

AGENTES GENOTÓXICOS: Métodos de detección y evaluación_(RC-153)

Isabel Mauriz Turrado (Fac. de CC. Biológicas y Ambientales - bioimt00@unileon.es)

José Manuel Martínez Pérez (Facultad de Veterinaria - jmarp@unileon.es)
Universidad de León

Resumen

La genotoxicidad es una propiedad que poseen ciertos agentes y que se caracteriza por afectar a la integridad del genoma de los seres vivos. Existen diversos métodos de detección y evaluación a partir de microorganismos y células animales, predominando los primeros por motivos de tiempo, simplificación y precio. Dentro de los ensayos microbianos de genotoxicidad se incluyen aquéllos que detectan mutantes inducidos y diferentes al organismo no mutado por crecer en medios específicos y los que detectan la respuesta SOS. A su vez, este segundo grupo engloba dos categorías: los tests basados en la detección de la actividad de un promotor inducible por SOS y los que miden la inducción de profagos residentes en el genoma de la bacteria. Este último subgrupo es el que posee mayores ventajas sobre todos los anteriores, puesto que es rápido en la obtención y confirmación de resultados, así como viable con cualquier combinación fago-bacteria.

Abstract

Genotoxicity is a property that certain agents present and is characterized for attack the integrity of the genome in organisms. There are some methods to detect and evaluate from microorganisms and animal cells, predominating the first ones thanks to time, simplification and costs reasons. Inside genotoxicity microbial assays, those detecting induced mutants and different to the original organism because of growing on specific substrates and those detecting the SOS response, are included. Besides, the second group includes two categories: tests based on detecting the activity of a promoter induced by the SOS response and those that measure the liberation of resident prophages from the genomes of their bacterial hosts. This last subgroup provides higher advantages over the previous techniques, because the results are generated and confirmed quickly, as well as is viable with any combination phage-bacteria.

1. Concepto

Un agente genotóxico es aquel compuesto de naturaleza química o física que puede inducir, directa o indirectamente, alteraciones en el material genético de los seres vivos

con el consiguiente bloqueo de la replicación así como la aparición de mutaciones que derivarían en patologías y/o cambios en las características de dichos organismos (Suárez y Soberón, 2009). Los errores producidos durante la replicación y división del material genético se pueden deber no solo a agentes genotóxicos, sino a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación (Zalacaín et al., 2005). En el campo de la antibioterapia y quimioterapia, la utilización de los agentes genotóxicos para la obtención de mutantes con mejores características terapéuticas está ampliamente extendida desde hace décadas (Marins et al., 1994).

2. Introducción

La integridad genética de los seres vivos puede verse influida por la exposición a productos químicos, agentes genotóxicos, tratamientos médicos, polimorfismos genéticos o el propio cambio climático, entre otros factores (Zalacaín et al., 2005). Por todo ello es necesario evaluar de un modo fiable sus acciones específicas y desarrollar técnicas que detecten sus efectos en las etapas iniciales para poder evitar daños irreversibles.

Aunque el principal campo de estudio son los antibióticos y quimioterapéuticos, las investigaciones también se centran en la detección y valoración de compuestos potencialmente mutagénicos como los derivados de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's), las micotoxinas y otros productos de desecho industrial peligrosos para el medio ambiente. Los primeros consisten en tres o más anillos bencénicos fusionados compartiendo un enlace común (Ellenhorn y Barceloux, 1988). Se trata de productos hidrocarbonados que aparecen en la naturaleza como resultado de un proceso de combustión incompleta de materia orgánica, aunque también han sido identificados como productos de la biosíntesis endógena de plantas superiores, algas y otros organismos (Sontag, 1981). Las micotoxinas, metabolitos fúngicos tóxicos, se incluyen en grupos de sustancias químicas muy diferentes (derivados cumarínicos, péptidos cíclicos, antraquinonas, pironas, esteroides, derivados escirpénicos y nonadrinas) y su regulación en cuanto a límites máximos en alimentos se rige según el RD 475/1988 de 13 de mayo. En cuanto a los quimioterapéuticos, es necesario obtener compuestos que superen la barrera de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, ya que muchos agentes que se unen al ADN no son activos frente a éstas porque no consiguen acceder al citoplasma, al contrario que en las Gram-positivas (Suárez y Soberón, 2009).

En la actualidad, para la medida de la genotoxicidad de sustancias biológicamente activas y/o potencialmente nocivas para el medio ambiente se utilizan cultivos de microorganismos o de células animales. El uso de ensayos basados en microorganismos, la primera opción, tiene ciertas ventajas sobre la segunda, como su sencillez, rapidez y bajo coste (Soberón et al., 2007). Los ensayos microbianos de genotoxicidad se basan en dos principios: por un lado describir mutantes inducidos por el agente genotóxico capaces de desarrollarse en medios en los que el organismo parental no lo hace, como el test de Ames o el de resistencia a la arabinosa (ambos a partir de cepas de *Salmonella* spp.); por otro, revelar la inducción de la respuesta SOS (de Save Our Souls), inducida en situaciones de estrés motivadas por el daño al material genético bacteriano, como los tests basados en la detección de la actividad de un promotor inducible por SOS o los

que miden la inducción de profagos¹ residentes en el genoma de la bacteria (Suárez y Soberón, 2009).

3. Ensayos que detectan mutantes inducidos por el agente genotóxico

Como ya se ha mencionado, aquí se engloban los tests de Ames (Ames et al., 1975) y de resistencia a la arabinosa (Dorado y Pueyo, 1988), donde se utilizan cepas de *S. typhimurium* con mutaciones puntuales que les impiden sintetizar histidina o crecer en presencia del monosacárido, respectivamente. Se valora la capacidad del agente genotóxico para revertir las mutaciones, lo que da lugar a bacterias que crecen en medios sin dicho aminoácido o en presencia de arabinosa, dependiendo del procedimiento. Sus inconvenientes son la larga duración (tres días), las posibles características tóxicas del compuesto a evaluar y la exclusividad en el uso de bacterias Gram-negativas -con los problemas en la permeabilidad de la pared que éstas acarrearán- (Suárez y Soberón, 2009).

4. Ensayos que detectan la respuesta SOS

Las dos categorías antes mencionadas en este grupo han sido adoptadas para la visualización y cuantificación de la respuesta SOS. El descubrimiento del sistema de respuesta SOS ocurrió a partir de los estudios del efecto de la radiación ultravioleta (UV) sobre cepas de *Escherichia coli*. No hemos de obviar que la radiación UV es un método de desinfección efectivo con bacterias, protozoos (Bukhari et al., 1999; Morita et al., 2002), mientras que en virus es poco eficaz, aunque el efecto sinérgico con la plata puede potenciarlo en su inactivación (Butkus et al., 2004). Se observó que la reactivación y mutagénesis del Fago- λ^2 irradiado con UV aumentó cuando éste infectaba una cepa de *E. coli* que había sido previamente irradiada (Weigle, 1953). Más tarde, a este fenómeno se le denominó reactivación-W en honor a Weigle (Radman, 1974). Además, la radiación UV provocaba la inducción del Profago- λ en bacterias lisogénicas (Hernan y Luria, 1967) y la mutación bacteriana (Witkin, 1969), entre otros efectos. Cuando las bacterias están expuestas a estrés, pueden producir proteínas de defensa cuyos genes estaban normalmente silenciados y esto les permite reparar el daño en el ADN y reactivar su síntesis; estos fenómenos están relacionados con la mutación (Witkin, 1989; Soberón et al., 2007).

En los primeros tests, el promotor activable por SOS provoca la expresión de un gen cuyo producto da lugar a cambios en el cultivo. Los promotores que responden a la inducción SOS son colocados frente a los genes reporteros apropiados tales como *lacZ*³ (Quillardet et al., 1982; Mamber et al., 1986), el complejo de la luciferasa⁴ (*lux*) (Vollmer et al., 1997; Davidov et al., 2000; Elasri et al., 2000) o la proteína verde

¹ Formas inactivas no infecciosas de un bacteriófago, que es un virus cuyos hospedadores naturales son las bacterias, donde se reproducen. También es denominado *fago*.

² Virus atemperado cuyo genoma reside en una molécula de ADN. Infecta a diversas cepas de *E. coli*.

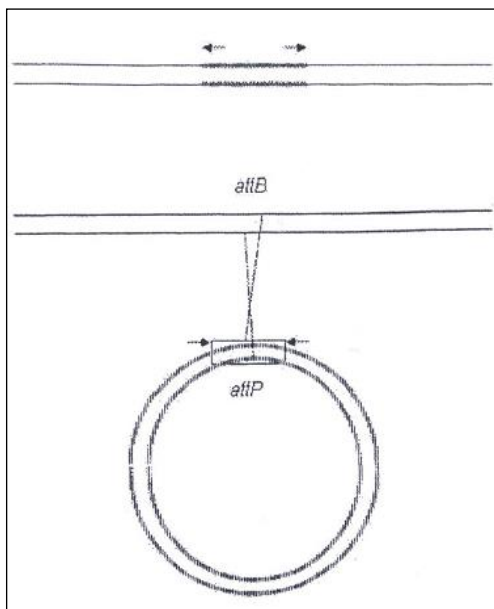
³ Gen que codifica para una β -galactosidasa, dando lugar a cambios en el color (cromotest).

⁴ Enzima termolábil que actúa sobre la luciferina produciendo radiaciones luminosas.

fluorescente⁵ (*GFP*) (Arai et al., 2001), permitiendo de esta manera la determinación de colorimetría, luminiscencia o fluorescencia, respectivamente. Los inconvenientes de la larga duración y la toxicidad son suprimidos con estas técnicas, aunque el agente a testar puede enmascarar los resultados. Al igual que los procedimientos del punto 3, el problema de la impermeabilidad al usar Gram-negativos se muestra patente.

Por otro lado, los tests de microescrutinio dependen de una cadena de *E. coli* que es lisogénica para el Fago- λ (Soberón et al., 2007). Aunque previamente ya se ha hablado de los términos “atemperado” y “lisogénicas”, hay que decir que los virus con la propiedad de integrar su ADN en el genoma de las bacterias se denominan atemperados; estas bacterias serían, por tanto, lisogénicas. La respuesta SOS se dirige hacia una activación de la actividad coproteasa del gen *RecA*, que une el represor *Cl* del Fago- λ e induce su proteólisis (Kim y Little, 1993). Gracias al *Cl* se libera la represión transcripcional del promotor lítico P_R , que es el primer paso para que el Fago- λ acceda al ciclo lítico. La inducción de la respuesta SOS va a provocar la liberación del genoma viral y, al final, la generación de una progenie viral y la lisis de la célula hospedadora (Janion, 2001), con la consiguiente pérdida de turbidez de los cultivos, pudiendo medirse esta característica (DeMarini y Lawrence, 1992). Para llevar a cabo el procedimiento se usan dos oligonucleótidos cebadores (que convergerán en el ADN circular viral) para la PCR-Q⁶, correspondiendo a cada lado de la secuencia *attP*⁷ del fago atemperado.

Figura 1. Durante el proceso de integración del profago, tanto el ADN viral como el bacteriano se abren en puntos específicos, denominados respectivamente *attP* y *attB*, a partir de los que se produce la soldadura entre ambas moléculas de ADN, quedando el genoma viral integrado en el cromosoma bacteriano (Suárez y Soberón, 2009).



Se espera que no haya amplificación de ADN de un cultivo lisogénico no inducido en el que la mitad de los sitios *attP* están separados y orientados en contraposición. Sin embargo, la liberación del profago provocará que se genere un genoma circular, permitiendo la amplificación del fragmento de ADN *attP* regenerado. La mayoría de los compuestos que inducen directa o indirectamente la genotoxicidad interfieren con la replicación del ADN, de ahí que este hecho sea importante (Soberón et al., 2007).

Aunque los procedimientos de microescrutinio no conseguían solucionar del todo los problemas del tiempo de realización (dos días), el material

⁵ Proteína producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible.

⁶ Significa PCR cuantitativa, también denominada PCR en tiempo real (RT-PCR), y permite la detección inmediata de la amplificación de secuencias de ADN o ARN proveyendo parámetros cuantitativos.

⁷ Región del genoma viral en donde ocurre una recombinación que conducirá a la integración/escisión de dicho genoma en el cromosoma bacteriano (Campbell, 2003).

de trabajo e incluso la permeabilidad de la membrana bacteriana, esta última técnica fue desarrollada a partir de cultivos lisogénicos de *E. coli* y *Lactobacillus casei*⁸ (Álvarez et al., 1998) y se demostró su viabilidad en cualquier combinación fago-bacteria, se consiguieron mitigar los problemas de permeabilidad de la membrana y los resultados podían ser obtenidos y confirmados en pocas horas, amén de la lisis efectuada directamente con el precalentamiento en la PCR-Q (Soberón et al., 2007).

Además, estas dos combinaciones incrementan el potencial de compuestos que pueden ser evaluados, ya que la diferente estructura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas facilita el paso de moléculas con distintas propiedades físico-química, pequeñas e hidrofóbicas en el caso del Fago- λ /*E. coli*, y grandes e hidrofílicas en cuanto al Fago A2/*L. casei*. El ensayo microbiano que señala la patente (Suárez y Soberón, 2009) se encuentra, con las características detalladas de cebadores y ciclos de la PCR-Q, en Soberón et al. (2007).

5. Evaluación de compuestos genotóxicos. A propósito de Soberón et al. (2007)

5.1. Evaluación del efecto genotóxico de la mitomicina C

La mitomicina C se enmarca dentro de los antibióticos antitumorales. El interés actual por el tratamiento del cáncer ha conducido a múltiples formas de actuación. Las tres modalidades clásicas son: cirugía, radiación y quimioterapia, aunque también se encuentra bien fundamentada la criocirugía. Cada una de las modalidades de tratamiento tiene sus ventajas e inconvenientes y limitaciones. Por esta razón, la terapia múltiple se está convirtiendo en lo deseable. En cuanto a la quimioterapia del cáncer, se practicó por primera vez con éxito cuando se emplearon las mostazas nitrogenadas (usadas como gases de guerra) para inhibir el crecimiento de los tumores. La quimioterapia, en contraste con la irradiación y la cirugía, está limitada por el número de células cancerosas. Por el contrario, resulta ideal para determinados tipos de cáncer, ya que los agentes son transportados por la sangre. Su éxito depende de disponer de fármacos que sean fijados rápida e intensamente a la célula o a alguno de los componentes celulares. Asimismo, los fármacos antineoplásicos son más efectivos contra las células clonogénicas y son parcial o totalmente ineficaces contra las células en reposo. Entre los fármacos utilizados en quimioterapia están los agentes alquilantes, los antimetabolitos, los alcaloides, las hormonas o los antibióticos antitumorales, entre otros.

La mitomicina C fue aislada de *Streptomyces caespitosus* en la década de los cincuenta (Hata et al., 1956). Contiene un grupo uretano y un grupo quinona en su estructura, así como un anillo de aziridina, esencial para su actividad antineoplásica (Gilman et al., 1980). En términos generales, los antibióticos antitumorales son productos naturales extraídos del hongo del género *Streptomyces* spp. y no tienen especificidad por el ciclo celular. Los más utilizados son la doxorubicina (frente a linfosarcomas), la actinomicina D (frente a linfosarcomas y carcinomas) y la bleomicina (frente a carcinomas).

El efecto genotóxico de la mitomicina C ocurre tras la unión al ADN con el consiguiente impedimento de la separación de las dos cadenas y el bloqueo de la

⁸ Para *Lactobacillus* spp. se utilizó el Fago atemperado A2 en lugar del Fago- λ .

replicación. De ahí que sea un eficaz quimioterapéutico antitumoral. La radiación UV se usa como agente microbiocida e induce fundamentalmente la formación de dímeros de pirimidina en el ADN (Suárez y Soberón, 2009).

En cuanto a la escisión del genoma del Fago A2 residente en el cromosoma de *L. casei*, ésta se detecta a bajas concentraciones de mitomicina C. El incremento en la concentración de ésta supone un aumento paralelo de la respuesta detectada hasta un límite que es igual a veinticuatro veces la respuesta inicial. A partir de este punto se produce una inhibición de la respuesta. Este hecho ocurre de manera similar, aunque a concentraciones y Ct (o valores umbrales en la PCR-Q) más altos en el caso de la combinación Fago- λ /*E. coli*. Su explicación refleja de la mayor permeabilidad de las células de *L. casei* (Gram-positiva) con respecto a las de *E. coli* (Gram-negativa). Pese a las dificultades de acceso al interior de la célula en esta última, a concentraciones elevadas se alcanzarían los valores umbral relativamente pronto, pero cuando la concentración del genotóxico fuera limitante, se establecería un gradiente continuo de células que irían alcanzando los niveles que disparan la respuesta SOS, lo que se apreciaría como una variación continua de los valores Ct. De aquí se extrae la conclusión que la respuesta SOS de *E. coli* es más sensible a la mitomicina C que la de *L. casei*, aunque la permeabilidad de membrana intente solapar los resultados. Además, mientras en *L. casei* se alcanzan rápidamente concentraciones intracelulares tóxicas, en *E. coli*, la penetración más lenta hace que no se alcancen dichos niveles hasta después de la inducción del profago. La liberación de profagos de A2 se inhibía a concentraciones de mitomicina C menores que las necesarias para ejercer el mismo efecto en el Fago- λ , igualmente por los problemas de permeabilidad. Hay que destacar que la liberación de genomas virales no requiere de la síntesis de ADN, proceso que inhibe la mitomicina C, mientras que la producción de nuevos fagos sí depende de que haya replicación del material genético viral (Suárez y Soberón, 2009).

Figura 2. Influencia de la mitomicina C sobre la escisión del genoma del Fago A2 del cromosoma de una cepa lisogénica de *L. casei*, medida por PCR-Q.
 (●) Sin mitomicina C; (■) 12,5 ng/ml de mitomicina C; (▲) 50 ng/ml; (◆) 300 ng/ml; (x) 1000 ng/ml; (○) 3000 ng/ml; (□) 5000 ng/ml; (△) 10000 ng/ml.

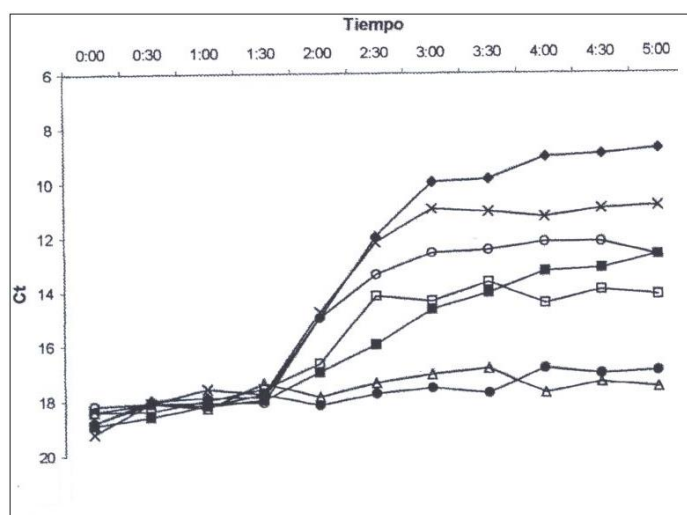
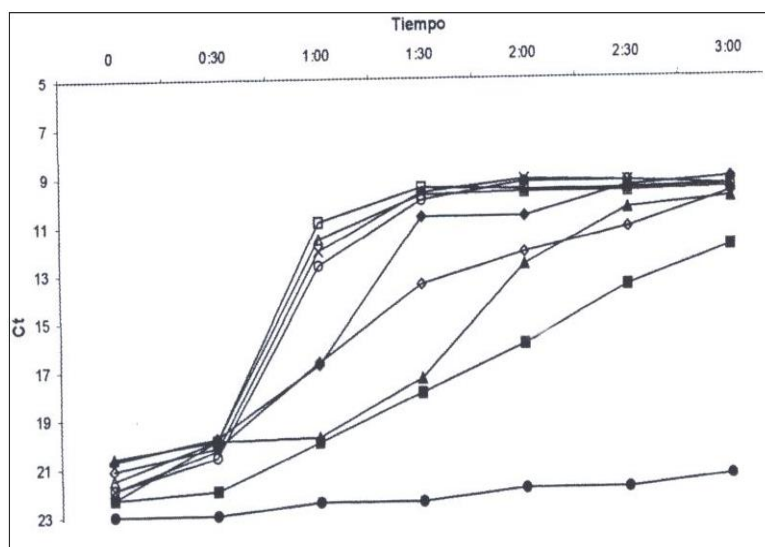


Figura 3. Influencia de la mitomicina C sobre la escisión del genoma del Fago- λ del cromosoma de una cepa lisogénica de *E. coli*, medida por PCR-Q.

(●) Sin mitomicina C; (■) 12,5 ng/ml de mitomicina C; (▲) 100 ng/ml; (◆) 500 ng/ml; (x) 1000 ng/ml; (○) 3000 ng/ml; (□) 5000 ng/ml; (△) 10000 ng/ml; (◇) 20000 ng/ml.



5.2. Evaluación del efecto genotóxico de la radiación UV

La luz UV ejerció un efecto inductor de la respuesta SOS, determinada como liberación de los profagos, importante tanto en el caso de *E. coli* como de *L. casei*, incluso a intensidades bajas. Dicha respuesta se mantuvo en valores máximos independientes de la intensidad de la radiación aplicada. Los resultados en la evaluación de nuevos fagos fueron similares en los dos grupos a partir de 1 J/m².

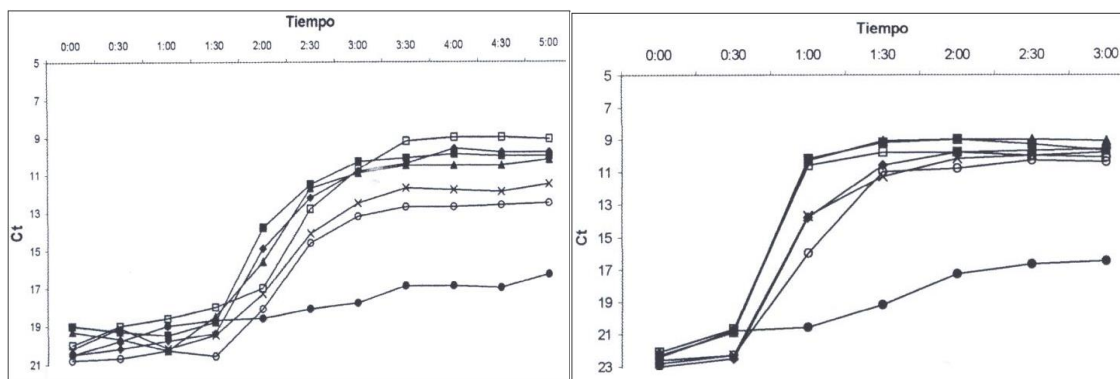


Figura 4. Influencia de la radiación UV sobre la escisión del genoma del fago A2 del cromosoma de una cepa lisogénica de *L. casei*, medida por PCR-Q. **Figura 5.** Influencia de la luz UV sobre la escisión del genoma del Fago- λ del cromosoma de una cepa lisogénica de *E. coli*, medida por PCR-Q. (●) 0 J/m²; (■) 1 J/m²; (▲) 5 J/m²; (◆) 10 J/m²; (x) 30 J/m²; (○) 50 J/m²; (□) C(+).

5.3. Evaluación del efecto genotóxico de la ciprofloxacina, el etopósido y otros agentes

La primera provoca la inducción del Fago- λ , pero no la del Fago A2, debido a que la cepa de *L. casei* lisogénica es resistente a dicho antibiótico; la liberación del profago parece ser más sensible que la generación de nuevos viriones⁹. El etopósido sólo indujo el ciclo lítico del Fago A2, porque *E. coli* es impermeable a este quimioterapéutico.

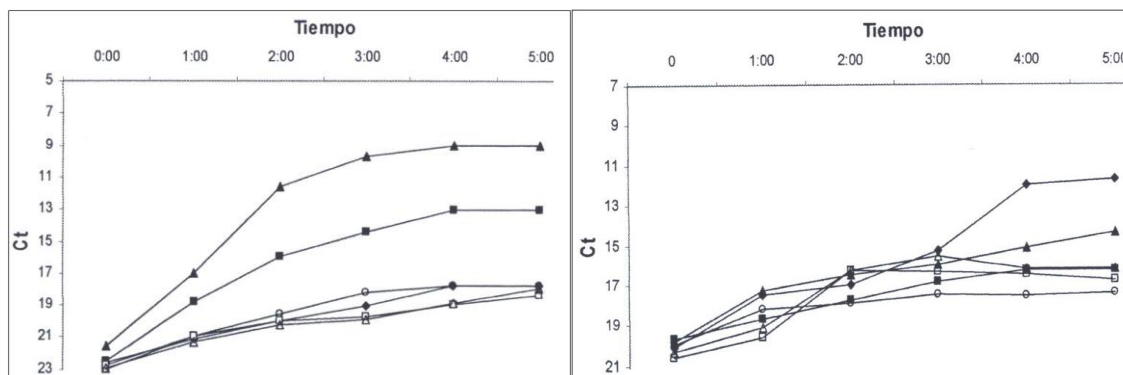


Figura 6. Influencia de la ciprofloxacina sobre la escisión viral, medida por PCR-Q. **Figura 7.** Influencia del etopósido sobre la escisión del genoma viral, medida por PCR-Q. *E. coli*/Fago- λ : (○) Sin inducir; (■) 10 nM; (▲) 50 nM; (◆) 500 nM. *L. casei*/Fago A2: (○) Sin inducir; (□) 10 nM; (△) 50 nM; (○) 500 nM.

Compuestos	<i>L. casei</i> (A2)	<i>E. coli</i> (lambda)
Químicos		
Ciprofloxacina	-	+++
Dacarbazina	++	-
Etopósido	+	-
Epiclorohidrina	++	++
Hidrazina	++	-
K ₂ Cr ₂ O ₇	+	-
Mitomicina C	+++	+++
Ácido nalidixico	-	++
Norfloxacina	+	+++
Fenantreno	-	++
Estreptozotocina	-	+++
Agentes Físicos		
UV-rays	+++	+++

Tabla 1. Capacidad inductora de la respuesta SOS de varios agentes genotóxicos, químicos y físicos, incluyendo los previamente descritos, medida por la liberación de los profagos A2/*L. casei* y λ /*E. coli*.

⁹ Unidad estructural de los virus. Consta fundamentalmente de dos estructuras imprescindibles: un ácido nucleico (ADN o ARN) y una envoltura proteica (*cápside*). A estas estructuras básicas se añade, en algunos casos, una envoltura lipídica (*peplos*) y/o espículas de glucoproteína.

6. Bibliografía

- Álvarez, M.Á.; Herrero, M. y Suárez, J.E. (1998). The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates in gram-positive and gram-negative bacteria. *Virology* 250: 185-193.
- Ames, B.N.; McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31: 347-364.
- Arai, R.; Makita, Y.; Oda, Y. y Nagamune, T. (2001). Construction of green fluorescent protein reporter genes for genotoxicity test (SOS/umu-test) and improvement of mutagen-sensitivity. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 301-304.
- Bukhari, Z.; Hargy, T.M.; Bolton, J.R.; Dussert, B. y Clancy, J.L. (1999). Medium pressure UV light for oocyst inactivation. *Journal of American Water Works Association* 91: 86-94.
- Butkus, M.A.; Labare, M.P.; Starke, J.A.; Moon, K. y Talbot, M. (2004). Use of aqueous silver to enhance inactivation of Coliphage MS-2 by UV disinfection. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2848-2853.
- Campbell, A. (2003). Prophage insertion sites. *Research in Microbiology* 154: 277-282.
- Davidov, Y.; Rozen, R.; Smulski, D.R.; Van Dyk, T.K.; Vollmer, A.C.; Elsemore, D.A., et al. (2000). Improved bacterial SOS promoter::*lux* fusions for genotoxicity detection. *Mutation Research* 466: 97-107.
- DeMarini, D. y Lawrence, B. (1992). Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen spp.: role of DNA breaks. *Mutation Research* 267: 1-17.
- Dorado, G. y Pueyo, C. (1988). L-Arabinose resistance test with *Salmonella typhimurium* as a primary tool for carcinogen screening. *Cancer Research* 48: 907-912.
- Elasri, M.O.; Reid, T.; Hutchens, S. y Miller, R.V. (2000). Response of a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm community to DNA-damaging chemical agents. *FEMS Microbiology Ecology* 33: 21-25.
- Ellenhorn, L.J. y Barceloux, D.G. (1988). "Chemical products", en *Medical Toxicology*, Elsevier Science Pub., Londres, pp. 952-954.
- Gilman, A.G.; Goodman, L.S. y Gilman, A. (1980). *The pharmacological basis of therapeutic. Mitomycin*. McMillan Pub., Nueva York, pp. 1296-1297.
- Hata, T.; Sano, Y.; Sugawara, R.; Matsumae, A.; Kanamori, K.; Shima, T. y Hoshi, T. (1956). Mitomycin a new antibiotic from *Streptomyces*. *Journal of Antibiotics* a-9: 141-146.

- Hernan, L. y Luria, S.E. (1967). Transduction studies on the role of *rec*⁺ gene in the ultraviolet induction of prophage lambda. *Journal of Molecular Biology* 23: 117-133.
- Janion, C. (2001). Some aspects of the SOS response system: a critical survey. *Acta Biochimica Polonica* 48: 599-610.
- Kim, B. y Little, J.W. (1993). *LexA* and *lambda Cl* repressors as enzymes: specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* 73: 1165-1173.
- Mamber, S.W.; Okasinski, W.G.; Pinter, C.D. y Tunac, J.B. (1986). The *Escherichia coli* K-12 SOS Chromotest agar spot test for simple, rapid detection of genotoxic agents. *Mutation Research* 171: 83-90.
- Marins, M.; Costa, S.O.P. y Padilla, G. (1994). Effects of genotoxic agents on his⁺ revertants and survival of spores of *Streptomyces aureofaciens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 560-562.
- Morita, S.; Namikoshi, A.; Hirata, T.; Oguma, K.; Katayama, H.; Ohgaki, S., et al. (2002). Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5387-5393.
- Quillardet, P.; Huisman, O.; D'Ari, R. y Hofnung, M. (1982). SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79: 5971-5975.
- Radman, M. (1974). "Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis", en *Molecular and Environmental aspects of Mutagenesis*, C.C. Thomas Pub., Springfield, pp. 128-142.
- Soberón, N.E.; Martín, R. y Suárez, J.E. (2007). New method for evaluation of genotoxicity, based on the use of Real-Time PCR and Lysogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2815-2819.
- Sontag, J.M. (1981). "Carcinogens in foods", en *Carcinogens in Industry and the Environments*, Marcel Dekker, INC, EEUU, pp. 465-475.
- Suárez, J.E. y Soberón, N.E. (2009). Método rápido de detección y evaluación de agentes genotóxicos (patente de invención con examen previo). *Oficina española de patentes y marcas*, pág. 2. ES 2 307 395 B2.
- Vollmer, A.C.; Belkin, S.; Smulski, D.R.; Van Dyk, T.K. y LaRossa, R.A. (1997). Detection of DNA damage by use of *Escherichia coli* carrying *recA*':*lux*, *uvrA*':*lux*, or *alkA*':*lux* reporter plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2566-2571.
- Weigle, J.J. (1953). Induction of mutation in a bacterial virus. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 39: 628-636.
- Witkin, E. (1969). Ultraviolet induced mutation and DNA repair. *Annual Review of Microbiology* 23, 487-514.
- Witkin, E. (1989). Ultraviolet mutagenesis and the SOS response in *Escherichia coli*: A personal perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 16: 30-34.

- Zalacaín, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 227-236.