

Ensayo de Ames

Resumen

Para evaluar la posible mutagenicidad de un compuesto se emplea con frecuencia el ensayo de Ames. Esta prueba consiste en el empleo de mutantes de *Salmonella typhimurium* deficientes en la síntesis del aminoácido histidina, y la posterior cuantificación de revertantes His⁺ inducidos por el tratamiento con el compuesto bajo estudio. Es importante resaltar que un importante número de mutágenos detectados primeramente por este ensayo han exhibido posteriormente su carcinogenicidad en modelos animales.

Introducción y fundamentos

El ensayo de Ames surge a partir de estudios de las interacciones entre la expresión génica y las mutaciones en bacterias. Constituye un ejemplo de cómo la investigación básica puede llevar directamente a importantes avances en la salud pública.

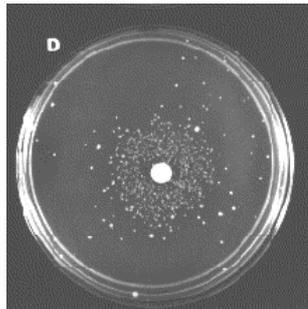
Una gran variedad de compuestos químicos nos rodea, tanto de origen natural como sintéticos. Dentro de este conjunto de elementos, algunos tienen la potencialidad de actuar como mutágenos. Estas sustancias se encuentran en los alimentos que consumimos, otras están en el aire que respiramos, e incluso otras son absorbidas a través de la piel o por otros medios de contacto. Los mutágenos actúan de diversas maneras, pero todos tienen la capacidad de alterar la secuencia de DNA (eg. mutaciones puntuales, mutaciones de cambio de marco de lectura, etc.) presente en el genoma. La mayoría, aunque no todos, de los mutágenos tiene la potencialidad de actuar como carcinógenos. Ejemplos de potenciales carcinógenos son la luz UV, los contaminantes industriales, los pesticidas y el tabaco. Claramente es importante disponer de un ensayo rápido y de bajo costo para probar distintas sustancias que sospechamos puedan ser nocivas, incluyendo la gran cantidad de químicos sintéticos nuevos que se producen anualmente.

A principios de los años 70 Bruce Ames desarrolló un ensayo que medía el grado al cual químicos sintéticos provocaban una mutación génica, vale decir un cambio en el DNA. Para realizar este ensayo, Ames partía de una cepa de la bacteria *Salmonella* deficiente para la producción del aminoácido histidina. Luego agregaba el agente a ensayar. Si el compuesto químico provocaba una mutación génica, el gen alterado de la bacteria volvía a mutar, recobrándose así la capacidad de producir histidina. Es precisamente debido a la universalidad del DNA que se pudieron emplear organismos modelos, como las bacterias, como sujetos de prueba en este tipo de ensayos.

Es así que el ensayo de Ames utiliza cepas específicas de la bacteria *Salmonella typhimurium* como herramientas para detectar mutaciones. Las cepas de *S. typhimurium* empleadas en este ensayo se conocen como **auxótrofas**. Una cepa bacteriana se define como auxótrofa si es incapaz de

sintetizar un nutriente (el organismo de prueba en el ensayo de Ames no puede sintetizar el aminoácido histidina) y por lo tanto no crecerá a menos que el nutriente sea agregado al medio de crecimiento. Las cepas auxótrofas generalmente surgen como resultado de una mutación que ocurre en un organismo **protótrofo** (una bacteria sin requerimientos nutricionales). El ensayo de Ames determina la capacidad de la sustancia bajo prueba de causar una reversión de estos auxótrofos al estado prototrófico original. Durante el ensayo, se hace crecer las bacterias auxótrofas en un medio de cultivo que contiene todos los nutrientes necesarios (medio mínimo glucosa con sales minerales), pero que contiene tan solo cantidades traza de histidina. Las bacterias auxotróficas son capaces de crecer por varias generaciones hasta que se agota la histidina presente en el medio de cultivo; en este momento dejarán de crecer a menos que hayan sufrido una reversión de la mutación que hubiera restaurado la capacidad de sintetizar histidina. Estas bacterias His⁺ se conocen como **revertantes**.

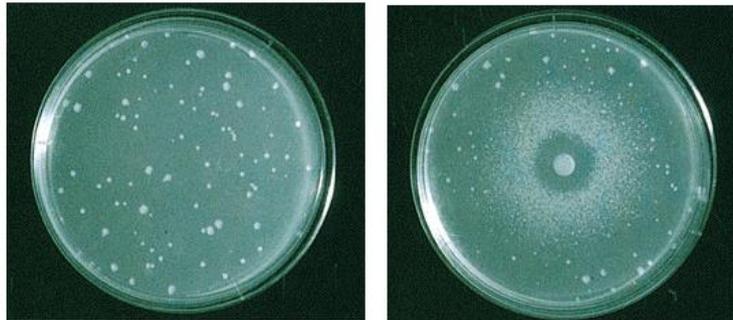
Los potenciales mutágenos son ensayados en cuanto a su capacidad de estimular reversiones colocándolos en discos de papel que luego son depositados en la superficie de las placas de medio mínimo previamente inoculadas con la bacteria auxótrofa. El compuesto a prueba difunde al medio circundante y, si resulta mutagénico, inducirá reversiones que permitirán el crecimiento de las bacterias hasta formar colonias visibles. Cuantos más revertantes se observen en las proximidades de la sustancia ensayada, con respecto a los controles experimentales, mayor será la mutagenicidad del compuesto.



Las cantidades traza de histidina incluidas en las placas de medio mínimo permiten que la bacteria se divida varias veces en presencia del potencial mutágeno. Esto es fundamental ya que la mayoría de las mutaciones ocurren como consecuencia de errores durante la replicación del DNA. A pesar de que las bacterias son procariontas y por lo tanto difieren significativamente de las células eucariotas, tanto en estructura celular como en metabolismo, el DNA es universal, permitiendo el uso de sistemas modelo bacterianos en la evaluación preliminar de potenciales mutágenos.

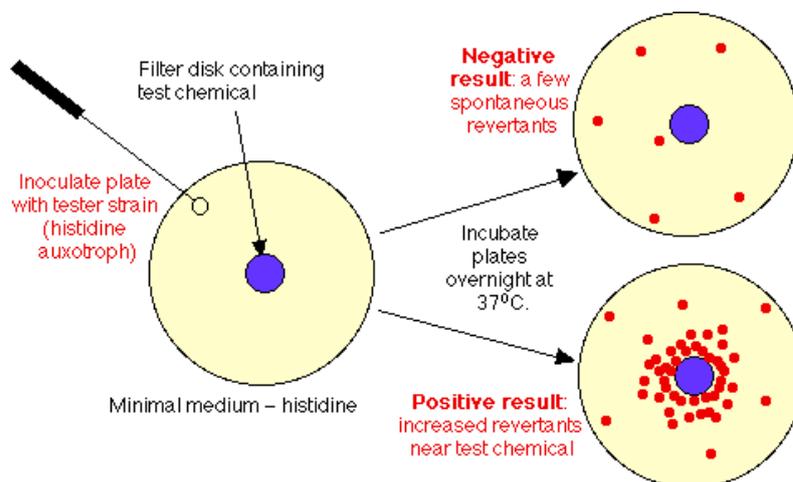
En la fotografía que aparece a continuación, la placa a la izquierda fue sembrada con aproximadamente 10^9 bacterias His⁻. En este caso, las bacterias son incapaces de crecer en ausencia de histidina con excepción de unas pocas colonias ($<10^2$) que han sufrido mutaciones espontáneas, revirtiendo a His⁺. En la placa de la derecha, el disco en el centro de la placa contiene un mutágeno. A medida que éste difunde hacia afuera, la sustancia primero mata a las

bacterias (zona clara sin crecimiento), pero a una concentración menor induce reversiones.



El ensayo de Ames mide la mutagenicidad de un agente como la diferencia entre las tasas de reversión inducida y la espontánea. Por definición en este ensayo, un mutágeno es cualquier agente químico que duplica el número de mutantes que ocurren espontáneamente. Cabe hacer notar que una reversión, ya sea espontánea o causada por un mutágeno, no es una mutación al azar. Se trata de un evento específico que sucedió al azar, pero al ocurrir, sabíamos exactamente cuál gen se estaba afectando. Previsiblemente, los mutágenos están induciendo muchas mutaciones en todo el genoma de *S. typhimurium* y no exclusivamente en los genes de biosíntesis de histidina. Sin embargo, debido al diseño experimental, las únicas mutaciones que se pueden detectar son las reversiones al estado prototrófico.

Al realizar el diseño del ensayo, los **controles** son fundamentales, como en cualquier experimento. Un control positivo es una condición que dará un resultado positivo en el ensayo; en este caso, esto implica agregar un agente químico que permitiría el crecimiento bacteriano en ausencia de histidina, vale decir un mutágeno conocido. Los controles negativos se refieren a condiciones donde nada sucede; en este tipo de ensayo, este control estaría dado por una condición en donde no se dieran mutaciones más allá de la tasa de reversiones espontánea.



Cepas bacterianas

Salmonella typhimurium TA98. Esta cepa tiene una mutación de corrimiento en el marco de lectura, causada por la delección de un nucleótido, en el gen *hisD* que codifica para la histidinol deshidrogenasa (una de las enzimas de la vía de biosíntesis de histidina).

Salmonella typhimurium TA100. Esta cepa presenta un intercambio de bases que resulta en una mutación “missense” en el gen que codifica para la primera enzima de la vía de biosíntesis de histidina.

Además de estas mutaciones específicas, cada una de estas cepas posee dos características particulares. En primer lugar, estos mutantes carecen del mecanismo de reparación-excisión del DNA que poseen las bacterias silvestres y que normalmente repararía las lesiones en el DNA provocadas por la exposición a mutágenos en el transcurso de estos ensayos. Esta mutación por delección elimina el mecanismo de reparación por excisión y obliga a que las lesiones sean corregidas por mecanismos de reparación con error, aumentando así la tasa de mutagénesis y la sensibilidad de las cepas a los mutágenos. En segundo lugar, estas cepas tienen una deficiencia a nivel de sus envolturas celulares que hace que los compuestos químicos penetren con mayor facilidad en estos mutantes que en las bacterias silvestres.

En suma, se utilizarán cepas mutantes de *S. typhimurium* incapaces de sintetizar histidina, muy susceptibles a mutaciones adicionales porque carecen de los mecanismos normales de reparación encontrados en bacterias, y que además son más permeables que las bacterias silvestres a agentes químicos externos, incluyendo potenciales mutágenos.

Procedimientos

I - Caracterización fenotípica

Antes de realizar el ensayo de Ames se debe corroborar el genotipo de las cepas de *S. typhimurium*. Se debe verificar:

- (i) requerimiento de histidina y de biotina
- (ii) sensibilidad frente al cristal violeta
- (iii) sensibilidad frente a la irradiación UV

Requerimiento de histidina y de biotina

1. Se preparan placas de medio mínimo la semana anterior al ensayo.
2. El día del ensayo se agregan los siguientes elementos a un subconjunto de placas de medio mínimo: (a) histidina (150 µl), (b) biotina (150 µl), (c) histidina y biotina (150 µl de cada uno), y (d) nada.
3. Se parte de un cultivo fresco de cada cepa a ensayar.
4. Se hace una suspensión de cada cepa en suero fisiológico estéril.
5. Se embebe un hisopo estéril en esta suspensión. Se escurre el exceso de líquido contra los bordes del tubo.
6. Se utiliza el hisopo para distribuir la suspensión sobre cada uno de los cuatro tipos de placa, cubriendo en cada caso la totalidad de la superficie de las mismas.
7. Se deja secar las placas (aprox. 10 mins).
8. Se incuban las placas a 37°C, 24 hs.

Sensibilidad frente al cristal violeta

1. Se preparan placas de medio rico (LB) la semana anterior al ensayo.
2. Se parte de un cultivo fresco de cada cepa a ensayar.
3. Se hace una suspensión de cada cepa en suero fisiológico estéril.
4. Se embebe un hisopo estéril en esta suspensión. Se escurre el exceso de líquido contra los bordes del tubo.
5. Se utiliza el hisopo para distribuir la suspensión sobre la placa, cubriendo toda la superficie de ésta.
6. Se deja secar la placa (aprox. 10 mins).
7. Mientras, se coloca un disco de papel de filtro estéril en una placa de Petri, también estéril. Se embebe en cristal violeta (100 µl).
8. Se coloca este disco, utilizando una pinza estéril, en el centro de la placa sembrada con la cepa bacteriana a ensayar.
9. Se incuban las placas a 37°C, 24 hs.

Sensibilidad frente a la irradiación UV

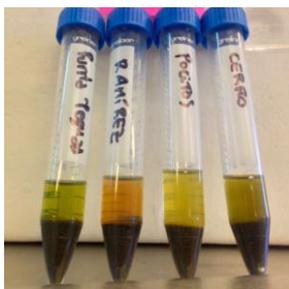
1. Se preparan placas de medio rico (LB) la semana anterior al ensayo.
2. Se parte de un cultivo fresco de cada cepa a ensayar.
3. Se hace una suspensión de cada cepa en suero fisiológico estéril.
4. Se embebe un hisopo estéril en esta suspensión. Se escurre el exceso de líquido contra los bordes del tubo.
5. Se utiliza el hisopo para distribuir la suspensión sobre la placa, cubriendo toda la superficie de ésta.
6. Se deja secar la placa (aprox. 10 mins).
7. Se cubre la mitad de la placa con papel aluminio y se procede a irradiar la placa con luz UV durante 30 segs, en la oscuridad.
8. Luego de la irradiación, y antes de prender la luz, se envuelve la placa con el papel aluminio.
9. Se incuban las placas a 37°C, 24 hs.

II - Ensayo de Ames

1. Una semana antes de la práctica se preparan placas de medio mínimo sales con glucosa.
2. El día anterior a la práctica se reparten 150 μ l de la solución de biotina y 2 μ l de la solución de histidina a un subconjunto de placas.
3. Se parte de un cultivo fresco de la cepa TA100 de *S. typhimurium*.
4. Se hace una suspensión de esta cepa en suero fisiológico estéril.
5. Se embebe un hisopo estéril en esta suspensión. Se escurre el exceso de líquido contra los bordes del tubo.
6. Se utiliza el hisopo para distribuir la suspensión sobre la placa, cubriendo toda la superficie de ésta.
7. Se deja secar la placa (aprox. 10 mins).
8. Así se preparan 10 placas, que serán utilizadas de la siguiente manera: ocho experimentales, un control positivo y un control negativo. Esto se debe a que se ensaya cada potencial mutágeno por duplicado.
9. Para realizar el ensayo se procede de la siguiente manera: introducir una pinza en etanol, flamear para esterilizar, tomar un disco de papel de filtro estéril y depositarlo sobre cada placa inoculada.
10. En cada placa experimental se deposita una gota (75 μ l) sobre el disco de papel de filtro de cada uno de los compuestos a ensayar.
11. En la placa de control negativo, el disco de papel de filtro será embebido con agua estéril (75 μ l).
12. En la placa de control positivo, el disco de papel de filtro será embebido con azida de sodio dilución 1/50 (75 μ l).
13. Se incuban las placas invertidas a 37° C durante 48 hrs.
14. Luego del período de incubación se analizan los resultados.

III – Preparación de muestras de sedimento para el ensayo de Ames

1. En caso de realizar el ensayo de Ames con muestras de sedimento, por ejemplo sedimentos estuarinos, se deben preparar las muestras por lo menos dos días antes de la práctica (se pueden preparar con más antelación).
2. Se combina una parte sedimento con cuatro partes dimetilsulfóxido (DMSO) en un tubo Falcon de 15ml (ver figura más abajo).
3. Se deja ON a temperatura ambiente, en la oscuridad (se puede dejar más tiempo).
4. Se pasa una alícuota de la fase líquida a un tubo eppendorf y se centrifuga 20 mins. a 13.000 rpm a temperatura ambiente.
5. Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se guarda a -20°C ON (se pueden dejar más tiempo a -20°C si fuera necesario).



IV - Ensayo de Ames con muestras de sedimento

1. Una semana antes de la práctica se preparan placas de medio mínimo sales con glucosa.
2. El día anterior a la práctica se reparten 150 μ l de la solución de biotina y 2 μ l de la solución de histidina a un subconjunto de placas.
3. Se parte de un cultivo fresco de la cepa TA100 de *S. typhimurium*.
4. Se hace una suspensión de esta cepa en suero fisiológico estéril.
5. Se embebe un hisopo estéril en esta suspensión. Se escurre el exceso de líquido contra los bordes del tubo.
6. Se utiliza el hisopo para distribuir la suspensión sobre la placa, cubriendo toda la superficie de ésta.
7. Se deja secar la placa (aprox. 10 mins).
8. Así se preparan diez placas, que serán utilizadas de la siguiente manera: ocho experimentales, un control positivo y un control negativo. Esto se debe a que se analiza cada muestra de sedimento por duplicado.
9. Mientras se secan las placas se centrifugan las muestras de sedimento (que están guardadas a -20°C) 15 mins. adicionales a 13.000 rpm a temperatura ambiente.
10. Para realizar el ensayo se procede de la siguiente manera: introducir una pinza en etanol, flamear para esterilizar, tomar un disco de papel de filtro estéril y depositarlo sobre cada placa inoculada.

11. En cada placa experimental se deposita una gota (75 μ l) sobre el disco de papel de filtro de cada una de las muestras a ensayar. Se extraen estos 75 μ l directamente del eppendorf (sin filtrar).
12. En la placa de control negativo, el disco de papel de filtro será embebido con dimetilsulfóxido (DMSO) (75 μ l).
13. En la placa de control positivo, el disco de papel de filtro será embebido con azida de sodio dilución 1/50 (75 μ l).
14. Se incuban las placas invertidas a 37° C durante 48 hrs.
15. Luego del período de incubación se analizan los resultados.