el contenido de histidina del top agar se reflejarán en las correspondientes variaciones del número de revertientes por placa.

También la presencia de mutágenos en el ambiente puede elevar el número de revertantes por placa.

Procedimiento

Se añade 0,1 ml de cultivo bacteriano en fase estacionaria, a 2 ml de agar blando; se mezcla y se vierte en la superficie de una placa de agar glucosado. Si el ensayo se realiza con activación metabólica, se añaden además al tubo de agar blando 0,5 ml de mezcla S-9; se deja solidificar y se incuban en estufa a 37°C durante 48 h. Finalizado el período de incubación, se cuentan las colonias revertidas en cada placa y si no se encuentran dentro del intervalo adecuado, es decir están fuera del rango de reversión espontánea que correspondiente a la cepa, deben desecharse los "stocks" bacterianos.

2.2.3. RESPUESTA ANTE TESTIGOS POSITIVOS

Se realiza para confirmar la sensibilidad de las cepas bacterianas ante mutágenos conocidos. En nuestro ensayo los controles positivos se han realizado con las siguientes sustancias:

- En el ensayo **sin activación metabólica**:
Cepa TA1535, Azida sódica ($1,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)
Cepa TA1538, 2-Nitrofluoreno ($2,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)
Cepa TA98, 2-Nitrofluoreno ($2,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)
Cepa TA100, Azida sódica ($1,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)
- En el ensayo **con activación metabólica** se ha empleado en todos los casos 2-Aminofluoreno (1×10^{-2} mg/placa).

Procedimiento

Se procede como en el caso anterior pero añadiendo además 0,1 ml del control positivo en el tubo de agar blando.

2.2.4. SENSIBILIDAD A LA LUZ ULTRAVIOLETA (UV)

La mutación *uvrB* se puede confirmar demostrando la sensibilidad a las radiaciones ultravioleta en las cepas que contienen esta mutación.

Procedimiento

Se rayan diversas placas de agar nutritivo con las diferentes cepas. Se cubre la mitad de cada placa rayada con un cartón y se irradia la placa con una lámpara de luz ultravioleta a una distancia de 33 cm durante 6 segundos para las cepas TA 1535 y TA 1538 y durante 8 segundos para las cepas TA 98 y TA 100. Posteriormente se retira el cartón y se incuban las placas a 37°C durante 24 horas, apareciendo crecimiento solo en la zona de la placa no irradiada.

2.2.5. RESISTENCIA A LA AMPICILINA

Se realiza para confirmar el plásmido pKM 101, ya que éste les confiere a las bacterias la propiedad de hacerlas resistentes a la ampicilina.

Procedimiento

Se añaden 0,1 ml de cultivo en fase estacionaria a un tubo con 2 ml de agar blando y se vierte sobre placas de agar nutritivo, se deja secar y se deposita en la placa un disco que contiene 10 mcg de ampicilina. Se incuba 24 h en estufa a 37°C, y transcurrido el tiempo de incubación las cepas sensibles a la ampicilina (carecen del Factor R) presentarán un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco (TA 1535 y TA 1538), y las cepas TA 98 y TA 100 que son resistentes a la misma, tendrán un crecimiento normal sin halo de inhibición (confirmación de la existencia del Factor R)

2.2.6. RESISTENCIA AL CRISTAL VIOLETA

Se utiliza para detectar la presencia del factor R.

Procedimiento

En placas de agar nutritivo conteniendo 0,1 ml de cultivo de noche vehiculado en agar blando, se coloca un disco de papel de filtro estéril, impregnado con una solución de cristal violeta de concentración 1 mg/ml, en el centro de la placa. Después de incubación en estufa a 37°, durante doce horas, se observa una zona de inhibición alrededor del disco confirmando la presencia del factor rfa.

2.2.7. MEDIDA DE LA SUPERVIVENCIA BACTERIANA

La medida de la supervivencia en el test de Ames es muy importante para valorar si la toxicidad de los compuestos de ensayo juega un papel significativo. Por ello Anderson y col., en 1984, propusieron realizar un ensayo de toxicidad paralelamente al ensayo de incorporación en placa.

Procedimiento

En placas de agar nutritivo, se vierte agar líquido, suplementado con histidina, al que previamente se añaden 0,1 ml de la dilución 10^{-6} de la cepa y 0,1 ml de la solución del compuesto a ensayar.

2.3. OBTENCION DEL CULTIVO EN FASE ESTACIONARIA

Es lo que se conoce con el nombre de cultivo de noche.

Procedimiento

Un matraz que contenga 100 ml de caldo nutritivo se reparte en frascos estériles con tapón de rosca, a razón de 5 ml por frasco. Se utilizan dos frascos por cepa y otros dos se dejan como testigos. A continuación de los tubos congelados que contienen las cepas, se extrae por raspadura con una cucharita estéril, una porción congelada de la cepa y se incuba en el caldo nutritivo. Los frascos se preservan de la luz

envolviéndolos en papel de aluminio y se sumergen en baño con agitación a 37°C durante 12-16 horas; transcurrido éste tiempo se sacan del baño y se guardan en el frigorífico a 4°C, hasta el momento de la siembra.

2.4. ENSAYO DE MUTAGENICIDAD

El ensayo de mutación con *Salmonella typhimurium*, puede realizarse mediante dos métodos:

- a. Método de preincubación
- b. Método de incorporación en placa

Se ha elegido el segundo de éstos métodos, que en síntesis consiste en que tanto las distintas cepas bacterianas como la sustancia problema se mezclan con top agar o agar blando, y se vierten en una placa de agar glucosado; dicho método viene esquematizado en la Figura 4.

Este método se ha realizado con dos variantes:

1. Con incorporación de activación enzimática S9-mix (S9+)
2. Sin incorporación de activación enzimática (S9-)

Las cepas bacterianas se han cultivado a 37°C hasta el final de la fase estacionaria de crecimiento. La densidad celular osciló entre 1-2 por 10^9 células por ml.

Esta densidad elevada es necesaria por lo siguiente:

- El número de **revertientes espontáneos** para cada cepa, dependen del número de histidin-auxótrofos que crezcan a las 48 horas de incubación. Este número viene determinado por la concentración de histidina del agar, y es independiente dentro de los límites (10^5 a 10^9 células) del número de bacterias del inóculo inicial.

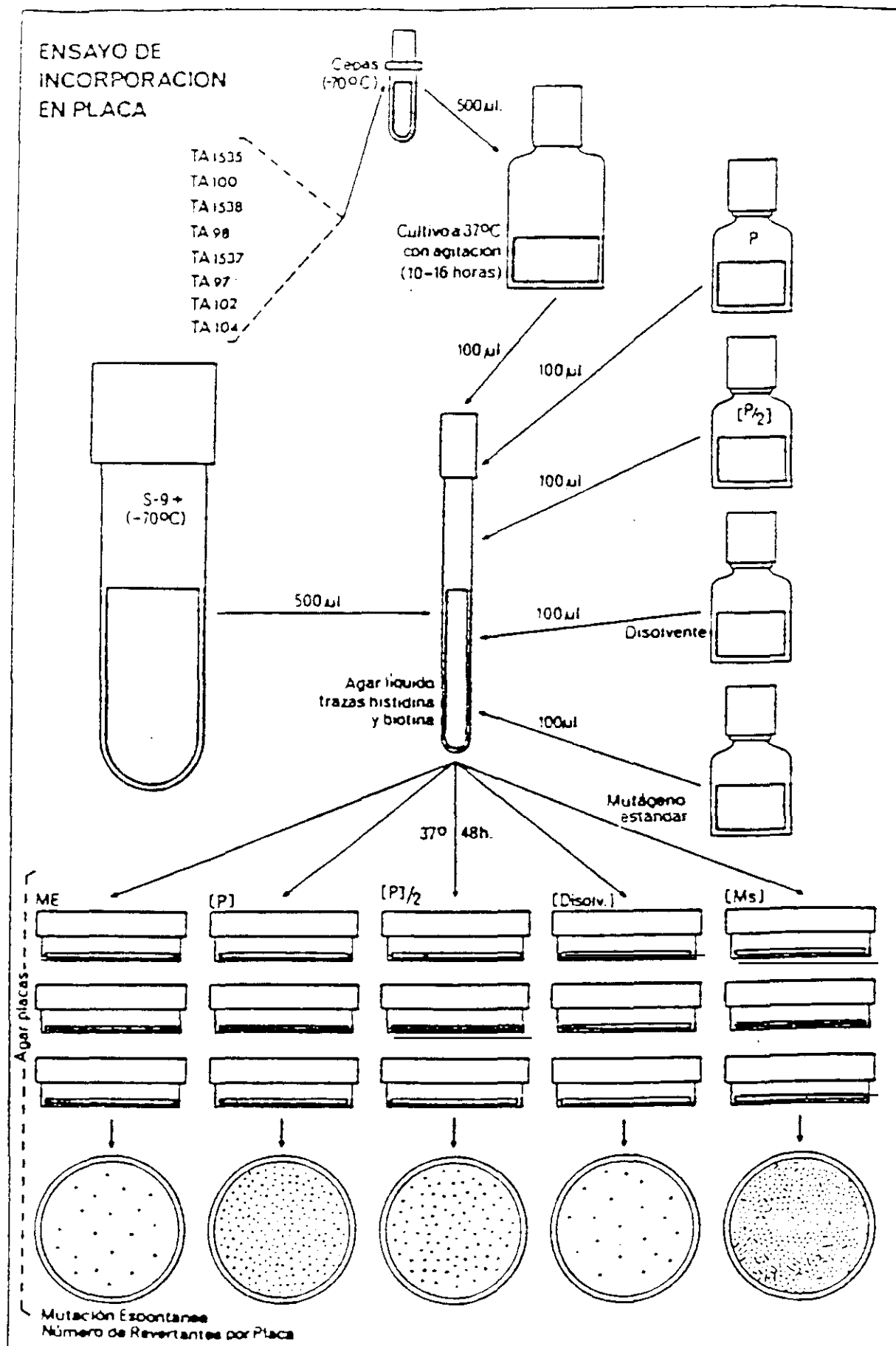


FIGURA 4. ESQUEMA DEL ENSAYO DE INCORPORACION EN PLACA

- El número de **revertientes inducidos** depende del inóculo inicial, y puesto que la frecuencia de mutaciones es baja, es esencial usar poblaciones de título elevado para poder detectarla. Si el inóculo es bajo, el número de revertientes espontáneos podría ser normal, pero el número de los inducidos por el mutágeno podría ser menor e incluso pasar inadvertida.

2.4.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PROBLEMA

Las muestras de agua que van a ser ensayadas, deben ser previamente filtradas por membrana de Millipore con poro de 0,2 μ m, para garantizar su esterilidad.

Procedimiento

A 100 ml de top agar licuado a una temperatura de 45°C , se incorporan 10 ml de la solución estéril de Histidina-Biotina, se agita y se distribuyen en tubos estériles a razón de 2 ml por tubo, manteniéndose en un baño a 45°C.

En el ensayo sin incorporación de S9, a los tubos de 2 ml de agar blando se les añade 0,1 ml de la sustancia problema y 0,1 ml del cultivo bacteriano fresco (en fase estacionaria).

Para los ensayos con activación metabólica (S9+), se añade al agar blando 0,5 ml de la mezcla de activación enzimática.

El contenido de cada tubo se mezcla y se vierte en la superficie de una placa de agar glucosado.

El agar se deja solidificar y las placas se incuban a 37°C durante 48-72 horas. Finalizado el período de incubación, se cuentan el número de UFC revertidas en cada placa. Cada placa utilizada en el ensayo ha sido realizada por triplicado.

Los resultados se consideran positivos, si la muestra estudiada produce una media de colonias que sobrepasa en el doble a la media de las que se producen en las placas control. Deben incluirse en el ensayo controles positivos y negativos.

2.4.2. ENSAYO CON FRACCION MICROSOMAL (S9+)

En cada ensayo se realizan los siguientes grupos:

A. Control negativo: 0,1 ml de cepa

0,5 ml de S9

B. Control con disolvente:

0,1 ml de cepa

0,5 ml de S9

0,1 ml de DMSO (disolvente)

C. Control positivo:

0,1 ml de cepa

0,5 ml de S9

0,1 ml de mutágeno estandar

D. Test:

0,1 ml de cepa

0,5 ml de S9

0,1 ml de muestra problema

2.4.3. ENSAYO SIN FRACCION MICROSOMAL (S9-)

A. Control negativo:

0,1 ml de cepa

B. Control con disolvente:

0,1 ml de cepa

0,1 ml de DMSO

C. Control positivo:

0,1 ml de cepa

0,1 ml de mutágeno estandar

D. Test:

0,1 ml de cepa

0,1 ml de muestra problema

2.5. CONTROLES DE ESTERILIDAD DE LOS ENSAYOS CON *Salmonella typhimurium*

En cada ensayo deben además realizarse los siguientes controles encaminados a garantizar y comprobar la esterilidad de los medios utilizados:

1. Dos tubos de agar blando con 0,5 ml de fracción microsomal se decantan en sendas placas de agar glucosado y se incuban en estufa durante 48-72 horas, a 37°C.
2. Dos tubos de agar blando, se mezclan con el DMSO que se utilizó para disolver las muestras y se decantan en placas de agar glucosado. Se incuban en estufa a 37°C durante 48-72 horas.
3. Dos tubos que contienen agar blando que provienen del mismo matraz que los empleados en la siembra se introducen en el mismo baño a 45°C y se extienden al final de la siembra en placas de agar glucosado, que se incuban junto con las placas inoculadas, hasta el momento de la lectura.
4. Dos placas de agar glucosado de la misma fecha de realización que las empleadas para la siembra, son asimismo incubadas en estufa a 37°C durante las 48-72 horas.

III. MATERIAL DE LABORATORIO

3.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

3.1.1. REACTIVOS

Los reactivos utilizados han sido:

- Mutágenos standard: Azida sódica (Merck)
 - 2-Aminofluoreno (Aldrich)
 - 2-Nitrofluoreno (Aldrich)
- Acetonitrilo CH_3CN (Panreac)
- Metanol CH_3OH (Merck)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Panreac)
- L-histidina $\text{C}_6\text{H}_9\text{ClN}_3\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5mM (Merck)
- L-biotina $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 0.5mM (Merck)
- Solución de Cristal Violeta (Panreac)
- Discos de Ampicilina (Oxoid)
- Permanganato potásico KMnO_4 (Panreac)
- Acido Oxálico 2-hidrato $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)
- Acido sulfúrico 96 %, SO_4H_2 (Panreac)
- Discos de papel de filtro estériles (Difco)
- O-Tolidinna solución 0,1 % (Panreac)
- Agua bidestilada Bio-Sell s.a.l.

3.1.2. SOLUCIONES

1. *Solución de Buffer-Fosfato* (pH = 7.4), cuya composición es:

- Fosfato monosódico NaH_2PO_4 (0.2M) (Merck)... 60 ml
- Fosfato disódico Na_2HPO_4 (0.2M) (Merck)..... 440 ml

Se autoclava 20 minutos a 121° C y se conserva a 4° C hasta su uso.

2. *Solución de Histidina-Biotina* 0,05M cuya composición es:

- L-Histidina.....26,21 mg
- D-Biotina.....30,54 mg
- agua bidestilada..... 250 ml

La solución se esteriliza filtrandola a través de una membrana de Millipore y bajo campana de flujo laminar, se guarda en frasco con tapón de rosca protegida de la luz, a 4°C hasta su utilización.

3. *Solución de Glucosa* al 40%:

- Glucosa anhidra $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Merck)
- Agua bidestilada

Se autoclava la solución durante 20 minutos a 121°C y se conserva a 4°C.

4. *Solución de Vogel-Bonner*, cuya composición es:

- Agua bidestilada templada (45°C)..... 670 ml
- Sulfato magnésico $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 gr
- Acido cítrico monohidratado..... 100 gr
- Fosfato potásico dibásico (anhídrido)..... 500 gr
- Sodio amonio fosfato $\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 175 gr

Añadir las sales en el orden indicado, permitiendo a cada sal disolverse antes de añadir la siguiente. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Se guarda a 4°C protegida de la luz hasta su uso.

3.2. MEDIOS

1. *Medio Agar*, cuya composición es:

- Agar..... 15 gr
- agua bidestilada.....930 ml

Una vez mezclado, se lleva a ebullición por llevar agar. Se autoclava 20 minutos a 121°C y se guarda a 4°C hasta su uso.

2. *Agar blando (Top Agar)*, cuya composición es:

- agar..... 6 gr
- cloruro sódico..... 5 gr
- agua bidestilada..... 1000 ml

Se procede igual que en el caso anterior.

3. *Agar Nutritivo*, cuya composición es:

- Nutrient Broth n°2..... 25 gr
- agar..... 15 gr
- agua bidestilada..... 1000 ml

Se prepara en un matraz y se lleva a ebullición (por llevar agar). Se autoclava durante 20 minutos a 121°C. Se vierte en las placas directamente sin añadir ninguna otra solución (Placas de agar nutritivo).

4. *Medio Agar Glucosado*, cuya composición es:

- Medio agar.....465 ml
- Solución Vogel-Bonner..... 10 ml
- Solución Glucosa al 40%..... 25 ml

El agar se licúa mediante calor y a continuación se añaden con pipeta y en cabina de flujo laminar los demás componentes. Se agita bien y después se deja reposar durante 4 ó 5 minutos con el fin de que desaparezcan las burbujas y se vierte en las placas a continuación (Placas de agar glucosado).

5. *Caldo Nutritivo* para cultivo de noche, cuya composición es:

- Nutrient Broth nº 2..... 25 gr
- agua bidestilada..... 1000 ml

Se disuelve (no es necesario hervir), y se reparte en frascos de 25 ml de capacidad, a razón de 9 ml de caldo cada uno. Se autoclava durante 20 minutos a 121°C y se guarda en nevera durante tres meses a 4°C.

3.3. MATERIAL E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Cabina de flujo laminar (Telstar)
- Autoclave
- Estufa de cultivo
- Arcón Congelador Revco (Giralt)
- Baño Selecta (Unitronic)
- Placa magnética caliente agitadora
- Agitador de tubos
- Microscopio

- Balanza de precisión
- Contador de placas
- Rota-vapor
- Bomba peristáltica de velocidad fija (Waters)
- Micropipeta Digital
- Material no reutilizable:
 - Criotubos Nunc (1,8 ml)
 - Placas de Petri estériles de 100 mm de diámetro

Tubos estériles de 16 por 100 mm

- Jeringas estériles de un solo uso
- Material reutilizable:
 - Pipetas de vidrio
 - Puntas de micropipeta
 - Tubos de vidrio
 - Frascos con tapón de rosca
 - Matraces

IV. MUESTRAS DE AGUA

Para valorar la posible mutagenicidad derivada de la presencia de compuestos clorados en el agua de la red de la ciudad de Madrid, se siguieron los siguientes pasos:

4.1. PREENSAYO

El ámbito geográfico del estudio, en principio quedó delimitado por el área municipal de Madrid.

Bajo el reinado de Isabel II, se terminó en 1852 el Canal de Castilla, del que se creó el Canal de Isabel II que desde 1857 abastece a Madrid.

En la actualidad, el Canal de Isabel II suministra de agua a Madrid capital y a la mayoría de los municipios y núcleos urbanos de la Comunidad Autónoma de Madrid (un 95% de la población).

4.1.1. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

El preensayo abarcó un muestreo de seis depósitos reguladores de agua del área de estudio. Estos puntos de recogida fueron:

- a) Santa Engracia
- b) Islas Filipinas
- c) Plaza de Castilla
- d) Hortaleza
- e) Vallecas
- f) San Blas

En total se recogieron 30 muestras de agua de los 6 puntos de muestreo, durante los meses de Septiembre a Noviembre de 1991.

4.1.2. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

Los análisis que se realizaron en las muestras de agua recogidas fueron:

4.1.2.1. Determinación del cloro libre residual

De acuerdo con el Artículo 20 de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de las aguas potables de consumo público (Real Decreto 1138/1990, de 14 de Septiembre; BOE de 20 de Septiembre de 1990), las aguas potables deben contener a lo largo de toda la red de distribución del sistema de abastecimiento y en todo momento, cloro residual libre o combinado (u otro agente desinfectante en su caso), en las concentraciones que determine la Administración Sanitaria competente.

En Madrid como en el resto del territorio Nacional, la concentración exigida del desinfectante es de 0,2-0,4 ppm de CLR (cloro libre residual).

Para determinar la dosis de cloro del agua problema, se eligió el **método de la ortotolidina** (Am. Pub. Health Assoc., 1971).

La ortotolidina reacciona con el cloro residual, dando una coloración amarillenta proporcional a la cantidad de cloro del agua.

La reacción consta de dos fases:

- a) Reacción con el cloro libre residual
- b) Reacción con el cloro libre combinado

De las dos fases sólo fué de nuestro interés determinar la primera o reacción con el cloro libre residual, que es prácticamente instantánea con la aparición de la coloración en menos de 15 segundos.

Después, el vial con el agua problema es enfrentado a la escala colorimétrica contenida en el clorómetro, la cual nos da, de una forma aproximada, la dosis de CLR en ppm que tiene ese agua.

4.1.2.2. Valoración de la cantidad de materia orgánica total

Como medida indirecta de la cantidad de materia orgánica total, se usó el método de la **oxidabilidad al permanganato** o demanda química de oxígeno, más conocido como DQO (Am. Pub. Health Assoc., 1971).

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria antes citada, el nivel guía para el agua potable en nuestro país, es de 2 mg/l de O₂, y la concentración máxima admisible es de 5 mg/l de O₂.

Procedimiento

Se distinguen dos fases:

1. Cálculo del factor del permanganato potásico: a un matraz de 500 ml se le añaden 100 ml de agua destilada, 15 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de permanganato N/100. Se pone al fuego y cuando hierva se añade al líquido anterior que es rosado, ácido oxálico hasta que la solución se vuelva incolora. Posteriormente se añade 10 ml de ácido oxálico N/100 y se valora el factor añadiendo permanganato gota a gota hasta obtener un color levemente rosado(en función de los ml de MnO₄K empleados).
2. Cálculo de la D.Q.O: se tiran el líquido anterior y en el mismo matraz sin lavarlo, se añaden 100 ml del agua problema, 10 ml de ácido sulfúrico al tercio, y se lleva a ebullición. Se añaden 10 ml de permanganato, y de nuevo se lleva a ebullición 10 minutos exactos. Entonces se añaden 10 ml de ácido oxálico (líquido incoloro) y se valora añadiendo permanganato gota a gota hasta que aparece el color rosado mantenido. En función del permanganato gastado y del factor antes calculado, se obtienen los mg/l de O₂ ,que contiene el agua problema y que corresponde a la Demanda Química de Oxígeno de ese agua.

4.1.3. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos en el preensayo, tanto en lo que respecta a la determinación del cloro libre residual como de materia orgánica total, fueron analizados por medio de un

análisis de la varianza (ANOVA) (Doménech, 1991), para comprobar si las diferencias aparecidas en los resultados de los seis puntos de muestreo eran significativas.

4.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras de estudio pueden clasificarse en tres grupos:

- **Muestra 1:** Concentrado de 5 litros de agua
- **Muestra 2:** Concentrado de 10 litros de agua
- **Muestra 3:** Concentrado de 20 litros de agua

4.2.1. TOMA DE MUESTRAS DE AGUA DE LA RED

Dado que tras analizar los resultados del preensayo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de los seis puntos de recogida, se decidió recoger las muestras de la red de distribución del distrito de Moncloa, Madrid, durante los meses de Octubre de 1991 a Junio de 1992.

Para efectuar las tomas, se siguió la metodología oficial para análisis de aguas, que viene recogida en la Orden Ministerial de 27 de Julio de 1983, publicada en el BOE de 13 de Agosto de 1983.

Para recoger el agua, se emplearon recipientes estériles y opacos para proteger a las muestras de la luz. Antes de tomar la muestra, se flamea el extremo del grifo y se deja que el agua fluya abundantemente para que se renueve la contenida en la tubería de alimentación.

La toma siempre debe ser representativa de la calidad del agua que hay que analizar.

Una vez tomadas, las muestras se conservan en nevera a 4°C, hasta su procesamiento. Este debe ser inmediato a la recogida ya que está demostrado que si no se hace así, los derivados clorados se pierden.

4.2.2. ANALISIS DE LAS MUESTRAS

1. *Determinación del cloro libre residual*

Se utilizó el método de la ortotolidina como se ha descrito anteriormente en el preensayo.

2. *Valoración de la cantidad de materia orgánica*

Este análisis se efectuó por medio del método anteriormente descrito de la Oxidabilidad al Permanganato o Demanda Química de Oxígeno.

3. *Determinación del pH*

Según la reglamentación en vigor, el pH normal del agua de bebida (nivel guía), es de 6,5-8,5, es decir neutro. El máximo admisible está fijado en 9,5.

El pH se midió por medio de un Indicador de pH en varillas (Merck); para obtener el valor del pH, se sumerge la varilla en el agua problema hasta el cambio de color de ésta (1-10 minutos) y se compara entonces con la escala colorimétrica.

4.2.3. CONCENTRACION DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras fueron procesadas con el fin de concentrar los solventes orgánicos que pudiesen contener, buscando con ello obtener los mejores resultados en los test bacterianos.

El método elegido fué el **Sistema Sep-Pak de Waters** (Millipore).

El Sep-Pak es un dispositivo fabricado por Waters Associates Inc, que podría definirse como una técnica perfeccionada de la cromatografía de columna. El cartucho de Sep-Pak, se acopla a una bomba de agua, o simplemente a una jeringa, pasando así la muestra y los eluyentes con cierta presión.

De entre los diferentes cartuchos Sep-Pak, se ha empleado el C₁₈ Cartridge, diseñado especialmente para muestras disueltas en agua, agua con tampones, agua- acetonitrilo, agua-metanol, es decir, agua con disolventes acuosos.

En cuanto a las características físico- químicas de estos cartuchos, hay que señalar que el cartucho C₁₈, contiene 360 mg de sorbente, constituido por partículas de entre 55-105 milimicras de tamaño y con poros de 125 Å.

Cada cartucho tiene una capacidad de retención que abarca desde 1-2 miligramos hasta 100 miligramos, dependiendo del tipo de compuesto. En ningún caso se recomienda pasar más de 1000 - 1500 ml de agua a través de un solo cartucho, para evitar la hidrólisis del sorbente.

Procedimiento

Antes de usar los cartuchos, deben prepararse éstos, haciendo pasar por cada uno de ellos, 5 ml de acetonitrilo. El agua es impulsada a través del cartucho por medio de una bomba peristáltica de velocidad fija.

4.2.4. EXTRACCION CON DISOLVENTES

Dado que las muestras de agua contienen compuestos orgánicos de distintas características físico-químicas (compuestos polares y no polares), para aumentar la eficacia del procedimiento de extracción se pasaron tres tipos de disolventes, en orden de polaridad, de más a menos polaridad:

- * Agua destilada: 10 ml
- * Metanol: 10 ml
- * Acetonitrilo: 10 ml

Procedimiento

Los tres disolventes se recogieron por separado, y se procesaron por separado, en un Rota-Vapor, hasta obtener un residuo seco en forma de polvo. Posteriormente el residuo se redisolvió en 10 ml de DMSO y se guardó en nevera a 4°C, protegido de la luz, hasta su utilización.

V. CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO

5.1. METODO BASADO EN EL CALCULO DEL INDICE DE MUTACION

Se denomina **índice de mutación** al cociente resultante de dividir los revertantes inducidos por los revertantes espontáneos. El índice de mutación es un término equivalente al incremento relativo de revertantes (Mattern, 1981).

El número de revertantes por placa corresponde en realidad , a la media del número de revertantes obtenido en las tres placas de cada nivel dosis, pues como ya se ha dicho, todas las experiencias se realizan por triplicado.

En nuestro caso hemos utilizado para evaluar el índice de mutación la llamada "regla de las dos veces" (Ames y col., 1975). Atendiendo al índice de mutación, los valores comprendidos entre 1,5 y 2 se consideran como "ligera mutación" y los valores superiores a 2, "mutación positiva".

La cualidad es una estimación del índice de mutación y así las distintas anotaciones correspondientes a la cualidad tienen el siguiente significado:

NM = No mutagénico (índice menor de 1,5)

LM = Ligera mutación (índice entre 1,5 y 2)

MP = Mutación positiva (índice mayor de 2)

T = Efecto tóxico (ausencia de césped bacteriano)

5.2. METODO ESTADISTICO BASADO EN EL ANALISIS DE LA VARIANZA Se ha utilizado el método estadístico descrito por Moore y Felton (1983), que en primer lugar consiste en un **análisis de la varianza modelo I (ANOVA I)** de los datos, para comparar las diferencias entre grupos debidas a las distintas dosis del producto a analizar. Cuando las condiciones requeridas (homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos) no se cumplen, hemos utilizado la prueba no paramétrica de Kruskall- Wallis.

Además se ha utilizado el **análisis de la varianza para medidas repetidas** (Doménech, 1991), determinando si existen variaciones al ensayar un mismo producto en ausencia y en presencia de S9+, y si estas diferencias son o no significativas.

RESULTADOS

I. RESULTADOS DEL PREENSAYO

De acuerdo con lo especificado en el apartado de Materiales y Métodos, el primer paso de nuestro estudio fue realizar un preensayo que abarcó un muestreo de seis depósitos reguladores de agua del área de estudio, que en principio se extendía a toda el área municipal de Madrid.

En total se recogieron 30 muestras de agua de cada uno de los puntos mencionados.

En todos los casos se determinó el cloro libre residual y la materia orgánica total.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1.1. DETERMINACION DEL CLORO LIBRE RESIDUAL

La media de las determinaciones de las seis muestras se detalla a continuación:

- Santa Engracia

Media= 0.13 ppm

Desviación Estandar= 0.062

- Islas Filipinas

Media= 0.13 ppm

Desviación Estandar= 0.053

- Plaza de Castilla

Media= 0.13

Desviación Estandar= 0.047

- Hortaleza

Media= 0.14

Desviación Estandar= 0.05

- Vallecas

Media = 0.14

Desviación Estandar = 0.05

- San Blas

Media = 0.15

Desviación Estandar = 0.05

La media total de cloro libre residual fue de 0.1366 ppm, con una desviación estandar de 0.081.

El análisis estadístico mediante el ANOVA, no fue significativo ($p > 0.05$), por lo que podemos afirmar que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos puntos de muestreo, en cuanto a la cantidad de cloro libre residual que se detecta al final del sistema de distribución.

1.2. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE MATERIA ORGANICA TOTAL

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Santa Engracia

Media = 1.61 mg/l

Desviación Estandar = 0.28

- Islas Filipinas

Media = 1.72 mg/l

Desviación Estandar = 0.466

- Plaza Castilla

Media= 1.61 mg/l

Desviación Estandar= 0.21

- Hortaleza

Media= 1.64 mg/l

Desviación Estandar= 0.45

- Vallecas

Media= 1.64 mg/l

Desviación Estandar= 0.31

- San Blas

Media= 1.72 mg/l

Desviación Estandar= 0.24

La media de las seis determinaciones nos dió una cifra de materia orgánica total de 1.6566 mg/l (des. st= 0.05). El análisis de la varianza resultó no significativo por lo que podemos concluir que las diferencias encontradas entre los seis puntos de muestreo, no fueron estadísticamente significativas.

II. RESULTADOS DEL ENSAYO

Con el fin de valorar la posible mutagenicidad derivada de la presencia de compuestos orgánicos clorados en un agua de consumo público, desinfectada con cloro, procedimos a realizar cuatro ensayos de mutagenicidad por medio del test de Ames, durante el período de estudio anteriormente mencionado.

Estos ensayos vienen recogidos en las tablas de resultados y se denominan: ensayo 1, ensayo 2, ensayo 3 y ensayo 4.

Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado (ensayos 1 y 2; ensayos 3 y 4), tal como exige el protocolo del estudio, y sembrando siempre tres placas por cada experiencia, lo que supone 12 datos para cada una de las tomas analizadas con cada una de las cepas de estudio, y otros doce al realizarse el experimento añadiendo la fracción microsomal (S9+).

Previamente a la realización de los mismos, se procedió a analizar las muestras de agua tomadas de la red, siguiendo la pauta anteriormente descrita:

1. Determinación del cloro libre residual por el método de la ortotolidina.
2. Determinación de la cantidad de materia orgánica total.
3. Determinación del pH del agua.

En todos los casos, estos tres parámetros estuvieron dentro de los límites de la normalidad, tal y como se comprobó durante el preensayo: cloro libre residual entre 0.2 a 0.4 ppm; materia orgánica total inferior a 5 mg/l y pH neutro.

Las muestras de estudio se clasificaron en tres grupos:

- Muestra 1: correspondiente al residuo orgánico extraído de 5 litros de agua problema
- Muestra 2: correspondiente al residuo orgánico extraído tras la concentración de 10 litros de agua problema
- Muestra 3: concentrado de 20 litros de agua problema

Todas las muestras se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) antes de incorporarlas al ensayo.

En cada experiencia se ensayaron las cuatro cepas descritas en el apartado de Materiales y Métodos: TA1535, TA1538, TA98 y TA100.

Además en cada ensayo se incluyeron: el control negativo, el control con disolvente y el control positivo.

Se realizaron también los correspondientes controles de supervivencia bacteriana y no se observó en ningún caso ni halo de inhibición bacteriana, ni ausencia de césped lo que indicó que no existió toxicidad con ninguna de las muestras ensayadas.

Los resultados individuales de cada ensayo vienen descritos en las tablas: III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII Y XVIII, y en ellas se especifican los siguientes parámetros:

- Muestras: 1, 2, 3, DMSO (control con DMSO) y M.E (mutación espontánea)
- RV/P: N° de colonias revertantes por placa
- M.R: Media de revertantes
- I.M: Índice de mutagenicidad
- C: Calidad

La calidad refleja el valor del índice de mutación. Cuando dicho índice alcanza valores comprendidos entre 1.5 y 2 se considera "ligera mutación" (L.M); si el índice es superior a 2 corresponde a "mutación positiva" (M.P) y todo valor inferior a 1.5 equivale a "no mutagénico" (N.M).

En cuanto al análisis estadístico, se detallan en cada tabla tanto el Análisis de la Varianza (ANOVA) para los experimentos con y sin S9, como el Análisis de la Varianza para Medidas Repetidas que compara los resultados de ambos ensayos conjuntamente.

2.1. CEPA TA1535

2.1.1. ENSAYO 1

En el ensayo 1 sin S9, que viene descrito en la Tabla III, se observa un ligero incremento del número de revertantes por placa en las muestras 2 y 3 con respecto a la muestra 1 y los controles.

Asimismo, los índices de mutagenicidad se incrementan como ocurría con el número de revertantes, en las muestras 2 y 3, alcanzando en ambos casos niveles de "ligera mutación" (1.76 para la muestra número 2 y 1.94 para la muestra 3). Como se ve este último caso roza la cualidad "mutación positiva", según la regla de las "dos veces" que es la empleada en este estudio.

En cuanto al análisis estadístico, se calculó el ANOVA y podemos ver que resultó "no significativo", con lo que no podemos afirmar que las variaciones en el número de revertantes sean debidas a las diferentes concentraciones de las muestras problema, que a su vez reflejan las distintas cantidades de agua de las que procede cada una de ellas.

En el estudio paralelo con incorporación de la fracción microsomal (S9+), se observó el mismo comportamiento en cuanto al número de revertantes por placa que en el caso anterior, siendo mayores para la muestra número 3. El índice de mutagenicidad fue 1.02 en el caso de la muestra número 3, mayor que los de las dos muestras anteriores (0.87 y 0.89). Todos ellos resultaron por lo tanto, no mutagénicos.

El ANOVA de este ensayo, tampoco fue significativo, por lo que no podemos establecer relación directa entre el número de revertantes y el aumento en las concentraciones de las muestras.

Al realizar el análisis de la varianza para medidas repetidas para comparar los resultados de ambos ensayos con y sin S9+, no se alcanzó la significación estadística. Por ello, aunque se ve claramente un aumento tanto en el número de revertantes como en los índices de mutagenicidad en la experiencia sin activación metabólica (S9-), se puede

afirmar que:

1. Las concentraciones diferentes de las tres muestras no influyen significativamente en el número de revertantes.
2. La fracción microsomal (S9), tampoco influye en este caso significativamente en el número de revertantes.
3. Las distintas concentraciones en las tres muestras de estudio no influyen de forma estadísticamente significativa sobre el número de revertantes de la cepa TA1535, en función de la presencia o ausencia de S9.

Asimismo en la Tabla III, se recogen los resultados obtenidos con el control negativo (M.E) y el control con disolvente (DMSO), estando ambos en los rangos de normalidad de la cepa TA1535.

El control positivo se realizó con Azida sódica para la mutación sin S9, y con 2-Aminofluoreno para la mutación con S9. En la Tabla XIX se especifican los resultados obtenidos con dichos mutágenos estandar. La cepa respondió adecuadamente a los mismos, ya que como puede verse el número de revertantes inducidos por el agente empleado como control positivo duplica al menos, la media esperada de mutación espontánea.

No apareció efecto tóxico alguno con ninguna de las muestras ensayadas y el análisis de supervivencia que se realizó paralelamente, fue asimismo adecuado (Tabla XXIV).

2.1.2. ENSAYO 2

La Tabla VII recoge los resultados obtenidos en el ensayo 2, con la cepa TA1535.

En la experiencia sin activación metabólica (-S9), se puede ver que existe un incremento en la media de revertantes (M.R.) por placa en las muestras 3 y 4, con respecto a la muestra número 1.

Por otro lado, el aumento en el número de revertantes inducidos con respecto al control, origina unos índices de mutagenicidad que son asimismo mayores en las muestras 2 y 3. Además en ambos casos alcanzan la cualidad de "ligera mutación" por sobrepasar el valor 1.5 (muestra 2, 1.71; muestra 3, 1.80).

Al efectuar el análisis estadístico por medio del ANOVA, se obtuvo una $p=0.0056$, resultando por tanto en el límite de significación, lo que supone que las variaciones encontradas en el número de revertantes en este ensayo, pueden atribuirse a las distintas concentraciones ensayadas.

En cuanto a la prueba con fracción microsomal (S9+), podemos ver que se mantiene la gradación ascendente en el número de revertantes conforme pasamos de la muestra 1 a la 2 y a la 3; sin embargo las diferencias entre estas últimas (muestras 2 y 3) son muy pequeñas.

Los índices de mutagenicidad son muy inferiores a los del ensayo sin S9, resultando todos ellos "no mutagénicos".

El análisis de la varianza resultó en este caso no significativo ($p=0.404$), por lo que no podemos establecer relación directa entre el aumento del número de revertantes y las distintas muestras de ensayo.

Por último, para comparar entre sí los resultados obtenidos en la experiencia con S9 y sin S9, procedimos a realizar el análisis de la varianza para medidas repetidas, el cual arrojó los siguientes resultados:

1. Se alcanzó la significación estadística al analizar las diferencias en el número de revertantes en relación a las tres concentraciones ensayadas, lo cual nos dice que en este ensayo, las concentraciones del agua problema influyen significativamente en la mutación inducida.
2. La fracción microsomal no varió de forma significativa los resultados del ensayo.

3. Tampoco podemos afirmar que la presencia o ausencia de S9 influya de forma significativa en las variaciones en el número de revertantes inducidos según aumentan las concentraciones de las muestras problema.

En la Tabla XIX, se recogen los resultados de los controles con el mutágeno estandar, en nuestro caso Azida sódica para la experiencia sin S9 y 2-Aminofluoreno para el experimento con S9. En ambos casos la cepa respondió de forma correcta a los mismos.

Los análisis de supervivencia (Tabla XXIV) resultaron asimismo adecuados y no se detectó efecto tóxico alguno en ninguna de las muestras.

2.1.3. ENSAYO 3

En el ensayo sin S9, se observa un incremento en el número de revertantes en las dos muestras inferiores de la Tabla XI, que se corresponden con las mayores tasas de concentrados del agua problema, es decir la muestra 2 y la 3.

Al analizar los índices de mutagenicidad, vemos que las tres concentraciones se califican como "ligera mutagenicidad", al ser superiores a 1.5 y no rebasar ninguna el valor 2 (1.55; 1.76; 1.94). Podemos observar, al igual que ocurría en los otros ensayos, como aumentan los valores según avanzamos en las concentraciones ensayadas.

Sin embargo, a pesar de las diferencias entre las muestras, el análisis de la varianza arrojó una $p = 0.5259$, con lo que no se alcanzó la significación estadística.

En el estudio con la adición de S9, tanto el número de revertantes inducidos como los índices de mutagenicidad, aumentan progresivamente desde la muestra 1, a la 2 y a la 3.

Además ambos parámetros fueron netamente inferiores a los del ensayo sin activación metabólica.

El ANOVA no fue significativo, por lo que no podemos establecer relación entre el aumento en el número de colonias y las concentraciones de las muestras ensayadas.

En cuanto al análisis conjunto de los dos experimentos con y sin S9, el test estadístico (ANOVA para medidas repetidas), no alcanzó en ningún caso una $p < 0.05$, con lo que no podemos afirmar que ni las diferentes concentraciones, ni la presencia o ausencia de S9, influyan significativamente en el número de revertantes inducidos.

La Tabla XIX, expone los resultados de los controles positivos, tanto para el ensayo sin S9 como para el ensayo con fracción microsomal. La respuesta de la cepa en ambos casos estuvo dentro del rango aceptable.

No apareció efecto tóxico alguno y el análisis de la supervivencia viene recogido en la Tabla XXIV.

2.1.4 ENSAYO 4

Los resultados del ensayo 4 con la cepa TA1535, se muestran en la Tabla XV.

En el experimento sin S9, el número de revertantes y las medias de los mismos, se incrementan conforme pasamos a concentraciones superiores (1.50 para la muestra 1; 1.75 para la 2 y 1.94 para la 3).

Los índices de mutagenicidad derivados de comparar estas colonias inducidas con la mutación espontánea, arrojan unos valores que resultan ligeramente mutagénicos en el caso de las muestras 2 y 3, estando el índice de la muestra 1 en el límite de la ligera mutagenicidad, al ser igual a 1.5 exactamente.

Además al ser el ANOVA significativo ($p = 0.0000$), podemos afirmar que las variaciones en el número de revertantes tienen relación con las distintas concentraciones ensayadas.

En cuanto a los resultados obtenidos con S9, podemos ver como en este caso la media del número de colonias por placa fue mayor en las muestras 1 y 3, con respecto a la 2 y la misma tónica siguieron los índices de mutagenicidad. Ambos parámetros fueron además, claramente inferiores si los comparamos con los valores que se obtuvieron en el

ensayo sin S9. El ANOVA no fue significativo ($p = 0.8135$).

Al comparar los resultados obtenidos con y sin S9, por medio del análisis de la varianza para medidas repetidas, podemos destacar que:

1. Las concentraciones de las muestras de ensayo no infuyen de forma significativa en la reversión inducida.
2. La fracción microsomal si influye significativamente en el número de revertantes.
3. Las concentraciones de las muestras de ensayo influyen en el número de revertantes de forma diferente, dependiendo de la presencia o ausencia de S9.

Tanto los controles positivos (Tabla XIX), como los análisis de supervivencia de la bacteria (Tabla XXIV), resultaron adecuados y no apareció rastro de toxicidad.

2.2. CEPA TA1538

2.2.1. ENSAYO 1

En la Tabla IV se exponen los resultados del test, con la cepa TA1538 y en los dos ensayos paralelos, con y sin S9.

En el experimento sin S9 (-S9), se obtuvo mayor número de revertantes inducidos con la muestra 3, seguida de la 1 y por último el menor número de revertantes por placa correspondió a la muestra número 2.

La misma regla siguieron los índices de mutación, resultando todos ellos calificados como "no mutagénicos", ya que ninguno alcanzó el valor 2.

Se calculó, como en todos los casos, el ANOVA para comprobar si las diferencias encontradas en el número de revertantes se relacionaban con las distintas concentraciones de las muestras problema, y dicho análisis resultó no significativo.

En el estudio con S9 (+S9), la media de las tres lecturas de los revertantes por placa aumentó al hacerlo la concentración, siendo mayor en las muestras 3 y 2 que en la

1. De igual manera se comportaron los índices de mutación, que además fueron muy semejantes a los obtenidos en el ensayo sin fracción microsomal. Todos fueron "no mutagénicos". El análisis de la varianza, fue no significativo.

Por último, se realizó el análisis de la varianza para medidas repetidas y se comprobó que la concentración de las muestras problema no influía de forma estadísticamente significativa en el número de revertantes dependiendo de la presencia o ausencia de S9.

Asimismo, en la Tabla IV, se expresan los resultados del control negativo (M.E) y del control con disolvente (DMSO), estando ambos en el rango normal para la cepa de ensayo.

Los controles positivos se llevaron a cabo con 2-nitrofluoreno, para la mutación sin S9 y con 2-Aminofluoreno para la experiencia con S9. En ambos casos la cepa reaccionó de forma adecuada, como se detalla en la Tabla XX.

No se detectó toxicidad en ninguno de los experimentos y la medida de la supervivencia bacteriana fue satisfactoria (Tabla XXV).

2.2.2. ENSAYO 2

La Tabla VIII, traduce los resultados de este ensayo en sus dos modalidades, con y sin S9-mix.

En la prueba sin S9, se observa un aumento de revertantes conforme aumenta la concentración, de la muestra 1 a la 3.

Los índices de mutagenicidad son también mayores en la muestra 3 que en las dos anteriores, y ninguno alcanzó el valor de 1.5, resultando por tanto "no mutagénicos".

El análisis estadístico por medio del ANOVA, no fue significativo por lo que no podemos afirmar que la variación en el número de colonias inducidas esté directamente relacionada con las distintas muestras problema.

En el caso del ensayo con S9 (+S9), se mantiene esta tendencia a subir la media de revertantes en las dos últimas muestras (2 y 3), y sobre todo los índices de mutagenicidad, siendo muy semejantes en las muestras 2 y 3. Globalmente considerados, estos índices resultaron en este ensayo, superiores a los obtenidos en la prueba sin S9 (-S9).

El análisis estadístico para la experiencia con S9, no fue significativo.

Al comparar ambos estudios, el análisis para medidas repetidas fue significativo para la fracción microsomal, pero no para el experimento en conjunto por lo que no podemos afirmar que la presencia o ausencia de S9, influya de forma decisiva en el experimento.

La Tabla XX recoge los controles positivos para la cepa y la Tabla XXV hace lo mismo para el análisis de la supervivencia. En ambos casos la cepa respondió adecuadamente a los mutágenos estandar y no hubo rastro de toxicidad.

2.2.3. ENSAYO 3

En el ensayo sin activación metabólica tanto el número de revertantes como los índices de mutagenicidad, fueron mayores en la muestra que representa la menor concentración (muestra 1) y menores en la muestra número 2, siendo los valores de la muestra 3 de rango intermedio (Tabla XII). Todos los índices fueron "no mutagénicos".

Los resultados del análisis estadístico fueron no significativos, ya que el ANOVA arrojó un valor de p de 0.6327.

Al añadir la fracción microsomal al ensayo de incorporación en placa, disminuyó el número de revertantes por placa y, en cuanto al comportamiento mutagénico, podemos ver como el índice de mutagenicidad de la muestra 1 es inferior al correspondiente del ensayo sin S9, y los otros dos (el de la muestra 2 y 3), son sin embargo superiores.

El ANOVA no alcanzó tampoco la significación estadística para la prueba con activación metabólica.

Con el análisis de la varianza para medidas repetidas, vemos que las concentraciones no influyen significativamente en el número de revertantes; el S9 sí influye de forma significativa en el mismo; y las variaciones en el número de revertantes de acuerdo con las concentraciones, no dependen de la existencia o no de S9.

Los controles positivos vienen explicados en la Tabla XX y el análisis de supervivencia en la Tabla XXV.

2.2.4. ENSAYO 4

El ensayo viene reflejado en la Tabla XVI, y en el experimento sin S9 podemos ver como el número de revertantes es menor en la muestra 1, siendo muy semejante en el caso de las muestras 2 y 3.

Por contra los índices de mutagenicidad se comportan de manera diferente, siendo mayor el índice correspondiente a la muestra número 2, que se corresponde con la concentración intermedia. Todos fueron inferiores a 1.5 (N.M).

En el ensayo con activación metabólica, se ve un aumento progresivo tanto en el número de revertantes inducidos como en los índices de mutagenicidad conforme aumenta la concentración, siendo mayores para la muestra 3. En esta ocasión, al igual que en la experiencia sin S9, todos fueron "no mutagénicos".

El ANOVA no fue significativo y el análisis de la varianza para medidas repetidas, confirmó que las diferentes concentraciones ensayadas no influyen en el número de revertantes de manera distinta, en función de la presencia o ausencia de S9.

El control positivo se realizó con 2-Nitrofluoreno (-S9) y con 2-Aminofluoreno (+S9) y está recogido en la Tabla XX. El control de supervivencia de la cepa fué correcto como se detalla en la Tabla XXV.

2.3. CEPA TA98

2.3.1. ENSAYO 1

Con el fin de evaluar la posible mutagenicidad de las tres muestras de agua problema, se realizó un primer ensayo utilizando la cepa TA98. El estudio se llevó a cabo, como en los otros casos con y sin fracción microsomal. Los resultados se recogen en la Tabla V.

En el estudio sin S9, el número de revertantes inducidos aumentó en la muestra 2, siendo muy semejantes en las muestras 1 y 3. En cuanto a los índices de mutagenicidad, el mayor correspondió asimismo a la muestra 2 (1.33), que se corresponde con la concentración intermedia (derivada de 10 litros de agua problema). Ninguno de ellos resultó ser mutagénico.

En cuanto al análisis estadístico, se calculó el ANOVA para el experimento -S9, y se obtuvo la significación estadística ($p = 0,044$).

Con S9+, disminuye la actividad mutagénica, hecho que se refleja en la disminución del número de revertantes por placa en todas las muestras respecto a la experiencia sin S9. Los índices de mutagenicidad fueron todos no mutagénicos. El análisis estadístico fue no significativo.

Con el análisis de la varianza para medidas repetidas, se compararon los resultados de ambos ensayos y se pudo concluir que hubo significación estadística para las concentraciones y el S9, que por tanto en este ensayo influyen significativamente en el número de revertantes, pero de forma totalmente independiente de la presencia o ausencia de la fracción microsomal.

En la Tabla XXI, se detallan los resultados de los controles positivos realizados con 2-Nitrofluoreno (ensayo sin S9) y 2-Aminofluoreno para el ensayo con S9. La cepa respondió de forma adecuada en los dos casos obteniéndose un número de revertantes inducidos de al menos el doble de la media de mutación espontánea esperada.

El análisis de supervivencia fue satisfactorio (Tabla XXI).

2.3.2. ENSAYO 2

En el ensayo 2 sin activación metabólica, tal como se describe en la Tabla IX, el mayor número de revertantes por placa se obtuvo con la concentración intermedia (muestra 2), siendo muy semejantes en el caso de las otras dos muestras ensayadas.

Los índices de mutagenicidad no alcanzaron en ninguna de las concentraciones un valor igual o superior a 1.5, resultando por lo tanto todos ellos "no mutagénicos".

El análisis estadístico resultó no significativo, por lo que no podemos establecer relación entre la variación en el número de revertantes y las distintas concentraciones estudiadas.

Al añadir al ensayo la fracción microsomal, disminuye en todas las muestras la mutagenicidad, siendo todos los índices inferiores a la unidad. El ANOVA resultó no significativo.

Se realizó el análisis de la varianza para medidas repetidas y se comprobó, que la fracción microsomal influyó de forma estadísticamente significativa en el número de revertantes, pero no así las concentraciones de las muestras problema; además estas diferentes concentraciones no influyeron sobre la mutación inducida de diferente forma en función de la existencia o no de la S9.

Tanto los controles positivos (Tabla XXI), como el análisis de supervivencia (Tabla XXVI), se realizaron paralelamente al estudio y no apareció efecto indeseable alguno, ni signos de toxicidad.

2.3.3. ENSAYO 3

La descripción del ensayo viene reflejada en la Tabla XIII, mostrando los resultados obtenidos con cada una de las muestras problema así como con los controles negativos y con disolvente.

En la experiencia sin S9, obtenemos medias de revertantes por placa muy similares para las muestras extremas (1 y 3), siendo mayor el número obtenido con la concentración intermedia (muestra 2).

Los índices de mutagenicidad fueron todos ellos inferiores al nivel 1.5 y el ANOVA fue levemente significativo ($p=0.049$).

Como ocurrió en los dos ensayos anteriores, al duplicar el ensayo con activación metabólica (S9+), disminuye el número de revertantes inducidos así como los índices de mutagenicidad, correspondiendo los mayores valores en esta experiencia a los obtenidos con la muestra número 2. Además el análisis de la varianza no fue significativo.

Los controles positivos se llevaron a cabo con los mutágenos estandar adecuados para la cepa TA98 y se recogen en la Tabla XXI.

La medida de la supervivencia bacteriana fue correcta tanto con como sin S9.

2.3.4. ENSAYO 4

Tanto en el ensayo con S9 como en la experiencia sin S9, se observa un número de revertantes inducidos mayor para la muestra 2, es decir para la muestra que equivale a la concentración intermedia (Tabla XVII).

Ninguno de los índices de mutagenicidad en las dos pruebas, alcanzó el valor ≥ 1.5 , siendo por lo tanto todos "no mutagénicos". Los análisis estadísticos realizados con el ANOVA simple, no resultaron significativos en ninguno de los dos test, por lo que no se pudo establecer relación entre el número de revertantes y las diferentes concentraciones de estudio.

El análisis combinado de la varianza para medidas repetidas no fue significativo, por lo que tampoco podemos establecer que las diferentes concentraciones del estudio tengan una influencia significativa sobre el número de revertantes, en función de la presencia o ausencia de S9.

Las Tablas XXI y XXVI, reproducen los resultados de los controles positivo y de supervivencia, tanto sin como con S9.

2.4. CEPA TA100

2.4.1. ENSAYO 1

En el ensayo 1 sin activación metabólica (-S9), descrito en la Tabla VI, se observa un claro aumento en el número de revertantes inducidos conforme avanzamos en las concentraciones de estudio, es decir de las muestras 1 a la 3, y también respecto a los controles.

En el caso de los índices de mutagenicidad, estos aumentan paralelamente con el número de colonias inducidas, siendo calificados como "ligeramente mutagénico" en la muestra 3.

En cuanto al análisis estadístico, el ANOVA resultó significativo con lo que podemos afirmar que las diferencias en el número de revertantes se relacionan de forma estadísticamente significativa con las distintas concentraciones de las muestras problema.

Al añadir la fracción microsomal, descienden de forma visible tanto el número de revertantes como los índices de mutagenicidad, resultando para las tres muestras "no mutagénicos". Además el análisis de la varianza no alcanzó la significación estadística.

Al comparar el estudio con y sin S9, por medio del análisis de la varianza para medidas repetidas, se observó que:

1. Las diferentes concentraciones de las muestras de estudio influyen de forma significativa en el número de revertantes inducidos.
2. La fracción microsomal también influye de forma significativa en la aparición de estas colonias.
3. Sin embargo no se pudo afirmar que las diferentes concentraciones objeto de estudio influyeran de forma significativa sobre el número de revertantes, de distinta

manera en presencia y en ausencia de S9.

Se realizaron los correspondientes controles positivos utilizando Azida sódica para el ensayo sin S9 y 2-Aminofluoreno para el ensayo con S9 (Tabla XXII). La cepa respondió bien a ambos mutágenos estandar.

En el ensayo de supervivencia se aprecia una buena viabilidad de la bacteria tanto con S9 como sin dicha fracción (Tabla XXVII).

2.4.2. ENSAYO 2

Podemos ver en la Tabla X los resultados del ensayo 2, con la cepa TA100. Como en el ensayo precedente, observamos en el experimento sin S9, un incremento en el número de revertantes conforme aumenta la concentración de las muestras problema.

El mayor índice de mutación corresponde al obtenido con la muestra 3, es decir con la concentración mayor, pero en este caso no alcanza el valor 1.5, calificándose como "no mutagénico".

El tratamiento estadístico pone de nuevo de manifiesto la relación entre el aumento en las concentraciones y el incremento en el número de revertantes (ANOVA significativo).

En el experimento con la adición de S9, se mantiene la tendencia a aumentar los índices de mutagenicidad conforme aumenta la concentración. Además se observa una clara disminución de los mismos en comparación a la prueba sin S9.

El ANOVA en este segundo caso, fue además no significativo.

El análisis de la varianza para medidas repetidas, puso de manifiesto la influencia de la fracción S9 en el efecto mutagénico producido por las muestras de ensayo, así como el de las diferentes concentraciones de las mismas; pero no se obtuvo significación en el análisis conjunto de los dos ensayos en función de la presencia o ausencia de S9.

Los controles positivos y la medida de la supervivencia bacterianas se detallan en las Tablas XXII y XXVII.

2.4.3. ENSAYO 3

En esta ocasión, se empleó de nuevo un doble ensayo con S9 y sin S9, para evaluar la respuesta mutagénica de los derivados orgánicos clorados en las muestras de agua de consumo.

Como puede verse en la Tabla XIV, en la experiencia sin activación metabólica, aumentan el número de revertantes y los índices de mutación conforme lo hace la concentración ensayada, desde las muestras 1 a la 3. Ninguno de los índices resultó mutagénico, siendo el más elevado de ellos igual a 1.21 (muestra 3).

Con el ANOVA se confirmó la relación entre el aumento en la concentración y el incremento en el número de revertantes y la "p" fue significativa.

Con la adición de la fracción S9, decrece la mutagenicidad aunque se mantiene el gradiente concentración/nº de revertantes. El ANOVA sin embargo, no alcanzó el nivel de significación estadística.

El análisis conjunto por medio del análisis de la varianza para medidas repetidas, no fue significativo para ninguno de los parámetros de estudio.

Las Tablas XXII y XXVII, recogen los resultados de los controles positivos y de la supervivencia de la bacteria. No se apreció en ningún caso ningún signo de toxicidad.

2.4.4. ENSAYO 4

Los resultados de este ensayo, nos muestran un aumento en el número de revertantes por placa a medida que aumenta la concentración en las muestras problema, tanto en el ensayo sin activación metabólica como con S9 (Tabla XVIII).

Los índices de mutagenicidad aumentan también desde las muestras 1 a la 3, pero no alcanzan en ninguno de los niveles el valor 2, necesario para calificarlos como

mutagénicos.

El test estadístico no fue significativo en ninguna de las experiencias, sin y con S9. El análisis de la varianza para medidas repetidas, puso de manifiesto que tanto las diferentes concentraciones como la fracción microsomal, consideradas individualmente, influyen en el número de revertantes, pero no fue así al considerar globalmente la presencia o ausencia de S9.

La cepa respondió adecuadamente a los controles positivos (Tabla XXII).

No apareció efecto tóxico alguno con ninguna de las muestras ensayadas y el análisis de supervivencia mostró un comportamiento correcto de la bacteria (Tabla XXVII).

III. RESUMEN DE LA EVALUACION MUTAGENICA

Como resumen de la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos clorados, procedentes de aguas de consumo público, podemos destacar los siguientes resultados:

1. En cuanto a las **cepas de estudio**, las más sensibles para detectar la mutagenicidad inducida por las muestras problema parecen ser la TA1535 y TA100. Las cepas restantes, TA1538 y TA98, nos ofrecen índices de mutagenicidad menores en todos los ensayos, tal y como viene reflejado en las Tablas XXVIII y XXIX, que resumen los índices medios de mutagenicidad tanto en presencia como en ausencia de S9.
2. En cuanto a la **relación número de revertantes/aumento de las concentraciones**, este gradiente solo se mantiene con las cepas TA1535 y TA100, tanto en el ensayo sin fracción microsomal (+S9), como en la experiencia con activación metabólica (-S9). Esto indica en estos casos, que según aumenta la concentración de los residuos orgánicos clorados (muestras 2 y 3), se incrementa la reversión inducida. El grado de significación estadística de esta asociación, que viene dado por el cálculo del ANOVA, varió sin embargo ampliamente de unos ensayos a otros.
3. En cuanto a la **fracción S9**, se observa una disminución de la actividad mutagénica en los ensayos con activación enzimática (+S9), con respecto a los ensayos sin S9; este hecho es notorio sobre todo en las cepas TA1535 y TA100, algo menos evidente en la cepa TA98, y no siempre se confirma en el caso de la cepa TA1538 (Tablas XXVIII y XXIX). Sin embargo, la aplicación de los test estadísticos para valorar esta diferencia (análisis de la varianza para medidas repetidas) no fueron significativos, exceptuando quizás el caso del ensayo 4 con la cepa TA1535, en el cual se rozó el nivel de significación estadística ($p = 0.0507$). Por lo tanto, solamente en el caso de esta cepa y de este ensayo, podemos afirmar que las distintas concentraciones ensayadas (muestras 1, 2 y 3), influyen en el número de revertantes inducidos de manera diferente en función de que esté presente o ausente

- la fracción S9.
4. En lo que respecta a la **evaluación mutagénica**, podemos afirmar que ninguna de las muestras de concentrados de aguas de consumo público ensayadas se han mostrado como mutagénicas, al no alcanzar los índices de mutagenicidad el valor 2, necesario para calificar un producto como mutagénico en el test de Ames según la "regla de las dos veces". En el caso de las muestras 2 y 3, y con la cepa TA1535, podemos ver en la Tabla XXVIII como en el ensayo sin S9, se obtienen índices de mutagenicidad medios de 1.74 (muestra 2) y 1.90 (muestra 3), que se califican como L.M. (ligeramente mutagénicos), al superar el valor 1.5.
 5. Los **controles positivos** efectuados para cada cepa del ensayo, vienen resumidos en la Tabla XXIII, donde se puede comprobar que todas las cepas respondieron adecuadamente. No hubo además rastro de toxicidad en ninguna de las pruebas y las medidas de supervivencia de las bacterias fueron asimismo satisfactorias.

ENSAYO 1 CEPA TA1535

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	20 10 12	14.0	1.20	N.M.	24 22 12	19.3	0.87	N.M.
2	20 24 16	20.0	1.76	L.M.	16 22 21	19.6	0.89	N.M.
3	22 20 24	22.0	1.94	L.M.	38 16 44	22.6	1.02	N.M.
DMSO	21 8 15	11.3		N.M.	19 17 30	22.0		N.M.
ME	20 11 32	19.6			20 22 28	23.3		

ANOVA

F = 1.035

p = 0.436

F = 1.32

p = 0.33

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1.92 p = 0.1467

F(S9) = 3.59 p = 0.0728

F(C*) = 0.51 p = 0.7280

* Combinación de M y S9

TABLA III. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA TA1535.

ENSAYO 1 CEPA TA1538

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	23 24 34	27.0	1.09	N.M.	8 12 21	13.6	1.08	N.M.
2	34 24 18	25.3	1.02	N.M.	12 14 19	15.0	1.19	N.M.
3	41 26 31	32.6	1.32	N.M.	19 17 13	16.3	1.30	N.M.
DMSO	17 23 34	24.6		N.M.	22 12 4	12.6		N.M.
ME	21 13 10	14.6			20 22 6	16.0		

ANOVA

F = 2.380 p = 0.12

F = 0.351 p = 0.84

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1.22 p = 0.3300

F(S9) = 16.16 p = 0.0007

F(C*) = 1.45 p = 0.2451

* Combinación de M y S9

TABLA IV. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA TA1538.

ENSAYO 1 CEPA TA98

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	33 33 31	32.3	0.96	N.M.	11 21 25	19.0	0.90	N.M.
2	56 40 39	45.0	1.33	N.M.	20 23 23	22.0	1.04	N.M.
3	35 26 37	32.6	0.97	N.M.	12 21 10	14.3	0.68	N.M.
DMSO	34 27 35	33.6		N.M.	17 19 27	21.0		N.M.
ME	26 32 30	29.3			16 15 25	18.6		

ANOVA F = 3.653 p = 0.044 F = 0.886 p = 0.506

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3.21 p = 0.0343
F(S9) = 57.75 p = 0.0000
F(C*) = 1.39 p = 0.2727

* Combinación de M y S9

TABLA V. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA TA98.

ENSAYO 1 CEPA TA100

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	94 116 126	112.0	1.10	N.M.	94 81 136	103.6	0.94	N.M.
2	146 136 138	140.0	1.44	N.M.	100 113 112	108.3	0.99	N.M.
3	147 145 154	148.6	1.53	L.M.	103 112 125	113.3	1.03	N.M.
DMSO	83 103 105	97.0		N.M.	127 118 83	109.3		N.M.
ME	100 110 120	110.0			110 120 90	106.6		

ANOVA F = 14.787 p = 0.0003 F = 0.107 p = 0.978

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3.89 p = 0.0171
F(S9) = 6.32 p = 0.0200
F(C*) = 2.60 p = 0.0672

* Combinación de M y S9

TABLA VI. RESULTADOS DEL ENSAYO 1 CON LA CEPA TA100.

ENSAYO 2 CEPA TA1535

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	21 13 12	15.3	1.12	N.M.	16 19 10	11.6	0.71	N.M.
2	24 26 20	23.3	1.71	L.M.	20 25 16	20.3	1.02	N.M.
3	25 24 24	24.3	1.80	L.M.	20 21 18	19.6	1.20	N.M.
DMSO	20 10 11	13.6		N.M.	21 9 19	16.3		N.M.
ME	12 14 11	12.3			13 17 15	15.0		

ANOVA F = 7.108 p = 0.0056 F = 1.109 p = 0.404

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 6.30 p = 0.0019
F(S9) = 0.14 p = 0.7190
F(C*) = 1.05 p = 0.4055

* Combinación de M y S9

TABLA VII. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA TA1535.

ENSAYO 2 CEPA TA1538

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	31 21 24	25.3	1.07	N.M.	8 14 22	14.6	1.16	N.M.
2	30 26 22	26.0	1.10	N.M.	16 14 20	16.6	1.31	N.M.
3	35 30 32	32.3	1.37	N.M.	20 15 15	16.6	1.32	N.M.
DMSO	20 21 30	23.6		N.M.	17 10 11	16.6		N.M.
ME	20 18 27	21.6			13 14 16	14.3		

ANOVA F = 2.857 p = 0.0811 F = 0.518 p = 0.724

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 2.32 p = 0.0924
F(S9) = 47.29 p = 0.0000
F(C*) = 0.77 p = 0.5583

* Combinación de M y S9

TABLA VIII. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA TA1538.

ENSAYO 2 CEPA TA98

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	30 31 32	31.0	1.02	N.M.	11 21 24	18.6	0.87	N.M.
2	34 35 33	34.0	1.12	N.M.	19 21 23	21.0	0.98	N.M.
3	35 29 34	32.6	1.07	N.M.	15 20 16	17.0	0.79	N.M.
DMSO	26 34 31	30.3		N.M.	18 20 26	21.3		N.M.
ME	23 21 39	27.6			21 21 16	19.3		

ANOVA F = 0.692 p = 0.6143 F = 0.568 p = 0.6917

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 0.63 p = 0.6457
F(S9) = 48.84 p = 0.0000
F(C*) = 0.65 p = 0.6309

* Combinación de M y S9

TABLA IX. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA TA98.

ENSAYO 2 CEPA TA100

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	90 115 120	108.3	1.09	N.M.	94 82 130	102.0	0.94	N.M.
2	138 140 136	138.0	1.39	N.M.	100 110 108	106.0	0.97	N.M.
3	145 146 139	143.3	1.44	N.M.	104 108 125	112.3	1.03	N.M.
DMSO	82 110 105	99.0		N.M.	115 120 90	108.3		N.M.
ME	103 106 108	105.6			115 109 114	112.6		

ANOVA F = 12.188 p = 0.0007 F = 0.288 p = 0.8791

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 4.47 p = 0.0096
F(S9) = 5.43 p = 0.0303
F(C*) = 3.87 p = 0.1740

* Combinación de M y S9

TABLA X. RESULTADOS DEL ENSAYO 2 CON LA CEPA TA100.

ENSAYO 3 CEPA TA1535

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	14 18 21	17.6	1.55	L.M.	24 22 12	19.3	0.87	N.M.
2	20 24 16	20.0	1.76	L.M.	22 16 21	19.6	0.89	N.M.
3	22 24 20	22.0	1.94	L.M.	38 16 14	22.6	1.03	N.M.
DMSO	21 8 15	11.3		N.M.	19 17 30	22.0		N.M.
ME	22 10 24	18.6			18 20 21	19.6		

ANOVA

F = 0.848 p = 0.5259

F = 0.128 p = 0.9689

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 0.38 p = 0.8183

F(S9) = 0.78 p = 0.3979

F(C*) = 0.33 p = 0.8516

* Combinación de M y S9

TABLA XI. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA TA1535.

ENSAYO 3 CEPA TA1538

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	41 26 31	32.6	1.32	N.M.	12 21 8	13.6	1.08	N.M.
2	24 34 18	25.3	1.02	N.M.	14 12 19	15.0	1.19	N.M.
3	23 24 34	27.0	1.09	N.M.	19 17 13	16.3	1.32	N.M.
DMSO	17 23 34	24.6		N.M.	22 12 4	12.6		N.M.
ME	32 22 16	23.3			18 16 20	18.0		

ANOVA F = 0.661 p = 0.6327 F = 0.442 p = 0.7760

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 0.37 p = 0.8232
F(S9) = 21.80 p = 0.0001
F(C*) = 0.80 p = 0.5350

* Combinación de M y S9

TABLA XII. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA TA1538.

ENSAYO 3 CEPA TA98

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	33 33 31	32.3	0.96	N.M.	11 21 25	19.0	0.90	N.M.
2	56 40 39	45.0	1.33	N.M.	20 23 23	22.0	1.04	N.M.
3	26 35 37	32.6	0.97	N.M.	12 21 10	14.3	0.68	N.M.
DMSO	34 27 35	33.6		N.M.	19 27 17	21.0		N.M.
ME	30 32 31	31.0			21 22 22	21.6		

ANOVA F = 3.497 p = 0.0493 F = 1.278 p = 0.3416

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3.23 p = 0.0330
F(S9) = 63.84 p = 0.0000
F(C*) = 1.79 p = 0.1710

* Combinación de M y S9

TABLA XIII. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA TA98.

ENSAYO 3 CEPA TA100

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	104 136 126	122.0	1.07	N.M.	94 81 136	103.6	0.94	N.M.
2	136 126 128	130.0	1.14	N.M.	112 113 100	108.3	0.99	N.M.
3	133 133 147	137.6	1.21	N.M.	103 125 112	113.3	1.03	N.M.
DMSO	93 123 125	113.6		N.M.	127 118 83	109.3		N.M.
ME	97 73 103	91.0			120 114 89	107.6		

ANOVA F = 5.179 p = 0.0160 F = 0.100 p = 0.9801

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 2.08 p = 0.1213
F(S9) = 2.95 p = 0.1011
F(C*) = 1.57 p = 0.2196

* Combinación de M y S9

TABLA XIV. RESULTADOS DEL ENSAYO 3 CON LA CEPA TA100.

ENSAYO 4 CEPA TA1535

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	18 20 16	18.0	1.50	N.M.	20 19 21	20.0	0.95	N.M.
2	23 20 20	21.0	1.75	L.M.	14 24 20	19.3	0.92	N.M.
3	22 24 24	23.3	1.94	L.M.	26 20 16	27.0	1.28	N.M.
DMSO	12 10 14	12.0		N.M.	18 18 27	21.0		N.M.
ME	16 15 14	15.0			18 18 30	22.0		

ANOVA F = 23.163 p = 0.0000 F = 0.387 p = 0.8135

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1.78 p = 0.1730
F(S9) = 4.00 p = 0.0592
F(C*) = 2.85 p = 0.0507

* Combinación de M y S9

TABLA XV. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA TA1535.

ENSAYO 4 CEPA TA1538

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	16 28 30	24.6	1.02	N.M.	14 20 10	18.0	0.85	N.M.
2	34 30 22	28.6	1.19	N.M.	18 16 22	18.6	0.88	N.M.
3	30 26 25	27.0	1.12	N.M.	30 26 25	27.0	1.28	N.M.
DMSO	22 24 26	24.0		N.M.	16 20 27	21.0		N.M.
ME	16 28 22	22.0			20 23 23	22.0		

ANOVA F = 4.064 p = 0.0328 F = 0.720 p = 0.5975

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 1.99 p = 0.1353
F(S9) = 7.30 p = 0.0137
F(C*) = 1.78 p = 0.1723

* Combinación de M y S9

TABLA XVI. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA TA1538.

ENSAYO 4 CEPA TA98

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	36 26 32	31.3	1.09	N.M.	12 14 20	15.3	0.80	N.M.
2	32 36 36	34.6	1.21	N.M.	22 21 18	20.3	1.07	N.M.
3	36 32 20	29.3	1.02	N.M.	16 18 22	18.6	0.98	N.M.
DMSO	28 28 30	28.6		N.M.	15 16 26	19.0		N.M.
ME	38 16 34	29.3			19 27 17	21.0		

ANOVA F = 0.377 p = 0.8200 F = 0.752 p = 0.5791

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 0.50 p = 0.7364
F(S9) = 31.20 p = 0.0000
F(C*) = 0.47 p = 0.7574

* Combinación de M y S9

TABLA XVII. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA TA98.

ENSAYO 4 CEPA TA100

-S9

+S9

MUESTRA	RV/P	M.R.	I.M.	C	RV/P	M.R.	I.M.	C
1	110 96 100	102.0	0.93	N.M.	90 86 99	91.6	0.86	N.M.
2	120 132 136	129.3	1.19	N.M.	112 100 104	105.3	0.99	N.M.
3	140 160 113	137.6	1.26	N.M.	112 126 96	111.3	1.05	N.M.
DMSO	100 96 130	108.0		N.M.	120 108 90	106.0		N.M.
ME	103 112 125	113.3			100 113 112	108.3		

ANOVA F = 2.881 p = 0.0796 F = 1.462 p = 0.2845

ANOVA DE MEDIDAS REPETIDAS

F(M) = 3.07 p = 0.0402
F(S9) = 7.95 p = 0.0106
F(C*) = 0.66 p = 0.6292

* Combinación de M y S9

TABLA XVIII. RESULTADOS DEL ENSAYO 4 CON LA CEPA TA100.

ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO

CEPA: TA 1535

PATRON: Azida sódica ($1,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)

MUTACION SIN S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	584, 672, 623	626,33	44,09	42,69
III-IV	608, 623, 632	621,00	12,12	43,33

PATRON: 2-Aminofluoreno (1×10^{-2} mg/placa)

MUTACION CON S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	> 1200	> 1200	—	> 102,83
III-IV	> 1200	> 1200	—	> 109,09

TABLA XIX

ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO

CEPA: TA 1538

PATRON: 2-Nitrofluoreno ($2,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)

MUTACION SIN S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	405, 342, 389	378,67	32,75	27,05
III-IV	431, 413, 376	406,67	28,04	27,72

PATRON: 2-Aminofluoreno (1×10^{-2} mg/placa)

MUTACION CON S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	> 1200	> 1200	—	> 75,00
III-IV	> 1200	> 1200	—	> 64,27

TABLA XX

ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO

CEPA: TA 98

PATRON: 2-Nitrofluoreno ($2,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)

MUTACION SIN S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	464, 421, 503	462,67	41,02	27,21
III-IV	406, 467, 437	436,67	30,50	23,82

PATRON: 2-Aminofluoreno (1×10^{-2} mg/placa)

MUTACION CON S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	>1200	> 1200	—	> 57,14
III-IV	>1200	> 1200	—	> 69,24

TABLA XXI

ENSAYO DE MUTACION CON PATRON POSITIVO

CEPA: TA 100

PATRON: Azida sódica ($1,5 \times 10^{-3}$ mg/placa)

MUTACION SIN S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	589, 638, 601	609,33	25,54	6,82
III-IV	580, 587, 620	595,67	21,36	5,98

PATRON: 2-Aminofluoreno (1×10^{-2} mg/placa)

MUTACION CON S9+

ENSAYO	COLONIAS/PLACA	MEDIA	DESVIACION STANDARD	INDICE DE MUTACION
I-II	> 1200	> 1200	—	> 11,92
III-IV	> 1200	> 1200	—	> 13,64

TABLA XXII

TABLA XXIII

INDICES MEDIOS DE MUTACION CON PATRONES POSITIVOS

CEPA	SIN S9+	CON S9+
TA 98	25,51	> 63,19
TA 100	6,40	> 12,78
TA 1535	43,01	> 105,96
TA 1538	27,38	> 69,63

SUPERVIVENCIA

CEPA: TA1535

ENSAYO I-II

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	104, 114, 136	118,00
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	120, 113, 105	112,67
10^{-6}	—	10^{-1}	138, 125, 106	123,00
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	125, 102, 113	113,33

ENSAYO III-IV

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	101, 102, 110	104,33
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	121, 125, 107	117,67
10^{-6}	—	10^{-1}	131, 112, 124	122,33
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	119, 117, 102	112,67

TABLA XXIV

S U P E R V I V E N C I A

CEPA: TA1538

ENSAYO I-II

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	104, 107, 117	109,33
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	150, 114, 120	128,00
10^{-6}	—	10^{-1}	135, 129, 112	125,33
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	153, 158, 142	151,00

ENSAYO III-IV

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	113, 104, 106	107,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	129, 134, 115	126,00
10^{-6}	—	10^{-1}	141, 117, 109	122,33
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	121, 128, 138	129,00

SUPERVIVENCIA

CEPA: TA 98

ENSAYO I-II

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	111, 110, 102	107,67
10^{-6}	5.10^{-1}	—	134, 172, 176	160,67
10^{-6}	—	10^{-1}	187, 152, 134	157,67
10^{-6}	5.10^{-1}	10^{-1}	142, 110, 107	119,67

ENSAYO III-IV

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	102, 121, 118.	113,67
10^{-6}	5.10^{-1}	—	115, 106, 133	118,00
10^{-6}	—	10^{-1}	109, 136, 126	123,67
10^{-6}	5.10^{-1}	10^{-1}	111, 151, 129	130,33

TABLA XXVI

S U P E R V I V E N C I A

CEPA: TA100

ENSAYO I-II

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	111, 115, 139	121,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	190, 189, 171	183,33
10^{-6}	—	10^{-1}	187, 156, 142	161,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	190, 178, 179	182,33

ENSAYO III-IV

DILUCION (bact./placa)	FRACCION MICROSOMAL (S9+) (ml/placa)	MUESTRA	RECuento (colonias/placa)	MEDIA
10^{-6}	—	—	152, 112, 104	122,67
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	—	137, 129, 115	127,00
10^{-6}	—	10^{-1}	103, 112, 124	113,00
10^{-6}	$5 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	150, 117, 131	132,67

TABLA XXVII

MUESTRA	C E P A S			
	TA1535	TA1538	TA98	TA100
1	1.34	1.12	1.00	1.04
2	1.74	1.08	1.24	1.29
3	1.90	1.22	1.00	1.36

TABLA 28. INDICES MEDIOS DE MUTACION SIN S9+.

MUESTRA	C E P A S			
	TA1535	TA1538	TA98	TA100
1	0.85	1.04	0.86	0.92
2	0.93	1.14	1.03	0.98
3	1.13	1.30	0.78	1.03

TABLA 29. INDICES MEDIOS DE MUTACION CON S9+.

DISCUSSION

I. EVALUACION MUTAGENICA

En la actualidad existen más de 100 ensayos destinados a predecir el riesgo genotóxico de los productos químicos para el hombre. El que exista un número tan elevado de ensayos indica claramente que ninguno de ellos por sí solo puede suministrar los datos necesarios para establecer dicho riesgo por varias razones:

1. Las mutaciones comprenden una gran variedad de efectos genéticos y un único test tan sólo podría darnos información de efectos específicos.
2. Un único test podría no ser lo suficientemente sensible como para demostrar la existencia de un efecto mutagénico.
3. Un mutágeno podría ser específico de órganos o especies, de forma que, si no se utilizan los sistemas de ensayos apropiados, podría no ser detectado como tal.

De todo ello se deduce que el uso de una batería de ensayos es indispensable para la evaluación del riesgo genotóxico de los productos químicos y útil para la predicción de su carcinogenicidad (Maron y Ames, 1983).

Por ello, todas las recomendaciones efectuadas por la EPA proponen que todos los agentes sospechosos de poseer potencial mutagénico/carcinogénico, sean sometidos a múltiples ensayos.

Según Sobels, (1980), la evaluación mutagénica de un determinado producto debería de constar de cuatro etapas consecutivas:

1. Identificación, mediante pruebas con sistemas bacterianos (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*).
2. Verificación, empleando ensayos eucarióticos (*Drosophila*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, etc).
3. Cuantificación, haciendo uso de pruebas con cultivos celulares por su elevada precisión.

4. Extrapolación al hombre, mediante ensayos con mamíferos.

En principio los datos procedentes de sistemas basados en procariontes pueden ser utilizados para prever la capacidad que posee un producto químico de provocar mutaciones hereditarias o cáncer en el hombre, pero hay que formular previamente una serie de hipótesis:

- * El efecto se manifestaría en células de mamíferos.
- * Las condiciones del metabolismo "in vitro" reflejarían bien el metabolismo "in vivo".
- * Una mutación somática ocasionaría la formación de un tumor, o bien una mutación germinal se transmitiría a la siguiente generación y daría lugar a un fenotipo anormal.

Cualquier resultado obtenido en diferentes sistemas de ensayo puede utilizarse para prever lo que ocurriría en otros sistemas diferentes con grados de confianza variables (Figura 5) (OCDE, 1986).

Sin discutir que lo ideal para establecer el riesgo potencial de un producto químico es utilizar una batería de ensayos, sin embargo, en muchas ocasiones cuando se trata de evaluar un número elevado de productos en un corto período de tiempo, acatar dicha recomendación resulta imposible.

Por ello, creemos necesario establecer prioridades al realizar ensayos de mayor complejidad, y la evaluación por etapas obliga a adoptar una solución de compromiso.

Todos los productos químicos deben evaluarse inicialmente mediante un test rápido y poco costoso como es el test de Ames (Bridges, 1974; Ashby, 1986). Aquellos que resultaran mutagénicos en estos test, pasarían a ser evaluados con otros ensayos más precisos y apropiados para predecir el riesgo, siguiendo la secuencia de la Figura 5.

DAÑOS PARA EL HOMBRE:

DAÑOS PARA LOS ANIMALES:

ENSAYOS DE CORTA DURACION:

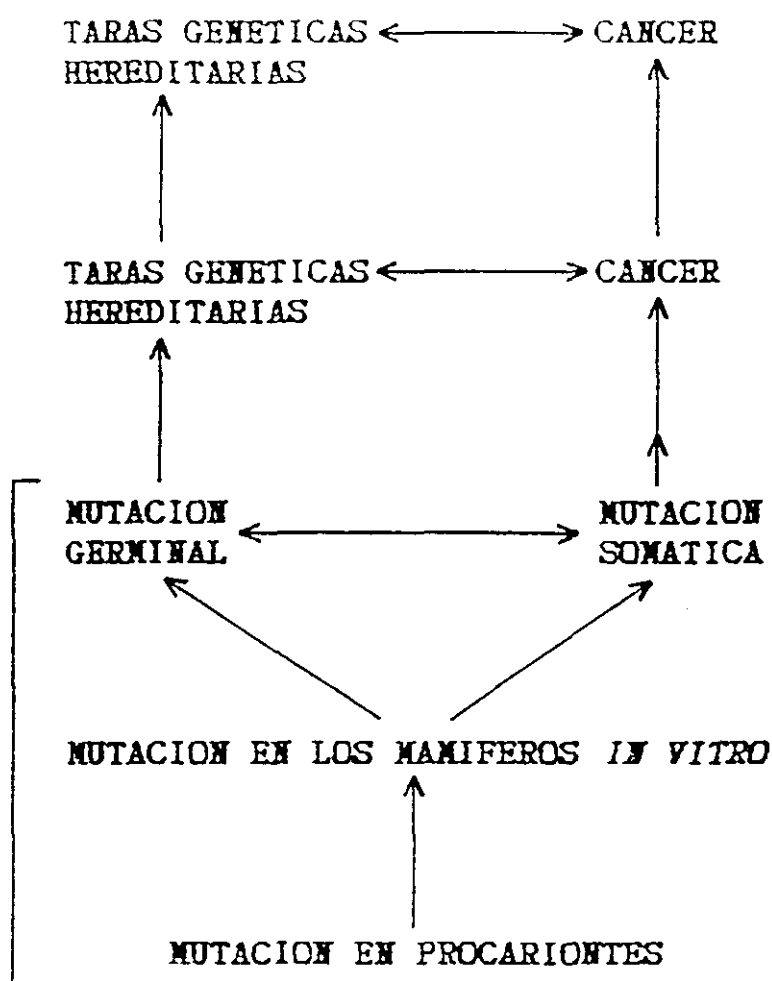


FIGURA 5. APLICACION AL HOMBRE DE LOS DAÑOS OBSERVADOS EN OTROS ORGANISMOS

Ahora bien, esta estrategia no es perfecta ya que puede ocurrir que productos químicos que originen efectos genotóxicos específicos den resultados negativos en los tests preliminares, escapando así a estudios más complejos.

En cualquier caso, los ensayos con *Salmonella typhimurium* constituyen el elemento base en la batería de ensayos de mutagenicidad, y se han impuesto en la actualidad tanto por organismos científicos como públicos, para la realización de un estudio básico de todo producto químico, y por ello lo hemos elegido como soporte de nuestro estudio.

II. TECNICAS DE MUTAGENESIS

Los numerosos ensayos de mutagenicidad varían en cuanto a su sensibilidad, su complejidad y su habilidad para detectar carcinógenos potenciales pudiéndose clasificar atendiendo a diversos parámetros:

1. Según se lleven a cabo **"in vivo"** o **"in vitro"**.

Algunos ensayos de mutagénesis se llevan a cabo "in vitro" con bacterias, levaduras, hongos o cultivos celulares. Otros se realizan "in vivo" utilizando mamíferos como organismos de ensayo. Para nuestra experiencia hemos utilizado un ensayo "in vitro" ya que estos están considerados como los más sencillos y sensibles (Taylor, 1986).

2. Según se utilicen organismos **procariotas** o **eucariotas**.

En el test de Ames se utiliza *Salmonella typhimurium* un organismo procariota. El material genético de los procariotas tiene algunas diferencias básicas con el de los eucariotas. Dichas diferencias pueden tener alguna importancia en el valor predictivo de los sistemas de detección de mutágenos; así por ejemplo muchos productos químicos no son mutagénicos o carcinogénicos "per se", sino que necesitan activación metabólica. Estos promutágenos o procarcinógenos necesitan activarse por sistemas enzimáticos presentes en organismos superiores. Para solventar este problema hemos utilizado en nuestro ensayo, el sistema de activación

más conocido, consistente en una fracción microsomal de hígado de ratón (Ames et al, 1975) que contiene todos los enzimas necesarios, asemejándose a los procesos de metabolización de los mamíferos.

3. Dependiendo del **tipo de mutación** que genere el compuesto.

Los ensayos de mutagenicidad van a detectar distintos tipos de daño genético, principalmente mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas. Los tests de mutagénesis bacterianos , incluido el test de Ames empleado por nosotros, detectan solo mutaciones genéticas. Dado que el proceso de inicio de la carcinogénesis inducida por productos químicos es una mutación genética (Boutwell et al, 1974), el ensayo elegido por nosotros para nuestro estudio es teóricamente uno de los que imitan más de cerca los procesos de iniciación de la carcinogénesis química (Taylor, 1982).

Por otro lado, en todas la técnicas de mutagénesis está presente el problema de la fiabilidad de los datos y su extrapolación a organismos superiores y al hombre.

Son numerosos los factores que pueden ser responsables de **falsos negativos** y por lo tanto de la disminución de la sensibilidad del test:

1. **Toxicidad de la sustancia**

Algunos compuestos químicos pueden ejercer acción bactericida sobre los organismos de ensayo, pudiendo falsear los resultados (Purchase et al, 1976). Para evitar este posible error, hemos llevado a cabo paralelamente con el test de Ames, ensayos de supervivencia bacteriana, comprobando que ninguna de las muestras a las concentraciones por nosotros estudiadas, disminuye el número de bacterias viables por placa de modo significativo.

2. **Estructura química del compuesto problema**

El tipo de compuesto químico objeto de ensayo tiene gran importancia en la

sensibilidad de la técnica de mutagénesis. Diversos estudios (Mc Cann et al, 1975; Rinkus y Legator, 1979; Sugimura et al, 1976; Bartsch et al, 1980) han demostrado el grado de sensibilidad del ensayo de Ames para distintos compuestos químicos. No hemos encontrado en la bibliografía consultada ningún estudio que nos muestre la sensibilidad del test de Ames para los mutágenos contenidos en un agua de consumo público.

3. **Inadecuado sistema de transporte**

El transporte a través de la membrana celular, puede ser otro factor responsable de falsos negativos, ya que puede diferir de las bacterias a las células de los mamíferos. Un claro ejemplo es la Actinomicina D, conocido carcinógeno que es sin embargo negativo en el test de Ames (Heddle y Bruce, 1977), presumiblemente por su incapacidad para atravesar la membrana bacteriana (Rinkus y Legator, 1979). Por ello en este ensayo se han empleado cepas con la mutación *rfa*, que causa pérdida parcial de la pared bacteriana aumentando así la permeabilidad a las macromoléculas.

4. **Imposibilidad de detectar aberraciones cromosómicas**

Un conocido ejemplo de falso negativo originado por este mecanismo es la Griseofulvina, un carcinógeno demostrado que actúa causando disfunción en el aparato mitótico, proceso presumiblemente mutagénico y que sin embargo no se detecta en células microbianas (Heddle y Bruce, 1977).

Por otra parte son varios los factores responsables de la incidencia de **falsos positivos** en los ensayos de mutagénesis:

1. **Activación bacteriana** de los compuestos químicos

Si la bacteria empleada tiene enzimas capaces de metabolizar al compuesto químico a una forma activa y si estas enzimas no están presentes en mamíferos, se puede generar un falso positivo (Mc Cann y Ames, 1979). Este problema lo hemos

solventado en nuestro estudio, al emplear *Salmonella typhimurium*, una bacteria presente en la flora intestinal de los mamíferos.

2. Presencia de **impurezas mutagénicas**

La presencia de impurezas mutagénicas puede generar falsos positivos. En nuestro caso las muestras no han sido purificadas, ya que lo que se pretende es evaluar la posible actividad mutagénica global de los concentrados de agua de bebida.

3. **Limitaciones en la sensibilidad** de los ensayos de carcinogénesis

En algunos casos los ensayos de carcinogénesis animal pueden no ser lo suficientemente sensibles para detectar potenciales carcinógenos que han sido identificados como mutágenos en ensayos bacterianos (Taylor, 1982). Esta situación puede parecer un falso positivo, cuando realmente no lo es. Según Mc Cann y Ames (1977), muchos mutágenos débiles se clasifican como falsos positivos e incluso otros más potentes están clasificados como tales cuando la evidencia de carcinogenicidad no es contundente.

4. Exclusión de importantes **mecanismos de detoxificación** y protección

Los ensayos de mutagénesis "in vitro" no incluyen importantes mecanismos de detoxificación presentes en los mamíferos (Tsuda et al, 1980). La acción enzimática de la flora intestinal, las limitaciones impuestas por el tracto gastro-intestinal, el transporte y vías de excrección y detoxificación, representan ejemplos claros de mecanismos de defensa de los que carecen los ensayos bacterianos y que pueden ser motivo de aparición de falsos positivos.

Como hemos indicado anteriormente, el apoyarse en un solo ensayo podría generar un aumento significativo del número de falso positivos y negativos. Por todo lo anteriormente expuesto, el Food Safety Council (1980) ha sugerido como ya hemos comentado, la aplicación de una batería de ensayos como método para limitar la incidencia de resultados que pudieran llevar a confusión.

En relación con este último punto, hemos de precisar que paralelamente a nuestro estudio se está realizando un estudio gemelo, utilizando *Escherichia coli* como organismo de ensayo. La comparación de los resultados de ambos, permitirá, en un futuro próximo los errores al calificar el producto como "mutagénico" o "no mutagénico".

III. METODOS DE ENSAYO

3.1. ENSAYO DE INCORPORACION EN PLACA

Es preciso tener en cuenta las relaciones mutagenicidad-toxicidad y mutación espontánea-inducida a la hora de evaluar el resultado obtenido con este procedimiento de ensayo.

En el primer caso, el efecto tóxico que pueden ejercer determinadas concentraciones de un producto químico sobre las bacterias podría enmascarar el efecto mutagénico, principalmente cuando la acción letal del compuesto sea elevada a concentraciones débilmente mutagénicas; o bien podría inducir a error en la interpretación de resultados, ya que las colonias revertantes crecen sobre un césped de bacterias auxotróficas que aparecen debido a las trazas de histidina y biotina añadidas al medio, de forma que en el caso de que la concentración ensayada sea tóxica y, por tanto produzca una muerte masiva de las bacterias his-, habrá mayor cantidad de histidina disponible para las bacterias supervivientes.

A consecuencia de lo anterior, se producirá mayor división celular y aparecerán colonias pequeñas que pueden confundirse con revertantes inducidas, sin serlo. Por ello es por lo que debe examinarse siempre con atención el césped bacteriano.

La medida de la supervivencia en el test de Ames llega a ser importante cuando la toxicidad del compuesto es significativa. El número de revertantes observados en la placa es el resultado final de una serie de acontecimientos complejos y aunque poco se sabe acerca de la naturaleza de estos procesos, se podría argumentar que el resultado final es decir, el número de revertantes por placa, está determinado por el número final de

El método es más sensible que el ensayo en placa convencional (Matsushima, 1980), debido a que el compuesto a ensayar, la bacteria y la fracción microsomal se incuban a una concentración superior, facilitándose así el contacto entre ellos y haciéndose más factible la metabolización del compuesto.

Sin embargo Ames en 1975, lo propuso solo como apoyo al método convencional, ya que aunque existen productos que han sido eficazmente detectados por este método como la dietilnitrosamina, existen otros que no se detectan. Esto pudiera deberse a que la preincubación requiere un período de tiempo (20- 30 minutos), durante el cual los enzimas han de estar a 37°C, temperatura a la cual los microsomas pierden su actividad rápidamente, mientras que en el ensayo convencional permanecen activos entre seis y nueve horas, probablemente debido a la estabilización de los enzimas inmovilizadas por el agar.

En todo caso el método de preincubación se considera ventajoso para la detección de mutágenos dependiendo del comportamiento y las características del compuesto a ensayar; así será válido cuando el compuesto debido a su inestabilidad requiera una rápida metabolización del mismo para ejercer su efecto mutagénico.

En este último punto nos basamos para elegir el ensayo convencional en placa en lugar de la preincubación, dado que la literatura consultada sobre el tema (Loper, 1984), nos informaba que la mutagénesis derivada de aguas de bebida cloradas disminuía en presencia de S9 mix, en el test de Ames. Por tanto, nos pareció más adecuado estudiar los compuestos sin preincubación, para valorar mejor su potencia mutagénica.

IV. REPRODUCIBILIDAD DE LOS ENSAYOS

El carácter cuantitativo de un ensayo está definido por su capacidad de reproducción; si no existiera esta capacidad, el ensayo solo tendría validez desde el punto de vista cualitativo.

Para que el ensayo sea reproducible, es necesario estandarizar al máximo el protocolo experimental, a fin de comparar los resultados. En la práctica todos los investigadores suelen emplear pequeñas modificaciones del protocolo original, y éstas podrían ser responsables de las diferencias obtenidas en los resultados de los distintos laboratorios, al evaluar una misma sustancia.

Existen múltiples factores que influyen en la precisión del test, algunos de los cuales están asociados con la manipulación o las condiciones de realización del mismo (Maron y Ames, 1983).

El **número de bacterias plaqueadas** como ya hemos comentado puede afectar a la respuesta obtenida y por ello muchos autores recomiendan que solo los resultados donde dicho número se encuentre comprendido entre 5×10^7 y 2×10^8 sean considerados adecuados, para evitar la pequeña variabilidad que pudiera atribuirse al número de bacterias plaqueadas, (Maron y Ames, 1983; Anderson y col, 1987).

El **número de revertantes espontáneos** que como sabemos, es independiente del número de bacterias plaqueadas dentro de los límites de 10^5 a 10^9 (Maron y Ames, 1983). Sin embargo los mutantes preexistentes, originados durante el crecimiento del cultivo de noche, dependen directamente del número de bacterias plaqueadas (Anderson y col., 1987).

El número final de bacterias existentes en la placa, que depende también de la **concentración de histidina** presente en el medio, va a determinar el número de revertantes espontáneos (Green, 1981).

Los cambios en las concentraciones de histidina también parecen afectar al número de revertantes inducidos; aunque sabemos que el número de colonias espontáneas aumenta conforme lo hace la concentración de histidina, la influencia en el número de revertantes inducidos depende más de la naturaleza del compuesto ensayado (Anderson, 1984).

Grafe y col. en 1981, indican que otra fuente de variación son las **condiciones en las que se incuban los cultivos de noche** en cada laboratorio, ya que la bacteria podría estar en diferentes fases de crecimiento y el estado fisiológico de la misma sería el responsable de las variaciones observadas.

Existe una relación entre la fase de crecimiento en que se encuentra la bacteria y la duración de la fase de latencia en el cultivo de agar mínimo; así parece más apropiado usar bacterias con el máximo de actividad fisiológica y capaces de reducir al mínimo la fase de latencia. Esto se consigue utilizando cultivos bacterianos que estén alcanzando la fase estacionaria dado que es en este punto donde se obtienen el mayor número de formas viables, independientemente de la hora a la que se alcance dicha fase en cada laboratorio; por lo tanto esperar de 16 a 18 horas no supondrá ninguna ventaja si las bacterias han alcanzado antes la fase estacionaria, ya que solamente una parte de las mismas será capaz de superar la fase de latencia en el agar mínimo y en el caso de que la superen, si esta se alarga, muchas sustancias pueden perder su actividad biológica dando lugar a falsos negativos (Ames y col., 1978).

Por todo esto varios autores (Belser y col., 1981; Goggelman y col., 1981; Maron y Ames, 1983), recomiendan que las bacterias utilizadas en el ensayo se encuentren al final de la fase de crecimiento exponencial, razones estas que justifican el método seguido en nuestro estudio.

Barber y col. (1983), describen los resultados obtenidos al realizar estudios acerca del crecimiento de las bacterias en el agar y comprueban que el número de colonias finales depende de la concentración de histidina. Además el tiempo de duplicación es similar para las cepas TA1535, TA100, TA1538 y TA98, y es 50 ± 5 minutos.

Por otro lado, el número de duplicaciones se ha establecido en $5 \pm 0,1$ cuando el inóculo es 1×10^8 . El tiempo de dependencia de la reversión no es función del mutágeno bajo estudio sino que es una propiedad intrínseca del ensayo de incorporación en placa, y tampoco es un fenómeno específico de las cepas.

Existe una interdependencia entre la reversión de la bacteria y su crecimiento en la placa, así la reversión no tiene lugar durante las primeras cuatro horas después de plaquear la bacteria y esto puede tener efectos importantes cuando se ensayan productos químicos de corta vida.

No existe pues una relación constante que indique que a mayor mutación espontánea de la cepa, mayor respuesta al mutágeno estandar (Cheli y col., 1980).

Esto viene apoyado por todo lo expuesto hasta ahora, en el sentido de que existen múltiples factores que pueden causar fluctuaciones en las proporciones de mutación espontánea e inducida.

Dependiendo de las propiedades del compuesto a ensayar convendrá utilizar o bien el protocolo estandar del ensayo de incorporación en placa, o bien introducir modificaciones del mismo, con el propósito de obtener una mejora en los resultados y, una vez adoptado el criterio a seguir, el protocolo debe ser estrictamente estandarizado a fin de asegurar la reproducibilidad de los resultados.

De todo esto se deduce que el test de Ames no puede usarse para realizar determinaciones cuantitativas de la potencia mutagénica de un producto a causa de los múltiples factores internos que hemos mencionado y que pueden influir en la obtención de la misma; sin embargo, el conocimiento de estos factores puede ayudar a una mejor interpretación de los resultados y permite realizar una estimación aproximada de la potencia mutagénica que además debe basarse en los resultados de los test estadísticos.

La validez e importancia del test de Ames se mantiene, sobre todo si se compara con la escasa estandarización de la mayoría de los ensayos de corta duración utilizados para predecir el riesgo carcinógeno de los productos químicos.

V. CUANTIFICACION DEL EFECTO MUTAGENICO

Se han propuesto varios métodos para la interpretación de los resultados obtenidos en el ensayo en placa; todos ellos tienen como finalidad establecer un criterio para considerar al compuesto mutagénico/no mutagénico y cuantificar dicho efecto.

A la hora de clasificar un compuesto como mutagénico o no mutagénico los autores no se ponen de acuerdo y emplean distintos criterios. Generalmente se aplica la llamada "regla de las dos veces" (Ames y col. 1975).

El incremento de dos veces sobre el valor de la mutación espontánea, tiene varias desventajas. En cepas con una mutación espontánea muy baja (2-5), el incremento de dos veces indica un efecto positivo si se obtiene una respuesta por ejemplo de 4-10 a una determinada concentración del producto, aunque esta respuesta se encuentre dentro del rango de mutación espontánea aceptable.

En estos casos el "incremento de dos veces modificado", que introduce el requerimiento de una relación dosis/respuesta para considerar los resultados positivos, mejora el promedio de falsos positivos para las cepas sin plásmido aunque no lo elimina totalmente (Chu y col., 1981).

Por otro lado, para las cepas con una mutación espontánea alta, como la TA100, el incremento de dos veces podría ser un requerimiento muy restrictivo para determinar el efecto positivo. Por ello algunos autores no consideran válida esta regla para la cepa TA100 y en este caso aplican el criterio de 100 revertantes en exceso de los controles (Moriya y col., 1983).

Un resultado positivo, para la mayoría de los compuestos evaluados, indica la existencia de un grupo de concentraciones que produce una curva de dosis/respuesta con una porción lineal; ésta a medida que se incrementa la concentración del producto se achata y finalmente desciende debido, principalmente, a efectos de toxicidad.

A veces, se obtienen curvas no lineales, como en el caso de mutágenos conocidos como la 9-aminoacridina, y esto debe tenerse en cuenta al valorar la mutagenicidad del producto.

Una medida de la potencia mutagénica de un producto, si se asume una relación dosis/respuesta lineal a bajas dosis mutagénicas sería la pendiente de la recta, es decir, el incremento absoluto del número de revertantes por unidad de dosis, o su inversa, la dosis requerida para producir un incremento de una unidad en el número de revertantes. La pendiente de la curva de dosis/respuesta depende de la escala de concentraciones utilizada.

Basándose en esto, Bernstein y col.,(1982) describen una aproximación para elegir las concentraciones que se encuentran en ésta porción lineal de la curva de dosis/respuesta así como un método para estimar la pendiente inicial de la curva y determinar la bondad del ajuste.

More y Felton (1983), describen un método estadístico consistente en un análisis de la varianza y posteriormente un análisis de regresión. La comparación de ambos métodos indica que están de acuerdo en la clasificación de los agentes como mutagénicos y no mutagénicos.

Otros autores para estimar la respuesta mutagénica, utilizan modelos estadísticos como es el caso de Weinstein y Lewinson (1978) que aplican un análisis convencional de la varianza. Además de la mutagénesis y la toxicidad, son muchos los factores que pueden afectar a la pendiente de la curva de dosis/respuesta, por ello a la hora de hacer un análisis estadístico de los datos muchos autores han elegido modelos que tienen en cuenta la toxicidad del producto y otros factores que podrían afectar a la pendiente de la curva (Haynes y Eckard, 1980; Margolin y col., 1981).

Sin embargo es difícil incorporar en un modelo los múltiples factores que pueden afectar a la pendiente de la curva de dosis/respuesta y en particular, el mecanismo de toxicidad que probablemente varíe para los distintos productos.

Chu y col. (1981) después de realizar un análisis de los métodos utilizados, para determinar si un ensayo de mutagenicidad se consideraba positivo o negativo indican que en general, los métodos estadísticos dan lugar a un elevado número de falsos positivos y que la "regla de las dos veces" puede dar lugar a falsos positivos o falsos negativos dependiendo de la tasa de mutación espontánea.

Por último McCann y col.(1984) realizan una evaluación de los datos del test de Ames, existentes en la literatura publicada, aplicando el método estadístico de Berstein y col. (1982) y comparan los resultados obtenidos en el test estadístico con la opinión de los autores que, en la mayoría de los casos, suele ser la llamada "regla de las dos veces".

Los resultados en ambos casos fueron coincidentes en su mayor parte, sin embargo se observaron algunos desacuerdos. Las razones de los mismos serían por una parte la tendencia de los métodos estadísticos a considerar más experimentos positivos cuando existe una relación dosis/respuesta lineal, mientras que los autores por su parte, tienden a juzgar más experimentos positivos que los métodos estadísticos cuando la dosis/respuesta no es lineal.

Esto pone de manifiesto que la elección del método influye en la interpretación del resultado, por lo que se considera conveniente el establecimiento de un mismo criterio para informar un resultado y, puesto que ninguno es considerado como el ideal, podría admitirse el uso combinado de más de un método, basado siempre en la realización de ensayos repetidos.

Por todo lo expuesto, decidimos utilizar en nuestro estudio dos metodologías diferentes, para cuantificar el efecto mutagénico con mayores garantías. Estos métodos son:

1. El cálculo del índice de mutagenicidad en función de la "regla de las dos veces".
2. El método estadístico por medio del cálculo del análisis de la varianza y del análisis de la varianza para medidas repetidas.

VI. FORMACION DE MUTAGENOS EN AGUAS CLORADAS

Desde que en las últimas décadas han ido apareciendo en la literatura numerosas publicaciones científicas que hablan de la presencia de actividad genotóxica en los concentrados orgánicos derivados de las aguas potables, multitud de investigadores se han centrado en estudiar el problema en las fuentes de agua de consumo (Am. Pu. H. Ass., 1971 y 1975; Jolley y col., 1987; Kopfler y col., 1987).

6.1. FUENTES DE MUTAGENOS POTENCIALES

Parece claro que existen más de una fuente potencial de mutágenos en la agua de bebida (Meier, 1988), entre las que hemos de tener presente al menos las siguientes:

1. Contaminantes de las aguas libres o no tratadas
 - a. Algas y materias húmicas
 - b. Descargas industriales
 - c. Efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales
 - d. Residuos de los terrenos o de la agricultura
2. Contaminantes químicos añadidos o formados durante el proceso de tratamiento del agua
 - a. Sustancias utilizadas como coagulantes/floculantes
 - b. Productos utilizados para la desinfección
 - c. Aparición de compuestos orgánicos clorados
3. Contaminantes químicos que se generan durante el proceso de distribución
 - a. Compuestos producidos en los tanques de almacenamiento o en las tuberías
 - b. Transformación microbiana de compuestos químicos en mutágenos

Pero la opinión de la mayoría de los autores coincide en afirmar que la cloración del agua parece ser la máxima responsable de la aparición de mutágenos en aguas de consumo público (Coleman y col., 1980; Douglas y col., 1980; Kim y col., 1989; Kool y col., 1984; Kopfler y col., 1987).

Otro problema con el que se encontraron los investigadores que estudiaron el tema, era la idea expresada por Loper (Loper y col., 1987), de que la mutagénesis derivada de aguas contaminadas dependía de la activación microsomal (+S9), mientras que aguas no contaminadas y por tanto no mutagénicas en principio, mostraban actividad mutagénica directa en el test de Ames tras la cloración, la cual disminuía en presencia de S9.

Esto apoya la idea de que en ambos casos se trata de mutágenos de naturaleza diferente (Nazar y col., 1980; Nestman y col., 1981; RooK, 1980).

6.2. AISLAMIENTO DE LOS AGENTES MUTAGENICOS

Dada la preocupación que existe sobre la exposición crónica a lo largo de toda la vida a mutágenos que pueden comportarse como posibles carcinógenos, al beber en nuestras ciudades aguas cloradas, se intenta avanzar lo más posible en el conocimiento y aislamiento de los agentes responsables de esta actividad mutagénica.

Desafortunadamente no es una tarea fácil, debido en primer lugar a que más de 1100 compuestos han sido identificados y se ha visto que la mayoría estaban presentes a unos niveles inferiores a 1 $\mu\text{g/l}$ en el agua. En segundo lugar, se calcula que más del 90% de los compuestos orgánicos disueltos en el agua son volátiles y por tanto difíciles de analizar. Por último debido a la carencia de datos, la contribución de la mayoría de los mutágenos identificados es desconocida (Meier, 1990).

Varios estudios en Finlandia, USA y Gran Bretaña (Heming y col., 1986; Meier y col., 1987; Kromberg y col., 1988 y Horth y col., 1989), han estimado que la contribución de uno de los principales mutágenos aislados, el MX, se ranga entre el 5 y el 60%.

Por su parte, el otro isómero importante bien conocido, el E-MX y otros compuestos del grupo todos juntos no contribuyen a más del 10% de la actividad mutagénica total (Kromberg y col., 1988).

Dado que incluso con un protocolo de aislamiento y fraccionamiento adecuado el MX y sus isómeros son muy difíciles de aislar, al ser componentes minoritarios de las aguas de consumo, en el presente estudio hemos preferido limitarnos a concentrar de forma global todos los compuestos orgánicos no volátiles contenidos en el agua objeto de estudio, por lo que solo podemos hablar de actividad mutagénica en conjunto y no atribuída a un determinado compuesto. Consideramos conveniente continuar los estudios en esta línea, para llegar a la identificación y el aislamiento de los mutágenos que permanecen sin ser reconocidos.

La cuestión que subyace a todo el problema, es sí el MX o cualquier derivado clorado representa un peligro real para la salud del hombre. Lo que si parece claro es que a la temperatura y pH similares a los del agua de consumo público, la vida media de estos mutágenos es de 4 a 6 días (Meier, 1990), por lo tanto una parte importante va a persistir a través del sistema de distribución.

Sin embargo no debemos dejar de mencionar que varios autores (Maruoka y col., 1983; Norwood y col., 1981), han comprobado que el pH ácido aumenta la actividad mutagénica de las aguas de consumo desinfectadas con cloro. Así, según Kromberg (Kromberg y col., 1989), conforme aumenta el pH del agua disminuye la estabilidad del MX y de sus isómeros, llegando a pH 8 o superior a la degradación e hidrólisis de los mismos. La mayor estabilidad de los mutágenos estaría según el autor a un pH de 2.

Nuestro trabajo se ha realizado a pH neutro, condición que reproduce la situación natural del agua de abastecimiento que se ha ensayado, y tal y como les llega desde el sistema de distribución a los consumidores. Quizás sería interesante repetir el ensayo acidificando las muestras antes de procesarlas y concentrarlas, con el fin de mantener la estabilidad de los compuestos disueltos en el agua y conseguir el aislamiento de un mayor

número de sustancias potencialmente mutagénicas.

6.3. TEST "IN VIVO" E "IN VITRO"

En cuanto a las técnicas de detección de la genotoxicidad de estas sustancias, Thompson (1985) recopiló datos de más de 200 agentes, analizados tanto "in vivo" como "in vitro", y vio que la respuesta "in vitro" es altamente predictiva de lo que ocurrirá "in vivo" y viceversa.

Sin embargo, se mantienen diferencias entre los resultados "in vitro" e "in vivo" que pueden explicarse por varias razones (Meier, 1990; Bartsch y col., 1980):

1. En primer lugar hay que tener en cuenta las diferencias inherentes en la sensibilidad de los distintos tipos de organismos y de células.
2. En segundo lugar, los posibles errores que se cometen al administrar a los animales, en los ensayos "in vivo", dosis lo suficientemente altas para provocar una respuesta forzada.
3. Por último, factores como la inestabilidad química de los compuestos, la influencia de los procesos de detoxificación y metabolización o de activación metabólica y los mecanismos farmacocinéticos que previenen el acceso a los órganos y tejidos.

Como ya hemos comentado más arriba, la bibliografía consultada nos muestra que en la mayoría de las ocasiones, estos mutágenos que estudiamos se metabolizan de forma favorable con la fracción microsomal, hecho que puede prevenir que las formas activas se distribuyan por el organismo y alcancen los tejidos corporales. Además estudios "in vitro" han demostrado que el MX puede inactivarse por el glutatión (Meier y col., 1987; Meier, 1990) y esto puede ser de interés para su detoxificación "in vivo".

En nuestro estudio, se confirman la tesis de los autores que han trabajado con test "in vitro", para evaluar la actividad mutagénica de derivados clorados en aguas de consumo, en el sentido de una disminución de la mutagenicidad al añadir a las

preparaciones la fracción microsomal. Sería por tanto un eficaz sistema depurador que si actúa de igual forma en el interior de los mamíferos, prevendría el acceso de los mutágenos activos al organismo de estos.

6.4. CONSISTENCIA DE LAS ASOCIACIONES "IN VIVO"

A diferencia de lo que ocurre con las técnicas "in vitro", en el caso de los estudios "in vivo", resulta mucho más difícil probar una asociación.

Las medidas de calidad de agua usadas en estos estudios son muy globales. El efecto de la cloración depende de la cantidad y tipo de materiales orgánicos presentes en el agua. Por lo tanto los efectos carcinogénicos potenciales de las fuentes de agua cloradas diferirán en función de sus características. Este es el principal problema con el que nos encontramos en nuestro estudio.

En general los estudios epidemiológicos realizados han encontrado un riesgo asociado con el consumo de agua desinfectada con cloro de 1.1 a 2.0 veces mayor que con el agua no clorada para el cáncer de recto, vejiga y colon (Craun, 1988; Kopfler y col., 1984).

Este riesgo relativo está sin embargo sujeto a imprecisiones, porque puede deberse a la existencia de factores de confusión. En muchos casos los datos sobre la enfermedad se extrajeron de los certificados de defunción. Por otro lado no se controlaron muchas características personales y demográfica. Otro problema que se presenta a la hora de valorar el riesgo para el ser humano, es definir la proporción de casos de cáncer que es atribuible o se presume que está causada por la exposición de interés.

Nosotros en nuestro estudio, nos hemos centrado en la determinación de la mutagenicidad con un test "in vitro", por lo que no podemos aportar ningún dato nuevo en lo que se refiere a extrapolación al hombre.

VII. ANALISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

La aplicación del test de Ames, utilizando el método de incorporación en placa nos ha permitido valorar los compuestos orgánicos formados durante la cloración de un agua de consumo público desde el punto de vista de su posible mutagenicidad.

Las cepas de estudio que proporcionaron los índices de mutagenicidad mayores, fueron la TA1535 y la TA100. Este hecho coincide con la opinión de los autores que señalan especialmente a la cepa TA100 como la más sensible para detectar mutagenicidad de concentrados orgánicos clorados (Bull y col., 1982; Forster y col., 1981; Jolley, 1981 y 1987).

La cepa TA 1535, es un mutante hisG46, es decir que presenta una sustitución de una base, haciendo por tanto imposible la biosíntesis de la histidina. Presenta además, como se recoge en la Tabla II, una deficiencia en el mecanismo de escisión reparación (uvrB) y una mutación rfa, que hace a la bacteria más permeable a las macromoléculas.

En cuanto a la cepa TA100, es una bacteria mutante con las mismas características genotípicas de la cepa TA1535 de la que procede, diferenciándose solamente en la presencia del plásmido pKM 101, el cual le confiere un aumento de la posibilidad de error durante la duplicación del ADN.

Estas cepas, detectan sobre todo mutaciones que produzcan sustituciones de pares de bases, por lo que podemos pensar que las posibles mutaciones originadas por los compuestos ensayados se llevarían a cabo por este mecanismo.

En cuanto a las cepas TA1538 y TA98, podemos afirmar que no han sido adecuadas para valorar la mutagenicidad de los concentrados obtenidos de las aguas problema y por lo tanto, al ser cepas que detectan sobre todo mutágenos "frameshift", es poco probable que las mutaciones inducidas por este tipo de compuestos, sean del tipo de las que ocasionan un desplazamiento en el marco de lectura o desfase genético.

No se ha obtenido en ninguno de los ensayos, una evaluación mutagénica positiva. Tan solo en el caso de la cepa TA1535, sin S9, se ha rozado la positividad ya que prácticamente se cumplió la condición de la "regla de las dos veces".

Ya hemos comentado que el empleo de la "regla de las dos veces" tiene varias desventajas, sobre todo en lo que se refiere a las cepas de mutación muy alta, como es el caso de la cepa TA100, en la que el incremento de dos veces sobre el valor de la mutación espontánea, podría ser un requerimiento muy restrictivo para determinar el efecto positivo (Moriya y col., 1983).

Quizás, esto pueda explicar el hecho de que en nuestro ensayo los índices de mutagenicidad obtenidos con la cepa TA100, a pesar de haber sido los segundos en importancia, no hayan alcanzado los niveles de la cepa TA1535, que es de características muy semejantes.

Por otro lado, un resultado positivo indicaría la existencia de un grupo de concentraciones que produce una curva de dosis/respuesta con una porción lineal, que se incrementa con la concentración del producto, y finalmente desciende al aparecer la toxicidad.

En el caso de los ensayos expuestos, no hemos calculado esta curva dosis respuesta porque los test estadísticos utilizados han proporcionado unos niveles no significativos, incluso con la cepa TA1535, y además muy variables entre unos ensayos y otros, aún dentro de la misma cepa.

En algunos ensayos, especialmente con la cepa TA1535, se han obtenido diferencias significativas al realizar el análisis de la varianza (ANOVA) con respecto a los controles, pero esto no es representativo dado que este test aprecia diferencias que pueden ser debidas a factores de variabilidad y sin evidencia biológica significativa (More y Felton, 1983). Por ello a la hora de juzgar a los compuestos como no mutagénicos, solamente hemos tenido en cuenta el "índice de mutación".

Sería aconsejable en este sentido, utilizar otros métodos de ensayo como serían la preincubación en placa, para repetir el ensayo con el fin de profundizar en el estudio de estos compuestos, intentando obtener además las curvas dosis/respuesta y la potencia mutagénica.

Los resultados obtenidos sin S9, son netamente superiores en cuanto al número de revertantes y a los índices de mutagenicidad, con respecto a los que se obtienen en los ensayos con S9; esto es especialmente notorio con las cepas TA1535 y TA100, y algo menos claro en la TA98 y sobre todo TA1538, la cual se comporta de manera inversa en varios de los ensayos.

En esto también coincidimos con la mayoría de los autores que encuentran resultados similares, en otras fuentes de agua desinfectadas con cloro (disminución de la mutagenicidad en presencia de S9) (Loper y col, 1987; Meier y col, 1987). Y nos reafirma en la idea de que las cepas TA1538 y TA98, no son muy adecuadas para valorar estos compuestos.

No podemos establecer una comparación con los resultados de otros autores porque, si bien se ha estudiado este problema ampliamente en otros países, no hemos encontrado publicado ningún estudio en España, que hubiera analizado aguas con las mismas características que las nuestras.

Otros posibles factores a tener en cuenta para explicar, los resultados obtenidos, son:

1. El método de **concentración** de las muestras que se ha utilizado.

Varios autores (Kromberg y col., 1989; Dukta y col., 1981; Epler y col., 1978; Guerrero y col., 1979; Jpn. W. W. As., 1978), proponían métodos basados en la extracción con resinas cambaiones y posterior aplicación de técnicas de cromatografía. Nosotros hemos elegido el sistema Sep-Pak (Waters) debido a que posee una serie de ventajas: operar como una cromatografía de columna, ahorrar

tiempo porque permite trabajar a presión, tener un bajo consumo de disolventes y un bajo coste (Fontane, 1981).

2. El efecto de los **disolventes** utilizados para la extracción y disolución de los residuos retenidos en los cartuchos.

Los viales conteniendo los productos obtenidos con cada disolvente fueron procesados por separado en un rota-vapor, para extraer finalmente un residuo seco en forma de polvo, que posteriormente es redisuelto en DMSO e incluido de esta manera en el ensayo. La posible acción mutagénica del DMSO, ha sido ensayada paralelamente en cada prueba y resultó "no mutagénico" con todas las cepas y en todas las experiencias.

Por último, podemos resaltar que sería necesario realizar estudios más complejos, que cuenten con el adecuado tamaño muestral, detallada cuantificación de la exposición al agua clorada, y que ofrezcan un control válido de los principales factores de confusión, para de este modo, confirmar las evidencias que sugieren la relación entre el consumo de agua clorada y la aparición de cáncer de recto, vejiga y colon.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Con respecto a la evaluación mutagénica de los concentrados orgánicos derivados del agua de consumo público analizada, no hemos encontrado actividad mutagénica positiva en ninguna de las muestras ensayadas con el test de Ames.
2. Las cepas de *Salmonella typhimurium* TA1535 y TA100 han mostrado ser las más adecuadas para detectar la mutagenicidad de los concentrados orgánicos clorados.
3. Con la cepa *Salmonella typhimurium* TA1535 se ha alcanzado la calificación de "**ligera mutagenicidad**" al obtener índices superiores a 1.5.
4. Se postula que la acción mutagénica de estos derivados clorados podría consistir en la sustitución de pares de bases.
5. La presencia de la fracción microsomal (S9+) disminuye la mutagenicidad inducida en todas las cepas, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Por todo ello, se pone de manifiesto la necesidad de continuar las investigaciones en este sentido, con el fin de valorar de forma rigurosa los efectos que sobre la salud humana pueda tener la exposición prolongada a los derivados clorados contenidos en el agua de consumo público. Y en su caso considerar otros agentes desinfectantes alternativos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- **American Public Health Association.** Standard Method for examination of Water and Wastewater, Washington DC, 1971, 117-233.
- **American Public Health Association.** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1975, 14 edn., New York.
- **Ames BN.** A bacterial system for detecting mutagens and carcinogens. En: *Mutagenic Effects of Environmental Contaminants*. Sutton HE, Harris MI . (Eds). Academic Press, New York, 1972; 57-66.
- **Ames BN, Lee FD, Durston WE.** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1973a; 70: 782-786.
- **Ames BN, Durston WE, Lee FD.** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining *lives* homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1973b; 70: 2281-2285.
- **Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E.** Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1975a; 72: 2423-2427.
- **Ames BN, Haroun L.** An overview of the Salmonella Mutagenicity Tests. En: *Microsomes, Drug Oxidations, and Chemical Carcinogenesis*. Coon MJ, Conney AH, Estabrook RW, Gelboin HV, Gillete JR, O'Brien PJ. (Eds). Volume II, Academic Press, New York, 1980; 1025-1040.

- **Ames BN, McCann J.** Validation of the Salmonella test: A replay to Rinkus and Legator. *Can Res* 1981; 41: 4192-4196.
- **Ames BN, McCann J, Yamasaki E.** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975b; 31: 347-364.
- **Ames BN, Magaw R, Gold RS.** Ranking Possible Carcinogens: One Approach to Risk Management. En: *The Risk assessment of Environmental and Human Health Hazards. A textbook of case studies* 1989; Wiley Interscience Publications, 1082-1104.
- **Anderson D, et al.** An International collaborative study of "genetic drift" in *Salmonella typhimurium* stains used in the Ames test. En: *Mutation Research* , 1984, 130: 1-10.
- **Anderson WB, Huck PM, Daignault SA, Irvine GA, Rector DW, Savage E, von Borstel RC, Williams DT.** Comparison of Drinking Water Disinfectants Using Mutagenicity Testing. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 201-225.
- **Ashby J.** The prospects for a simplified and internationally harmonized approach for the detection of possible human carcinogens and mutagens. En: **Mutagenesis**. 1986; 1: 3-16.
- **Auerbach C, Kilbey BJ.** Mutation in Eukariotes. En: *Ann. Rev. Genet.* 1971; 5: 163-218.
- **Axtell LM, Cutler SJ, Myers MH.** End Results in Cancer: Report n°4. NIH, 1972; 73-272.

- **Backlund P, Wondergem E, Voogd K, de-Jong A.** Mutagenic activity of the strong mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-(5H)-furanone (MX) in chlorine raw and drinking water in the Netherlands. *Sci Total Environ* 1989; 84: 273-282.
- **Barber ED, Donish WH and Mueller KR.** The relationship between growth and reversion in the Ames *Salmonella* plate incorporation assay. En: *Mutation Research*, 1983; 113: 89-101.
- **Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel-Planche G, Brun G, Montesano R.** Validation and comparative studies on 180 chemicals with *Salmonella typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutat Res* 1980; 76: 1-50.
- **Belser WL et al.** A standardized procedure for quantification of the Ames *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. En: *Environ. Mutag.*, 1981; 3: 123-139.
- **Bernstein L et al.** An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. En: *Mutation Research*, 1982; 97: 267-281.
- **Bridges BA.** Short term Screening test for Carcinogens. *Nature*, volume 261, May 90; 1976: 195-200.
- **Brusick DJ, Simmon VF, Rosenkranz HS, Ray VA, Stafford RS.** An Evaluation of the *Escherichia Coli* WP2 and WP2 *uvrA* Reverse Mutation Assay. *Mutat Res* 1980; 76: 169-190.
- **Bull RJ, Robinson M, Meier JR, Stober J.** The use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection byproducts. *Environ Health Perspect* 1982; 46: 215-227.

- **Buncher CR, Kuzma RJ, Forcade CM.** Drinking water as an Epidemiologic Risk Factor for Cancer. En: *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, 1977, Book A: 347-356.
- **Burke TA, Amsel J, Cantor KP.** Trihalomethane Variation in Public Drinking Water Supplies. En: *Water Chlorination: environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1343-1351.
- **Cairns C.** El Cáncer. En: *Prensa Científica*. S.A. Barcelona. 1986.
- **Cantor KP.** Epidemiologic Studies of Chlorination By-products in Drinking Water: An Overview. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1381-1398.
- **Cantor KP, Hoover R, Hartge P, Mason TJ, Silverman DT and Levin LI.** Drinking Water Source and Risk of Bladder Cancer: A Case Control Study. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5. Lewis Publisher; 1984, 145-152.
- **Cantor KP, McCabe LJ.** The Epidemiologic Approach to the Evaluation of Organic in Drinking Water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 2, 1978. Jolley RL, Gorchev H, Hamilton DH, Jr. (Eds). Ann. Arbor, Michigan: Ann. Arbor Science Publishers, INC; 379-393.
- **CEE.** 1986; 7454/86/CEE.
- **Cheh AM, Skochdopole J, Koski P, Cole L.** Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite. *Science*, 1980; 207: 90-92.

- **Coleman WE, Munch JW, Kaylor WH, Ringhand HP, Meier JR.** GC/MS analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acids-a comparison of the by-products to drinking water contaminants, Reprints of Papers Presented at the 186th National Meeting of the Division of Environmental Chemistry, American Chemical Society; 1980,
- **Commoner B, Vithayathil AJ, Dolara P.** Mutagenic analysis of complex samples of aqueous effluents, air particulates and foods. *Plenum* 1979, New York; 529-570.
- **Cooper JA, Suracc R, Cole P.** Describing the validity of carcinogen screening test. *Br J Cancer* 1979; 39: 87-89.
- **Cooper WJ, Kaganowicz DM.** Novel Precursor of Trihalomethanes. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 895-906.
- **Cotruvo JA.** Drinking Water Perspective. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1417-1422.
- **Cragle DL, Shy CM, Struba RJ, Siff JE.** A Case-Control study of Colon cancer and Water Chlorination in North Carolina. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984: 153-159.
- **Craun GF.** Surface water supplies and health. *J Am Wt Wks Assn* Feb 1988: 40-52.
- **Craun GF.** Epidemiologic Considerations for Evaluating Associations Between the Disinfection of Drinking Water and Cancer in Humans. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984, 133-143.

- **Cheli C et al.** The *Salmonella* mutagenicity assay: reproducibility. En: *Mutation Research*. 1980; 74: 145-150.
- **Christman RF, Johnson JD, Pfaender FK, Norwood DL, Webb MR.** Chemical identification of aquatic humic chlorination products. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 3, 1980. Jolley RL, Brungs WA, Cumming RB (Eds). Ann. Arbor Science, Michigan, 75-84.
- **Chriswell CD, Glatz BA, Fritz JS, Svec HJ.** Mutagenic analysis of drinking water. En: *Application of short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures*. Environmental Science Research. volume 15 Plenum Press: New York 1978; 478-494.
- **Chu KC et al.** Evaluating statistical analyses and reproducibility of microbial mutagenicity assays. En: *Mutation Research*, 1981; 85: 119-132.
- **Clark SW.** Key issues for regulation Disinfectin By-products. En: *Regulation Drinking water Quality*. capitulo 13. Lewis Publishers, 1992; 135-144.
- **Clark SW, Cotruvo JA.** Regulatory Effects on the Practice of Drinking Water Treatment. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; 1987, 87-100.

- **Crump KS.** Chlorinated Drinking Water and Cancer: The Strenght of the Epidemiologic Evidence. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1481-1491.
- **Davis WP, Roberts MH, Jr.** Water Chlorination: Crossroad of Uncertainties and Decisions. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984, 3-38.
- **De Greef E, Morris JC, van Kreijl CF, Morra CFH.** Health effects in the cehmical oxidation of the polluted water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 3, 1980. Joley RL, Brungs WA, Cummings RB (Eds). Ann. Arbor Science, Michigan, 913-924.
- **De Serres FJ.** The Utility of Short-term Tests for Mutagenicity. *Mutat Res* 1976; 38: 1-2.
- **De Serres FJ and Ashby J** (Eds). *Evaluation of Short-Terms Tests for Carcinogens*, Report of the International Collaborative Programme, Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1981).
- **De Serres FJ, Shelby MD.** Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 1979; 64: 159-165.
- **Devoret R.** Tests bacterianos de sustancias potencialmente cancerígenas. *Investigación Científica*. Octubre 1979.
- **Dolara P, Ricci V, Burrini D, Griffini O.** Effect of Ozonation on the Mutagenic Potential of Drinking Water. *Bull Environm Contam Toxicol* 1981; 27: 1-6.

- **Doll R., Peto R.** The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in United States today. *J natl cancer Inst* 1981; 66: 1191-1308.
- **Douglas GR, Nestmann ER, Betts JL, Mueller JC, Lee EG-H, Stich HF, San RH, Brouzes RJ, Chmelauskas AL, Paavila HD, Walden CC.** Mutagenic activity in pulp mill effluents. En: *Water Chlorintaion: Environmental Impact and Healht Effects*, volume 3, 1980. Jolley RL, Brungs WA, Cumming RB (Eds). Ann. Arbor Science, Michigan, 865-880.
- **Dukta BJ, Jova A, Brechin J.** Evaluation of four concentration/extraction procedures on waters and effluents collected for use with tha *Salmonella typhimurium* screening procedure for mutagens. *Bull Environm Contam Toxicol* 1981; 27. 758-764.
- **Dunkel VC.** Perspectives on detection of chemicals carcinogens as mutagens. En: *Advances in Modern Toxicology*, volume XII: Mechanism and Toxicity of chemical carcinogens and mutagens. Princeton Scientific Publishin Co INC, Princeton 1985: 61-78.
- **Dyrby T, Ingvarlsen P.** Sensitivity off different *Escherichia Coli* and *Salmonella* strains in mutagenicity testing calculated on tha basis of selected literature. *Mutat Res* 1983; 123: 47-60.
- **EPA.** Environmental Protection Agency USA. En: *Fed. Reg.*, 1982; 47: 45009.

- **Epler JL, Clark BR, Ho C-h, Guerin MR, Rao TK.** Short-term Bioassay of Complex Organic Mixtures: Part II, Mutagenicity Testing. En: *Application of Short-term Bioassays in the Fractionation and analisis of Complex Mixtures*. Environmental Science Research, volume 15. Plenum Press, 1978, 270-289.
- **Eriksson KE, Kolar MC, Kringstad K.** Studies on the mutagenic properties of bleaching effluents, Part 2, *Sven Papperstidn*, 1979; 82: 95-104.
- **FAO/OMS** Residuos de plaguicidas en los alimentos. Informe 1977. *Estud. FAO Prod. Prot. Veg.* 10. 1979
- **Farber E.** Chemical carcinogenesis. *N Engl j med* 1981; 305: 1379-1389.
- **Flanagan EP, Allen HE.** Effect of water treatment on mutagenic potential. *Bull Environm Contam Toxicol* 1981; 27. 765-772.
- **Fontane JC.** Introducción al "Baker 10". *Técnicas de Laboratorio*, nº 118, 407-414.
- **Fontane JC.** Introducción al Sep-Pak. *Técnicas de Laboratorio*, nº 118, 34-37.
- **Forster R, Wilson I.** The application of mutagenicity testing to drinking water. *J Inst Water Eng Scient* 1981; 35: 259-274.
- **Forster R, Green MHL, Gwilliam RD, Priestley A, Bridges BA.** Use of the Fluctuation Test to Detect Mutagenic Activity in Unconcentrated Samples of Drinking Water in the United Kingdom. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1189-1197.

- **Friederich U, Wurgler FE.** The *Salmonella*/Mamalian Microsome Assay: Variations of the test protocol; results of a questionnaire returned by 87 laboratories. *Teratogen Carcin Mut.* 1983; 3:177-82
- **Giner-Sorolla A.** Carcinogénesis química. En: Ochoa S et al. *Bioquímica y Biología Molecular.* Salvat. Barcelona, 1986: 543-53
- **Glatz BA, Chriswell CD, Arguello MD, Svec HJ, Fritz JS, Grimm SM, Thompson MA.** Examination of drinking water for mutagenicity activity. *J Am Wat Wks Ass* 1978; 70: 465-468.
- **Glaze WH, Peyton GR, Saleh FY, Huang FY.** Analysis of disinfection by-products in water and wastewater. *Int J Environ Ana Chem* 1979; 7: 143-160.
- **Grafe A.** Test cell problems in the Ames test. *Prog Mut Res* 1981; 2: 167-72
- **Green MHL.** Mutagen Testing Using Tpr+ Reversion in *Escherichia Coli*. En: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures.* Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C. edits; 1984: 161-187.
- **Goggelmann W.** Culture conditions and influence of the number bacteria on the number of revertants. *Prog Mut Res.* 1981; 2: 173-78
- **Guerin MR, Clark BR, Ho C-h, Epler JL, Rao TK.** Short-term Bioassays of complex organic mixtures: Part I, Chemistry. En: *Application of short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures.* Environmental Science Research. volume 15 Plenum Press: New York 1978; 248-268.

- **Guerrero RR, Rounds DE.** The Use of Sister Chromatid Exchange Analysis to Detect Ambient Mutagens in Drinking Water. *In Vitro*, 1979; 15: 171.
- **Haas CN.** A Microbiological Perspective on Risks from Water Chlorination. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 971-972.
- **Haynes RM, Eckardt F.** Mathematical analysis of mutation induction kinetics. In: De Serres FJ et al. *Chemical Mutagens*. 1980: 271-307
- **Hartman PE et al.** Classification and mapping of spontaneous and induced mutations in the histidine operon of *Salmonella*. *Adv Genet* . 1971; 16: 1-34
- **Heartlein MW, DeMarini DM, Katz AJ, Means JC, Plewa MJ, Brockman HE.** Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ Mutagen* 1981; 3: 519-530.
- **Hemming J, Holmbom B, Reunanen M, Kronberg L.** Determination of the strong mutagen, 3-chloro-4- (di-chloro-methyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone in chlorinated drinking water and humic waters. *Chemosphere* 1985; 15: 549-556.
- **Hofnung M, Quillardet P.** Recent developments in bacterial short-term test for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis* 1986; volume 1, 319-330.

- **Holmbom B, Kronberg L, Backlund P, Langvik V-A, Hemming J, Reunanen M, Smeds A, Tikkanen L.** Formation and Properties of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, A potent Mutagen in Chlorinated Waters. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 125-135.
- **Horth H, Fielding M, James HA, Thomas MJ, Gibson T, Wilcox P.** Production of Organic Chemicals and Mutagens During Chlorination of Amino Acids in Water. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher INC, 1987, 107-124.
- **Hubbard SA, Green MHL, Gatehouse D, Bridges JW.** The Fluctuation Test in Bacteria. En: *Handbook of Mutagenicity test Procedures*. Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C. edits; 1984: 141-160.
- **Hyman J, Leizer Z, Rosenkranz HS.** The Escherichia Coli Pol A₁ Assay. A quantitative procedure for Difussible and Non-difussible Chemicals. *Mutation Res.* 1980; 74: 107-111.
- **IARC Working Group Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Man.** Volume 8. Int. Agency for Research on Cancer, Lyon 1975
- **IARC.** Long-term and short-term screening assays for carcinogens. A critical appraisal. In. *IARC Monograf.* 1980; 2: 426 pp.
- "International Programme for the Evaluation of Short-term Tests for Carcinogenicity" *Mutat Res* 1978; 54: 203.

- **Isacson P, Bean JA, Lynch Ch.** Relationship of Cancer Incidence Rates in Iowa Municipalities to Chlorination Status of Drinking Water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1353-1364.
- **Jenner P, Testa B.** Concepts in drug metabolism. Part B. Marcel Dekker. New York, 1981
- **Jolley RL.** Conference Summary and Perspectives. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 973-975.
- **Jolley RL.** Concentrating organics in water for American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1975, 14 edn., New York.
- **Jolley RL.** Conference Summary and Perspectives. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 973-975.
- **Jolley RL.** Concentrating organics in water for biological testing. *Environ Sci Technol* 1981; 15: 874-880.
- **Jolley RL, Johnson JD.** The Interim: Selected Chemical Research Reported Between Conferences Five and Six. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher INC, 1987, 3-19.
- **Jorgenson R., et al.** Carcinogenicity of Chloroformo in Drinking Water to Male Osborne-Mendel Rats and Female B6C3F1. *Fundam Appl Toxicol* 1979; 5: 760-69.
- **Jpn. Water Works Assoc.** *Standard Method for the Examination of Drinking Water*. Tokyo, 1978, 230-233.

- **Kfir R, Grabow W, Hilner CA.** Ames Salmonella Mutagenicity assays on water dichloromethano extracts versus preparation of growth media with Test Samples. *Bull Environm Contam Toxicol* 1982; 28. 641-646.
- **Kim H-S, Symons JM.** The removal of various aquatic humic substances molecular weight fractions by anion exchange resin. *J Am W Works Assoc* 1989. Annual Conference Proceedings; 1627-1642.
- **Kool HJ, van Kreijl CF, Hrubec J.** Mutagenic and Carcinogenic Properties of Drinking Water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984, 187-205.
- **Kool HJ, van Kreijl CF, van Kranen HJ.** Use of XAD- resins for the Detection of Mutagenic Activity in Water. Studies with drinking water. *Chemosphere* 1981; 10, 1: 99-108.
- **Kopfler FC, Ringhand HP, Coleman WE, Meier JR.** Reactions of Chlorine in Drinking Water, with Humic acids and In Vivo. En: *Water Chlorination : Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984, 161-173.
- **Kopfler FC, Ringhand HP, Meier JR, Kaylor W.** Comparison of Mutagenic Activity of Chlorinated Aquatic and Commercial Humic Substances. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher INC, 1987, 147-158.
- **Kronberg L, Christman RF.** Chemistry of mutagenic by-products of water chlorination. *Sci Total Environ* 1989; 81/82, 219-230.

- **Kronberg L, Holmbom B, Tikkanen L.** Identification of the Strong Mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its Geometric Isomer E-2-Chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic Acid in Mutagenic Fractions of Chlorine-Treated Humic Water and in Drinking Waters. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher INC, 1987, 137-146.

- **Kronberg L, Vartianen T.** Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-chloro-4(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3(dichloromethyl)-4-oxo-butenoic acid in chlorine-treated tap waters. *Mutat Res* 1988; 206: 177-182.

- **Laborda E, De la Peña E.** Carcinogénesis química. En: *SIRMCE Congreso de Madrid 1981. Medio Ambiente Trabajo y Salud. Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer*, 1982: 245-259

- **Laborda E et al.** Valor predictivo de los ensayos de corta duración sobre carcinogénesis química. *Rev Esp Oncol* 1982; 29: 547-54

- **Leonardo JM, Dornfeld SS, Peak MJ.** Evaluation of E. Coli K12 343/113 and derived strains for microbial mutagenicity assays. *Mutat Res* 1984; 130: 87-95.

- **Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, Ames BN.** A new Salmonella tester Strain (TA102) with A-T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Sci USA*. volume 79. Dec. 1982: 7445-7449.

- **Levin DE, Yamasaki E, Ames BN.** A new Salmonella tester strain, TA 97, for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutat Res* 1982; 94: 315-330.
- **Loper JC.** Overview of the use of short-term Biological test in the Assessment of the Health Effects of Water Chlorination. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 3; Ann. Arbor Science, 1980: 937-945.
- **Loper JC.** Mutagenic Effects of Organic Compounds in Drinking Water. *Mutat Res* 1980; 76: 241-268.
- **Loper JC, Lang DR.** Mutagenic, Carcinogenic and Toxic effects of residual organics in drinking water. Plenum Press, New York, 1979. (falta).
- **Loper JC, Langg DR, Schoeny RS, Richmond BB, Gallagher PM, Smith CC.** Residue organic mixtures from drinking water show in vitro mutagenic and transforming activity. *J Toxicol Environ Health* 1978; 4: 919-938.
- **Loper JC, Schoeny RS, Tardiff RG.** Evaluation of organic extracts of drinking water by bacterial mutagenesis. *Mutat Res* 1978; 53: 223-224.
- **Loper JC, Tabor MW.** Detection of organic mutagens in water residues. *Environ Sci Res* 1981; 22:155-165.
- **Loper JC, Tabor MW.** Isolation of mutagens from drinking water: something old, something new.(falta)
- **Loper JC, Tabor MW, Miles SK.** Mutagenic Subfractions from Nonvolatile Organics of Drinking Water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1199-1210.

- **Loper JC, Tabor MW, Rosenblum L.** Mutagenic Residues Recovered from Granular Activated Carbon After Use in Drinking Water Treatment. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 1329-1339.
- **Mamber SW, Bryson V, Katz SE.** The E. Coli WP2/WP100 rec assay for detection of potential chemical carcinogens. *Mutat Res* 1983; 119: 135-144.
- **Magalin BH, Kaplan N, Zeiper E.** Statistical analysis of Ames Salmonella/microsome test. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3779-3783.
- **Maron DM, Ames BN.** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173-215.
- **Maruoka S, Yamanaka SI.** Production of mutagenic substances by chlorination of waters. *Mutat Res* 1980; 79: 381-386.
- **Maruoka S, Yamanaka SI.** Mutagenic potential of laboratory chlorinated river water. *Sci Total Environ* 1983; 29: 143-154.
- **McCann J, Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1976; 73: 950-954.
- **McCann J, Choi E, Yamasaki E. and Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1975a; 72/12:5135-5139.
- **McCann J, Spigarn NE, Kobori J and Ames BN.** Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1975b; 72/3:979-983.

- **McCann J, Ames BN.** The Salmonella/microsome mutagenicity test: Predictive value for animal carcinogenicity. En: *Origins of Human Cancer*. Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA. (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York; 1977: 1431-1450.
- **McCann J, Horn L, Kaldor J.** An Evaluation of Salmonella (Ames) test data in the published literature: Application of Statistical procedures and Analysis of mutagenic potency. *Mutat Res* 1984; 134: 1-47.
- **McMahon RE, Cline JC and Thompson CL.** Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Can Res* 1975; 39:682-693
- **Meier JR.** Mutagens in chlorinated water. *Mutation and the Environment*, Part E; 1990, 11-19.
- **Meier JR., et al.** Identification of Mutagenic Compounds Formed During Chlorination of Humic Acid. *Mutat Res* 1985; 157: 111-22.
- **Meier JR.** Genotoxic activity of organic chemicals in Drinking Water. *Mutat Res* 1988; 196: 211-245.
- **Meier JR, Bull RJ.** Mutagenic Properties of Drinking Water Disinfectants and By-Products. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publisher, 1984, 207-220.

- **Meier JR, Knohl RB, Coleman WE, Ringhand HP, Munch JW, Kaylor WH, Streicher RP, Kopfler FC.** Studies on the potent bacterial mutagen, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5hydroxy-2(5H)-furanone: aqueous stability, XAD recovery and analytical determination in drinking water and in chlorinated humic acids solutions. *Mutat Res* 1987; 189: 363-373.
- **Meier JR, Knohl RB, Merrick BA, Smallwood CL.** Importance of Glutathione in the In vitro Detoxification of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone, an Important Mutagenic By-product of Water Chlorination. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 159-170.
- **Meier JR, Lingg RD, Bull RJ.** Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment. *Mutat Res* 1983; 118: 25-41.
- **Meier JR, Lingg RD, Baker KL, Kaylor WH, Bull RJ.** Preliminary characterization of mutagens produced as a result of chlorination of humic acids. *The Toxicologist*, 2, 1982; 173 (Abstr.).
- **Meselson M, Rusell K.** Comparisons of Carcinogenic and Mutagenic Potency. En: *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, Book C, 1977: 1473- 1481.
- **Miller JA, Miller EC.** The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr. Exp. Tumor Res* 1969; 11:273-301.
- **Miller JA, Miller EC.** Searches for ultimate chemical carcinogens and their recations with cellular macromolecules . *Cancer* 1981; 47: 2327

- **Mohn GR.** Mutagenicity of Selected Chemicals in Escherichia Coli Test Systems. En: *Comparative Chemical Mutagenesis*. De Serres J, Shelby MD. eds. Plenum Press, New York, 1981; 69-107.
- **Mohn GR, Ellenberger J, McGregor D.** Development of Mutagenesis tests Using Escherichia Coli K-12 as indicator organism. *Mutat Res* 1974; 25: 184-196.
- **Mohn GR, Ellenberger J, Van Bladeren PJ.** Evaluation and relevance of Escherichia Coli test systems for detecting and characterizing chemical carcinogens and mutagens. En: *The Predictive value of Short-term Screening test in carcinogenicity Evaluation: Applied Methods in Oncology* 1980; volume 3:27-41.
- **Monarca S, Hongslo JK, Kringstad A and Carlberg GE.** Microscale fluctuation assay coupled with Sep-pak concentration as a rapid and sensitive method for screening mutagens in drinking water. *Water Res* 1985; 19:1209-1216.
- **Monarca S, Pasquini R, Sforzolini GS.** Mutagenicity Assessment of Different Drinking Water supplies before and after treatments. *Bull Environm Contam Toxicol* 1985; 4:815-823.
- **Moreau P, Devoret R.** Potential carcinogens Tested by induction and mutagenesis of Prophage lambda in Escherichia Coli K12. En: *Origins of Human Cancer*, Book C. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York; 1977, 1451-1472.
- **Munson A, et al.** Toxicology of Organic Drinking Water Contaminants: Trichloromethane, Bromodichloromethane, Dibromochloromethane and Tribromomethane. *Environ Health Perspec* 1981; 46: 117-26.

- **Murphy PA, Craun GF.** A Review of Recent Epidemiologic Studies Reporting Associations Between Drinking Water Disinfection and Cancer. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 361-372.
- **National Academy of Sciences, National Research Council Assembly of Life Sciences.** *Drinking Water and Health*, volume 1, 1977. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- **Nagao M, Sugimura T and Matsushima T.** Environmental mutagens and carcinogens. *Annu Rev Genet* 1978; 12:117-159.
- **Nazar MA, Rapson WH.** Elimination of the mutagenicity of bleach plant effluents. *Pulp Paper Can* 1980; 81: T191-T196.
- **Nazar MA, Rapson WH.** pH stability of some mutagens produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Environ Mutagen* 1982; 4: 435-444.
- **Nazar MA, Rapson WH, Brook MA, May S, Tarhanen J.** Mutagenic reaction products of aqueous chlorination of catechol. *Mutat Res* 1981; 89: 45-55.
- **Nestmann ER, LeBel GL, Williams DT, Kowbel DJ.** Mutagenicity of organic extracts from Canadian drinking water in the Salmonella/ mammalian microsome assay. *Environ Mutagen* 1979; 1: 337-345.
- **Nestmann ER, Lee E G-H, Mtula TI, Douglas GR, Mueller JC.** Mutagenicity of constituents identified in pulp and paper mill effluents using the Salmonella/mammalian-microsome assay. *Mutat Res* 1980; 79: 203-212.

- **Nestmann ER, Otson R, LeBel GL, Williams DT, Lee E G-H, Biggs DC.** Correlation of Water Quality Parameters with Mutagenicity of Drinking Water Extracts. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1151-1164.
- **Norwood DL, Johnson JD, Christman RF, Millington DS.** Chlorinated Products from Aquatic Humic Material at Neutral pH. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 1. Ann. Arbor Science, 1981:191-200.
- **OCDE** Lignes directrices sur l'utilisation des test de mutagenicitie pour l'evaluation toxicologique des produits chimiques. Ottawa, 1986
- **Oliver BG.** Chlorinated non-volatile organics produced by the reaction of chlorine with humic materials. *Can Res* 1978; 11: 21-22.
- **Oliver BG, Thurman EM.** Influence of Aquatic Humic Substance Properties on Trihalomethane Potential. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 1. Ann: Arbor Science, 1981: 231-241.
- **OPS/OMS** Criterios de Salud Ambiental. 6. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte I. Pub Cien OPS/OMS. 1980; 402: 287
- **Orme J, Mullin CS, Ohanian EV.** Health Effects of Disinfectants and Disinfection By-Products: a Regulatory Perspective. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher INC, 1987, 75-86.

- **Owusu-Yaw J, Wheeler WB, Wei C-I.** Mutagenicity of the Nonvolatile Reaction Products of Aqueous Chlorination of L-Tryptophan. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 179-191.

- **Palmstrom NS, Carlson RE, Cooke GD.** Potential Links between the Eutrophication of surface water and the formation of carcinogens in drinking water. En: *Regulation Drinking water Quality*. capitulo 18. Lewis Publishers, 1992; 175-190.

- **Pereira MA.** Carcinogenicity of Chlorination By-products: Trihalomethanes. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981:1165-1176.

- **Peto R.** The preventability of cancer. En: *Cancer risk and prevention*. Oxford University Press, 1985; 1-14.

- **Peto R.** Epidemiology, Multistage Models, and Short-term Mutagenicity Tests. En: *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory, Book C, 1977: 1403-1428.

- **Purchase IFH.** An appraisal of predictive tests for carcinogens. *Mutat Res* 1982; 99: 53-71.

- **Purchase IFH, Longstaff E, Ashby J, Styles JA, Anderson D, Lefevre PA, Wetswood FR.** Evaluation of six short term for detecting organic chemicals carcinogens and recommendation for their use. *Nature (London)*, 1976; 264: 624-627.

- **Rapson WA, Nazar MA, Butsky VV.** Mutagenicity produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Bull Environ Contam Toxicol* 1980; 24: 590-596.

- **Real Decreto** 1138/1990 14/9/1990. B.O.E. núm 226 de 20/9/1990.
- **Report on the Carcinogenesis Bioassay of Chloroformo** (Washington,DC: Nat Can Inst, 1976).
- **Rinkus SJ, Legator MS.** Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the *Salmonella typhimurium* system. *Can Res* 1979; 39: 3289-3318.
- **Rinkus SJ, Legator MS.** *Salmonella* revisited: A replay to Ames and McCann. *Can Res* 1981; 41: 4196-4203.
- **Roberts MH, Jr.** Water Chlorination: Is There Environmental Risk?. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 969-970.
- **Rook JJ.** Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat Exam* 1974; 23: 234-243.
- **Rook JJ.** Haloforms in drinking water. *J AWWA* 1976; 68: 168-172.
- **Rook JJ.** Chlorination reactions of fulvic acids in natural waters. *Environ Sci Technol* 1977; 11: 478.
- **Rook JJ.** Possible pathways for the formation of chlorinated degradation products during chlorination of humic acids and resorcinol. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 3, 1980. Jolley RL, Brungs WA, Cumming RB (Eds). Ann. Arbor Science, Michigan, 85-98.

- **Rosenkranz HS, Karpinsky G, McCoy EC.** Microbial assays: evaluation and application to the elucidation of colon cancer. In: Norpoth HK et al. Short-term test systems for detecting carcinogens. Springer-Verlag. Berlin, 1980: 19-57

- **Rosenkranz HS, Mermelstein R.** The Salmonella and the E. Coli pol A+/pol A- repair assays: Evaluation of relevance to carcinogenesis. En: *The Predictive Value of Short-term Screening Tests in Carcinogenicity Evaluation: Applied Methods in Oncology*. Williams GM et al eds. volume 3, 1980; 5-25.

- **Rosenkranz HS.** Newer Methods for Determining Genotoxicity Using DNA Repair-Deficient Escherichia Coli. En: *Handbook of Mutagenicity Procedures*. Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, Ramel C. edits. 1984; 1-11.

- **Sakamoto H, Hayatsu H.** A simple Method for monitoring Mutagenicity of River Water Mutagens in Yodo River System, Kyoto-Osaka. *Bull Environm Contam Toxicol* 1990; 44: 521-528.

- **Schnitzer M, Khan SU.** En: *Humic Substances in the Environment*. McLaren AD (Ed). Marcel Dekker, New York.

- **Scully FE, Jr., Kravitz R, Howell GD, Speed MA, Arber RP.** Contribution of Proteins to the Formation of Trihalomethanes on Chlorination of Natural Waters. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 807-819.

- **Scully FE, Jr., Mazina KE, Sonenshine DE, Daniel FB.** Reactions of Hypochlorite and Organic N-Chloramines in Stomach Fluid. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 5; Lewis Publishers, 1984, 175-184.
- **Slater E, Anderson E, Marvin D., Rosenkranz HS.** Rapid Detection of Mutagens and Carcinogens. *Can Res* 1971; 31: 970-973.
- **Speck WT, Santella RM, Rosenkranz HS.** An Evaluation of the Prophage lambda Induction (inductest) for the detection of potential carcinogens. *Mutat Res* 1978; 54: 101-104.
- **Stevens AA, Slocum CJ, Seeger DR, Robekc GC.** Chlorination of organics in drinking water. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 1, 1978. Jolley RL (Eds). Ann. Arbor Science, Michigan, 77-104.
- **Sugimura T.** A view of a cancer researcher on environmental mutagens. En: *Proceeding of the Third International Conference on Environmental Mutagens*. Takebe H (Eds). University of Tokyo, Press/Alan R Liss, 1982; 3-20.
- **Sugimura T, Sato S, Nagao M, Yahagi T, Matsushima T, Seino Y, Takeuchi M, Kawachi T.** Overlapping of carcinogens and mutagens. En: P.N. Magee et al (eds). *Fundamentals in Cancer Prevention*, University of Tokyo Press; Tokyo 1976: 191-215.
- **Symons J, Bellar TA, Carsweel JK, DeMarco J, Kropp KL, Robeck GG, Seeger DR, Slocum CJ, Smith BL, Stevens AA.** National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *J AWWA* 1975; 67(11): 634-647.

- **Tabor MW, Loper JC.** Separation of Mutagens from Drinking water using coupled Bioassay/Analytical Fractionation. *Inter J Environ Ana Chem* volume 8; 1980, 197-215.
- **Tabor MW, Loper JC, Barone K.** Analytical Procedures for Fractionating Nonvolatile Mutagenic Components from Drinking Water Concentrates. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 3, Ann. Arbor Science. 1980, 899-912.
- **Taylor SL.** Mutagenesis versus Carcinogenesis. *Food Technology*. March 1982: 65-127.
- **Tenenbaum L, Quinto I, Faalen M.** The E. coli multitest: a set of strains to characterize diverse genotoxic effects. *Mutat Res* 1988; 203:415-426.
- **Tikkanen L, Kronberg L.** Genotoxic effects of various chlorinated butenoic acids identified in chlorinated drinking water. *Mutat Res* 1990; 240: 109-116.
- **Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chlorodibromomethane in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies), RS No. 282** (Washington, DC: Nat Toxicol Pro 1985).
- **Urano K, Haga N, Emoto F, Shinome T.** Method for evaluating mutagenicity of water I. A new method of preparing samples for mutagenicity test. *Sci Tot Environ* 1988; 74: 177-189.
- **Urano K, Haga N, Emoto F.** Method for evaluating mutagenicity of water II. Conditions for applying new sample preparation method to the Ames test. *Sci Tot Environ* 1988; 74: 191-198.

- **Varma MM, Ampy FR, Verma K, Talbot WW.** In vitro Mutagenicity of Ware Contaminants in Complex Mixtures. *J. Appl. Toxicol.* vol 8(4), 1988: 243-248.
- **Vennit S and Levy LS.** Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature (London)* 1974; 250: 493-495.
- **Walker GC.** Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia Coli*. *Microbiol Rev* 1984; 48: 60-93.
- **Wang YY, Flessel PC, Chang K-I, Hollander DA, Marsden PJ, Williams LR.** Evaluation of a Protocol for Preparing Drinking Water Samples for Ames Mutagenicity Testing. En: *Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, volume 6; Lewis Publisher, 1987, 261-277.
- **Weinstein D, Lewinson TM.** A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay. *Mutat Res* 1978; 51: 433-434.
- **Wilcox P, Williamson.** Mutagenic activity of concentrated drinking water samples. *Environ Health Perspect* 1986; 69:141-149.
- **Wolkoff AW, Creed C.** Use of Sep-Pack Cartridges for the Collection and Concentration of Environmental Samples. falta.
- **Yamagiwa K, Ichikawa K.** Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J Cancer Res* 1918; 3:1-29.

- **Young TB, Kanarek MS.** Matched Pair Case Control Study of Drinking Water Chlorination and Cancer Mortality. En: *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, volume 4, Book 2. Ann. Arbor Science, 1981: 1365-1380. biological testing. Environ. Sci. Technol. 1981; 15: 874-880.