ISSN 1980-3540

Genética NA ESCOLA

06.02, 11-16 (2011)
www.sbg.org.br

OS PRINCÍPIOS DO TESTE DE AMES (SALMONELLA/ MICROSOMO) E SUA APLICABILIDADE

Aiub, C.A.F. e Felzenszwalb, I[1,2].

1- Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biofísica e Biometria, Laboratório de Mutagênese Ambiental.

2- Correspondência do autor: Av. 28 de setembro, 87 fundos, 4 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, Cep:20551-030. uerj.felzen@gmail.com

Palavras-chave: mutagenicidade, mutação espontânea e induzida, marcadores genéticos.

A avaliação das substâncias em relação à mutagenicidade e genotoxicidade são baseadas em uma combinação de testes que servem para a detecção dos possíveis danos genéticos associados a doenças humanas: mutação genética (mutações pontuais, ou seja, exclusões/inserções que afetam os genes); clastogenicidade, ou seja, alterações cromossômicas estruturais; aneuploidia (aberrações cromossômicas numéricas). Mesmo que se considere que nenhum único ensaio detecte todos os possíveis danos ao DNA, o teste de mutagenicidade (conhecido como teste de Ames) deve ser aplicado a qualquer nova substância antes da mesma chegar à população (OECD, 1997).

O teste de Ames – desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores, – utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações em *loci* específico responsável pela biossíntese do aminoácido histidina, isto é, essas bactérias não sintetizam esse aminoácido e logo proliferam somente em meio de cultura acrescido do mesmo. O cientista percebeu que quando esses mutantes eram submetidos à ação de um agente mutagênico, o genótipo his- poderia ser modificado, revertido *(his+)*. Em contato com o agente mutagênico, algumas células revertiam, passavam a proliferar e a formar colônias. A reversão indicava que existiam alterações nos códons permitindo à célula bacteriana sintetizar o aminoácido e multiplicar-se (Figura 1A e 1B).

O Dr. Bruce Ames e seus colaboradores agruparam algumas dessas cepas de *S. typhimurium* com a intenção de serem usadas para determinação de substâncias com potencial mutagênico/carcinogênico. Tais cepas tinham como características: (1) determinar o tipo de lesão no DNA; (2) possuir um gene que confere aumento na permeabilidade da membrana (*rfa*) facilitando a entrada da substância teste pela célula bacteriana (figura 1C); (3) apresentar mutação do tipo deleção no gene (*uvrB*) que confere reparo à luz UV evitando que a célula consertasse o dano induzido pelo agente teste (Figura 1D); (4) apresentar em plasmídeos, marcadores de resistência a antibióticos de forma seletiva evitando contaminação por outras bactérias (Figura 1E) (Maron & Ames, 1983).

O princípio do teste, baseado na capacidade de detecção visual de colônias bacterianas que se formam em meio nutriente de composição definida, tornou-se muito difundido e internacionalmente aceito e exigido pelos órgãos que regulamentam o uso de fármacos, cosméticos, pesticidas, e até alimentos, entre outras aplicações (McCann et al., 1975; Zeiger, 1997, Umbuzeiro e Vargas, 2003; http://www.sbmcta.org.br/pdfs_xb1/113.pdf).

O Anexo 1 descreve um passo a passo do teste de Ames buscando simular sua utilização.

As cepas padrão de *S. typhimurium* sugeridas para o ensaio são TA97, TA98, TA100 e TA102. No entanto, outras cepas são comparativamente usadas com estas, como as cepas TA1535 e TA1538 para TA100 e TA98, respectivamente. Resumo das características genotípicas e fenotípicas estão listadas na tabela 1:

Tabela 1- Características genotípicas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de teste de Ames:

Cepa	Mutação em *His*	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA97	***hisD6610 hisO1242***	pKM101	***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Frameshift	Adição de um par G:C
TA98	***hisD3052***	pKM101	***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Frameshift	Deleção de um par G:C
TA100	***hisG46***	pKM101	***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Substituição	G:C para A:T
TA102	**pAQ1 (*hisG428*)**	pKM101, pAQ1	***rfa***	Substituição	A:T para G:C
TA1535	***hisG46***		***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Substituição	G:C para A:T
TA1537	***hisC3076***		***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Frameshift	Adição de um par G:C
TA1538	***hisG46***		***rfa Δ(uvrB chl bio)***	Frameshift	Deleção de um par G:C

As linhagens de *S. typhimurium* com a marca R+ possuem o plasmídeo pKM101, que faz aumentar a frequência de mutagênese espontânea, supostamente pela via de reparação error-prone. As que apresentam o locus *his*G428 são acompanhadas do plasmídeo pAQ1, que lhes confere resistência à tetraciclina.

A cepa TA97 de *S. typhimurium* apresenta uma mutação que, ao ser alterada (*his*GD6610), causa deleção de um par de bases (frameshift mutation), levando a proliferação bacteriana pelo restabelecimento normal do quadro de leitura. Esta mutação induzida dá origem à formação de uma pseudo histidinol desidrogenase, o que permite o crescimento muito próximo ao normal em meio mínimo (Maron & Ames, 1983).

A cepa TA98 também detecta agentes mutagênicos que induzem uma mutação que altera o quadro de leitura. Estes mutágenos geralmente atuam em unidades repetitivas do DNA fazendo com que haja uma restauração do quadro correto da leitura envolvida na síntese de histidina. Nesta cepa, a reversão para o fenótipo *his*+ ocorre pela deleção de um ou dois pares de bases desta seqüência ou, pela adição de um par (Maron & Ames, 1983). Além disto, a linhagem TA98 possui uma mutação espontânea no gene que codifica a maior nitroredutase de *S. typhimurium (nfsA)* e apresenta seu nível de nitroredutases menor do que na linhagem TA100 (Watanabe et al, 1994).

A cepa TA98 assim como a TA100 são utilizadas para se estudar o metabolismo de nitrocarcinógenos já que em comum apresentam características de serem nitroredutases-deficientes. Devido a tal propriedade, utiliza-se a TA100 para detecção de agentes que possam induzir metilação e causar substituição de pares de bases (G-C). Sua construção é baseada em uma mutação de ponto, a partir de alteração de base A-T por G-C, que codifica numa trinca específica prolina e leucina, respectivamente, obtendo-se a produção da primeira enzima da biossíntese de histina, restaurando o fenótipo selvagem (Maron & Ames, 1983).

A cepa TA102 apresenta aproximadamente 30 cópias do plasmídeo que confere resistência à tetraciclina e contém o gene mutante *hisG*, determinando seu caráter auxotrófico. Além disto, contém o par de bases A-T no sítio crítico da reversão, detectando uma grande variedade de mutagênicos oxidativos e de agentes cross-links que atacam preferencialmente estes pares de base, diferenciando-a das demais cepas que são revertidas nos alvos G-C (Maron & Ames, 1983).

Cepas que apresentam o plasmídeo pYG216 codificam enzimas conhecidas como nitroredutases. As linhagens YG1021 e YG1026 (derivadas de TA98 e TA100, respectivamente) que o contêm, possuem alto nível de atividade nitroredutase e são, portanto, muito sensíveis à ação de compostos mutagênicos que possuem o grupamento nitro, como os nitroarenos. São cepas muito

usadas quando se investiga o mecanismo de ação de um toxicante após sua metabolização. Pode-se utilizar também as cepas TA98NR e TA100NR, ambas deficientes em atividade nitroredutase (Watanabe et al., 1990).

Cepas que contêm o plasmídeo pYG219 codificam acetiltransferases: *N*-hidroxiarilamina *O*-acetiltransferase (NAT ou OAT). A expressão gênica desta enzima age na *O*-acetilação do produto já reduzido por NR (nitroredutases) sendo, portanto, usada também na investigação envolvendo metabolização de compostos. A linhagem YG1024, derivada de TA98 e YG1029, derivada da TA100 que o contém é extremamente sensível à ação de aminas aromáticas bem como a compostos químicos nitro. As cepas deficientes relativas a esta característica são TA98/1,8DNP-6 e TA100/1,8DNP-6 (Watanabe et al., 1990).

O conjunto de cepas padrão e cepas especializadas em metabolização pode ser completado ainda pelas cepas YG1041, e YG1042 (derivadas de TA98 e TA100, respectivamente) que possuem tanto alta atividade de nitroredutases como de acetiltransferases (Watanabe et al., 1990).

Com a finalidade de tornar estes testes mais consistentes e aplicáveis a mamíferos, os ensaios com bactérias tornaram-se dependentes de um passo fundamental que é a mimetização por um sistema de metabolização exógeno (Claxton et al., 1987). A fração pós-microssomal (S9), utilizada pela maioria dos laboratórios, pode ser adquirida comercialmente e é preparada a partir fígados de ratos Sprague-Dawley pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254).

O período de pré-incubação refere-se apenas ao tempo em que a cepa, o toxicante e a presença ou ausência de enzimas de metabolização estarão juntos antes do plaqueamento, de modo a permitir que a ação de enzimas e a geração de compostos eletrofílicos possam entrar e agir no DNA. Além disto, o tempo parece ser também importante na fixação do dano após as primeiras gerações evitando o mascaramento de uma resposta citotóxica. Assim, podemos realizar experimentos em 20 minutos, 40, 60 e 90 minutos de pré-incubação de modo a detectar o tempo ótimo para a determinação da atividade mutagênica do composto em questão (Aiub et al., 2004).

Culturas bacterianas são muito utilizadas em experimentos toxicológicos por apresentarem algumas vantagens em relação aos experimentos realizados in vivo ou com culturas de células de mamíferos, pelas seguintes razões: a) são facilmente manipuladas; b) seu genoma já está sequenciado, permitindo alterações controladas; c) a população usada experimentalmente é muito superior à usada com animais experimentais ou com humanos; d) diminui o custo e o tempo experimental.

Referências Bibliográficas

http://www.sbmcta.org.br/pdfs_xb1/113.pdf, Teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium (Teste de Ames, Ensaio Salmonella/ microssoma)

Gisela de Aragão Umbuzeiro, CETESB-SP; Vera Ma. Ferrão Vargas, FEPAMRS;

Israel Felzenszwalb, UERJ; João Antonio Pegas Henriques-UFRGS e Eliana Varanda, UNESP.

http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf , OECD #471Guideline for testing of chemicals for bacterial reverse mutation test, 21th July, 1997.

Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., and Zeiger, E., (1987). Guide for the Salmonella typhimurium/ Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res., 189, 83-91.

Maron D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res. 113, 173-215.

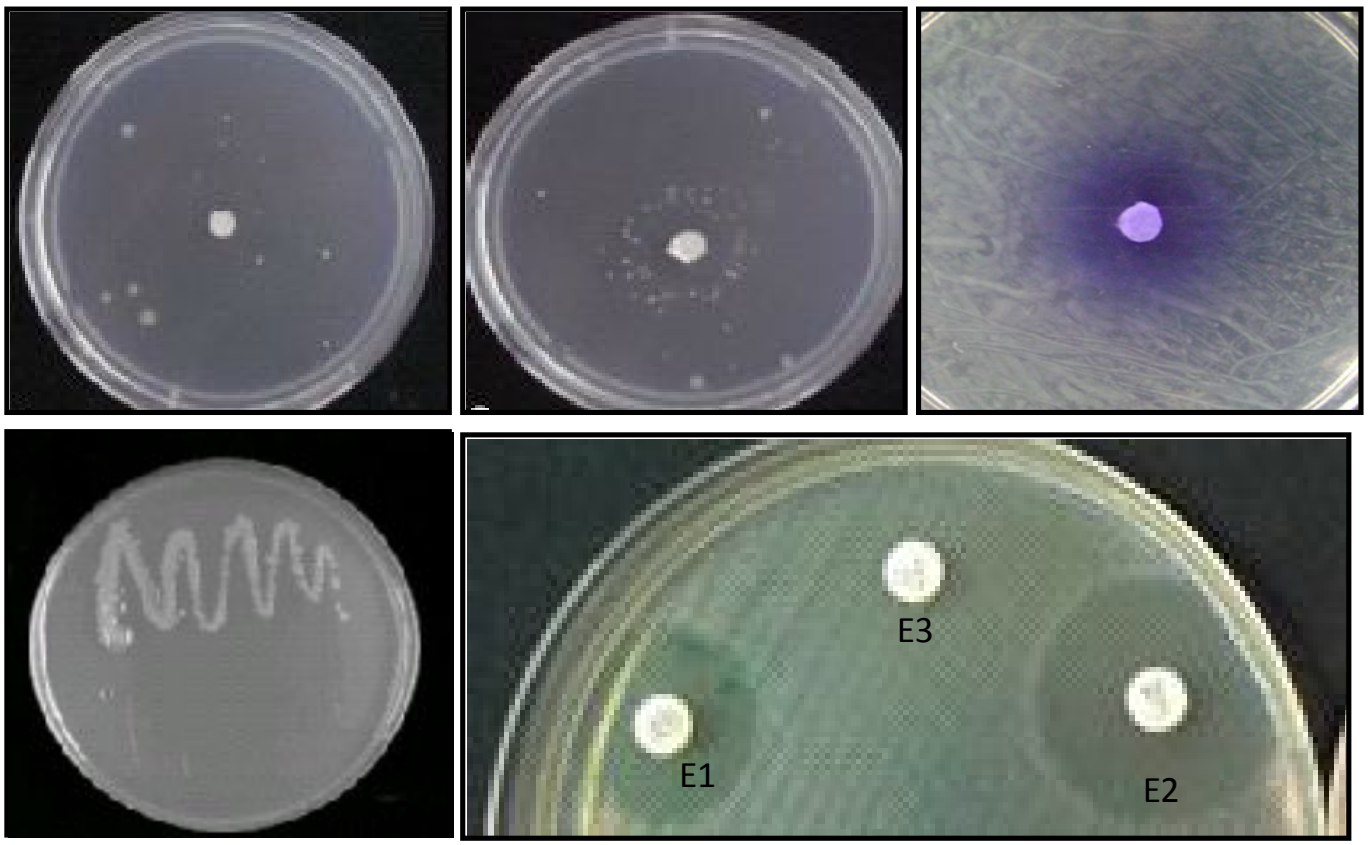
McCann, J.,Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogenics as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5135-5139.

Umbuzeiro, G.A. e Vargas, V.M.F. Série Documentos da SBMCTA. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade potencial em mamíferos. In: Ribeiro, L.R. et al. Mutagênese Ambiental. Canoas, RS: Ulbra, 2003 p. 81-112.

Watanabe M, Ishidate M Jr, Nohmi T. 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of Salmonella typhimurium tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. Mutat Res 234:337–348.

Zeiger, E. 1997. Genotoxicity database. In Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases (L.S. Gold and E. Zeiger, eds.) pp. 687-729. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Figura 1- Fotografias de placas de petri: (A) com colônias de cepa que proliferaram por terem tido mutação espontânea e (B) com colônias formadas por indução de mutação por agente químico conhecido inoculado no disco de filtro; (C) halo de inibição do crescimento bacteriano em torno do disco embebido com solução de cristal violeta indicando que a parede celular é permeável, confirmando a presença da mutação rfa; (D) o crescimento da cepa ocorreu somente do lado da placa que não foi irradiado com luz ultravioleta (metade superior), indicando a presença da deleção uvrB; (E) halos de inibição do crescimento em torno do disco embebido com a solução de (E1) canamicina e (E2) tetraciclina indicando que a bactéria é sensível a estes antibióticos, e ausência do halo, indicando resistência ao antibiótico ampicilina (E3).



Anexo 1 - Passo a passo do teste de Ames

Condições de Crescimento

Células bacterianas deverão ser inoculadas para proliferação a partir de colônias isoladas em meio Louria Bertani (LB) líquido (5g/L de extrato de levedura; 10g/L de triptona; 10g/L de NaCl) com ampicilina (8 mg/mL), a 37ºC, com agitação orbital de 250 OPM (proporção de ~5 colônias + 10 mL meio LB líquido), até atingirem fase estacionária de crescimento (~10-14 h após a inoculação).

As culturas deverão ser verificadas quanto à densidade, que deverá estar entre 2-6 X 10^9 células/ mL. Diluição seriada e semeadura em placas de Petri contendo meio LB sólido (5g/L de extrato de levedura; 10g/L de triptona; 10g/L de NaCl; 15g/L de Agar) seguido de incubação das placas a 37ºC, durante 24 horas, permitirá visualizar as colônias formadas e assim o cálculo do número de células.

É recomendável que as culturas não cresçam em meio Oxoid uma vez que foi detectado aumento no número de revertentes espontâneos em cepas como TA100 e TA1535.

Curvas de sobrevivência

Uma das variáveis existentes no teste de Ames, que pode contribuir para apresentação de resultados do tipo falso-negativos, relaciona-se com a toxicidade gerada pelos compostos avaliados. Uma vez que determinada concentração é tóxica, o número de células viáveis diminui e, assim, por consequência, diminuem o número de revertentes induzidos. Sugere-se utilizar como maior concentração a ser avaliada, a primeira dose considerada tóxica, ou seja, aquela que apresenta uma taxa de sobrevivência menor que 70% de colônias em relação ao controle.

Teste Quantitativo de Ames

Semeadura direta (com e sem metabolização):

1. Incubam-se linhagens de *Salmonella typhimurium*, overnight (12 horas).
2. Adiciona-se 500 mL de mix S9 (para os experimentos com S9, ou o mesmo volume em tampão fosfato-sódio 0,2 M, pH 7,4 para os experimentos sem metabolização) + 100 mL da suspensão (2 x 10^9 cels/mL) e 100 mL do toxicante ou do solvente, em tubos de ensaio com capacidade apropriada, em triplicata. S9 mix a 4% e, sob condições estéreis, formado pela adição de: 19,75 mL água destilada estéril, 25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH7.4 estéril, 1 mL de sais de $MgCl_2$ 0,4M e KCl_2 1,65M, 2 mL de NADP 0,1 mM, 0,25 mL de glicose 6-fosfato 1M, 2,1 mL de enzimas microssomais -S9 mix- reconstituídas com água destilada estéril.
3. Adiciona-se aos tubos 2000 mL de agar de superfície (7g/L de Agar; 5g/L de NaCl) enriquecido com solução de histidina/biotina 0,5mM (123,6 g/L Histidina e 96g/L Biotina) numa proporção de 10:1 (agar de superfície: histidina/biotina), pH 7,4, 45ºC. Agita-se e semeia-se em ágar mínimo (15 g ágar, 20 mL meio Vogel-Bonner - 50x concentrado, 10 g de magnésio heptahidratado, 100 g de ácido cítrico, 175 g de fosfato de sódio e amônio, 500 g de fosfato de potássio dibásico e 670 mL de água destilada-, 50 mL glicose 40%, para 930 mL de água).
4. Incuba-se por 72 horas e observa-se revertentes *his*+. Calcula-se com base nos revertentes espontâneos.
5. Paralelamente, semeiam-se células, em meio rico (Oxoid ou LB), para verificação de efeito citotóxico, através de teste de sobrevivência. Em meio rico, a semeadura deve ser feita na concentração de aproximadamente 10^2 cels/mL.

Semeadura pós pré-incubação (com e sem metabolização):

Segue o procedimento anterior, introduzindo no item (2) um período determinado de pré-incubação, sob agitação orbital de 250 OPM, a 37ºC em períodos de 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos e 90 minutos.

Avaliação dos dados:

Um toxicante será considerado positivo quando apresentar ANOVA significativa ($p<0,05$), índice de mutagenicidade (IM) igual ou superior a 2.0 (IM_x= número médio de revertentes na concentração X, dividido pelo número médio de revertentes no controle), não citotóxico (viabilidade acima de 70% em relação ao controle) para ao menos uma das linhagens padrões estabelecidas. Sugere-se ainda a observação de efeito dose-resposta significativamente positiva ($p<0,05$).

Modelo para organização dos dados experimentais

Cepa:_____

Metabolização:

( ) **com** ativação metabólica exógena.

( ) **sem** ativação metabólica.

Concentração de células/mL: _____

Incubação (tempo):_____

Toxicante:_____

Concentrações:_____

Controle:_____

Tabela de resultados:

Teste de Ames

Concentrações Finais	1	2	3	Média	Desvio padrão
0					

Curva de Sobrevivência

Concentrações Finais	1	2	3	Média	Desvio padrão
0					

Tabela Final:

Concentrações finais	Nº Revertentes /placa ± Desvio padrão	I.M.	% Sobrevivência
0		1	100