

26
2ej.

2014
RECEBIDA
2014
30
11:25
11:54



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD MUTAGENICA EN Salmonella typhimurium DE
LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA REACCION DE
METILUREA CON NITRITO DE SODIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

SILVIA CABALLERO SALAZAR



MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Silvia Caballero Salazar

con número de cuenta 7715960-3 con el Título: " ACTIVIDAD MUTAGENICA EN Salmonella typhimurium DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA REACCION DE METILUREA Y NITRITO DE SODIO "

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Jesús Javier	Espinosa Acuirra	
Director de Tests Dra.	Judith	Guzmán Rincón	
M en C.	Marco Antonio	Martínez Avila	
Dr.	Emilio	Rojas del Castillo	
Suplente Dra.	Patricia	Ramos Morales	
Suplente			

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE GENETICA Y TOXICOLOGIA AMBIENTAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS (U.N.A.M.) Y EN EL LABORATORIO DE GENETICA TOXICOLOGICA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION EN SALUD INFANTIL DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA (I.N.P.)

CON EL APOYO PARCIAL DE LA FUNDACION MIGUEL ALEMAN

BAJO LA DIRECCION DEL

Dr. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

CON TODO MI CARINO DEDICO
ESTA TESIS A MI HIJA, POR
SU TERNURA E INOCENCIA.

SILVIA LILIANA.

POR SU CONFIANZA Y APOYO
INCONDICIONAL, A MI ESPOSO.

JOSE RICARDO.

POR SU CARINO, A MIS PADRES.

CATALINA Y FRANCISCO

CON AGRADECIMIENTO:

AL Dr. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE, POR SUS CONSEJOS,
ORIENTACIONES E INVALORABLE AYUDA PARA LA REALIZACION
DEL PRESENTE TRABAJO.

AL Dr. ISMAEL LARES ASSEFF, POR SU CONFIANZA Y APOYO.

Y A LA Dr. ROSA ANA DE LA TORRE MELIS, POR SUS VALIOSOS
CONSEJOS PARA MEJORAR LA CALIDAD DE ESTE TRABAJO.

INDICE

I.- INTRODUCCION .	1
II.- ANTECEDENTES.	3
1.- Exposición a compuestos N-nitroso.	3
1.1.- Clasificación de alimentos contaminados con precursores de compuestos N-nitroso.	5
1.2.- Exposición ocupacional.	6
1.3.- Exposición por tabaco y medicamentos.	7
2.- Fuentes de nitritos y nitratos.	8
3.- Definición química.	9
3.1.- Cinética de formación.	9
3.2.- Formación endógena.	10
4.- Sustancias que inhiben la formación de compuestos N-nitroso.	12
5.- Ensayo de mutagénesis.	13
III.- MATERIALES Y METODOS	
1.- Reacción de nitrosación	15
1.1.- Cuantificación química de la reacción de nitrosación.	15
2.- Ensayo de mutagénesis (Prueba de Ames).	16
2.1.- Obtención y mantenimiento de las cepas de prueba.	17
2.2.- Métodos para verificar la presencia de marcadores génicos y determinar la frecuencia de reversión espontánea.	18
2.3.- Prueba de Mutagenicidad de la reacción de nitrosa ción.	19
2.4.- Prueba de sobrevida.	20
3.- Obtención de extractos de frijol (<u>Phaseolus vulgaris</u>) variedad flor de Mayo.	21
3.1.- Rotoevaporación.	21

3.2.- Liofilización.	22
IV- RESULTADOS Y DISCUSION.	23
V.- TABLAY GRAFICAS	36
VI.- FIGURAS	55
VII.- BIBLIOGRAFIA	63
VIII.- ANEXO 1	68
MEDIOS Y SOLUCIONES.	
1.- Medios de cultivo.	
1.1.- Agar de superficie	68
1.2.- Medio mínimo de Vogel-Bonner.	68
1.3.- Medio completo de superficie.	69
1.4.- Medio completo para placas.	69
1.5.- Medio mínimo de Vogel-Bonner complementado con histidina.	69
2.- SOLUCIONES.	
2.1.- Solución madre de sales de Vogel-Bonner.	70
2.2.- Amortiguador Estándar.	70
2.3.- Reacción de Nitrosación.	71
2.4.- Bicarbonato de Sodio.	71
2.5.- Sulfamato de Amonio.	71
2.6.- Reactivo de Gries.	71

I.- Introducción

Los compuestos N-nitroso son considerados en la actualidad como un grupo importante de mutágenos químicos involucrados en la etiología del cáncer en humanos. Se sabe que estos compuestos son capaces de inducir tumores en más de 40 especies animales incluyendo primates, habiéndose descrito en el hombre una alta incidencia de cáncer de esófago, colon y estómago en lugares como China, Japón y el este de África en donde se ingieren alimentos con alto contenido de compuestos N-nitroso o de sus precursores.

Los compuestos N-nitroso pueden formarse durante la cocción y ahumado de los alimentos o encontrarse en bebidas alcohólicas y en el humo del tabaco. Sin embargo, se ha reportado que la mayor exposición a estos carcinógenos ocurre por su formación endógena en la cavidad ácida del estómago a partir de sus precursores (aminas, amidas y nitritos), que pueden consumirse en bebidas, alimentos y medicamentos.

Se ha encontrado también, que los alimentos contienen diversos compuestos que son antagonicos con el efecto de los mutágenos químicos o que inhiben su formación endógena, por lo que proveen así de una alternativa natural para moderar el riesgo de la exposición a los diferentes carcinógenos químicos con los que el hombre está en contacto.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, resulta importante contar con un sistema de ensayo sencillo, rápido y confiable que permita la identificación y tamizaje de compuestos de origen natural, presentes en los vegetales comunes de la dieta mexicana,

que inhiban de alguna manera la reacción de nitrosación y por consiguiente, la formación de compuestos N-nitroso potencialmente carcinogénicos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general.

Contribuir a la evaluación y prevención del riesgo de exposición a compuestos nitrosados potencialmente carcinogénicos, derivados de la reacción de nitrosación de productos aminados y nitritos.

Objetivos específicos.

1) Establecer la metodología para la formación de compuestos N-nitroso altamente mutagénicos como la N-nitrosometilurea en un modelo de nitrosación in vitro .

2) Determinar la actividad mutagénica de los productos resultantes de la reacción de nitrosación de metilurea y nitrito de sodio en el sistema de Salmonella typhimurium

3) Realezar la cuantificación química mediante colorimetría de los productos resultantes de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio.

4) Determinar la inhibición de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio, con diferentes concentraciones de vitamina C por medio del sistema de Ames y cuantificación colorimétrica.

II.-Antecedentes

1.- Exposición a compuestos N-nitroso

Los compuestos N-nitroso constituyen un grupo extenso de productos químicos cuyo interés de estudio surgió desde 1956, cuando Magee y Barnes pusieron en evidencia la capacidad carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina (1). Posteriormente Druckrey y Preussmann (2) postularon que la formación de nitrosaminas carcinogénicas ocurre frecuentemente en el humo del cigarro, vía interacción de óxidos de nitrógeno y aminas del tabaco. La primera confirmación de la presencia de nitrosaminas en el medio ambiente fue mostrada por Ender y colaboradores (3), quienes encontraron, después de una epidemia hepatotóxica trazas de N-nitrosodimetilamina en forraje para ovejas preservado con nitrito. Con ello se puso de manifiesto el riesgo de exposición a compuestos N-nitroso. La actividad entre los agentes precursores quedó demostrada después con los trabajos de Sander (4) quien mostró su formación endógena en animales de experimentación.

Trabajando en el desarrollo de detectores de alta sensibilidad y selectividad para nitrosaminas, Fine y colaboradores (5) establecieron que la exposición humana a compuestos carcinogénicos N-nitroso provenía frecuentemente de la dieta.

Los alimentos en particular, constituyen una fuente muy importante y probablemente la más conocida de precursores de compuestos N-nitroso (6).

Los productos preservados son una fuente importante de nitro-

saminas y de sus precursores, ya que durante su manufactura son tratados con nitrito de sodio. En diferentes trabajos se ha reportado la presencia de N-nitrosopirrolidina, N-nitrosodimetilamina y N-nitrosopiperidina en carnes y tocinos (7,8).

Los compuestos mutagénicos que se han encontrado en los alimentos pueden formarse durante los procedimientos de cocción (9,10) o almacenamiento de los productos. Existen evidencias de que las reacciones de nitrosación pueden ocurrir dentro de la matriz lipídica de las carnes, mediante un mecanismo de reacción que involucra radicales libres (11,12,13).

Los pescados, debido a su alto contenido de aminas nitrosables como dimetil y trimetilamina, han sido objeto de numerosos estudios. Sin embargo, se han detectado niveles muy bajos en el contenido de N-nitrosodimetilamina en las muestras estudiadas, debido posiblemente a que este compuesto es volátil y se pierde en el mismo proceso de cocción (13,14).

Por otro lado, se ha reportado que la concentración de nitrosodimetilamina puede ser cuatro veces mayor en pescados horneados con gas que en pescados horneados en aparatos eléctricos, debido posiblemente a que durante la cocción con gas se producen óxidos de nitrógeno que reaccionan con las aminas presentes en los alimentos (14, 15).

Además de las carnes y pescados, se ha reportado que los productos lácteos como quesos y leche descremada en polvo, contienen N-nitrosodimetilamina (16,17).

En algunos lugares de Europa se añade nitrato a los quesos para

impedir el crecimiento de especies del género Clostridium. Al reducirse este nitrato se produce nitrito, que puede dar lugar a la formación de compuestos N-nitroso (17).

También se han detectado estos compuestos en algunos de los aditivos y saborizantes de algunos alimentos como la salsa de soya y la pimienta blanca o negra . Así, el uso de saborizantes en alimentos curados con nitratos y nitritos representa una fuente adicional de exposición humana (17,18).

1.1.- Clasificación de alimentos contaminados con precursores de compuestos N-nitroso.

De acuerdo a la gran variedad de alimentos más comunmente contaminados con compuestos N-nitroso, así' como de sus precursores, estos pueden ser clasificados en cinco grandes grupos (19):

1) Alimentos preservados por la adición de nitrato y/o nitrito, denominados como productos curados o en conserva (en particular tocinos, embutidos y quesos), ya que en los métodos para su procesamiento y preservación se introducen especies nitrosantes.

2) Alimentos preservados por ahumado, tal como pescados y carnes. En este caso, el óxido de nitrógeno presente en el ahumado actúa como agente nitrosante.

3) Alimentos sujetos a desecación por combustión de gases, por ejemplo malta para la producción de cerveza y whisky, leche en polvo, sazónadores, etc.

4) Productos preservados con sal, en particular aquellos provenientes de plantas como por ejemplo, los vegetales en salmuera,

en los que la reducción de nitrato a nitrito puede ser causada por microorganismos.

5) Alimentos almacenados bajo condiciones altamente húmedas, que favorecen el crecimiento de hongos, particularmente de la especie Fusarium moniliforme, y a los cuales se les tiene necesariamente que añadir conservadores

Además de las fuentes de exposición ya mencionadas, pueden sumarse otras, como por ejemplo la formación y migración de nitrosaminas de los materiales que están en contacto con los alimentos. Y por último, el uso de chupones de goma que se utilizan en la alimentación de los bebés, ya que estos contienen nitrosaminas que migran a los alimentos (19).

1.2.- Exposición ocupacional a compuestos N-nitroso

Si bien los alimentos y bebidas representan la forma de exposición de nitrosaminas y nitrosamidas más importante y frecuente en la población en general, cuantitativamente no es la más significativa debido a que la exposición ocupacional a nitrosaminas, aunque restringida a una parte de la población, es importante debido a las altas concentraciones que estos compuestos pueden alcanzar en el ambiente de trabajo. En la industria del hule, por ejemplo, la N-nitrosodifenilamina se usa como retardante de la vulcanización. Este compuesto puede intervenir en reacciones de trasnitrosación, dando lugar a la formación de varios compuestos N-nitroso carcinogénicos. En este tipo de fábricas se ha detectado la presencia de nitrosodifenilamina, nitrosodimetilamina y nitrosomorfolina (7). En otras industrias donde se trabaja con

aminas, así como las del curtido y varias otras industrias químicas, también se ha detectado altos niveles de nitrosaminas en el ambiente de trabajo (7).

1.3.- Exposición a compuestos N-nitroso por tabaco y medicamentos

Por otro lado, el tabaco se ha identificado como otro de los principales factores etiológicos de cáncer en seres humanos, ya que es una de las principales fuentes de exposición exógena de nitrosaminas volátiles, tanto en los fumadores activos como en los pasivos. Recientemente se han detectado N-nitrosomorfolina y N-nitrosodimetilamina en los concentrados del humo de tabaco, siendo la cantidad de nitrosaminas formada dependiente del contenido de nitrito en el tabaco (20).

Entre 1960 y 1980 se incrementó la concentración de nitratos (del 0.5 al 1 %) durante la manufactura de los tabacos, trayendo esto como consecuencia que se aumentara el potencial carcinogénico de los mismos, debido a la formación de derivados N-nitroso de la nicotina y de la nornicotina. Estas nitrosaminas específicas del tabaco que han demostrado ser carcinogénicas en animales de laboratorio, y pueden formarse durante la práctica de fumar o de mascar el vegetal (21).

Se ha detectado que diversos medicamentos empleados frecuentemente son susceptibles de nitrosación, por ejemplo la administración de piperazina, oxitetraciclina y cimetidina junto con nitrito de sodio en animales de laboratorio pueden inducir cáncer. El riesgo que representa la nitrosación de medicamentos como

agentes etiológicos en el cáncer , no ha sido totalmente evaluado hasta ahora debido a la complejidad de factores que afectan las reacciones in vivo (22,23,24,25).

2.- Fuente de nitritos y nitratos.

La principal fuente de iones nitrosantes es el nitrito de sodio, el cual puede ingerirse como tal o provenir de la reacción de reducción del nitrato. Este puede encontrarse normalmente en la saliva, variando su concentración de una persona a otra. El nitrato pasa al estómago e intestino delgado, en donde es absorbido, llegando luego al torrente sanguíneo. Otra parte del nitrato presente en la saliva es convertido in situ a nitrito por la flora bacteriana de la cavidad oral, pasando directamente al estómago. El nitrato que ha pasado de la saliva al estómago puede ser reducido a nitrito mediante la actividad nitrato-reductasa de las bacterias, generalmente cuando el pH del estómago se encuentra en valores de 1 a 3, aumentando con ello la concentración del nitrito y de los compuestos N-nitrosos. La actividad nitrato- reductasa de las bacterias se ha visto asociada a una enzima que tiene un grupo molibdeno, la cual es inducible en presencia de nitrato, especialmente en condiciones anaeróbicas; adicionalmente se ha detectado la presencia de una enzima en la bacteria Escherichia coli, semejante a la nitrato-reductasa que cataliza la reacción de nitrosación (26,27,28).

Otra fuente importante de nitritos y nitratos la constituye el agua. Así; se ha relacionado la alta incidencia de cáncer del tracto gastrointestinal en lugares donde el contenido de estos

iones en el agua es muy alto, por ejemplo en China y Colombia (29,30).

3.- Definición química de compuestos N-nitroso.

Los compuestos N-nitroso se definen como el producto de la reacción catalítica a pH ácido, entre el ion nitrito y diferentes compuestos nitrogenados, que pueden ser nitrosaminas o nitrosamidas. De acuerdo con el compuesto nitrogenado que ha dado lugar a su formación, se denomina nitrosaminas a los productos de la reacción del nitrito con aminas secundarias alifáticas, aminas terciarias alifáticas y aminas terciarias heterocíclicas, derivados pirimídicos y enaminas. Las nitrosamidas son el producto de la reacción del nitrito con N-alquilureas, N-alquil carbamatos, hidroxilaminas, hidrazinas, hidrazonas y N-alquilamidas (31,32,33).

3.1.- Cinética de la formación de compuestos N-nitroso.

La cantidad de producto N-nitroso que se pueda formar a partir de sus precursores, ya sea en una reacción in vivo o in vitro, dependerá de la constante de la reacción, así como de su origen. La reacción de nitrosación ocurre en varios pasos, en primer lugar el nitrito de sodio es convertido en ácido nitroso, el cual es convertido en alguna de las especies reactivas como anhídrido nitroso, nitrosil-tiocianato, halogenuros de nitrilo o ácido nitroso protonado (34).

El agente nitrosante puede reaccionar con aminas secundarias alifáticas o aromáticas, siendo una de las principales fuentes de formación de compuestos N-nitroso. Esta reacción puede llevarse a

cabo durante la cocción de los alimentos o en procesos de fermentación. La reacción entre el ácido nitroso y aminas secundarias, a la inversa de las aminas primarias, producen compuestos muy estables. En la mayoría de los casos, esta reacción ocurre mediante la formación de anhídrido nitroso, a partir de dos moléculas de ácido nitroso. Se ha calculado que el pH óptimo para que se lleven a cabo estas reacciones está entre 2.5 y 4. Como el pH del jugo gástrico es cercano a 3.5, pueden darse las condiciones para que las reacciones de nitrosación se efectúen in vivo (35,36).

3.2.- Formación endógena de compuestos N-nitroso.

La reacción de nitrosación de compuestos nitrogenados (aminas y amidas), puede llevarse a cabo en la cavidad del estómago del hombre y de los animales. Existen evidencias que sugieren que la reacción in vivo sigue una cinética semejante a la que se ha reportado para la reacción in vitro. Aunque debido a la dificultad de cuantificar los compuestos N-nitroso formados, y a los diferentes factores que pueden modificar su reacción in vivo, es difícil conocer su cinética con precisión. No obstante Oshima y Bartsh (37) han destacado que la formación in vivo en seres humanos de N-nitrosoprolina a partir de nitrito y prolina, sigue la cinética de las reacciones de nitrosación de aminas secundarias observadas in vitro.

También existen evidencias indirectas, de que el consumo de precursores de nitrosaminas, o de las propias nitrosaminas, constituye un factor importante en el riesgo de cáncer. Al estudiarse

comparativamente dos regiones de China que presentaban en un caso alto y en el otro bajo riesgo de cáncer de esófago para el hombre y los animales domésticos, se encontró que el contenido de nitrosaminas, especialmente en los vegetales, fué muy superior en la región de alto riesgo. Por otra parte se observó que el contenido de aminas secundarias y especialmente de nitritos en el suelo y en los granos, fue el doble de lo que se detectó en el área de bajo riesgo (38).

En otros estudios, tanto en animales como en pacientes a los que se les había practicado la vagotomía, a pesar de que resultó difícil hacer una correlación del contenido de compuestos N-nitroso, sí se pudo demostrar que era mayor la cantidad de estos compuestos cuando los valores de pH se encontraban entre 1.5 y 4 (39).

La reacción de nitrosación in vivo puede estar mediada por bacterias y macrófagos activados. Por ejemplo, existen estudios epidemiológicos, en los que se ha reportado que sujetos con infecciones urinarias tienen mayor riesgo de padecer cáncer de vejiga del tipo carcinoma de células escamosas. En estos individuos se han encontrado altas concentraciones de compuestos N-nitroso (39).

Las infecciones parasitarias también pueden incrementar de manera importante la síntesis de nitrosaminas en el hombre, tal como se encontró en sujetos Tailandeses infectados con Opisthorchis viverrini, (lombriz del hígado). Se observó que estos individuos tenían aumentada 10 veces más la síntesis de compuestos N-nitroso (39).

Todos estos resultados, conjuntamente con el conocimiento de la producción de tumores por compuestos N-nitroso en más de 40 especies animales incluyendo primates, sugieren claramente el papel de los compuestos N-nitroso en la etiología del cáncer en el humano (39).

4.- Sustancias que inhiben la formación de compuestos N-nitroso.

Por otro lado, la formación de nitrosaminas y nitrosamidas puede ser inhibida por diferentes sustancias que se encuentran distribuídas en la naturaleza y que han sido encontradas entre los componentes de la dieta del hombre, principalmente entre las plantas. En ellas se ha encontrado que la cafeína, ácido caféico, alfa-tocoferol (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C), entre otros, pueden inhibir la formación in vitro de compuestos N-nitroso, o también la formación de tumores en animales tratados conjuntamente con nitrito de sodio y aminas, amidas o ureas (40,41,42,43).

Existen evidencias de que una dieta rica en vegetales y frutas, frecuentemente se encuentra asociada a una baja incidencia de cáncer. Así se ha demostrado que en personas que consumen frecuentemente col, brócoli, y frijoles, es menor el riesgo de contraer cáncer de colon.

5.- Ensayo de mutagenesis.

Una de las pruebas para la identificación de mutágenos más difundida es la desarrollada por el grupo del Dr. Bruce N. Ames, la cual utiliza como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes aisladas de cepas silvestres de Salmonella typhimurim.

Las bacterias mutantes (auxótrofas his-) a diferencia de las silvestres (protótrofas) requieren histidina para crecer, y la base de la prueba consiste en revertir el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de la histidina, lo que confiere a las revertantes la capacidad de desarrollarse en medios carentes del aminoácido, o con cantidades limitantes de él (44).

Uno de los aspectos interesantes de esta prueba, además de su fácil manipulación, bajo costo y rapidez en su ejecución, deriva del conocimiento de los cambios moleculares ocurridos en el operón de la histidina como consecuencia de las mutaciones originales, lo que permite averiguar, no tan solo si un agente químico es mutagénico, sino además a través de qué mecanismo induce la mutación (44).

Varias de estas cepas se originaron; en efecto a través de sustituciones de bases y otras por desfasamiento de la secuencia nucleotédica (frameshift), lo que implica que su reversión requiere del concurso de los mismos mecanismos, es decir sustitución de las bases adecuadas en el primer caso o eliminación en el segundo, para así correr la secuencia y restablecer el código genético (44).

El grupo del Dr. Ames ha incrementado además la sensibilidad del sistema mediante modificaciones genéticas adicionales a las cepas y son las siguientes:

a) Reparación deficiente del ADN. Las cepas son deficientes en el sistema de reparación por escisión como resultado de una deleción en la región *uvrB* del cromosoma, lo que permite la detección de mutaciones que normalmente son reparadas (44).

b) Alteración de la permeabilidad. Como la pared celular de *Salmonella typhimurium* no es permeable a moléculas de gran tamaño, se seleccionaron mutantes que presentan un defecto en la capa de polisacáridos que recubre su superficie, con lo que se facilita el acceso de los compuestos al interior de la célula (45).

c) Introducción de plásmidos. Con la introducción a las células de moléculas circulares de ADN con replicación autónoma, y portadoras de información que les confieren resistencia a antibióticos, se ha visto incrementada la sensibilidad de las cepas a mutágenos (46).

d) Biotransformación de agentes químicos. En los mamíferos existen sistemas enzimáticos in vivo responsables de la transformación metabólica de los compuestos que entran al organismo y que están ausentes en microorganismos. Por ello, la prueba de Ames ha sido complementada mediante la adición de homogenados de órganos de roedores o humanos que contienen las enzimas correspondientes (47).

III. Métodos.

1.1.-Reacción de nitrosación.

La reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Stich y colaboradores (48), con una leve modificación.

Se coló 0.011 g de metilurea y 0.0413 g de nitrito de sodio en un recipiente con tapón de rosca, se agregaron 6 ml de amortiguador estandar, se ajustó el pH a 3.6 para iniciar la reacción, y se incubó a temperatura ambiente (22°C por 60 minutos). Transcurrido este tiempo, se paró la reacción agregando 0.750 ml de una solución de sulfamato de amonio (0.300 g/ml.) y se incubó con agitación a 4°C por 15 minutos. figura 4.

Se tomó una pequeña muestra (0.500 ml.) y se guardó a 4°C para hacer la determinación química posteriormente. Al volumen restante se le ajustó el pH a 7.4 para la prueba de mutagénesis (Diseño experimental I) figura 4.

Para las pruebas de inhibición de la reacción de nitrosación, se agregó la vitamina C ó los extractos de frijol a la metilurea justo antes de la adición del nitrito de sodio y el amortiguador estandar (Diseño experimental II)

1.2.- Cuantificación química de la reacción de nitrosación.

La determinación química de los productos resultantes de la reacción de nitrosación de metilurea y nitrito de sodio se realizó de acuerdo a la metodología colorimétrica descrita por Whong y

colaboradores (49).

Se tomaron 0.025 ml de la muestra de la reacción de nitrosación que se guardó a 4°C, y se colocó en un tubo de ensayo, se agregó 1 ml de ácido bromhídrico al 1 % en ácido acético, se incubó a 25°C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 2 ml reactivo de Gries, se esperó 10 minutos y se leyó a 556 nm en un espectrofotómetro (figura 5).

2.-Ensayo de mutagenesis (prueba de Ames).

Las cepas de *S. typhimurium* usadas para las pruebas de mutagenicidad fueron las siguientes: TA1535 y TA100, ambas cepas poseen una mutación en el codon 96 del gen de hisG46 el cual tiene un triplete GGG que codifica para la síntesis de prolina en lugar de un triplete GAG que codifica para la síntesis de leucina como en el caso de la cepa silvestre LT2 de la cual se originaron. Estas cepas solo pueden ser revertidas por mutágenos que actúan a nivel de substitución de bases en el par G/C del codon 96 del gen hisG. Además estas cepas también poseen una deleción del gen rfa que las hace más sensibles al paso de los compuestos de gran tamaño por carecer de una lipoproteína de la pared celular. Otra característica de estas cepas es una deleción en el gen uvrB involucrado en el sistema de reparación por escisión la cual se introdujo para mejorar la eficiencia del sistema en la detección de compuestos capaces de dañar al ADN, ya que el sistema de reparación por escisión podrá en gran parte eliminar el daño inducido por esos compuestos (44,45).

La cepa TA100 fué obtenida al introducir el plásmido pKm101 en

la cepa 1535, el cual contiene los genes umuB y umuC que promueven el mecanismo de reparación propenso a error y esto la hace más sensible (46).

2.1.- Obtención y mantenimiento de las cepas de prueba.

Se recomienda obtener las cepas bacterianas directamente del Dr. Ames: Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California, 94720, BC43, U.S.A.

Las bacterias obtenidas por conducto del Dr. Ames vienen en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa, dentro de bolsitas de plástico con agar blando para evitar su desecación. Los discos se colocaron con pinzas estériles en 5 ml de caldo nutritivo y se incubaron toda la noche (aproximadamente 16 hrs.) a 37°C con agitación. Los cultivos así obtenidos se sometieron a las pruebas para verificar la presencia de los marcadores genéticos, así como la frecuencia de reversión espontánea, y se determinó la sensibilidad a mutágenos conocidos. Se prepararon además los cultivos permanentes colocando 0.8 ml de la suspensión bacteriana (incubada 16 hrs) más 0.09 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y se congelaron rápidamente sobre hielo seco para mantenerlos a -80°C (50).

Para evitar congelar y descongelar constantemente los cultivos permanentes se prepararon cajas de petri de reserva con cultivos que se guardaron a 4°C por 1 o 2 meses. Se tomó con un aplicador de madera estéril una muestra del cultivo permanente y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo, posteriormente se incubó con agitación por 16 hrs a 37°C, y se comprobaron nuevamente los marcadores

genéticos, reversión espontánea y sensibilidad a mutágenos (50).

Los cultivos para las pruebas de mutagénesis se obtuvieron tomando con una asa estéril una colonia de bacterias de las cajas de reserva, se sembraron en 5 ml de caldo nutritivo, y se incubaron a 37°C por 16 hrs, con agitación (50).

Para obtener nuevos cultivos de reserva en cajas petri, se recomienda tomar de los cultivos permanentes que se encuentran a -80°C y no de las cajas de reserva que se van a desechar ya que pueden haber perdido los marcadores genéticos. Si algunas de las cepas de prueba pierde parcial o totalmente sus marcadores es recomendable obtenerla nuevamente por conducto del Dr Ames (50).

2.2.- Métodos para verificar la presencia de marcadores genéticos y determinar la frecuencia de reversión espontánea.

a) Requerimiento de histidina. Se sembró por medio de estrías el cultivo de 16 horas sobre cajas conteniendo medio mínimo de Vogel-Bonner. Se hizo lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina. Solamente hubo crecimiento en las cajas complementadas con histidina-biotina (fig.1).

b) Sensibilidad al cristal violeta. Para verificar el marcador "rfa" (modificación de la pared celular), se determinó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Para ello se hizo una estría aplicando una solución de cristal violeta (1 mg/ml) sobre medio mínimo con exceso de histidina, de manera que dividiera en dos la caja petri y se dejó secar. Posteriormente se colocó una estría del

cultivo de bacterias perpendicular a la de cristal violeta, y se incubó de 12 a 24 horas a 37°C. Una zona de inhibición de crecimiento se observó en el cruce de las dos estrías, esto indicó la presencia de la mutación (fig.2,3).

c) Presencia del plásmido. La presencia del plásmido se verificó comprobando la resistencia de las cepas a la ampicilina.

Para ello se hizo una estría aplicando una solución de ampicilina (0.1 ml de una solución de 8 mg/ml en hidróxido de sodio 0.02 N) sobre medio mínimo con exceso de histidina, de manera que divida en dos las caja y se dejó secar. Posteriormente se colocó una estría del cultivo perpendicular a la de ampicilina, y se incubó de 12 a 24 horas a 37°C. Las cepas que contenían el plásmido no mostraron inhibición del crecimiento en el cruce de las dos estrías (fig. 2 y 3).

d) Frecuencia de reversión espontánea. Se colocó 0.1 ml del cultivo en un tubo que contenía 2 ml de agar de superficie a 45°C, se homogenizó perfectamente, se vació en una cajas que contenía medio mínimo de Vogel-Bonner, se distribuyó perfectamente, y se incubó a 37°C por 48 horas. Posteriormente se contó el número de colonias revertantes por caja (fig.2 y 3) (50).

2.3.-Prueba de mutagenicidad de la reacción de nitrosación

La mutagenicidad de los productos de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio, se realizó de acuerdo al método descrito por Ames con una modificación de Stich y Rosin (48).

Se centrifugaron 3 ml de un cultivo de 16 hrs de Salmonella typhimurium (cepa TA1535 ó TA100), por 10 minutos a 3000 rpm. Se resuspendió el botón en 3 ml de la reacción de nitrosación y se incubó la suspensión a 37°C con agitación por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 3000 rpm por 10 minutos, se resuspendió perfectamente el botón en un amortiguador de fosfatos salino pH 7.4 (PBS) y se centrifugo nuevamente en las mismas condiciones. Se obtuvo el botón y se resuspendió en PBS al volumen original (3ml), posteriormente se tomaron 100 ul de la suspensión bacteriana (para la prueba de mutagénesis), y se colocó en un tubo que contenía agar de superficie, se agitó perfectamente y se sembró en una placa de medio mínimo, se dejó gelificar y se incubó a 37°C por 48 hr. Se Contó el número colonias revertantes por caja (ver figura 6 y 7).

2.4.-Prueba de sobrevida.

Por otro lado se tomaron 100 ul de la misma suspensión bacteriana y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS hasta 1×10^6 . Se tomaron 100 ul de las últimas dos diluciones (1×10^5 y 1×10^6) y se colocaron en tubos que contenían medio completo de superficie, se agitaron perfectamente y se sembraron en cajas con medio completo. Posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C y se contó el número de colonias sobrevivientes por caja (fig.7).

3.-Obtención de los extractos de frijol (Phaseolus vulgaris) var. flor de Mayo.

Los extractos de frijol fueron proporcionados por la Dra. Elvira González del Departamento de Posgrado e Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Queretaro. Se obtuvieron de la testa cáscara de frijol variedad flor de mayo porque se encontró que contenía una gran cantidad de polifenoles, los cuales se han descrito como antimutagénicos y anticarcinogénicos de una gran variedad de químicos que incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos, aflatoxina B y N-metil-N-nitrosoguanidina (51).

Una vez que se adquirió el frijol se limpió cada uno de ellos con una gasa para eliminar sustancias extrañas que se pudiera quitar de esta forma. El descascarillado se realizó en forma manual auxiliándose de una navaja o bisturí, procurando sólo desprender la cascarilla. Posteriormente se realizó la molienda la cual consistió en reducir el tamaño de la cascarilla hasta obtener un polvo más o menos fino, con la ayuda de un mortero.

Para la extracción se usaron tres solventes: metanol 100% , metanol-agua al 50% y agua al 100% (fig 8).

3.1.- Rotoevaporación.

Se utilizó esta estrategia para llevar a sequedad los extractos: metanólico y metanol-agua, eliminando de esta manera los solventes sin que se dañaran dichos extractos, utilizando temperaturas inferiores a los 50°C.

3.2.- Liofilización.

Para esta acción se requirió que los extractos se encontraran disueltos en agua desionizada estéril para poder ser congelados a -50°C antes de liofilizarlos. El extracto acuoso fue el único que se liofilizo directamente después de la extracción, sin pasar por ningún otro proceso.

Los extractos para las pruebas de antimutagénesis se disolvieron en DMSO.

La prueba de Ames (pruebas de mutagénesis) se realizaron por triplicado y los valores que se observan en los resultados son los promedios de estos, con sus respectivas desviaciones estandar.

IV.-Resultados y discusión

La reacción de nitrosación se realizó siguiendo la metodología descrita por Stich y colaboradores (49). Se utilizó la misma concentración de metilurea (MU) a 25 mM y nitrito de sodio (N.S) a 100 mM, así como el pH del amortiguador estandar (3.6), el tiempo de incubación (30 minutos) y la temperatura ambiente (22°C), condiciones en las que los autores mencionados obtuvieron una respuesta para la nitrosación.

Los primeros experimentos se realizaron para confirmar que se produjera la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio bajo estas condiciones experimentales. Sin embargo, no se detectó ninguna respuesta positiva medida por los siguientes parámetros: cuantificación por colorimetría de la formación de N-nitrosometilurea y mutagenicidad mediante la prueba de Ames (datos no mostrados).

La concentración de N-nitrosometilurea (N-NMU) formada se evaluó de acuerdo a una curva patrón de N-NMU pura.

Debido a que en los primeros experimentos no se obtuvo una respuesta positiva, se planteó el realizar varias cinéticas de la reacción de nitrosación, variando el tiempo de incubación (5,10,20,30,40,50 y 60 minutos), así como el pH del amortiguador estandar utilizado (4.0,3.6,3.4 y 1.2).

Los resultados se pueden observar en la tabla 1 , gráfica 1 (tendencia de los resultados), donde claramente se ve que la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio está directamente relacionada con el tiempo de incubación, ya que

conforme transcurre el tiempo hay un incremento en la concentración de N-NMU formada, observándose una buena correlación para cada cinética de nitrosación. Los valores obtenidos fueron los siguientes: para la cinética a pH 4, el valor de $R=0.986$, para la cinética a pH 3.6 el valor de $R=0.938$, para la cinética a pH de 3.4 el valor de $R=0.888$ y por último para la cinética a pH 1.2 el valor de $R=0.833$.

En cuanto al pH de la reacción también se observa que hay un incremento de N-NMU conforme baja el pH de la reacción, es decir cuando es más ácido, dando como resultado que a un pH de 1.2 se obtenga la mayor concentración, en contraste con un pH de 4.0 donde se forman concentraciones menores de N-NMU, como se puede observar en la grafica 1. De acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas de nitrosación se escogieron las condiciones óptimas para que se llevara a cabo dicha reacción. El pH del amortiguador estandar seleccionado fue de 3.6, ya que entre este pH y el de 3.4 se encontró que la reacción de nitrosación no era excesivamente rápida, observándose una correlación de $R=0.9388$. Teniendo en cuenta estos resultados, no se varió el pH con respecto a la metodología original, ya que se obtiene una buena formación de N-NMU así como también una buena correlación de esta cinética. Por otra parte, este pH es cercano al del jugo gástrico, siendo estas las condiciones en que se lleva a cabo la reacción de nitrosación in vivo.

La única variación que se le hizo a la metodología original, fue el tiempo de incubación, el cual quedó en 60 minutos, tomando en cuenta los resultados obtenidos de las cinéticas de nitrosación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para que se llevara a cabo la reacción de nitrosación, el siguiente paso fue probar la mutagenicidad del compuesto obtenido (N-NMU) como resultado de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio en el sistema de Ames. Se utilizaron dos cepas de Salmonella typhimurium TA1535 y TA100, y los resultados se muestran en la tabla 2 y gráfica 2. En ellas se observa claramente la respuesta mutagénica de la reacción de nitrosación (RN) en ambas cepas. El criterio utilizado para decidir su mutagenicidad fué el de que se incrementara al doble o más la reversión espontánea de las cepas correspondientes.

Para la cepa TA1535 el número de colonias revertantes espontáneas (RE) por caja en promedio fue de 20 y con la reacción de nitrosación (RN) fue de 1161 colonias revertantes por caja, incrementándose 58 veces más la reversión espontánea de dicha cepa.

Esto indica que el producto de la reacción de nitrosación realmente es mutágeno, ya que existe una marcada diferencia entre los grupos tratados (reacción de nitrosación) y los grupos testigo (reversión espontánea). En el caso de la cepa TA100 el número de revertantes espontáneas fue de 151 y con la reacción de nitrosación fue de 1310 colonias revertantes por caja en promedio, incrementándose 8 veces más la reversión espontánea, lo cual indica que también es mutagénica para esta cepa.

Para ambas cepas el producto resultante de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio fue altamente mutagénico, pero la cepa TA1535 fue más sensible para detectar dicho compuesto en comparación con la cepa TA100, por lo cual se

decidió trabajar los siguientes experimentos unicamente con la cepa TA1535.

En el mismo experimento se probó la mutagenicidad de los reactantes por separado, en las mismas condiciones experimentales, la metilurea (25 mM) y el nitrito de sodio (100 mM) en las concentraciones utilizadas para la reacción de nitrosación, en ambas cepas (TA1535 y TA100), los resultados se pueden observar en la tabla 2. y gráfica 3.

La metilurea (MU) no causó ningún efecto mutagénico en la cepa TA1535 ni en la cepa TA100, ya que los valores obtenidos del número de colonias revertantes por caja se encuentran en el rango de la reversión espontánea de cada cepa. En el caso del nitrito de sodio (NS) ocurre lo mismo, ya que el número de colonias revertantes son similares a la reversión espontánea de cada cepa, esto indica que los reactantes por separado no causan ningún efecto mutagénico, pero al ponerse juntos a reaccionar en condiciones ácidas se forma un compuesto altamente mutagénico.

Posteriormente se realizaron 5 experimentos en las mismas condiciones ya establecidas, para saber si la mutagenicidad de la reacción estaba directamente relacionada a la concentración del producto formado (N-NMU). Esto lo podemos observar en la tabla 3 y gráfica 4. En todos los experimentos se realizó la cuantificación de N-NMU por colorimetría así como la evaluación de mutagenicidad. Los resultados obtenidos indicaron que la mutagenicidad esta directamente relacionada a la concentración del producto formado (N-NMU), ya que en cada uno de los experimentos se produjo diferente concentración de N-NMU. El rango de concentración se

encuentra entre 497.8 ug/ml como mínima, con un número de 1225 revertantes/caja y 590.1 ug/ml como máxima, con un número de 1912 revertantes/caja, indicando esto una relación directa entre concentración de N-NMU formada y mutagenicidad de la misma.

Con estos resultados, queda demostrado que la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio si se está llevando a cabo, ya que se encontraron las condiciones óptimas para dicha reacción, y se obtuvo una respuesta positiva con los parámetros utilizados.

El siguiente paso fue determinar si la reacción de nitrosación podrá ser inhibida por la vitamina C para lo cual se realizó una curva concentración-respuesta de inhibición, en donde se probaron las siguientes concentraciones de vitamina C: 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml, 7.5 mg/ml y 10.0 mg/ml de reacción. Se realizaron las determinaciones químicas y la mutagenicidad de la reacción de nitrosación a la cual se le agregó la vitamina C. Los resultados se pueden observar en la tablas 4 y gráfica 5 en donde se midió la concentración de N-NMU formada mediante colorimetría. En ellas podemos ver una disminución concentración respuesta de la vitamina C sobre la reacción de nitrosación, con una correlación de $R = -0.952$. Para corroborar esto se realizaron las pruebas de mutagénesis, para lo cual se probaron las mismas concentraciones de vitamina C con la reacción de nitrosación. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 5 y gráfica 6. De igual manera se observa una disminución en el número de revertantes/caja conforme se aumenta la concentración de vitamina C. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente formula (52).

$$\text{PORCIENTO DE INHIBICION} = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{A} - \text{C}} \times 100$$

A= No. de colonias revertantes inducidas por el control positivo (Reacción de Nitrosación).

B= No. colonias revertantes inducidas por el control positivo + vitamina C.

C= No. de colonias revertantes inducidas con el control negativo (vitamina C sin reacción de nitrosación).

El porcentaje de inhibición para cada concentración se presenta en la tabla 5, en donde éste incrementa conforme aumenta la concentración de vitamina C, obteniéndose hasta un 59% de inhibición a la máxima concentración evaluada (10 mg/ml), lo cual indica un claro efecto concentración-respuesta.

Por otro lado, en este mismo experimento se midió la toxicidad para determinar si efectivamente el decremento observado se debía a la inhibición y no a la muerte de las bacterias por toxicidad de la vitamina C. Los resultados también se muestran en la tabla 5 y gráfica 6. En donde puede observarse que el número de bacterias sobrevivientes disminuye conforme se aumenta la concentración de vitamina C pero este decremento no es importante, bajando de un

100% a un 87.12% en la máxima concentración probada, por lo que hay un 12.8% de toxicidad, lo cual es un valor muy pequeño, siendo aún menor la toxicidad para las otras concentraciones evaluadas (5.6 % y 7.3 %). Los resultados anteriores indican que la disminución en el número de revertantes se debe a que hay una verdadera inhibición de la reacción de nitrosación por la vitamina C y no a la toxicidad de la misma. Por lo anteriormente expuesto se puede plantear que la vitamina C inhibe la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio y por consiguiente la formación de N-NMU altamente mutagénica.

Estos resultados concuerdan con estudios realizados con anterioridad en los cuales se encontró que la vitamina C inhibe ó bloquea la formación in vitro de compuestos N-nitroso altamente mutagénicos y carcinogénicos, debido a que el ácido ascórbico (vitamina C) reacciona con el nitrito de sodio mediante una reacción de óxido-reducción formándose monóxido de nitrógeno y ácido dehidro-ascórbico, ocurriendo esta reacción especialmente a un pH menor de 5.0. La reacción entre el ácido ascórbico y el nitrito de sodio se lleva a cabo mediante un ataque electrofílico del agente nitrosante y el agente reductor, la afinidad del agente nitrosante es mucho mayor sobre dicho agente reductor que sobre el compuesto aminado como se ha demostrado en reacciones in vitro (53, 54).

También se ha reportado que el ácido ascórbico bloquea la mutagenicidad de N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina y otros compuestos N-nitroso antes de su formación (51). Por otro lado se ha demostrado que no solo bloquea la reacción de nitrosación in

vitro, sino que al administrarse a animales tratados con nitrito de sodio y compuestos aminados como la aminopirina, dimitilamina, metilurea y prolina, se inhiben tanto las mutaciones detectables en bacterias por el ensayo vía el hospedero, así como la frecuencia de tumores inducidos por la nitrosación endógena de compuestos aminados (55, 56, 57, 40).

En recientes estudios in vivo en roedores y humanos utilizando la metodología descrita por Ohshima y Bartsch (58), donde se mide la formación de N-nitrosoprolina en orina, a partir la administración de nitrito de sodio y prolina ha confirmado la suposición de numerosos estudios in vitro que la vitamina C claramente inhibe la formación endógena de compuestos N-nitroso (59,60).

La potente actividad de la vitamina C para eliminar el nitrito de sodio puede ser un importante componente en el decremento de la incidencia de cáncer gástrico en muchos lugares del mundo (61, 62, 59).

En el presente trabajo se utilizó la vitamina C precisamente por sus características para reaccionar con el nitrito de sodio y por consiguiente la inhibición de la formación de N-NMU, ya que era importante que el modelo de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio in vitro contará con un control de inhición, debido a que el modelo se utilizaria en la identificación y selección de compuestos de origen natural presentes en los vegetales comunes de la dieta mexicana que inhiban la reacción de nitrosación.

Por otro lado con esta metodología se probaron 3 extractos obtenidos de testa de frijol Phaseolus vulgaris variedad flor de mayo, para evaluar su efecto sobre la reacción de nitrosación, ya

que se encontró que contenían polifenoles (resultados no mostrados), los cuales se han reportado como antimutagénicos para una gran variedad de compuestos químicos (51). Los extractos estudiados fueron los siguientes: Extracto metanólico (ME), extracto metanol-agua (ME-AG) y extracto acuoso (ACU). El esquema de obtención de los extractos se muestra en la figura 8.

Los controles que se utilizaron en este experimento fueron los siguientes: reversión espontánea de la cepa TA1535 (RE), metilurea (MU), Nitrito de sodio (N.S) y reacción de nitrosación (RN).

Los resultados obtenidos los podemos observar en la tabla 6 y gráfica 7, en donde podemos observar una vez más, que los reactantes por si solos no dan ningún efecto mutagénico, pero cuando se ponen a reaccionar juntos en condiciones ácidas dan un efecto altamente mutagénico, obteniéndose un número de revertantes de 1912 por caja. A estos mismos tratamientos se les realizó la prueba de toxicidad, de acuerdo al número de colonias sobrevivientes por caja, los resultados los podemos observar en la tabla 7 y en la gráfica 8. La MU es tóxica en un 37.5 %, el nitrito de sodio es tóxico en un 43.75 % y la reacción de nitrosación en un 75 % para la cepa TA1535 de S. typhimurium. A pesar que la reacción de nitrosación es muy tóxica, se obtuvo una mutagenicidad muy alta, indicando esto que las pocas bacterias que no se mueren, en su mayoría son mutadas. Esto nos habla de la potencia mutagénica del producto resultante de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio.

Los resultados del efecto de los extractos de frijol sobre la reacción de nitrosación se muestran en la tabla 8 y gráfica 9. Y la

toxicidad de los mismos en la tabla 9 y gráfica 10. Los extractos se probaron en dos concentraciones 1 mg/ml y 2 mg/ml de reacción.

El extracto metanólico (ME) a 1 mg/ml mostró una disminución en el número de colonias revertantes por caja con respecto a la reacción de nitrosación (control positivo), obteniendo una inhibición del 31.5%, pero presentó una toxicidad del 33.4%, lo cual sugiere que este decremento en la mutagenicidad es debido a su toxicidad y no a una verdadera inhibición. En el caso de de la concentración de 2 mg/ml si se obtuvo una inhibición real de la mutagenicidad, la cual fue del 38.9 %, sin haberse observado toxicidad. Lo anterior indica que la inhibición observada realmente se debió al extracto de la planta.

En el caso del extracto metanol-agua (ME-AG) a 1 mg/ml, se obtuvo una inhibición del 20.6 %, con una toxicidad del 50 %. Lo anterior indica que esta reducción en el número de revertantes por caja es debido a la toxicidad del extracto. Para 2 mg/ml se obtuvo una inhibición del 33.95 con una toxicidad del 16.7 %. En realidad se obtiene una inhibición del 17.2 % al restarse la toxicidad del extracto.

Para el extracto acuoso (ACU) a 1 mg/ml se obtuvo una inhibición del 51.3%, con una toxicidad del 75 %, esto indica que la reducción del número de colonias revertantes por caja es debido a la toxicidad del extracto. Para 2 mg/ml se obtuvo un 65.5 % de inhibición con una toxicidad del 58.4 pero realmente se tendría' una inhibición del 7.1 % al restarse la toxicidad del extracto.

Los resultados obtenidos sugieren que aunque los tres extractos inhiben la reacción de nitrosación, el más efectivo fue el extracto

metanólico a una concentración de 2 gm/ml, ya que se observó una inhibición de casi el 40.0 %. Y el más tóxico fue el extracto acuoso, pero a pesar de esto la inhibición de mutagenicidad que se obtuvo para los tres extractos fue a los 2 mg/ml con una toxicidad menor que a 1 mg/ml.

Estos resultados no son concluyentes ya que es necesario realizar curvas de concentración-respuesta para cada extracto y corroborar la toxicidad de los mismos.

Con todos los resultados obtenidos se puede plantear que la metodología quedó establecida para ser usada en la búsqueda e identificación de compuestos de origen natural presentes en los vegetales comunes de la dieta mexicana que inhiban la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio y por consiguiente la formación de compuestos N-nitroso potencialmente carcinogénicos.

Con este modelo se pretende como ya se menciono anteriormente buscar compuestos que inhiban la reacción de nitrosación in vitro como primer paso y los que resulten positivos en este sistema, serán candidatos para ser probados en modelos in vivo y de esta manera contar con una alternativa para moderar el riesgo de exposición a compuestos N-nitroso.

CONCLUSIONES.

1) La reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio se ve favorecida a pH ácidos, así como por el tiempo de incubación.

2) El producto resultante de la reacción de metilurea y nitrito de sodio fue altamente mutagénico en las cepas TA1535 y TA100 de Salmonella typhimurium, resultando la cepa TA1535 más sensible para detectar compuestos N-nitroso como la N-NMU, aumentando la reversión espontánea de esta cepa hasta 58 veces.

3) Los reactantes (metilurea y nitrito de sodio) por separado no dieron ningún efecto mutagénico, pero cuando se incubaron para reaccionar en condiciones de pH ácido formaron un compuesto mutagénico muy potente (N-NMU).

4) La mutagenicidad de N-NMU esta directamente relacionada a la concentración de la misma.

5) El producto de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio fue muy tóxica (75%) para la cepa de S. typhimurium TA 1535, pero a pesar de esto la mutagenicidad observada es alta.

6) La vitamina C inhibe la reacción de nitrosación, produciendo un efecto concentración-respuesta, en los parámetros que se midieron, como cuantificación química del producto y mutagenicidad.

7) En las dosis utilizadas la vitamina C fué poco tóxica (12%) para la cepa TA 1535

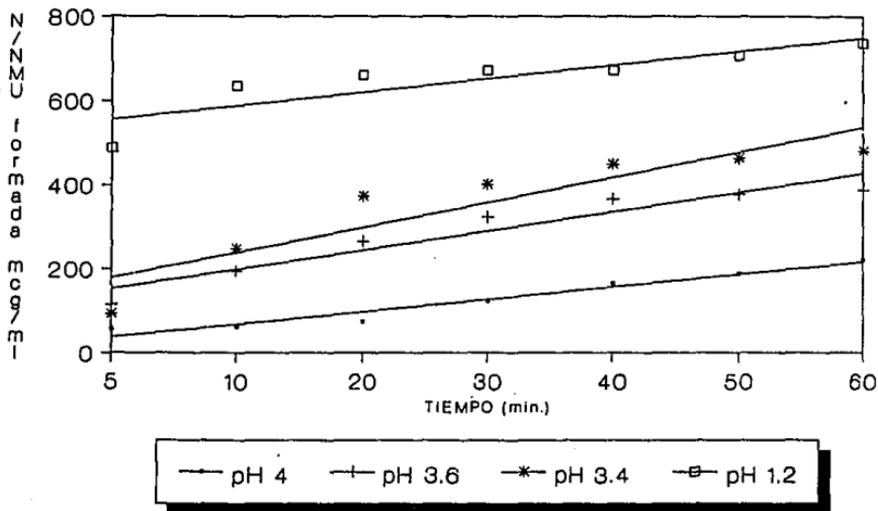
8) Los extractos de la testa de frijol flor de Mayo fueron poco efectivos para inhibir la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio, ya que mostraron porcentajes de inhibición bajos.

9) El extracto metanólico a una concentración de 2 mg/ml mostró un ainhibición del 38.9 %, siendo el más efectivo para inhibir la reacción de nitrosación. En el caso del extracto metanol-agua solamente a la concentración de 2mg/ml mostró una inhibición del 17.2 % y por último el extracto acuoso el cual fue el más tóxico mostro una inhibición del 7.1 % para la concentración de 2 mg/ml.

10) Con todos los resultados obtenidos se puede plantear que la metodología quedó establecida para ser usada en la búsqueda e identificación de compustos de origen natural, presentes en los vegetales comunes de la dieta mexicana que inhiban la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio y por consiguiente la formación de compuestos N-nitrosos potencialmente carcinogénicos.

Tabla.1. Cinética de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio variando pH y tiempo de incubación (cuantificación química de N-NMU formada mcg/ml)

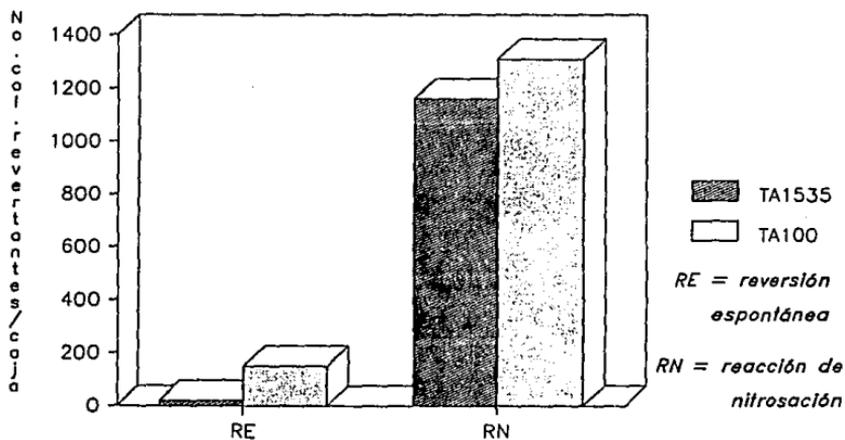
Tiempo de incubación (min)	pH. amortiguador estandar			
	4.0	3.6	3.4	1.2
5	57.312	114.94	92.67	487.94
10	62.22	195.40	247.8	635.34
20	73.68	265.81	373.5	660.75
30	122.81	323.28	400.8	670.92
40	163.75	366.39	449.01	670.92
50	188.31	377.16	463.37	706.50
60	221.06	387.94	481.33	736.99



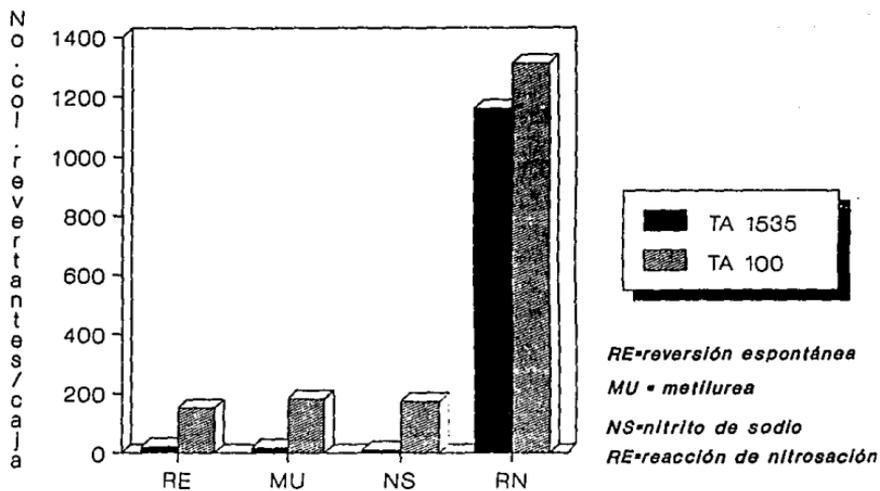
Gráfica 1. Cinética de la reacción de nitrosación (cuantificación química)

Tabla 2. Mutagenicidad de la reacción de nitrosación

Tratamiento	Promedios.No.colonias revertantes/caja <i>S.typhimurium</i>	
	cepa TA1636	cepa TA100
Reversión espontánea	20 \pm 2.08	151 \pm 23.1
Metilurea (25 mM)	17 \pm 3.05	181 \pm 19.2
Nitrito de sodio (100 mM)	10 \pm 0.70	172 \pm 10.1
Reacción de nitrosación	1161 \pm 72.5	1310 \pm 83.1



Grafica 2. Mutagenicidad de la reacción de nitrosación sobre S. typhimurium cepa TA1535 y cepa TA100



Grafica 3. Mutagenicidad de la reacción de nitrosación con respecto a los controles experimentales

Tabla 3. Cuantificación química y mutagenicidad de la reacción de nitrosación sobre S. typhimurium cepa TA1535

Experimento	Cuantificación química de N-NMU mcg/ml	Mutagenicidad Promedios No.col.revertantes/caja
I	497.8	1225 \pm 43.9
II	509.3	1256 \pm 332
III	547.6	1500 \pm 74.2
IV	555.3	1810 \pm 63.0
V	590.1	1912 \pm 30.6

GRAFICA No. 4

Mutagenicidad y cuantificación química de la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio

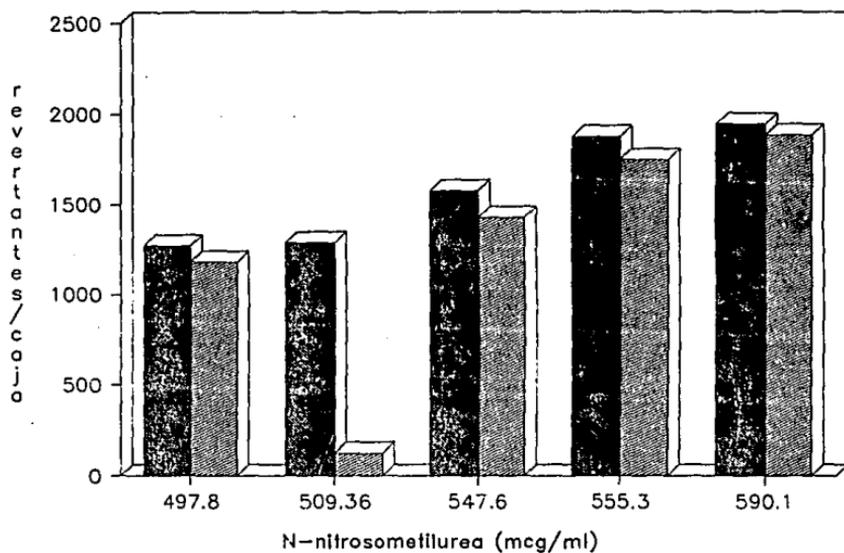
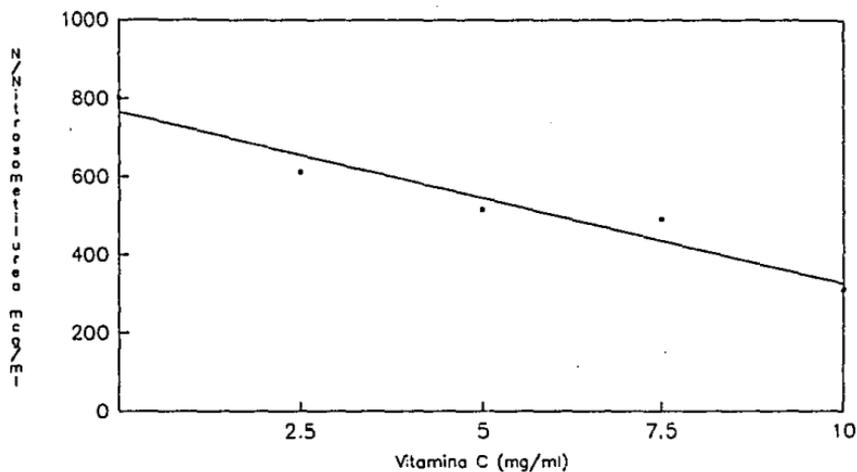


Tabla 4. Efecto inhibitorio de vitamina C sobre la reacción de nitrosación (cuantificación química de N-NMU formada)

Tratamiento <i>Vitamina C</i>	Cuantificación N-NMU mcg/ml	% de inhibición de la formación de N-NMU.
<i>Reacción de nitrosación (RN)</i>	800	0
<i>RN + vit C 2.5 mg/ml</i>	611	23.7
<i>RN + vit C 5 mg/ml</i>	515.4	35.6
<i>RN + vit. C 7.5 mg/ml</i>	491.2	38.6
<i>RN + vit. C 10 mg/ml</i>	310.9	61.2

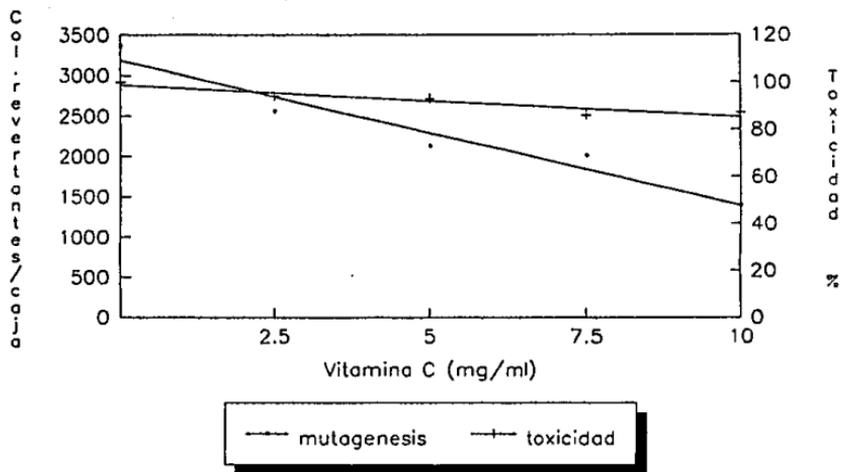


Gráfica 5. Efecto inhibitorio de vitamina C sobre la reacción de nitrosación (cuantificación química)

Tabla 5. Efecto inhibitorio de vitamina C sobre la reacción de nitrosación (mutagénesis, inhibición y toxicidad)

<i>Tratamiento Vitamina C</i>	<i>Mutagénesis Promedios No.Col.Rever/caja</i>	<i>Inhibición %</i>	<i>Toxicidad %</i>
<i>Reacción de Nitrosación(RN)</i>	3362	0	0
<i>RN + Vitam C 2.5 mg/ml</i>	2556	23.9	5.6
<i>RN + Vitam C 5 mg/ml</i>	2125	36.8	7.3
<i>RN + Vitam C 7.5 mg/ml</i>	2007	40.3	14.2
<i>RN + Vitam C 10 mg/ml</i>	1390	58.7	12.8

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la fórmula descrita en resultados y discusión

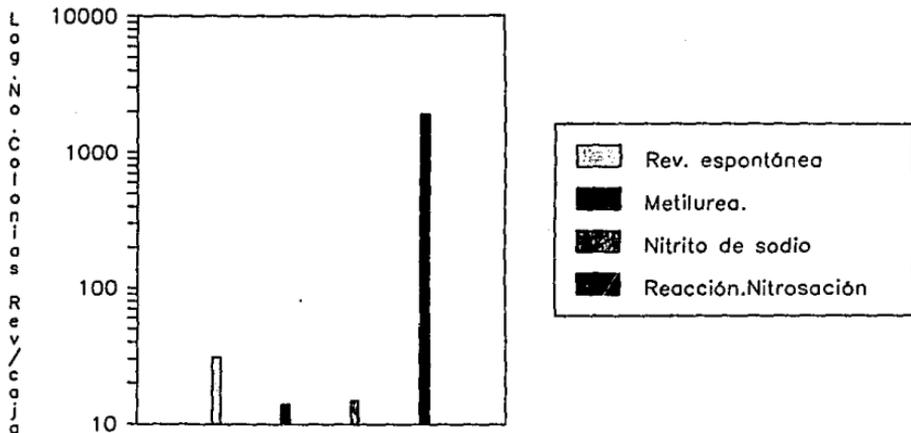


Gráfica 6. Efecto inhibitorio de Vitamina C sobre la reacción de nitrosación.

Tabla 6. Efecto mutagénico de la reacción de nitrosación sobre *S. typhimurium* (cepa TA1535)

Tratamiento	<i>Mutagenicidad</i> promedios.No.Col.revertantes/caja		
Reversion Espontanea	31	+ -	2.08
N-metilurea (25 mM)	14	+ -	3.7
Nitrito de Sodio (100mM)	15	+ -	2.6
Reaccion de Nitrosación	1912	+ -	30.6

Controles correspondientes al experimento de los extractos de frijol



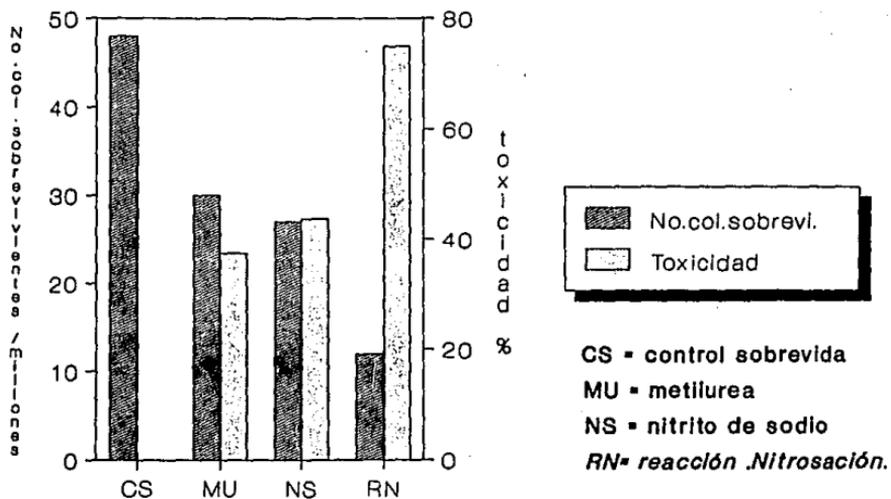
Tratamientos

Gráfica 7. Efecto mutagénico de la reacción de nitrosación (controles correspondientes a los experimentos de extractos de frijol)

Tabla 7. Toxicidad de la reacción de nitrosación sobre *S. typhimurium* (cepa TA1535)

Tratamiento	Promedios. No.Colonias sobrevivientes/caja	Toxicidad %
control Sobrevida	$480 \times 10^5 \pm 5.1$	0
N-metilurea (25 mM)	$300 \times 10^5 \pm 4.3$	37.5
Nitrito de Sodio(100mM)	$270 \times 10^5 \pm 6$	43.75
Reaccion Nitrosacion	$120 \times 10^5 \pm 1.7$	75.0

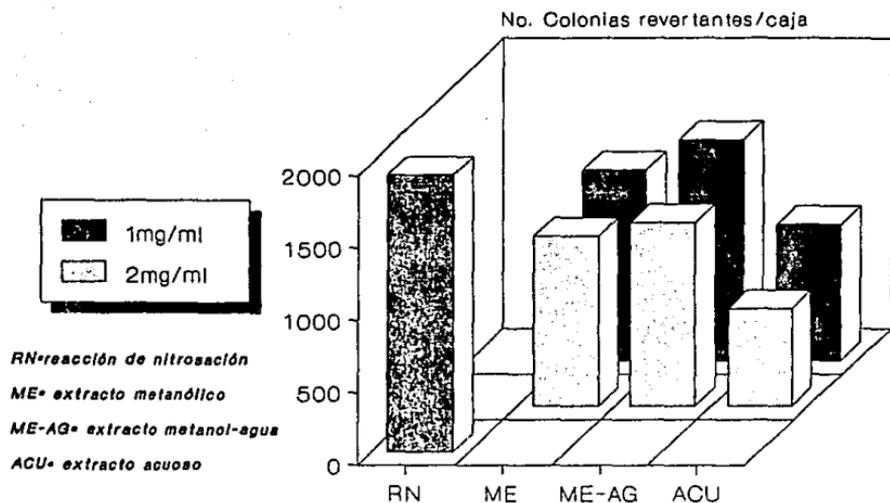
Controles correspondientes a los experimentos de extractos de frijol



Gráfica 8. Toxicidad de la reacción de nitrosación (controles correspondientes a los experimentos de los extractos de frijol)

Tabla 8. Efecto de extractos de frijol sobre la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio (*S. typhimurium* cepa 1535)

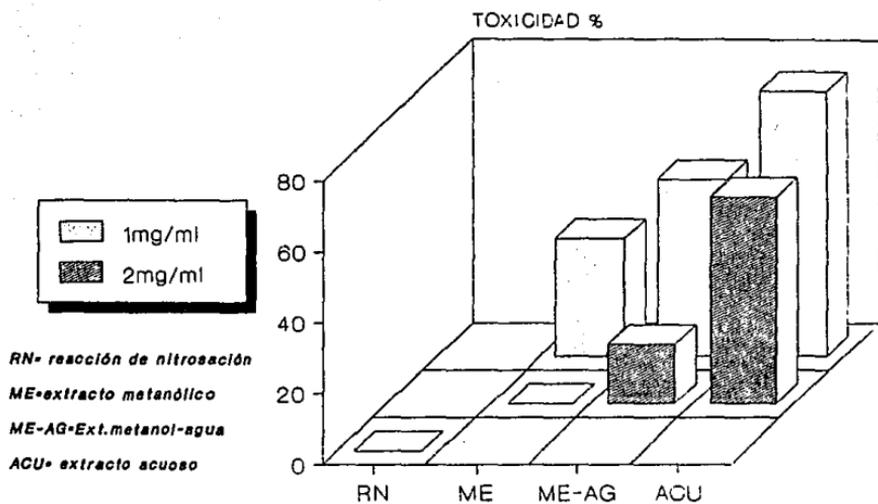
Tratamiento	Concent. mg/ml	<i>Mutagénesis</i> promedio del número de <i>Colonias revertantes/caja</i>		
Reacción de Nitrosación		1912	+ -	30.6
R.N.+Ext.METoH	1 mg/ml	1316	+ -	39
	2 mg/ml	1176	+ -	25
R.N.+Ext.MET-AGUA	1 mg/ml	1522	+ -	143.5
	2 mg/ml	1270	+ -	44
R.N.+EXT.ACUIOSO	1 mg/ml	942	+ -	49.6
	2 mg/ml	674	+ -	64.3



Gráfica 9. Efecto de extractos de frijol sobre la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio

Tabla 9. Efecto de extractos de frijol sobre la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio (toxicidad)

Tratamiento	Concent. mg/ml	Promedios del No.de Col.sobrevivientes/caja	Toxicidad %
Reacción de Nitrosación		120×10^5 \pm 1.7	0
R.N.+Ext.METOH	1	80×10^5 \pm 3.2	33.4
	2	120×10^5 \pm 3	0
R.N.+Ext.MET-AGUA	1	60×10^5 \pm 1.1	50
	2	100×10^5 \pm 3	16.7
R.N.+Ext.ACUOSO	1	30×10^5 \pm 2.5	75
	2	50×10^5 \pm 2.3	58.4



Gráfica 10. Efecto de extractos de frijol sobre la reacción de nitrosación de metilurea con nitrito de sodio (toxicidad)

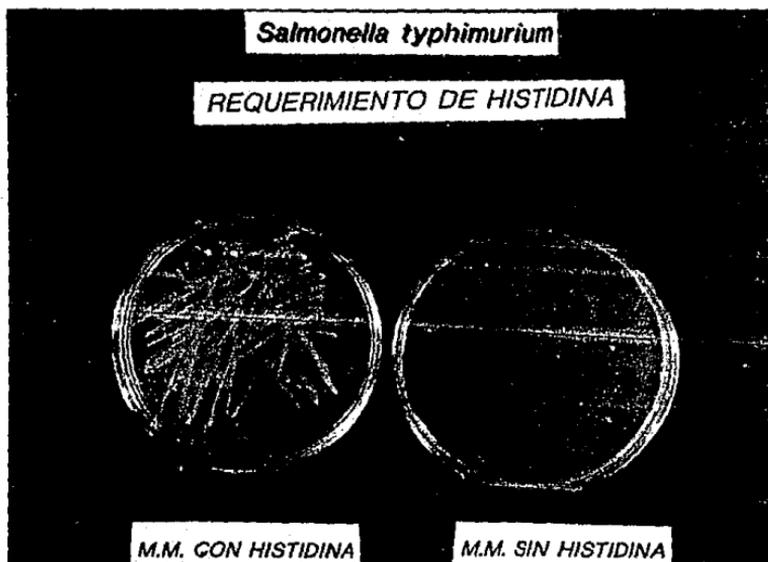


FIGURA 1. Salmonella typhimurium REQUIERE HISTIDINA PARA CRECER.

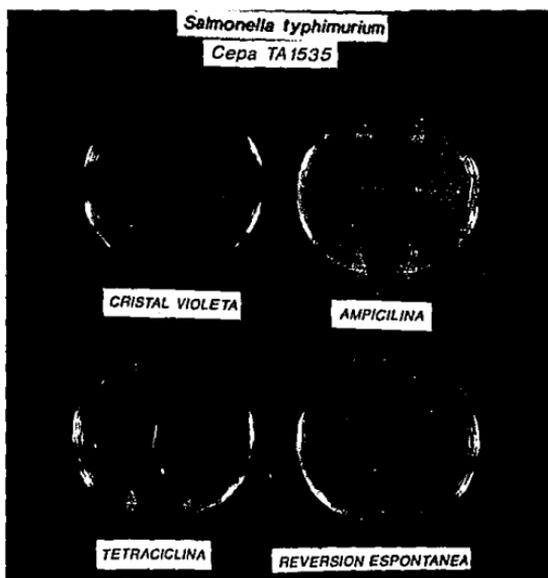


FIGURA 2. MARCADORES GENICOS DE S. typhimurium
CEPA TA1535.

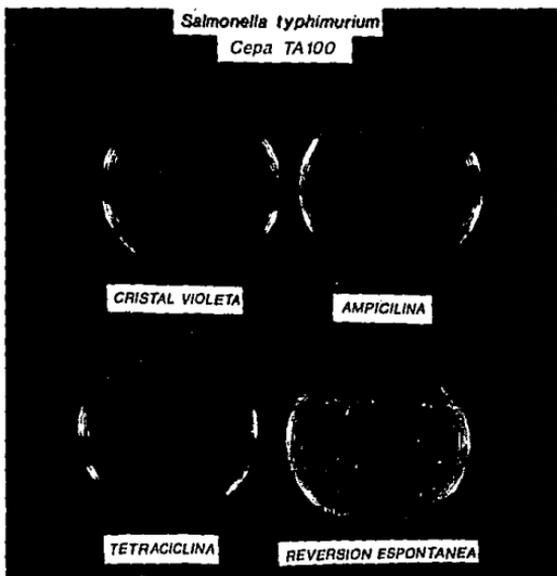


FIGURA 3. MARCADORES GENATICOS DE S. typhimurium
CEPA TA100.

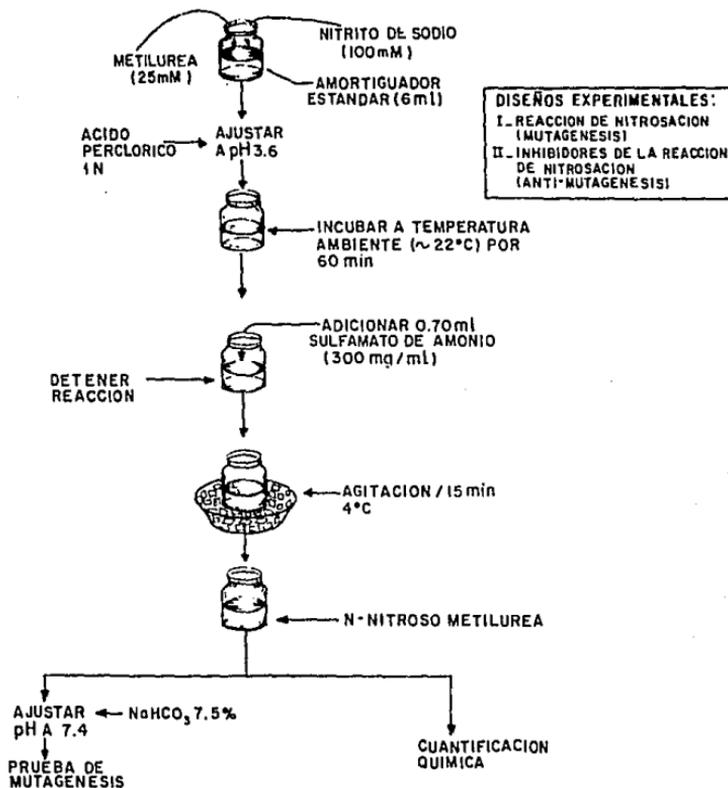


FIGURA 4. REACCION DE NITROSACION DE METILUREA CON NITRITO DE SODIO.

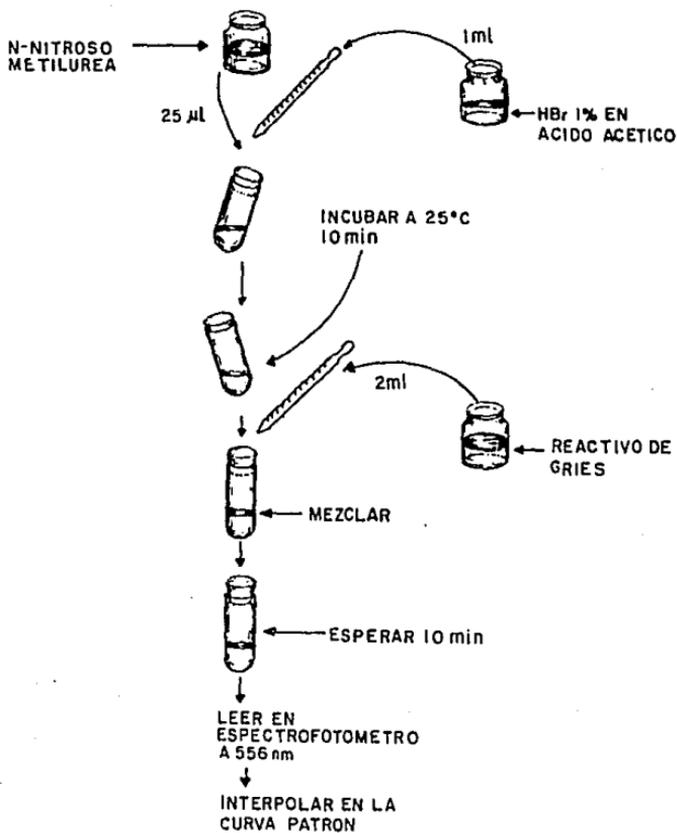


FIGURA 5. CUANTIFICACION QUIMICA DE N-NITROSO METILUREA.

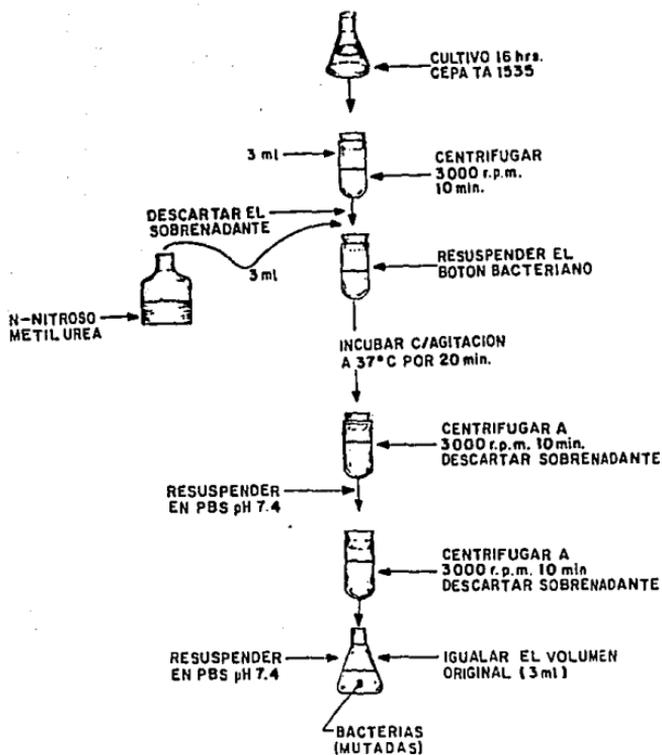


FIGURA 6. PRUEBA DE MUTAGENICIDAD DE N-NITROSOMETIL UREA SOBRE *S. typhimurium*.

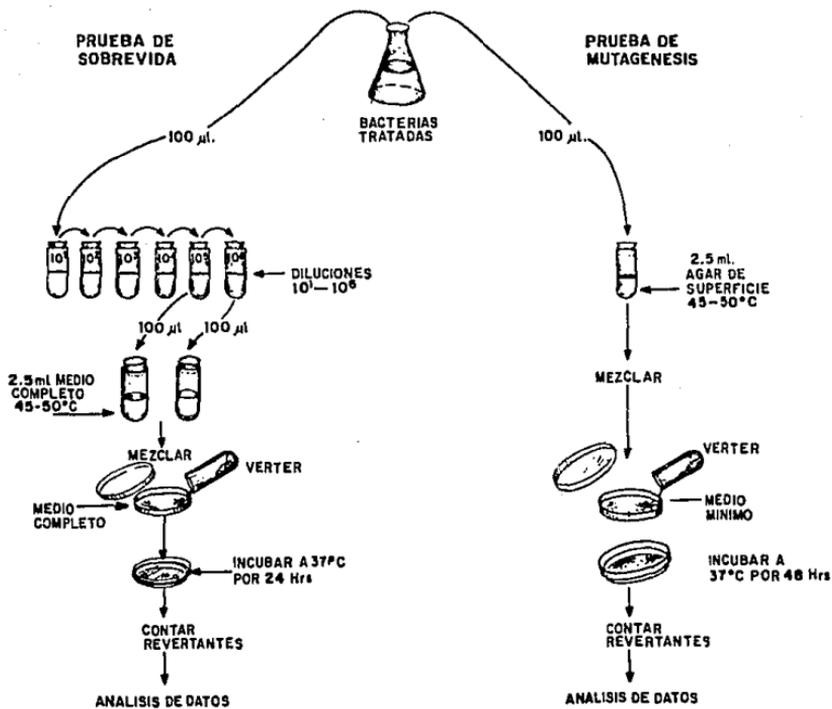
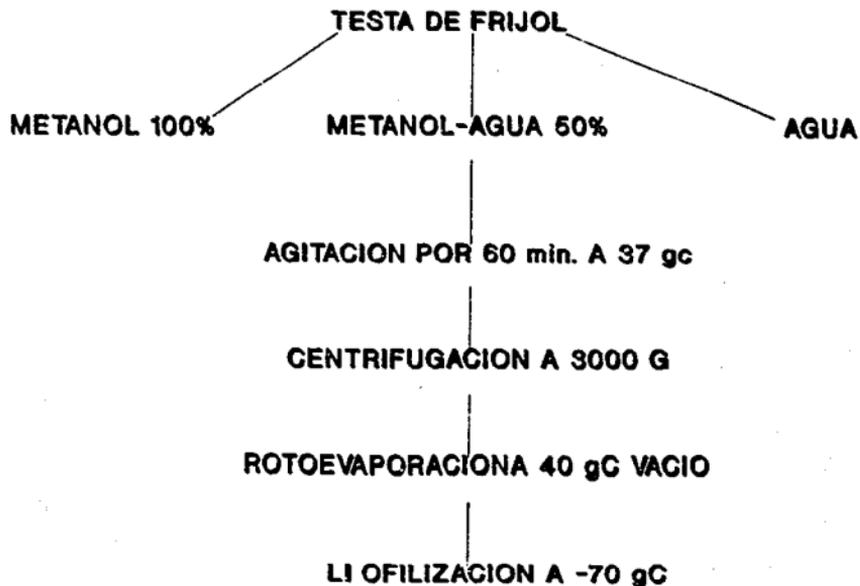


FIGURA 7. PRUEBA DE SOBREVIVENCIA Y MUTAGENESIS.

FIGURA 8. OBTENCION DE EXTRACTOS DE FRIJOL Phaseolus vulgaris
VARIEDAD FLOR DE MAYO.



BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Magee, P.M. y Barnes, J.M. 1956. The malignant primary hepatic tumoris in rat by feedeing dimetilnitrosamine. Br. J. Cancer. 10: 114-1639.
- 2.- Druckrey, H., y Preussman. 1962. Zur Entstehun carcinogene nitrosamine an Beispiel des tabakrausen, naturwissenschaften. 10: 498-501.
- 3.- Ender, F., G. Havre, A. Helgebostad., N. Koppang, R. Madsen y Chen, L. 1964. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring, Naturwissenschaften. 51: 637-638.
- 4.- Sander, J. 1967. Kann Nitrit in der menschlichen Nahrung Ursache einer Krebsentstehung durch Nitrosaminbildung sein?, Arch. Hygien. 151: 22-28.
- 5.- Fine, H. D., Lieb and Rufer, R. 1975. Principle of operation of the thermal energy analyser (TEA) for the trace analysis of volatile and no-volatile N-nitroso compounds. J. Chromatogr. 107: 351-357.
- 6.- Bartsch, H., y Montesano, R. 1984. Relevance of nitrosamines to human cancer. Carcinogenesis. 5: 1381-1393.
- 7.- Fine, H.D. 1982. Nitrosamines in the general environment and food. In: Magee, P.M. Nitrosamines and human cancer. Bahbury Report. 132. Cold. Spring Harbor Laboratory: 199-207.
- 8.- Poirier, S., Ohshima, H., Dethé, G., Hubert, A., Bougade, M.C. y Bartsch, H. 1987. Volatil Nitrosamine levels in common foods from Tunisia, South China and Greenland, High risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC), Int. J. Cancer 39: 293-296.
- 9.- Commoner, B., Vitayathil, A. J., Dolara, P., Nair, S., Nadyastha, G. y Luca, G. 1978. Formation of Mutagens in Beef and Beef Extract During Cooking. Science: 201 (8): 913-916.
- 10.- Felton, J.S., y Khize, M.G. 1991. Occurrence, Identification, and Bacterial Mutagenicity of heterocyclic amines in cooked food. Mutation. Res. 259: 205-217.
- 11.- Bharucha, K.R., Cross, C.K. 1980. Mechanism of N-nitrosopirro lidine formation in bacon. J. Agric. Food Chem 27: 63-69.
- 12.- Cole, R.J., Taylor, N., Cole, J., y Ariett, C.F. 1981. A model system for the formation of N-nitrosopirro lidine. J. Food Technol 13: 55-59.

- 13.- Pearson, M.A., Chen, C., Grey, I.J., y Aust, D.C. 1992. Mechanism (s) involved in meat mutagen formation and inhibition. Free Radical Biology and Medicine. Vol 13:161-167.
- 14.- Mirvish, S.S. y Carnes, D.A. 1981. Identification of Compound in a fish product yielding Metilurea (MU) on Nitrosation dinitrosation, as creatinine (CRN). Proc. Am. Assoc Cancer Res.22: 140.
- 15.- Matsui, M., Ohsima, H. y Kawata, T. 1980. Increase in the Nitrosamine content of several fish products upon broiling. Bull. Jpn. Soc.Sci. Fish. 46: 587-590.
- 16.- Goug, T.A., Webb, K,S. and Coleman, R.F. 1978. Mechanisms of dimetil nitrosamine content in U.K food. Nature. 272:161-162.
- 17.- Gray, J.I., Irvin, D.M. y Kakuda, H. 1979. Nitrates and nitro samine in cheese. J. food.prot. 42:263.
- 18.- Sugumura, T. y Sato, S. 1983. Mutagens, Carcinogens in food. Cancer Res. (suppl. 43): 2451-2.
- 19.- Tricker. A.R, y Preussmann. R. 1991. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential. Mutation. Res. 259: 277-289.
- 20.- Hoffman, .D. y Adams, J.D. 1981. Carcinogenic Tabaco Specific N-nitrosamines in Snuff and in the Saliva of Shuff Dippers. Cancer Res. 41 (11):4305-4308.
- 21.- Hoffman, D., Brunzmann, K.D., Adamas. A.R. y Hecht. S. 1982. Nitrosamines in Tabacco Carcinogenesis. In Magee, P.M. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbury Report. 12 cild. Spring Harbor Laboratory: 211-220.
- 22.- Lijinsky, W. 1974. Reaction of Drugs with Nitrous Acid as a Source of Carcinogenic Nitrosamines. Cancer Res. 34:225-258.
- 23.- Lijinsky, W.1980. Significance of "in vivo" formation of N-nitroso compounds. Oncology 37:223-226.
- 24.- Schmahl, D. y Habs, M. 1980. Carcinogenicity of N-nitroso Compounds. Oncology 37:237-242.
- 25.- Scheider, V.J., Wazok, R. Schwarz, H. 1977. Endogene Bildung Kanzerogable von Pharmaka und Nitrit an Ratten. Exp. Path. Bd. 13:32-43.
- 26.- Barnard, J., Bavin.P., Brimblecombe. D.W., Graham. D., Durany. J. y Keighley. 1982. In Mac. Gee P. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbary Report. 12. Col Spring Harbor Laboratory: 369-377.
- 27.- Hartman, P.E. 1982. Nitrite Load in tha Upper Gastrointestinal

- Tract. Past, Present and Future. In Magee, P.N. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbary Report. Cold Spring. Laboratory: 415-431.
- 28.- Parks, N.J., Krohn. K.A., Mathis. C.A., Chasko. J.M., Geiger. K.R., Gregor. M.E. y Peek. N.L. 1981. Nitrogen-13-labeled Nitrite and Nitrate: Distribution and metabolism after Intratracheal Administration. Science. 212:58-60.
 - 29.- Cuello. C., Correa. P., Haenzel. W., Gordillo. G., Brown. C., Archer. M. y Martínez. E.1983. Gastric Cancer in Colombia I. Cancer Risk and Suspect Environmental Agents. J. Natl. Cancer. Inst. 57: 1015-1020.
 - 30.- Yang, S. 1980. Research on Esophageal Cancer in China a Review. Cancer. Res (suppl).43:2454-2459.
 - 31.- Chow, Y.L. 1973. Nitrosamin Patochemistry. Acc. Chem. Res. 6:354-360.
 - 32.- Fiddler, W., Pensabene, J., Doer, R.C. y Wasserman. A.E. 1972. Formation of N-nitroso Dimetilamina from Natural Occurring Quaternary Amonion Compounds and Tertiary Amines. Nature (London) 236:307.
 - 33.- Lijinsky, W. y Greenblatt, M.M. 1972. Carcinogen Dimetilni trosamine Produce In vivo from Nitrite and Aminopirine. Nature. New. Biol.236: 177-178.
 - 34.- Mirvish, S.S. 1975. Formation of N-nitroso Compounds: Chemistry, Kinetics ans In vivo Occurrence. Toxicol Appl. Pharma col.31:325-351.
 - 35.- Lijinsky, W. y Spstein, S.S.1970. Nitrosamines as Environmen tal Carcinogens. Nature. 225: 21-23.
 - 36.- Mirvish, S.A. 1970. Kinetics of Dimetilamine- Nitrosation in Relation to Nitrosamin Carcinogenesis. J.Natl.Cancer Inst. 44:633-639.
 - 37.- Oshima, H. y Bartch, H.1981. Quantitative Estimation of Endogenous Nitrosation in Humans by Monitoring N-nitroso-proline Excreted in the Urine. Cancer Res. 41:3658-3662.
 - 38.- Lu, S. H., Oshima, H., Fuhimttan, Y., Li, F.M. Blettrier, M. Wahimttan, y Bartsh, H. 1986. Urinary Excretion of N-nitroso Aminoacids and Nitrite by Inhabitants of a High and Low Risk Aerea for Esophageal Cancer in China: Endogenous Formation by of Nitrosoproline and its Inhibition by Vitamin C. Cancer Res. 46:1485-1491.
 - 39.- Bartsch, H. 1991. Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds, Tabacco Smoke and Mycotixins. Ed. I.K, International Agency for Research on Cancer Lyon: 1-10.

- 40.- Mirvish, S.S. 1986. Effects of Vitamin C and on N-nitroso Compounds Formation Carcinogenesis and Cancer. 58: 1842-1850.
- 41.- Kuenzig, W., Chaw, J., Norkus, E., Halowaschenko, H., Newmark, H. y Cormey, A. H. 1984. Caffein and Ferulic Acid as Bloaders of nitrosamine Formation. Carcinogenesis. 5 (3) 309-313.
- 42.- Perchellet, J.P., Owen, M.D., Posey, T.D., Oryen, K. y Schnelder, B.A. 1985. Inhibitory Effects of Glutation Liver Raising Agents and Mouse Skin Tumor Promotion by 12-tetradecanoic Phorbol-13 acetate. Carcinogenesis: 565-573.
- 43.- Toth, B. y Patil, K. 1983. Enhancing Effect of Vitamine E on Murin Intestinal Tumorigenesis by 12-dimethylhydrazine, Dhydrochloride. J.Nat.Cancer Inst:1107-1111.
- 44.- Ames, B.N. 1971. The Detection of Chemical Mutagens with enteric Bacteria in: Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection. A. Hollaender Ed. Plenum Press, New York, Vol. 1, 267-282.
- 45.- Ames, B.N., Lee, F.D., y Durston, W.E. 1973. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Clasification of Mutagens and Carcinogens. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 782-786.
- 46.- McCann, J., Spingar, N.E., Kobori, J., y Ames, B.N. 1975. Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R factor Plasmids. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 979-983.
- 47.- Ames, B.N., Durston, W. E., Yamasaki, E. y Lee, F.D. 1973. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2282- 2285.
- 48.- Stich, H.F., Rosin, M.P. y Bryson, L. 1982. Inhibitor of Mutagenicity of a Model Nitrosation Reaction by Naturally Occurring Phenolics, Coffee and Tea. Elsevier. Biomedical Press.119-128.
- 49.- Whong, W.J., Steewar, J.D. and Ong, T. 1985. Formation of Bacterial Mutagens from Reaction of Chewing Tabacco with Nitrite. Mutation, Res. 158:105-110.
- 50.- Maron, D.M. y Ames, B.N. 1983. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res. 113:173-215.
- 51.- Hartman, E. P., y Shankel, M.D. 1990. Antimutagens and Anti carcinogens: A Survey of Putative Interceptor Molecules. Environmental and Molecular Mutagenesis 15: 162-163.

- 52.- Grover. I.S. y Saroj Bala.1993. Studies on Antimutagenic Effects of guava (Psidium guajava) in Salmonella typhimurium Mutation Res. 300:1-3.
- 53.- Bunton. D. 1959. Oxidation of Ascorbic Acid and Similar Reductones by Nitrous Acid. Nature.46 (55):163-165.
- 54.- Mirvish. S.S. 1971. Ascorbate-nitrite Reaction, Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogen N-nitroso Compounds. Science. 177:65-68.
- 55.- Barale. R., Zucconi.D., Bertani. R., y Lopireno. N.1983. Vegetals inhibit in vivo the mutagenicity of Nitrite Combined with nitrosable Compounds. Mutation Res. 120: 145-150.
- 56.- Greenblatt. M.D. 1973. Dose Response Studies with Concurrent Administration of Piperazine and Sodium Nitrite to Strains a Mice. J. Nat. Cancer Inst. 50: 1055-1056.
- 57.- Linitas. C., Clarck. A., Fox. J., Tannenbaum. S.R. y Newberne. P M.1982. in vivo Stability of Nitrite and Nitrosamine Formation in the dog Stomach: Effect of Nitrite and Amine Concentration and Ascorbic Acid. Carcinogenesis.3 (2): 161-165.
- 58.- Oshima. H., y Bartch. 1981 b. The Influence of Vitamin C on the in vivo formation of nitrosamines. In Counsell JN, Hornig DH : Vitamin C (Ascorbic Acid). London: Applied Science Publ: 215-224.
- 59.- Bartsch. H., Ohshima.H y Pignatelli. B. 1988. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implication in human cancer prevention. Mutation Res. 202: 307-324.
- 60.- Mackerness. C.W., Leach. S.A. y Thompson. M.H. y Hill. M.S. 1989. The Inhibition of Bacterially Mediated N-nitrosation in the achlorhydric Stomach. Carcinogenesis 10: 397-399.
- 61.- Hartman. P.E. 1983a Review: Putative Mutagens and Carcinogens in Food.I.Nitrite/nitrate Ingestion and Gastric Cancer Mortality. Environ Mutan 5: 111-121.
- 62.- Mirvish. S.S.1983. The etiology of Gastric Cancer. Intra gastric nitrosamide Formation and other theories. JNCI 71: 630-647.

I.-ANEXO.

MEDIOS Y SOLUCIONES.

1.- Medios de cultivo

1.1-Agar de superficie

Bacto agar	0.6 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el agar y el cloruro de sodio en los 100 ml de agua destilada, calentar hasta hervir procurando que no se derrame, agregar inmediatamente 10 ml de una solución de histidina 0.5 mM y biotina 0.5 mM. Mezclar perfectamente, distribuir en tubos con tapón de rosca a razón de 2.5 ml/tubo y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C. Almacenar a 4°C, hasta su uso.

1.2.- Medio Mínimo de Vogel-Bonner.

- a) En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml., colocar 7.5 g de Bacto- Agar e hidratar con 300 ml, de agua destilada.
- b) En un matraz Erlenmeyer de 250 ml. colocar 10 ml. de la solución de sales Vogel-Bonner y agregar 90 ml de agua destilada (dilución 1:10 de la solución madre).
- c) En otro matraz Erlenmeyer (250 ml). Colocar 10 g de dextrosa anhidra y agregar 100 ml de agua destilada.
- d) Esterilizar todos los matraces (agar, sales y dextrosa) por 20 minutos a 121°C.
- e) Una vez esterilizados, mezclar en el matraz de 1000 ml (que contiene el agar) los contenidos de los otros dos matraces de 250 ml (que contienen sales y dextrosa). Mezclar perfectamente y vaciar en cajas Petri desechables estériles aproxi-

madamente 20 ml. por caja, dejar gelificar y almacenar en refrigeración hasta su uso.

1.3.- Medio completo de superficie.

Caldo nutritivo No.2 OXOID	2.5 g
Bacto agar	0.6 g
Agua destilada	100 ml.

Disolver el caldo y el agar en los 100 ml de agua destilada, calentar hasta hervir procurando que no se derrame. Mezclar perfectamente y distribuir en tubos con tapón de rosca a razón de 2.5 ml/tubo. Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C y almacenar en refrigeración hasta su uso.

1.4.- Medio completo para placas.

Caldo nutritivo No. 2. OXOID	12.5 g.
Bacto agar	7.5 g.
Agua destilada	500 ml.

Disolver el caldo y el agar en los 500 ml. de agua destilada, esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C. Una vez esterilizado, mezclar perfectamente y vaciar en cajas de petri desechables estériles aproximadamente 20 ml por caja. Dejar gelificar y guardar en refrigeración hasta su uso.

1.5.- Medio Mínimo de Vogel-Bonner complementado con histidina.

Las cajas conteniendo medio mínimo se complementan con histidina de la siguiente manera: agregar 0.1 ml de una solución estéril de histidina 0.1 M y biotina 0.5 mM en la superficie del medio y distribuir uniformemente con ayuda de un triángulo de vidrio estéril. Dejar secar, realizar control de esterilidad (incubar 24 hrs a 37°C), almacenar en refrigeración hasta su uso.

2.- SOLUCIONES.

2.1.- Solución de L-histidina 0.5 mM y Biotina 0.5 mM (requerimiento mínimo).

L-histidina	0.0077 g.
Biotina	0.0122 g.
Agua destilada	100 ml.

Disolver la L-histidina y la Biotina en el agua destilada y guardar a 4°C en la oscuridad.

2.2.- Solución de L-histidina 0.1 M y Biotina 0.5 mM (exceso).

L-histidina	1.5516 g.
Biotina	0.0122 g.
Agua destilada	100 ml.

Disolver la L-histidina y biotina en el agua destilada y guardar a 4°C en la oscuridad.

2.3- Solución madre de sales Vogel-Bouner.

En 600 ml de agua destilada disolver las siguientes sales, en el mismo orden que aparecen:

Sulfato de magnesio heptahidratado	10 g.
Acido cítrico monohidratado	100 g.
Fosfato de potasio dibásico Anhidro	500 g.
Fosfato de sodio y amonio tetrahidratado	175 g.

Agregar suficiente agua destilada para completar 1000 ml, filtrar, agregar 1 ml. de cloroformo y almacenar a temperatura ambiente.

2.4.- Amortiguador estándar.

Acido cítrico monohidratado (0.068 M)	1.428 g
Fosfato de sodio dibásico (0.064 M)	0.9085 g

Agua destilada 100 ml.

Disolver el ácido cítrico y el fosfato de sodio en un poco de agua destilada, ajustar el pH a 3.6 y aforar a 100 ml. con agua destilada. Guardar en refrigeración hasta su uso.

2.5.- Reacción de nitrosación.

Metilurea 25 mM.	0.011 g.
Nitrito de sodio 100 mM.	0.041 g
Amortiguador estandar	6.0 ml.

Disolver la metilurea y el nitrito de sodio en amortiguador estándar y ajustar pH a 3.6 para iniciar la reacción.

2.6.- Bicarbonato de sodio al 8%.

Bicarbonato de sodio	8.0 g.
Agua destilada	100 ml.

2.7.- Solución de Sulfamato de amonio (300 mg/ml).

Sulfamato de amonio	3.0 g.
Agua destilada	10 ml.

2.8.- Acido bromhídrico al 1%

Acido bromhídrico (al 50%)	2.0 ml.
Acido acético glacial	98.0 ml.

Agregar el ácido bromhídrico al ácido acético glacial por las paredes del recipiente (con mucho cuidado).

2.9.- Reactivo de Gries.

Acido sulfanílico (0.5%)	0.250 g.
Clorhidrato de etilendiamina (0.05%)	0.025 g.

Disolver en 50 ml. de ácido acético al 30%. Prepararlo el mismo día en que se use.

2.10.- Amortiguador de fosfatos salino (PBS).

Cloruro de sodio	8.0 g.
Cloruro de potasio	0.2 g.
Fosfato de sodio dibásico	1.15 g.
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Agua destilada	1000 ml.

Disolver los ingredientes en un poco de agua destilada, ajustar pH a 3.6 y aforar a 1000 ml.