



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
CAMPUS IZTACALA

BO 1287/97
9:2

**EFFECTO ANTIMUTAGENICO DE ALFA -
TOCOFEROL Y BETA - CAROTENO
EN MUTACIONES PUNTUALES
INDUCIDAS POR QUINOLONAS
EN *Salmonella typhimurium***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

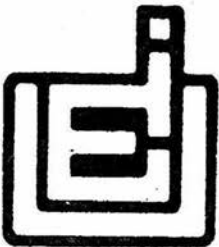
B I O L O G O

P R E S E N T A:

GERMAN PARRA CERVANTES

DIRECTORA DE TESIS

DRA. C. B. MYRIAM ARRIAGA ALBA



MEXICO, D. F.

ENERO, 1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Esta tesis fue realizada en el Hospital Juárez de México en el Laboratorio de Microbiología adscrito en la Dirección de Investigación y Enseñanza.

Dedico esta tesis con amor y gratitud a mis Padres: Miguel Parra Díaz y María Jacinta Cervantes Jonguitud, quienes con su apoyo, cariño y confianza, me han ayudado a alcanzar una meta más en mi vida, y a mi hermana Jezabel Parra Cervantes por su apoyo moral y alegría

AGRADECIMIENTOS

Con respeto y estimación doy las más sinceras gracias a la Dra en C.B. Miriam Arriaga Alba por su infinita paciencia y eficaz guía en la dirección de este trabajo.

Con afecto y sinceridad doy las gracias a mis sinodales: M. en C. Sergio Vaca Pacheco, Biol. Irma Elena Dueñas, Biol. Elias Piedra Ibarra y M. en C. Ramón V. Moreno Torres, quienes atentamente revisaron este trabajo y con sus acertadas observaciones le dieron mayor claridad.

Agradezco al Químico Roberto Rivera por su colaboración en el montaje de la técnica del M.I.C. y a mis compañeras Rocio Flores Paz y Elvia García Jiménez por su compañía y sencillez.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México campus Iztacala por brindarme una educación universitaria y al Hospital Juárez de México por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de crecer.

Agradezco a todos mis familiares y amigos por todos los gratos momentos que han compartido con su servidor.

De manera muy en especial agradezco a DIOS por permitirme llegar a la culminación de este trabajo y por su infinita paz, pureza, amor, bienaventuranza, verdad y sabiduría.

INDICE.

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCION.....	2
III	ANTECEDENTES.....	3
	Quinolonas.....	3
	Antimutagénesis.....	5
	Prueba de Ames.....	6
	Vitamina A (beta-caroteno).....	9
	Vitamina E (alfa-tocoferol).....	11
IV	OBJETIVOS.....	13
V	MATERIAL Y METODO.....	14
	Reactivos.....	14
	Cepa bacteriana.....	14
	Cultivo de reserva.....	15
	Confirmación del Genotipo de <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.....	15
	a)Requerimiento de Histidina.....	15
	b)Mutación <i>rfa</i>	16
	c)Mutación <i>wvrB</i>	16
	d)Presencia del plásmido pKM101.....	16
	e)Presencia del plásmido pAQ1.....	17
	f)Frecuencia de reversión espontánea.....	17
	Ensayo de sobrevivencia.....	17
	Preparación de mezcla S9.....	18
	Ensayo de Mutagénesis con el método de Ames.....	18
	Ensayo de Antimutagénesis con el método de Ames.....	19
	Concentración Mínima Inhibitoria (M.I.C.).....	20
	a)Preparación de las cajas petri.....	20
	b)Estudio del efecto bactericida.....	21
VI	RESULTADOS.....	22
	Toxicidad de beta-caroteno y alfa-tocoferol.....	22
	Efecto mutagénico de beta-caroteno y alfa-tocoferol.....	22
	Efecto antimutagénico de alfa-tocoferol.....	22

	Efecto antimutagénico de beta-caroteno.....	28
	Efecto del beta-caroteno en la acción bactericida de ácido pipemídico, norfloxacina y ácido nalidíxico.....	33
VII	DISCUSION.....	36
VIII	CONCLUSIONES.....	41
IX	APENDICE.....	42
X	BIBLIOGRAFIA.....	46

INDICE DE FIGURAS.

Figura # 1	MUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO Y ALFA-TOCOFEROL.....	25
Figura # 2	ANTIMUTAGENESIS DE ALFA-TOCOFEROL EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO PIPEMIDICO.....	26
Figura # 3	ANTIMUTAGENESIS DE ALFA-TOCOFEROL EN MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA.....	27
Figura # 4	ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO PIPEMIDICO.....	29
Figura # 5	ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA CON ACTIVACION METABOLICA.....	30
Figura # 6	ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA SIN ACTIVACION METABOLICA.....	31
Figura # 7	ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO NALIDIXICO.....	32

INDICE DE TABLAS.

Tabla # 1 PRUEBA DE SOBREVIVENCIA EN <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 CON BETA-CAROTENO.....	23
Tabla # 2 PRUEBA DE SOBREVIVENCIA EN <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 CON ALFA-TOCOFEROL.....	24
Tabla # 3 EFECTO DEL BETA-CAROTENO SOBRE LA ACCION BACTERICIDA DE QUINOLONAS EN AUSENCIA DE MEZCLA S9.....	34
Tabla # 4 EFECTO DEL BETA-CAROTENO SOBRE LA ACCION BACTERICIDA DE QUINOLONAS EN PRESENCIA DE MEZCLA S9.....	35

RESUMEN

Las mutaciones inducidas por ácido pipemídico, norfloxacina y ácido nalidíxico en cepas de *Salmonella typhimurium* hisG428, sugieren la generación de radicales libres oxígeno, observándose este efecto a dosis inferiores a la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los radicales libres son una de las principales causas endógenas de daño al DNA, por lo que se utilizaron dos antioxidantes, el α -tocoferol y el β -caroteno, para reducir el riesgo de daño genotóxico producido por quinolonas, sin que se altere su acción bactericida.

El preparado farmacéutico de la vitamina E al 50% en forma de acetato de α -tocoferol, a una concentración de 4 mg equivalente a 2 U.I. no presentó efectos tóxicos ni mutagénicos para la cepa *S. typhimurium* TA102, sin embargo tampoco fue capaz de inhibir el efecto mutagénico del ácido pipemídico y la norfloxacina, debido a que el acetato unido al grupo fenólico del α -tocoferol impide su acción como antioxidante.

El β -caroteno al 30%, en una concentración equivalente a 1600 U.I., no presentó efectos tóxicos ni mutagénicos en la cepa *S. typhimurium* TA102, con esta dosis se inhibió el efecto mutagénico de la norfloxacina y el ácido nalidíxico, mientras que el efecto mutagénico del ácido pipemídico fue inhibido con 800 U.I.

1600 U.I. de β -caroteno no alteraron el efecto terapéutico *in vitro*, de las tres quinolonas estudiadas con la técnica de dilución en placa de agar para 20 cepas de *Escherichia coli* y la cepa *S. typhimurium* TA102. Estos datos sugieren que las quinolonas a dosis inferiores a la terapéutica, generan radicales libres oxígeno que son capturados por el β -caroteno, también se observa que este efecto antimutagénico no afecta el mecanismo bactericida, inhibidor de las topoisomerasas, de quinolonas.

INTRODUCCION

En trabajos anteriores, realizados en este hospital, se demostró que las quinolonas (ácido pipemídico y norfloxacin) y sus metabolitos, son capaces de inducir transversiones A-T en cepas de *S. typhimurium*, a dosis 100 y 1000 veces menores que la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos estudiados. Se ha planteado la hipótesis de que el mecanismo por el cual estos medicamentos indujeron mutaciones puntuales en *S. typhimurium* TA102 Y TA104 es por la formación de radicales libres. El alfa tocoferol y beta caroteno, se han empleado como compuestos antioxidantes útiles, capaces de inhibir la actividad mutagénica de los radicales libres. En el presente trabajo se desea estudiar el efecto de estos antioxidantes, que se encuentran frecuentemente en los alimentos, para inhibir la actividad mutagénica de las quinolonas estudiadas, así como del ácido nalidixico, empleado como fármaco de primera elección en infecciones de vías urinarias empleando pruebas bacterianas, como la prueba de *Salmonella typhimurium* de Ames. Paralelamente, se determinará si el efecto terapéutico de éstos medicamentos, no es alterado con el uso simultáneo de alfa tocoferol y beta caroteno. El fin de este trabajo, es dar una alternativa para la disminución del riesgo de mutagénesis en pacientes que requieran el tratamiento con quinolonas.

PALABRAS CLAVE.

radicales libres de oxígeno, quinolonas, antimutagénesis, antioxidantes.

ANTECEDENTES

QUINOLONAS.

Las enfermedades infecciosas son el principal problema de salud en México. Dentro de éstas, las infecciones urinarias ocupan el tercer lugar de incidencia representando un problema de salud importante. Este hecho ha propiciado un uso indiscriminado de antibióticos, lo cual ha generado problemas de resistencia en cepas bacterianas, éste problema ha hecho que se incremente el uso de medicamentos opcionales a los antibióticos de primera elección ante los cuales la resistencia bacteriana sea menor, como es el grupo de las quinolonas.

Las quinolonas son antibióticos utilizados ampliamente para combatir infecciones de vías urinarias, infecciones de vías respiratorias bajas, sinusitis, infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones gastrointestinales como salmonelosis, infecciones del Sistema Nervioso Central, otitis y meningitis (Gendrel et al 1993, Ikeda y Tokasaka 1991). Algunas quinolonas utilizadas en México y Estados Unidos son; ácido pipemídico, norfloxacin, ciprofloxacina, enoxacin, pefloxacina, rosoxacina, ofloxacina y ácido nalidíxico; sin embargo, en México, solamente el ácido nalidíxico, la norfloxacin y el ácido pipemídico son utilizados dentro de cuadro básico del sector salud.

Pino et al. en 1991, reportaron que las quinolonas pueden producir intercambio de cromátides hermanas, aberraciones cromosómicas y rearrreglos cromosómicos. La ciprofloxacina y enoxacin fueron mutagénicas en la cepa TA102 y en *S. typhimurium* TA92 (*hisG46 uvrB+ pKm101*) (Clerch y Lagostera 1992). Estudios realizados anteriormente en éste laboratorio, han mostrado que la norfloxacin y ácido pipemídico, no produjeron mutaciones por substitución de bases en las cepas de *Salmonella typhimurium* TA100

(*hisG46 uvrB- pKm101*), ni en la cepa UHT8414 (*hisG46 uvrB+ pKm101*) sin embargo se mostró la actividad mutagénica de los metabolitos, de estos compuestos inducidos *in vitro*, en las cepas de *S. typhimurium* TA102 (*hisG428, pkm101 pQ1*) y *S. typhimurium* TA104 (*hisG428, uvrB- pKm101, pAQ1*) (Arriaga Alba et. al. 1994, Barron Moreno 1995). Las cepas TA102 y TA104, fueron diseñadas para la detección de mutágenos oxidativos, como las quinolonas contienen grupos quinona o carbonilo, pueden presentar reacciones oxidativas y ser generadores de radicales libres, los cuales no eran detectados por las cepas cuyos puntos sensibles están en sitios GC, como es el caso de cepas con mutaciones *hisG46* (TA100), Levin et. al. 1982). Consecuentemente, se ha concluido que es necesario valorar mejor la formación de radicales libres entre los productos metabólicos de Acido pipemídico y Norfloxacin.

Se ha determinado que los radicales libres de oxígeno, producen principalmente mutaciones por transversión CG--AT, que son fácilmente detectadas por *S. typhimurium* TA102. Los daños genéticos producidos por radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno como hidróxilo, superóxido, hidroperóxido, radicales oxhidrilo, se han asociado con diferentes enfermedades en el humano, destacando el envejecimiento celular, el cáncer, isquemia, demencia senil, y Parkinson (Chanarat 1992, Feig et. al. 1994).

Estos productos reactivos del oxígeno, son la principal causa endógena de inducción de mutaciones, teniendo como consecuencia las enfermedades ya mencionadas (Feig et. al. 1994). Debido a que éstos se producen en los procesos metabólicos normales, se han planteado diversos trabajos para encontrar alternativas para reducir el daño biológico, causado por los radicales libres de oxígeno, buscando componentes que se encuentran normalmente en la dieta.

ANTIMUTAGENESIS.

Los antimutágenos son compuestos químicos ó elementos que reducen la frecuencia de mutación espontánea o inducida en sistemas de prueba genotóxica de corta duración. Sin embargo, en el estudio del fenómeno de antimutagénesis *in vitro*, deberá tenerse la precaución de diferenciar la antimutagénesis verdadera de la reducción de las revertantes observadas por muerte celular. (Clark y Shankel 1975). Se a planteado que los antimutágenos químicos, son una forma natural para reducir el riesgo de la exposición a los numerosos compuestos químicos que hay en la naturaleza (Ames 1985).

Los compuestos antimutagénicos, han sido subdivididos en dos grupos principales, de acuerdo a su mecanismo de acción: Desmutágenos y Antimutágenos verdaderos ó biomutágenos. Se consideran como desmutágenos aquellos que adsorben el mutágeno químico, inhiben la conversión de un pre-mutágeno a un mutágeno, o reaccionan con la forma activa del mutágeno, impidiendo que este llegué a su blanco, el DNA. El grupo de Biomutágenos, comprende compuestos que promueven los mecanismos de reparación libres de error e inhiben el mecanismo de reparación SOS propenso a error ó que incrementa la fidelidad de la DNA polimerasa. (Kada et al 1986).

En base a diferentes estudios epidemiológicos, se ha planteado que los compuestos antimutagénicos pueden ser anticarcinogénicos, ya que se cuenta con datos que asocian una correlación directa de dieta y cáncer (Ames 1983). En efecto, la mayor distribución de anticarcinógenos conocidos, son compuestos que pueden encontrarse en la dieta, así se ha demostrado que una dieta rica en vegetales como col, frijol y brocoli, se asocia a una incidencia baja de canceres del tracto digestivo (Yavelow et. al. 1982, 1983). Otros compuestos anticarcinogénicos importantes en la dieta, son aquellos que son capaces de atrapar radicales libres de oxígeno, como α -tocoferol, β -carotenos, clorofila, retinoles y flavonas, pueden reducir la actividad mutagénica de algunos compuestos en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, habiéndose demostrado

que también pueden interferir con el proceso de inducción de carcinogénesis en animales de laboratorio (Baird y Birbaun 1979, Boutwell 1983, Ong 1986, Sani et. al. 1984, Verna et. al. 1979, Wattenberg y Leong 1970). Otros estudios realizados en humanos mostraron que con la administración de 100 000 UI/semana de vitamina A (β -caroteno), se logró disminuir la inducción de micronúcleos epiteliales en personas con el hábito de mascar tabaco/betel (Stich 1985).

Las quinonas son compuestos que pueden originar radicales libres de oxígeno, capaces de inducir rompimientos y pérdidas cromosómicas. Empleando una línea celular con actividad de prostaglandina H sintetasa, en presencia de ácido araquidónico, se demostró la generación de radicales libres a partir de hidroquinona, capaces de producir micronúcleos. Este efecto mutagénico pudo ser inhibido con catalasa y glutatión, (un compuesto antioxidante), que se encuentra frecuentemente en semillas de frijol. (Dobo y Eastmond 1994).

PRUEBA DE AMES

La prueba de mutagénesis en *Salmonella typhimurium*, desarrollada por el Dr. Bruce N. Ames, ha sido muy utilizada para detectar el efecto mutagénico de una amplia variedad de sustancias presentes en nuestro medio ambiente. La prueba consta de varias cepas de *Salmonella typhimurium* con diferentes mutaciones en el operón histidina, que les confiere auxotrofia a la histidina, estas cepas pueden ser revertidas a su fenotipo original (his^+) por la acción de un gran número de compuestos mutagénicos y posibles carcinógenos que actúan por diversos mecanismos. La prueba de Ames ha sido mejorada adicionando un homogenado de hígado de rata a la suspensión bacteriana como una aproximación del metabolismo de mamíferos. Con este sistema, más del 80% de los carcinógenos químicos probados han sido detectados como mutágenos (Levin y

Ames 1986, Maron y Ames 1983).

Para ensayos de mutagénesis rutinarios se recomienda el uso de las cepas TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1538 y TA102. Las cepas TA1535 y TA100 sólo pueden ser revertidas por mutágenos que actúan a nivel de sustitución de bases en el par GC, mientras que, las cepas TA97, TA98 y TA1538, cuyos puntos sensibles también se encuentran en pares GC, son revertidas a su fenotipo original por corrimiento de formato (Maron y Ames 1983)

Entre las clases de carcinógenos que no son detectados por estas cepas se encuentran los químicos oxidativos, estas sustancias mediante la generación de radicales libres, se encuentran entre los principales mutágenos que pueden inducir el desarrollo del cáncer y envejecimiento celular (Ames 1983, Levin et. al. 1984).

La cepa TA102 tiene la capacidad para detectar estos mutágenos oxidativos debido a que, a diferencia de las otras cepas prueba, presenta un par de bases AT en el lugar de la mutación ocre, que la hace más sensible a este tipo de mutágenos, además la mutación ocre (*hisG428*) se encuentra localizada en un plásmido multicopia (pAQ1) que da como resultado que cada bacteria posea cerca de 30 copias del gen mutante disponibles para su reversión, el plásmido también porta un marcador de resistencia a tetraciclina. Esta cepa cuenta con un sistema de reparación por excisión completamente funcional (Levin et. al. 1982).

Como todas las cepas de Ames utilizadas para ensayos de mutagénesis rutinario, TA102 tiene una mutación *rfa* que causa la pérdida de la barrera de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la bacteria e incrementa la permeabilidad a moléculas como el cristal violeta que no penetra normalmente la pared celular. Al igual que las cepas TA97, TA98 y TA100, la cepa TA102 lleva el plásmido pKM101 que contiene los genes *umuB* y *umuC* que promueven el mecanismo de reparación propenso a error, este plásmido contiene un marcador de resistencia a ampicilina (Levin et. al. 1982, Maron y Ames 1983).

La cepa TA102 puede ser revertida a su fenotipo original mediante transiciones (TA-CG), transversiones (TA-AT) y pequeñas deleciones de 3 a 6 pares de bases que remueven parte o todo el triplete ocre (Levin et. al. 1984).

Existe otra cepa que también posee la mutación *hisG428* TA104, pero a diferencia de TA102, la mutación se encuentra sobre el cromosoma y posee una deleción desde el gen *bio* al *galC*, incluyendo *wvrB* en el minuto 18 del cromosoma, por lo que es incapaz de efectuar correctamente la reparación por excisión. La cepa TA104, también es revertida mediante mutaciones por substitución de bases en el par AT, pero a diferencia de la cepa TA102 es más sensible a los compuestos químicos y no permite valorar diferentes concentraciones de los compuestos problema (Levin et, al. 1982).

Aunque se ha encontrado, en un estudio sobre la respuesta mutagénica de TA102 realizado en tres laboratorios, que TA102 posee una reversión espontánea e inducida inestable, lo que puede ser el reflejo de variaciones en el número de copias del plásmido pAQ1 por célula bacteriana (Jung et. al. 1992), en otro estudio en el que participaron 13 laboratorios, se encontró que con excepción de un laboratorio el conteo de revertantes espontáneas e inducidas con mitomicina C y bleomicina se encuentra dentro de los valores publicados por Maron y Ames, mencionando que la cepa es útil para ensayos de mutagénesis siempre que se mantenga un estricto control en la preparación de los cultivos stock originales de la cepa (Watanabe et, al. 1995).

VITAMINA A β -CAROTENO

Los carotenos se encuentran ampliamente distribuidos en los cloroplastos de las células de todas las plantas verdes, estas moléculas son a menudo los pigmentos dominantes en las flores y frutos, en las hojas su presencia está generalmente enmascarada por la mayor abundancia de las clorofilas. Se conocen cuatro tipos de carotenoides: α , β , γ , y δ . De estos el más abundante es el β -Caroteno (Curtis 1992).

El β -caroteno, es una sustancia oleosa, insoluble en agua, ácidos y álcalis, pero soluble en sulfuro de carbono, benceno y cloroformo. En éter, éter del petróleo, aceites y grasas su solubilidad es moderada y escasa en metanol y alcohol. Tiene un punto de fusión de 181-182°C, y forma cristales fácilmente. El color de las soluciones diluidas en la mayor parte de los disolventes, es amarillo, mientras que las más concentradas son de color rojo intenso. (Fritz 1950, Karrer y Jucker 1950).

Su molécula tiene un peso molecular de 536.85 y consta de una cadena poliisoprenoide con dobles enlaces conjugados, en la que la ordenación "cabeza-cola" de las unidades isopreno, se halla característicamente invertida en el centro de la molécula, cada extremo de la cadena posee un anillo de ciclohexeno sustituido insaturado. (Lehninger 1983) Su carácter químico de hidrocarburo no saturado se pone de manifiesto por el blanqueamiento gradual del caroteno, a medida que los cristales absorben el oxígeno del aire. Estas moléculas se oxidan fácilmente perdiendo su actividad de vitamina A.

En la industria alimenticia se utiliza como agente colorante amarillo, especialmente en alimentos deshidratados. Se almacena en lugares bien cerrados, protegidos de la luz y a bajas temperaturas -25 °C. Los cristales comerciales de β -Caroteno tienen una

actividad de vitamina A de 1.67 millones de unidades por gramo USP. La Unidad Internacional U.I. de 0.6 μg de β -Caroteno es casi exactamente igual a 0.3 μg de vitamina A. (Lawrence 1990).

En las plantas el β -Caroteno es un pigmento, cuyos colores van del rojo al amarillo. Absorben la luz con mayor intensidad en la region azul del espectro visible. La energía absorbida tiene que transmitirse como energía de excitación a las moléculas de clorofila, antes de que pueda utilizarse para la fotosíntesis. En el cuerpo de los animales es el precursor de la vitamina A. Ningún animal es capaz de sintetizar carotenoides, por lo que estos deben ser tomados en su dieta. Por sí mismo, el β -Caroteno no tiene actividad intrínseca de vitamina A, su molécula simétrica se escinde por el centro, mediante reacciones enzimáticas que se llevan a cabo en el hígado y principalmente en la mucosa intestinal, para dar origen a dos moléculas de vitamina A. (Curtis 1992, Lehninger 1983, White 1970).

La fuente principal de β -Caroteno en la naturaleza son las plantas, pero se puede encontrar en el reino animal en el tejido graso, hígado y riñón de mamíferos, en el cuerpo luteum de vacas y ovejas, en la leche y la placenta humana, en los huevos de peces y en el tegumento de insectos (Fritz 1950).

La dosis diaria recomendada para el ser humano es de 40 U.I. de β -Caroteno, la dosis terapéutica para mejorar deficiencias de vitamina A, en tratamientos de corta duración es de 5000 U.I. de vitamina A (Krause 1970).

VITAMINA E α -TOCOFEROL

Los tocoferoles son un grupo de sustancias liposolubles, derivadas del germen de trigo u obtenidas por síntesis, que poseen las propiedades de la vitamina E. Se conocen cuatro tipos de tocoferol: α , β , γ y δ , de los cuales, el α -Tocoferol es el más abundante y activo. (Krause 1970, Lawrence 1990, Rodwell 1973).

Su molécula tiene un peso molecular de 430.69 y comprende un núcleo trimetilado y una cadena poliisoprenica. Se presenta como un líquido viscoso amarillo, inodoro e insoluble en agua con una densidad de 0.950 y un punto de ebullición de 200°C. Es soluble en solventes orgánicos como alcohol, acetona, cloroformo, éter, benceno, aceites y otros solventes grasos. En ausencia de oxígeno es estable al calor, los álcalis y no es afectado por ácidos a temperaturas mayores de 100°C. Sin embargo es fácilmente oxidado por el oxígeno atmosférico. La oxidación es acelerada por la exposición a la luz, especialmente a la luz U.V. calor, álcalis y sales de hierro y cobre. No precipita con digitinona. (Lawrence 1990, Lehninger 1983, Merck Index 1983, Rodwell 1973).

Las fuentes principales son los alimentos de origen vegetal, el aceite de germen de trigo es la fuente más rica, pero también lo contienen el maíz, semillas de girasol, alfalfa, lechuga, aceites de soya, frijol, maíz y semilla de algodón, en las nueces, así como en las fuentes de origen animal como yema de huevo, grasa de la leche, mantequilla, manteca, y la carne especialmente en el hígado. También es producido sintéticamente (Kerschner 1984, Krause 1970, Rodwell 1973).

Como los componentes de la vitamina E son insolubles en agua, permanecen de una manera estable en los alimentos cocinados en general y son absorbidos en el intestino en presencia de sales biliares y grasas. Se depositan en diversos tejidos como, el hígado, músculos, hipófisis, placenta, gónadas y especialmente en el tejido adiposo. Su requerimiento diario ha sido calculado en 10

a 30 mg para el adulto y depende al parecer, del contenido de la dieta en ácidos grasos no saturados (Krause 1970, Lawrence 1990, Rodwell 1973).

El α -Tocoferol es un antioxidante efectivo, en los alimentos previene la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, en el intestino aumenta la actividad de la vitamina A, evitando su oxidación intestinal. A nivel celular, protege a los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en los lípidos de las membranas celulares y subcelulares, contra el deterioro ocasionado por el oxígeno, eliminando los radicales libres que contienen oxígeno, evitando así su polimerización y como consecuencia el desarrollo de una estructura celular anormal con alteraciones en su función. También aumenta la carga lipídica de la sangre y la leche. La capacidad de la vitamina E para evitar esta destrucción ha llevado a sugerir que tal vez sea de utilidad para prevenir alteraciones relacionadas con la destrucción de radicales libres, como algunas formas de carcinogénesis (Fisher y Bender 1972, Krause 1970, Lawrence 1990, Rodwell 1973).

La utilidad de la vitamina E para aliviar molestias de la fiebre reumática, la distrofia muscular, los trastornos menstruales, las toxemias gravídicas, el aborto espontáneo, la fibrositis y la esterilidad, no han sido confirmados en el ser humano. En el hombre es necesaria para la protección de la integridad vascular, la secreción glandular y la elasticidad de los músculos. Su ausencia prolongada en la dieta de animales de laboratorio, causa distrofia muscular, insuficiencia del poder reproductor, artereosclerosis y diabetes mellitus (Merck Index 1983, Rodwell 1973).

Se administra en forma de acetato di- α -tocoferol, en dosis de 20 a 100 mg por día por vía oral. Se mide en Unidades Internacionales, la U.I. de la vitamina E es igual a 1 mg de standar de acetato di- α -tocoferol (Krause 1970, Lawrence 1990, Merck Index 1983).

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Proporcionar una alternativa para disminuir el riesgo de daño genotóxico durante el tratamiento con quinolonas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

-Evaluar los efectos tóxicos y mutagénicos de α -tocoferol y β -caroteno en *S. typhimurium* TA102.

-Estudiar si el α -tocoferol inhibe la inducción de transversiones A-T en *S. typhimurium* TA102 inducidas por norfloxacin y ácido pipemídico.

-Estudiar si el β -caroteno puede ser un antimutágeno en mutaciones inducidas por norfloxacin, ácido pipemídico y ácido nalidíxico.

-Empleando ácido nalidíxico, una quinolona generadora de radicales libres, demostrar que los antimutágenos estudiados pueden actuar como antioxidantes de radicales libres generados por quinolonas.

-Evaluar que la actividad antimutágena de estas vitaminas no disminuya la actividad bactericida in vitro de norfloxacin, ácido pipemídico y ácido nalidíxico.

-Determinar si los metabolitos de las vitaminas antioxidantes generados in vitro pueden interferir con la actividad bactericida de los antibióticos

HIPOTESIS DE TRABAJO. -

Las mutaciones que el ácido pipemídico y la norfloxacinina inducen en las cepas de *S. typhimurium* TA102, se atribuyen a la generación de radicales libres, por lo tanto, antioxidantes como el β -caroteno y el α -tocoferol deben ser capaces de contrarrestar sus efectos mutagénicos.

MATERIAL Y METODO.

REACTIVOS.

El ácido pipemídico y la norfloxacinina fueron donados por Aplicaciones Farmacéuticas. El ácido nalidíxico fue donado por Laboratorios Winthrop. El β -caroteno al 30% y el α -tocoferol al 50% fueron donados por Productos Roche S.A. de C.V. El homogenado de hígado de rata inducido con aroclor 1254 fue adquirido de Molecular Toxicology Inc. El aceite mineral de parafina, NADP, G6P, Mitomicina C, 2 aminoantraceno, fueron adquiridos de Sigma Chemical Company. La dextrosa y el DMSO fueron adquiridos de J.T. Baker. El agar bacteriológico y el agar de Mueller-Hinton fueron adquiridos de DIBTCO.

CEPA BACTERIANA.

La cepa que se utilizó en los ensayos de sobrevivencia, mutagénesis y antimutagénesis fue *Salmonella typhimurium* TA102 (*his428*, *pKM101*, *pAQ1*, *rfa*), donada por el Dr. Bruce Ames del departamento de Bioquímica de la Universidad de Berkeley, California U.S.A. CA94720. Esta cepa se ha mantenido en criotubos (con 100 μ l de DMSO por 1 ml de cultivo en fase estacionaria) congelado a -75°C , en un ultracongelador (VWR Scientific modelo A8514 C-0-S) del Laboratorio de Microbiología del Hospital Juárez de México.

CULTIVOS DE RESERVA

Una asada del cultivo microbiano congelado, fue transferida a un tubo de ensaye (16 x 150) con tapón de rosca con 5 ml de caldo nutritivo y se incubó en un baño María con agitación a 120 rpm. durante 18h. a 37°C. Posteriormente se verificaron los marcadores genéticos de la cepa, en el cultivo microbiano y se sembró por medio de estrías en una caja petri con medio mínimo de Vogel-Boner con exceso de histidina (0.1 MD y biotina (0.5 mM) y ampicilina (8mg/ml en NaOH 0.02N) (ver apéndice I), de acuerdo a las recomendaciones de Maron y Ames, 1983. Finalmente la caja petri con el cultivo de reserva se incubó durante 24h. a 37°C y se almacenó en refrigeración a 4°C.

Los cultivos microbianos de la cepa, usados en los ensayos de sobrevida, mutagénesis y antimutagénesis, se hicieron de la caja petri con el cultivo de reserva almacenado a 4°C. De esta manera, se evitó la manipulación de los cultivos congelados de la cepa de Ames por un periodo de 4 a 5 semanas y se acortó el tiempo de incubación de los cultivos microbianos a 16h.

Finalizando el periodo de 4 a 5 semanas, la caja petri con el cultivo de reserva fue desechada y todo el procedimiento se repitió desde el principio, con el fin de mantener un buen control de calidad de los marcadores genéticos de la cepa.

CONFIRMACION DEL GENOTIPO DE *Salmonella typhimurium* TA102.

a) REQUERIMIENTO DE HISTIDINA. Se inoculó la cepa en caldo nutritivo y se incubó 18h. a 37°C/120 rpm. Posteriormente se sembró la cepa, por medio de estrías, en una caja petri con medio mínimo de Vogel-Boner (ver apéndice I), carente de histidina y se incubó invertida durante 24h. a 37°C. Lo mismo se hizo sobre medio mínimo complementado con 100 µl de una solución histidina-biotina 0.5 mM.(ver apéndice I). Sólo debe haber crecimiento en el medio

complementado con histidina.

b) MUTACION *rfa*. Esta mutación es una modificación en la pared celular, la cual le confiere mayor permeabilidad, lo que permite que grandes moléculas, como las del cristal violeta, entren al interior de la célula. En una caja petri con agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), se inoculó 100 μ l del cultivo de 18h. de la cepa y se dejó secar a temperatura ambiente. En el centro de la caja, se colocó un disco de papel filtro estéril de 0.6 cm y sobre este 10 μ l de una solución de cristal violeta (1mg/ml). La caja se incubó durante 18h. a 37°C. Posteriormente la aparición de una zona clara de inhibición, aproximadamente de 14 mm, rodeando al disco, indicó la presencia de la mutación *rfa*.

c) MUTACION *uvrB*. Las cepas con esta mutación presentan una delección en el minuto 18 del cromosoma bacteriano que va del gen *galC* al *Bio*, incluyendo el gen *uvrB*, necesario para reconocer daños al DNA por el mecanismo de reparación por escisión. Las cepas con esta mutación presentan mayor sensibilidad a la luz U.V. *S. typhimurium* TA102 no presenta este marcador genético. En una caja petri con agar BHI, se sembró la cepa, tomada del cultivo de 18h., por medio de estrias, la mitad de la caja se cubrió con papel aluminio y se irradió con una lámpara germicida de luz U.V. de 15 W. a una distancia de 33 cm durante 8 segundos. Después se incubó invertida durante 18h. a 37°C. El crecimiento de la cepa en la zona irradiada y en la zona no irradiada confirmó la ausencia de la mutación en la cepa.

d) PRESENCIA DEL PLASMIDO pKM101. Este plásmido confiere a la cepa resistencia a la ampicilina. En una caja petri con BHI, se inoculó 100 μ l del cultivo de 18h. de la cepa y se dejó secar a temperatura ambiente. En el centro de la caja se colocó un y disco de papel filtro estéril de 0.6 cm y sobre este 10 μ l de una solución de ampicilina 8 mg/ml en NaOH 0.02M. Después se incubó la caja invertida durante 18h. a 37°C. La ausencia de una zona clara de inhibición rodeando al disco indicó la presencia del plásmido pKM101.

e) PRESENCIA DEL PLASMIDO pAQI. Este plásmido confiere a la cepa resistencia a la tetraciclina. En una caja petri con BHI, se inoculó 100 μ l del cultivo de 18h. de la cepa y se dejó secar a temperatura ambiente. En el centro de la caja se colocó un disco de papel filtro estéril de 0.6 cm y sobre este 10 μ l de una solución de tetraciclina 8 mg/ml en HCl 0.02M. Después la caja se incubó durante 18h. a 37°C. La ausencia de una zona clara de inhibición rodeando al disco, indicó la presencia del plásmido (Maron y Ames 1983).

f) FRECUENCIA DE REVERSION ESPONTANEA. En tubos de ensaye (13 x 100) con tapón de rosca, con 2 ml de agar suave con requerimientos mínimos de histidina y biotina 0.5 mM (ver apéndice I), derretido a 45°C., se inoculó 100 μ l del cultivo de 18h., de la cepa. Los tubos se agitaron en un vortex (Fisher modelo 12-812), su contenido se virió en cajas petri con medio mínimo de Vogel-Boner y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Las cajas petri se incubaron invertidas durante 48h. a 37°C. Después se contó el número de revertantes espontáneas en un cuenta colonia (Fisher Accu-Lite modelo 133-8002). Para la cepa *S. typhimurium* TA102, se consideró adecuado, un rango de 240 a 320 revertantes por caja petri, según Maron y Ames 1983.

ENSAYOS DE SOBREVIDA.

A partir de un cultivo de 16h. de *S. typhimurium* en caldo nutritivo se hicieron suspensiones con solución salina isotónica (NaCl 0.85%) hasta tener 1×10^4 U.F.C./ml (Unidades Formadoras de Colonias). Posteriormente, 100 μ l de esta solución se adicionaron a una serie de tubos de ensaye (13 x 100) con tapón de rosca, con 2 ml de agar nutritivo al (0.6%) y 10 μ l de una solución de β -caroteno diluido en aceite mineral de parafina o 10 μ l de una solución de α -tocoferol diluido en DMSO, en concentraciones decimales crecientes de 0.15 μ g/caja a 1500 μ g/caja y de 0.4 μ g/caja a 4000 μ g/caja respectivamente. Como control negativo se utilizó a la cepa sola, es decir, libre del efecto de la solución antioxidante.

Los tubos de ensaye con los compuestos fueron agitados por tres segundos en un vortex (Fisher modelo 12-812), su contenido se virvió en cajas petri con agar BHI, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó las cajas invertidas durante 24h. a 37°C.

Finalmente se contó el número de U.F.C./caja mediante un cuenta colonias (Fisher Accu-Lite modelo 133-8002) y se determinó el porcentaje de sobrevida en base al número de U.F.C. obtenido en la caja petri control (100%).

PREPARACION DE MEZCLA S9

La mezcla S9 se preparó disolviendo 26 mg de NADP, 60 mg de Glucosa 6 fosfato, 18 ml de un buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.4 y 200µl de una solución de cloruros (KCl 1.65 M + MgCl₂ 0.4 M). La mezcla se esteriliza por filtración a través de una membrana milipore con poro de 45µm. Posteriormente, en condiciones asépticas se adicionaron 2 ml de una solución de hígado de rata inducido con Aroclor-1254. La mezcla S9, empleada para ensayos de mutagénesis y antimutagénesis se trabaja manteniendo todo el ensayo introducido en una bandeja con hielos.

ENSAYO DE MUTAGENESIS CON EL METODO DE AMES.

En una serie de tubos de ensaye (13 x 100) con tapón de rosca, se adicionó por tubo, 100 µl de un cultivo de 16h. de la cepa (1 x 10⁷), 500 µl de mezcla S9 (ver anexo) y 10 µl de una solución de β-caroteno diluido en aceite mineral de parafina o 10 µl de una solución de α-tocoferol diluido en DMSO, en concentraciones crecientes de 15 µg/caja a 1500 µg/caja y de 40 µg/caja a 4000 µg/caja respectivamente.

Los tubos de ensaye con los compuestos se incubaron en un baño María con agitación a 120 rpm durante 1h. a 37°C. Después se agregó a cada tubo 2 ml de agar suave, con requerimientos mínimos de histidina y biotina (0.5 mM), derretido a 45°C., se agitaron por tres segundos en un vortex (Fisher modelo 12-812) y se vertieron en cajas petri con medio mínimo de Vogel-Boner, el contenido de las cajas se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron invertidas durante 48h. a 37°C. Finalmente se contó el número de revertantes histidina + en un cuenta colonias (Fisher Accu-Lite modelo 133-8002).

Para cada experimento se incluyó como control a la cepa libre de compuestos, como controles negativos la cepa con mezcla S9 y la cepa con cada uno de los solventes usados para las soluciones antioxidantes. En los controles positivos se usaron mutágenos conocidos (Mitomicina C y 2-aminoantraceno), de acuerdo a las recomendaciones de Maron y Ames, 1983.

Se consideró al compuesto como mutagénico si fue capaz de inducir el doble de las revertantes espontáneas de la cepa y si incrementada la dosis pudo graficarse una curva dosis respuesta.

ENSAYO DE ANTIMUTAGENESIS CON EL METODO DE AMES.

En una serie de tubos de ensaye (13 x 100) con tapón de rosca, se adicionó por tubo, 100 µl de un cultivo de 16h. de la cepa, 10 µl de una solución de ácido pipemídico ó 10 µl de una solución de norfloxina ó 10 µl de una solución de ácido naidixico, cada una diluida con NaOH 0.001N, en concentraciones crecientes de 3.5 a 700 µg/caja, de 0.035 a 700 µg/caja y de 0.01 a 100 µg/caja respectivamente, 500 µl de mezcla S9 y 10 µl de una solución de β-caroteno diluido en aceite mineral de parafina ó 10 µl de una solución de α-tocoferol diluido en DMSO, en concentraciones crecientes de 150 µg/caja a 3000 µg/caja y de 400 a 4000 µg/caja respectivamente.

Los tubos de ensaye con los compuestos se incubaron en un baño María con agitación a 120 rpm durante 1h. a 37°C. Después se agregó a cada tubo 2 ml de agar suave, con requerimientos mínimos de histidina y biotina (0.5 mM), derretido a 45°C., se agitaron por tres segundos en un vortex (Fisher modelo 12-812) y se vertieron en cajas petri con medio mínimo de Vogel-Boner, el contenido de las cajas petri se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubaron invertidas durante 48h. a 37°C. Finalmente se contó el número de revertantes histidina + en un cuenta colonias.

En cada experimento se incluyó como control a la cepa libre de compuestos, los controles negativos fueron la cepa con mezcla S9 y la cepa con cada uno de los solventes utilizados en las soluciones de antibióticos y en las soluciones antioxidantes. Para los controles positivos se usaron mutágenos conocidos (Mitomicina C y 2-aminoantraceno) recomendados por Maron y Ames, 1983.

Se consideró al compuesto como antimutagénico si fue capaz de reducir el número de revertantes inducidas por el fármaco estudiado a las obtenidas en el control negativo.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (M.I.C.)

La concentración mínima inhibitoria se realizó con la técnica de dilución en placa de agar, según lo recomendado por (Waitz 1990)

a) PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI.

En una serie de tubos de ensaye (13 x 100) con tapón de rosca, se agregó por tubo, 10 µl de una solución de ácido pipemídico ó 10 µl de una solución de norfloxacin a ó 10 µl de una solución de ácido nalidíxico, cada una diluida con NaOH 0.001N, en concentraciones crecientes de 0.7 µg/ml a 700 µg/ml, de 0.007 µg/ml a 700 µg/ml y de 0.0015 µg/ml a 150 µg/ml respectivamente, 500 µl de mezcla S9 y 10 µl de una solución de β-caroteno diluido en aceite mineral de parafina, en concentraciones crecientes de 15 µg/ml a 300 µg/ml.

El contenido de los tubos se llevó a 1 ml con Buffer de fosfato pH 7.4, se agitaron manualmente y se vertieron en cajas petri, a las que se les adicionó 9 ml de agar Mueller Hinton, derretido a 45°C. Las cajas se agitaron manualmente, con movimientos circulares, para mezclar los componentes y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Como control se utilizaron cajas petri preparadas en la forma citada pero sin β -caroteno.

b) ESTUDIO DEL EFECTO BACTERICIDA.

Se estudio el efecto bactericida de los antibióticos con y sin β -caroteno para 20 cepas de *Escherichia coli* uropatógenas aisladas de pacientes que acudieron al Laboratorio de Investigación Microbiológica del Hospital Juárez de México y la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102. De cada una de las cepas bacterianas se hizo un cultivo de 16h. en caldo nutritivo, del cual se hicieron suspensiones con solución salina isotónica (NaCl 0.85%) hasta tener 1×10^5 U.F.C./ml. Posteriormente, con una micropipeta clinipette se agregó, por caja petri, 10 μ l de cada uno de los 21 cultivos bacterianos. Los inoculos se colocaron en hileras sobre la superficie del agar separados unos de otros por una distancia de 4 a 5mm, se esperó hasta que secaron a temperatura ambiente y se incubaron las cajas invertidas durante 18h. a 37°C. Después se observó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en los inoculos.

Finalmente se calculó el porcentaje de cepas resistentes y sensibles que presentó cada una de las cajas petri con las diferentes dosis de los medicamentos, en presencia y ausencia del β -caroteno, para determinar su efecto sobre la acción bactericida de los medicamentos.

RESULTADOS.

TOXICIDAD DE B-CAROTENO Y ALFA TOCOFEROL

Al inicio de este estudio, con el fin de conocer el efecto tóxico del B-caroteno y α -tocoferol, se realizaron ensayos de sobrevida, en los que se observó que las dosis más altas estudiadas de los antioxidantes, β -caroteno 1500 $\mu\text{g}/\text{caja}$ (tabla # 1) y α -tocoferol 4000 $\mu\text{g}/\text{caja}$ (tabla # 2), no tuvieron efectos tóxicos en la cepa *S. typhimurium*. TA102.

EFFECTO MUTAGENICO DE BETA CAROTENO Y ALFA TOCOFEROL.

Una vez descartado el posible efecto tóxico de estas sustancias se realizaron ensayos de mutagénesis (figura # 1), en los que se comprobó que el β -caroteno y el α -tocoferol no presentaron efectos mutagénicos sobre la cepa en estudio, con las mismas concentraciones utilizadas en los ensayos de sobrevida.

EFFECTO ANTIMUTAGENICO DE ALFA TOCOFEROL.

En cuanto se comprobó que el β -caroteno y el α -tocoferol no fueron tóxicos o mutagénicos para la cepa de *S. typhimurium* TA102, se procedió a trabajar estas sustancias en ensayos de antimutagénesis.

Los resultados obtenidos en estos ensayos de antimutagénesis con α -tocoferol, mostraron que dosis entre 40 y 4000 $\mu\text{g}/\text{caja}$ no fueron capaces de disminuir el efecto mutagénico inducido por la norfloxacin como se observa en la figura # 3, ni el efecto mutagénico inducido por el ácido pipemídico, como se observa en la figura # 2, en la cepa. Por tal motivo el α -tocoferol de la marca Roche no se utilizó en este trabajo para realizar estudios de MIC o como antimutágeno en ácido nalidíxico.

TABLA 1

PRUEBA DE SOBREVIVENCIA EN *Salmonella typhimurium* TA102 CON β -CAROTENO

COMPUESTO EN $\mu\text{g}/\text{CAJA}$	UFC/CAJA	% DE SOBREVIVENCIA
0.0	943	100.0
10 μl DE ACEITE MINERAL DE PARAFINA	919	97.4
β -CAROTENO		
0.15	916	97.1
1.5	906	96.1
15.0	944	100.1
150.0	906	96.1
1500.0	863	91.4

Cada dato representa el promedio de nueve cajas efectuadas en tres ensayos diferentes.

TABLA 2

PRUEBA DE SOBREVIVENCIA EN *S. typhimurium* TA102 CON α -TOCOFEROL

COMPUESTO EN $\mu\text{g}/\text{CAJA}$	UFC/CAJA	% DE SOBREVIVENCIA
0.0	719	100.0
10 μl DE DMSO	714	99.1
α -TOCOFEROL		
0.4	726	100.9
4.0	687	95.5
40.0	700	97.3
400.0	682	94.7
4000.0	723	100.4

Cada dato representa el promedio de nueve cajas efectuadas en tres ensayos diferentes.

MUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO Y ALFA-TOCOFEROL

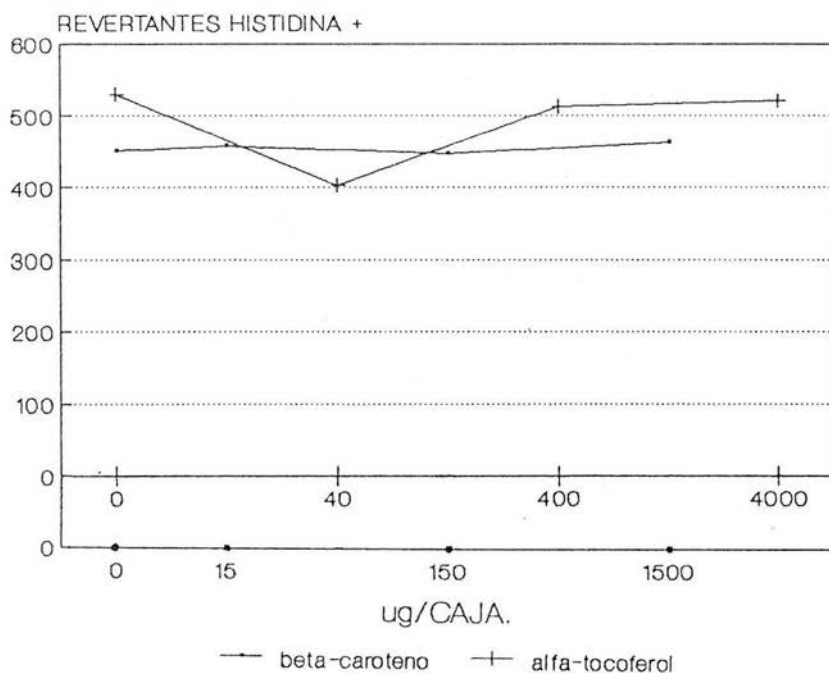


FIGURA 1

Estudio del efecto mutagénico de α -tocoferol y β -caroteno en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. Unidades Internacionales (2 U.I. = 4mg α -tocoferol, 800 U.I. = 1.5mg de β -caroteno). Reversión espontánea de TA102 (509) Revertantes Histidina +. Controles positivos: Mitomicina C (5736), 2-aminoantraceno (1822).

ANTIMUTAGENESIS DE ALFA-TOCOFEROL EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO PIPEMIDICO

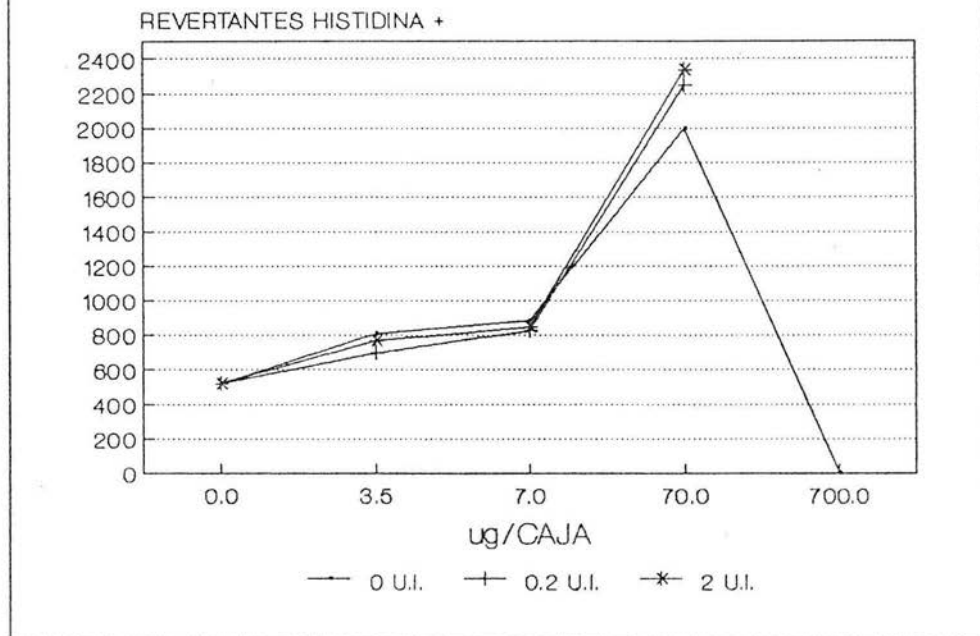


FIGURA 2

Efecto antimutagénico de α -tocoferol en mutaciones inducidas por ácido pipemídico en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. unidades internacionales (2 U.I. = 4mg de α -tocoferol). Reversión espontánea de TA102 (591) Revertantes Histidina ⁺, Controles positivos: Mitomicina C (1946), 2-aminoantraceno (1822).

- Mutaciones inducidas con ácido pipemídico sin α -tocoferol
- + Efecto con 0.2 U.I. de α -tocoferol.
- * Efecto con 2 U.I. de α -tocoferol.

ANTIMUTAGENESIS DE ALFA-TOCOFEROL EN MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA

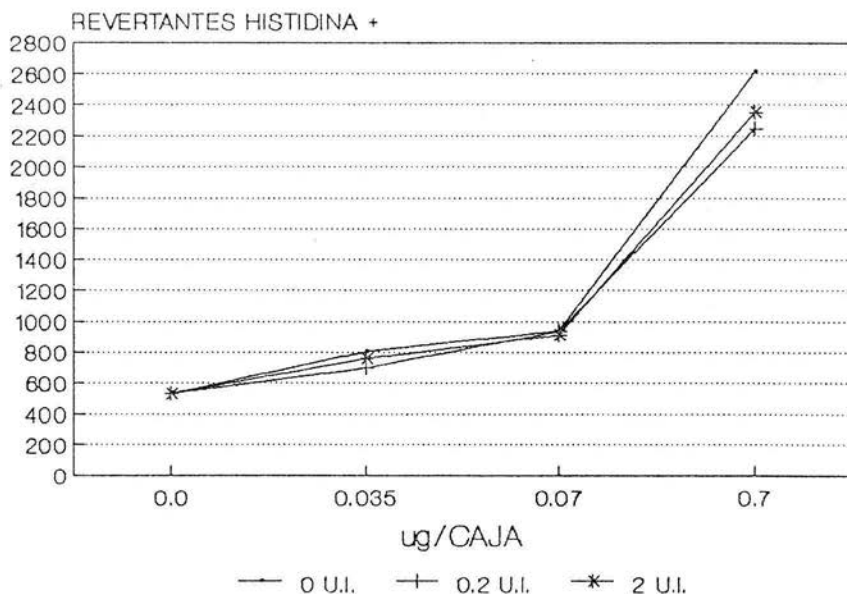


FIGURA 3

Efecto antimutagénico del α -tocoferol en mutaciones inducidas por norfloxacin en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. unidades internacionales (2 U.I. = 4mg α -tocoferol). Reversión espontánea de TA102 (474) Revertantes Histidina +, Controles positivos: Mitomicina C (8144), 2-aminoantraceno (4760).

- Mutaciones inducidas con norfloxacin sin α -tocoferol.
- +— Efecto con 0.2 U.I. de α -tocoferol.
- *— Efecto con 2 U.I. de α -tocoferol.

EFEECTO ANTIMUTAGENICO DE BETA CAROTENO.

Los resultados obtenidos en ensayos de antimutagénesis con β -caroteno, mostraron que este compuesto fue capaz de inhibir las mutaciones inducidas por ácido pipemídico en *S. typhimurium* TA102 empleando el método de preincubación con la mezcla S9, como se muestra en la figura 4.

Este efecto antimutagénico también se observó sobre mutaciones inducidas por norfloxacin, con el mismo método, como se observa en la figura 5. Así mismo, estudiando una quinolona previamente reportada como generadora de radicales libres, ácido nalidíxico (De Marini y Lawrence 1992), en este estudio se muestra que el β -caroteno fue antimutagénico sobre mutaciones inducidas por esta en la prueba de Ames (figura 7). El efecto mutagénico de norfloxacin no pudo ser inhibido por β -caroteno cuando la vitamina no fue tratada con la mezcla S9 (figura 6).

ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO PIPEMIDICO

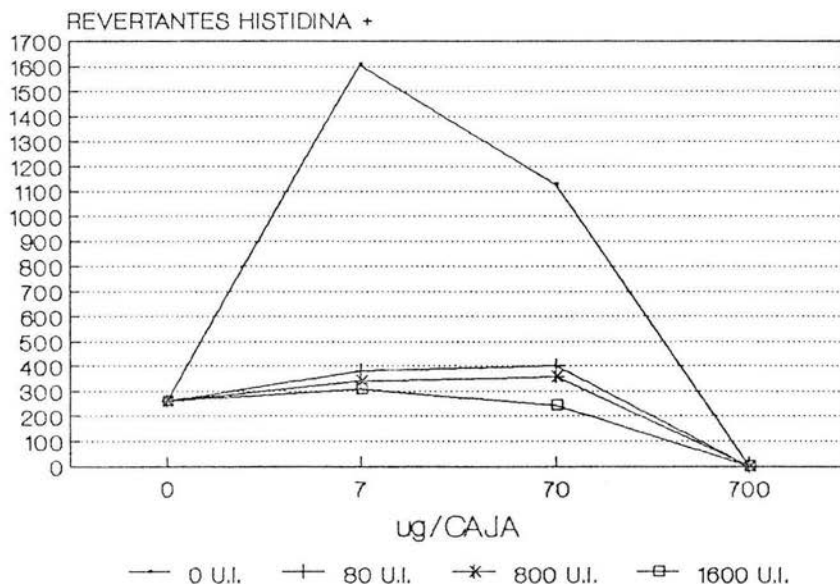


FIGURA 4

Efecto antimutagénico del β -caroteno en mutaciones inducidas por ácido pipemídico en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. unidades internacionales (1600 U.I. = 3mg de β -caroteno). Reversión espontánea de TA102 (361) Revertantes Histidina ⁺, Controles positivos: Mitomicina C (1089), 2-aminiantraceno (3398).

- Mutaciones inducidas con ácido pipemídico sin β -caroteno.
- + Efecto antimutagénico con 80 U.I. de β -caroteno.
- * Efecto antimutagénico con 800 U.I. de β -caroteno.
- Efecto antimutagénico con 1600 U.I. de β -caroteno.

**ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN
MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA
CON ACTIVACION METABOLICA.**

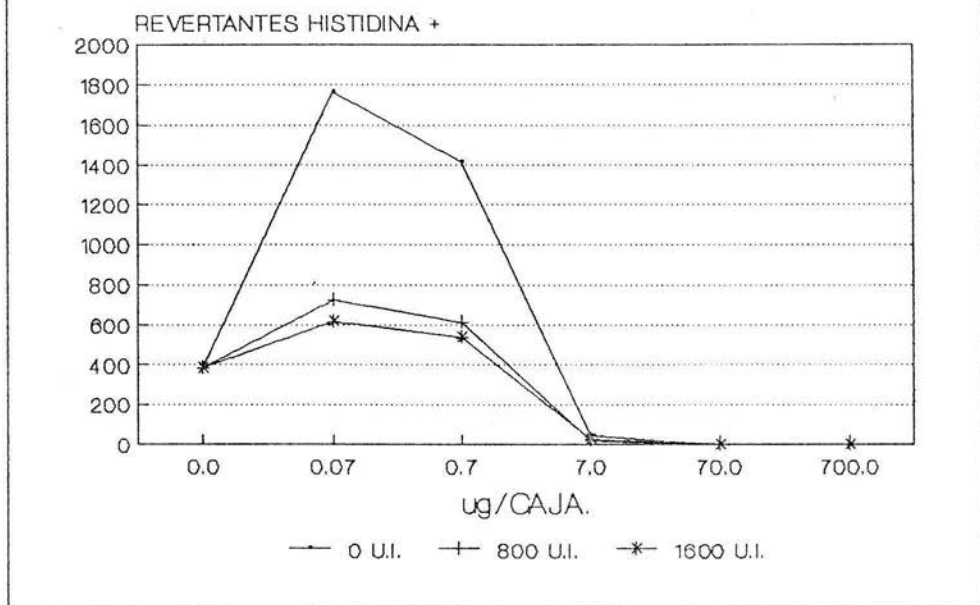


FIGURA 5

Efecto antimutagénico del β -caroteno en mutaciones inducidas por norfloxacin en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. unidades internacionales (1600 U.I. = 3mg de β -caroteno). Reversión espontánea de TA102 (401) Revertantes Histidina ⁺, Controles positivos: Mitomicina C TOXICA, 2-aminoantraceno (1709).

- Mutaciones inducidas con norfloxacin sin β -caroteno.
- + Efecto antimutagénico con 800 U.I. de β -caroteno.
- * Efecto antimutagénico con 1600 U.I. de β -caroteno.

ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN
MUTACIONES INDUCIDAS POR NORFLOXACINA
SIN ACTIVACION METABOLICA

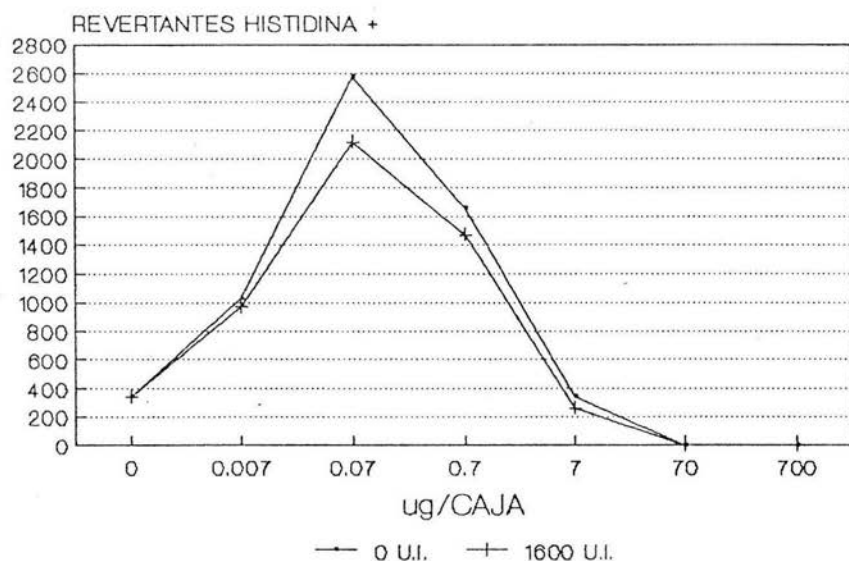


FIGURA 6

Efecto antimutagénico del β -caroteno en mutaciones inducidas por norfloxacin en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación sin activación metabólica. U.I. unidades internacionales (1600 U.I. = 3mg de β -caroteno). Reversión espontánea de TA102 (357) Revertantes Histidina +, Control positivo: Mitomicina C (7752).

- Mutaciones inducidas con norfloxacin sin β -caroteno.
- ×— Efecto con 1600 U.I. de β -caroteno.

ANTIMUTAGENESIS DE BETA-CAROTENO EN MUTACIONES INDUCIDAS POR ACIDO NALIDIXICO

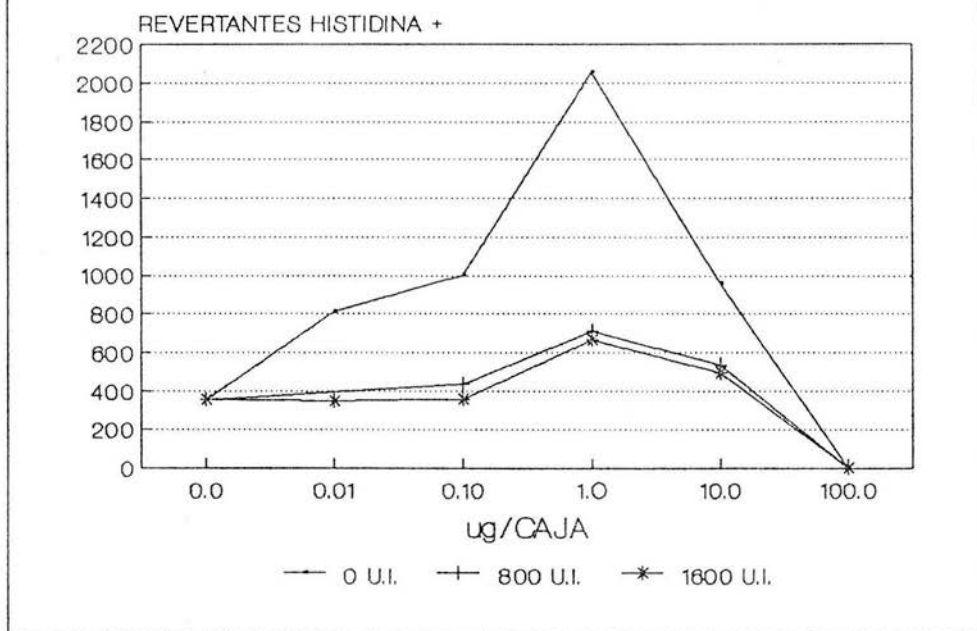


FIGURA 7

Efecto antimutagénico del β -caroteno en mutaciones inducidas por ácido nalidíxico en *S. typhimurium* TA102, utilizando el método de preincubación con activación metabólica. U.I. unidad internacional (1600 U.I. = 3mg de β -caroteno). Reversión espontánea de TA102 (322) Revertantes Histidina +, Controles positivos: Mitomicina C (2646), 2-aminoantraceno (969).

- Mutaciones inducidas con ácido nalidíxico sin β -caroteno.
- +— Efecto antimutagénico con 800 U.I. de β -caroteno.
- *— Efecto antimutagénico con 1600 U.I. de β -caroteno.

EFEECTO DEL B-CAROTENO EN LA ACCION BACTERICIDA DE ACIDO PIPEMIDICO, NORFLOXACINA, Y ACIDO NALIDIXICO.

Como se muestra en la tabla 3 la concentración bactericida del ácido pipemídico, la norfloxacin y el ácido nalidíxico no varió en las placas que contenían 300 $\mu\text{g/ml}$ de β -caroteno (equivalentes a 1600 U.I.) comparadas con las cajas que no contenían el antimutágeno.

En estas pruebas se consideró que el β -caroteno no interfirió con el efecto bactericida de los tres antibióticos, por no estar presente la mezcla S9.

Por lo que se realizaron pruebas en presencia de mezcla S9. En estos estudios (tabla 4) se demostró que el ácido pipemídico, la norfloxacin y el ácido nalidíxico en presencia de la mezcla S9, mostraron el mismo patron de sensibilidad con o sin β -caroteno

TABLA 3

EFEECTO DEL β -CAROTENO SOBRE LA ACCION BACTERICIDA DE QUINOLONAS EN AUSENCIA DE MESCLA S9

CONCENTRACION DEL ANTIBIOTICO EN $\mu\text{g/ml}$	CONCENTRACION DEL β -CAROTENO EN $\mu\text{g/ml}$	% DE SENSIBLES	% DE RESISTENTES
ácido pipemídico			
0.7	0	0.0	100.0
0.7	300	0.0	100.0
7.0	0	33.4	66.6
7.0	300	33.4	66.6
70.0	0	33.4	66.6
70.0	300	33.4	66.6
700.0	0	100.0	0.0
700.0	300	100.0	0.0
norfloxacin			
0.007	0	0.0	100.0
0.007	300	0.0	100.0
0.07	0	33.4	66.6
0.07	300	33.4	66.6
0.7	0	33.4	66.6
0.7	300	33.4	66.6
7.0	0	33.4	66.6
7.0	300	33.4	66.6
70.0	0	62.0	38.0
70.0	300	62.0	38.0
700.0	0	100.0	0.0
700.0	300	100.0	0.0
ácido nalidíxico			
0.015	0	0.0	100.0
0.015	300	0.0	100.0
0.15	0	4.8	95.2
0.15	300	4.8	95.2
1.5	0	28.6	71.4
1.5	300	28.6	71.4
15.0	0	33.4	66.6
15.0	300	33.4	66.6
150.0	0	38.1	61.9
150.0	300	38.1	61.9

Cada dato representa el promedio de ocho cajas efectuadas en cuatro ensayos diferentes.

TABLA 4

EFEECTO DEL β -CAROTENO SOBRE LA ACCION BACTERICIDA DE QUINOLONAS EN PRESENCIA DE MEZCLA S9.

CONCENTRACION DEL ANTIBIOTICO EN $\mu\text{g/ml}$	CONCENTRACION DEL β -CAROTENO EN $\mu\text{g/ml}$	% DE SENSIBLES	% DE RESISTENTES
ácido pipemídico			
0.7	0	0.0	100.0
0.7	300	0.0	100.0
7.0	0	33.4	66.6
7.0	300	33.4	66.6
70.0	0	33.4	66.6
70.0	300	33.4	66.6
700.0	0	100.0	0.0
700.0	300	100.0	0.0
norfloxacina			
0.7	0	33.4	66.6
0.7	300	33.4	66.6
7.0	0	33.4	66.6
7.0	300	33.4	66.6
70.0	0	62.0	38.0
70.0	300	62.0	38.0
700.0	0	100.0	0.0
700.0	300	100.0	0.0
ácido nalidíxico			
0.15	0	33.4	66.6
0.15	300	33.4	66.6
1.5	0	33.4	66.6
1.5	300	33.4	66.6
15.0	0	33.4	66.6
15.0	300	33.4	66.6
150.00100.00.0			
150.0300100.00.0			

Cada dato representa el promedio de ocho cajas efectuadas en cuatro ensayos diferentes.

DISCUSION

En trabajos anteriores, se ha reportado que los metabolitos del ácido pipemídico y la norfloxacin no son capaces de producir mutaciones puntuales, por corrimiento de formato o por substitución de bases en el par GC, en las cepas de la prueba de Ames (TA98, TA100 y UTH8414), pero la norfloxacin o sus metabolitos fueron capaces de inducir mutaciones en las cepas TA102 y TA104, mientras que los metabolitos de ácido nalidíxico, generados *in vitro* en presencia de hígado de rata inducida con aeroclor 1254 fueron mutagénicos para la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102 (Arriaga Alba et.al. 1994, Barron Moreno 1995). También se ha demostrado, que algunas quinolonas como el ácido nalidíxico y oxolónico, con estructura similar al ácido pipemídico y norfloxacin, son capaces de revertir a la cepa TA102 mediante transiciones, transversiones y delesiones (Goke 1991). Estas cepas *hisG428* (TA102 y TA104), a diferencia de anteriores *hisG46*, detectan mutágenos por substitución de bases en el par AT., y fueron diseñadas para la detección de mutágenos oxidativos (Levin et.al. 1982).

En el presente trabajo sólo se utilizó la cepa de *S. typhimurium* TA102, con el método modificado de preincubación de la prueba de Ames, con activación metabólica, por que permite detectar el efecto mutagénico de estas quinolonas a diferentes dosis. Considerando los resultados antes mencionados, se puede pensar que estos antibióticos inducen mutaciones puntuales en el DNA mediante un mecanismo similar el cual implica la generación de radicales libres.

La principal causa endógena de lesiones en el DNA, son los radicales libres oxígeno, así mismo, debido a que los compuestos oxidativos exógenos pueden producir daños severos al DNA, (Ames et.al. 1985, Feig et.al. 1994), se ha hecho necesaria la búsqueda de sustancias que prevengan o disminuyan el daño ocasionado al DNA

por especies reactivas de oxígeno. Consecuentemente, en este trabajo se estudio si la actividad mutagénica de las quinolonas; norfloxacin, ácido pipemídico y ácido nalidíxico, puede ser reducida con componentes antioxidantes que se encuentren normalmente en la dieta.

El β -caroteno y el α -tocoferol son potentes antioxidantes (Burton e Ingold 1984, Niki et. al, 1987) utilizados en la industria alimenticia como preservadores (Lawrence 1990), que de manera natural se encuentran en muchos alimentos en cantidades minutas, su función es atrapar radicales libres y se ha reportado que pueden funcionar como anticarcinógenos (Ames 1983).

La vitamina A, cuyo precursor es el β -caroteno, puede ser tóxica en concentraciones elevadas por lo tanto, en este trabajo se aplicaron ensayos de sobrevida y ensayos de mutagénesis con el método de Ames, independientemente para α -tocoferol y β -caroteno, en los que se determinó que estos antioxidantes (en concentraciones de 4000 y 3000 $\mu\text{g}/\text{caja}$ respectivamente) no presentaron efectos tóxicos o mutagénicos para la cepa *S. typhimurium* TA102.

Posteriormente se aplicaron ensayos de antimutagénesis con el método de Ames, en los que se encontró que el α -tocoferol, contrariamente a lo que se esperaba, no tuvo ningún efecto antimutagénico (ver figuras # 2 y 3), el número de revertantes histidina + es muy similar al valor obtenido con los antibióticos (ácido pipemídico y norfloxacin) en ausencia del α -tocoferol. Sin embargo, estos resultados se explican por que generalmente los laboratorios que producen y comercializan el α -tocoferol presentan a este producto en forma de acetato de α -tocoferol. En esta forma se dificulta que el grupo fenólico, responsable de la captura del oxígeno, reaccione con el mismo, originado así que el acetato de α -tocoferol pueda ser un compuesto más estable, sin embargo esto también impide su función como antioxidante (Lawrence 1990).

Por otro lado se considera la hipótesis de que el acetato de α -tocoferol en presencia de β -NADP, G6P y citocromo P450 pueda sufrir reacciones de óxido-reducción generando acetaldehído que es mutagénico para *S. typhimurium* TA102 (Levin et, al. 1982). Debido a esto aquí terminaron la investigaciones que se realizaron con α -tocoferol, haciéndose la observación de que es necesario la utilización de vitamina E químicamente pura d- α -tocoferol con un grado de pureza del 95%, para poder completar este trabajo.

En los ensayos de antimutagénesis con β -caroteno, utilizando el método modificado de preincubación con activación metabólica *in vitro* de la prueba de Ames, se encontró que el β -caroteno fue capaz de contrarrestar el efecto mutagénico del ácido pipemídico, la norfloxacina y el ácido nalidíxico. Estos resultados dejan en claro que el mecanismo por el cual estos antibióticos inducen mutaciones en el ADN de la cepa TA102 es debido a la generación de radicales libres, ya que en presencia del β -caroteno, el cual es un atrapador de radicales libres (Burton e Ingold 1984), el efecto mutagénico de estos antibióticos desaparece. También hay que hacer notar que el efecto antimutagénico del β -caroteno se logró con dosis de 800 U.I. de β -caroteno para ácido pipemídico y 1600 U.I. para norfloxacina y ácido nalidíxico, estas dosis son inferiores a las dosis terapéuticas recomendadas para pacientes con deficiencia de vitamina A 5000 U.I. (Krause 1970). Estos resultados nos dan una pauta para sugerir que una dieta rica en alimentos con β -caroteno, como el jugo de zanahoria y otros vegetales amarillos, junto con la toma de los medicamentos puede ser de mucha utilidad en la prevención de posibles daños genotóxicos en pacientes tratados con estas quinolonas.

Por otro lado, se observó que el efecto antimutagénico del β -caroteno no fue notorio en norfloxacina cuando no se utilizó la mezcla S9 figura # 7, lo que sugiere que la molécula de β -caroteno tiene que ser escindida, por las enzimas del hígado de rata (mezcla S9), en dos moléculas de vitamina A, para que su efecto

antimutagénico pueda ser observado (actividad biológica de vitamina A). Para comprobar esto puede repetirse este trabajo utilizando algunas presentaciones de la vitamina A disponibles en el comercio como All trans Retinol al 70% o 13-cis-retinol al 85%. La norfloxacin se estudió de esta manera por que es el único antibiótico que por si mismo induce mutaciones en la cepa TA102.

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren con los obtenidos por Han en 1992, él en su experimento sobre el efecto de 5 antimutágenos comunes de la dieta (β -caroteno, ácido retinoico, vitamina A, vitamina C y vitamina E) observó que ninguno inhibió las mutaciones en la cepa TA104 inducidas por peróxido de hidrógeno. Esto posiblemente se debe a que los radicales libres actúan por diferentes mecanismos y por tanto son inhibidos por diferentes tipos de antimutágenos. Consecuentemente, el hecho de que el β -caroteno haya funcionado como un buen antimutágeno para inhibir el efecto mutagénico inducido por estos antibióticos, no significa que pueda ser utilizado con el mismo éxito en contra de otros mutágenos aunque estos sean de tipo oxidativo.

Como un trabajo a parte, es conveniente probar el efecto que otros inhibidores de radicales libres tengan sobre la acción mutagénica de estas quinolonas, para así, tener una visión más clara de las especies de radicales libres generadoras de daño al DNA sobre las cuales actúa el β -caroteno.

Para conocer si el efecto antimutagénico del β -caroteno alteró la actividad bactericida del ácido pipemídico, la norfloxacin y el ácido nalidíxico, se realizaron estudios con la técnica de dilución en placa de agar, para 20 cepas de *Escherichia coli* uropatógenas y la cepa de *S. typhimurium* TA102, con activación metabólica (tabla # 3) y sin activación metabólica (tabla # 4) en los que se determinó que una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de β -caroteno no interfirió con el efecto terapéutico *in vitro* de estas tres quinolonas, independientemente de la presencia o ausencia de la mezcla S9. Estos resultados nos indican que la

actividad bactericida de los tres antibióticos no es producto de la generación de radicales libres, lo que está de acuerdo con numerosos reportes que señalan que en la bacteria, el blanco principal es la DNA girasa, una enzima bacteriana esencial para la replicación del DNA (Chu y Fernandes 1989, Drlica 1987, Sutcliffe 1989)

Consecuentemente, con los resultados de este estudio, se demuestra la utilidad que puede tener, aconsejar al paciente una dieta rica en β -caroteno durante el tratamiento con quinolonas, para disminuir posibles riesgos de daños genotóxicos, empleando una antimutágeno que se encuentra en forma natural y que no alterara el efecto bactericida de los fármacos a las dosis terapéuticas estudiadas.

CONCLUSIONES

- 1.- El α -tocoferol y el β -caroteno no son tóxicos ni mutagénicos para la cepa *Salmonella typhimurium* TA102.
- 2.- El preparado farmacéutico de la vitamina E, marca Roche, no inhibe las mutaciones por substitución de bases que el ácido pipemídico, la norfloxacina y el ácido nalidíxico, inducen en la cepa *Salmonella typhimurium* TA102.
- 3.- El β -caroteno es antimutagénico en mutaciones inducidas por el ácido pipemídico, la norfloxacina y el ácido nalidíxico en *Salmonella typhimurium* TA102.
- 4.- El efecto mutagénico producido por el ácido pipemídico, la norfloxacina y el ácido nalidíxico, en *Salmonella typhimurium* TA102, se debe a la generación de radicales libres, que al ser capturados por el β -caroteno inhibe su efecto mutagénico.
- 5.- El β -caroteno es un antioxidante que no interfiere con la actividad bactericida del ácido pipemídico, la norfloxacina y el ácido nalidíxico.
- 6.- Los metabolitos del β -caroteno, generados *in vitro*, tampoco afectan la actividad bactericida de las tres quinolonas estudiadas.
- 7.- El β -caroteno puede ser útil en la dieta de pacientes tratados con quinolonas para disminuir posibles riesgos genotóxicos.

APENDICE

*MEDIO MINIMO DE VOGEL BONNER.

Ingredientes	para 400.0 ml
A) Agar.....	7.5 g
Dextrosa.....	10.0 g
Agua destilada.....	400.0 ml
B) SALES DE VOGEL BONNER.	para 100 ml
Sales de Vogel-Bonner.....	10 ml
Agua destilada.....	90 ml

Esterilizar a 121°C a 20 psi por 20 minutos por separado.
Mezclar y distribuir en cajas petri.

*SALES DE VOGEL BONNER

Ingredientes	para 1000 ml
Agua Destilada a 45°C	670 ml
Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).....	10 g
Acido Cítrico monohidratado.....	100 g
Fosfato de Potasio dibásico (anidro) (K_2HPO_4).....	500 g
Fosfato de Sodio y Amonio ($\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....	175 g

Agregar las sales en el orden indicado en un matraz de 2 litros con agua destilada a 45°C y agitación magnética. Permita que cada sal se disuelva completamente antes de agregar la siguiente. Distribuya la solución en matraces de 1 litro con tapón de algodón. Esterilice en autoclave durante 20 minutos a 121°C .

*SOLUCION DE HISTIDINA 0.1 M/BIOTINA 0.5 mM CONCENTRADA.

Ingredientes	para 100 ml
L-Histidina 0.1 M.....	1.5516 g
D-Biotina 0.5 mM.....	0.0122 g
Agua destilada (H ₂ O).....	100 ml

Disuelva la histidina por calentamiento en agua a punto de ebullición. Esterilice en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Almacenar la solución en botellas de vidrio a 4°C.

En ensayo de mutagénesis agregar 10 ml por cada 100 ml de agar top.

*SOLUCION DE HISTIDINA 0.5 mM/BIOTINA 0.5 mM REQUERIMIENTOS MINIMOS

Ingredientes	para 100 ml
l-Histidina 0.5 mM.....	0.0077 g
D-Biotina 0.5 mM.....	0.0122 g
Agua destilada (H ₂ O).....	100 ml

*SOLUCION DE AMIPICILINA.

Ingredientes	para 100.0 ml
Solución de Ampicilina (8mg/ml).....	0.8 g
Hidróxido de Sodio (NaOH (0.02N).....	100.0 ml

No es necesario esterilizar la solución de ampicilina, pero debe ser filtrada en filtros de membrana de 0.22- μ m. Almacenar en botellas de vidrio a 4°C.

*SOLUCION DE TETRACICLINA.

Ingredientes	para 100.0 ml
Solución de Tetraciclina (8mg/ml).....	0.8 g
Acido Clorhídrico (HCl) (0.02 N).....	100.0 ml

*AGAR SUAVE (DE SUPERFICIE)

Ingredientes	para 1000 ml
Agar.....	6 g
Cloruro de Sodio (HCl).....	5 g
Agua destilada.....	1000 ml

Mezcle completamente las sustancia y transfiera alicuotas de 100 ml en botellas de vidrio de 250 ml con tapón de rosca. Esterilice en autoclave durante 20 minutos a 121°C, con el tapón flojo. Deje enfriar y apriete el tapón. Almacenar la mezcla a 4°C.

*BUFFER DE FOSFATOS (0.2M) pH 7.4 PARA ENSAYOS DE MUTAGENESIS CON MEZCLA S9.

Ingredientes	para 500 ml
Fosfato monobásico de Sodio (0.2) (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)... (13.8 g/500 ml)	60 ml
Fosfato dibásico de Sodio (0.2) (Na ₂ HPO ₄).....	440 ml
(14.2 g/500 ml)	

Estos son valores aproximados. Revisar el pH. Si es muy bajo agregar Fosfato dibásico de Sodio (0.2M) pH 7.4. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos. .

*MEZCLA S9 PARA ENSAYOS DE MUTAGENESIS

	para 20.0 ml
β -NADP.....	0.026 g
G6P.....	0.06 g
Buffer de Fosfatos.....	18.0 ml
Homogenado de hígado de rata.....	2.0 ml
Solución de cloruros.....	200.0 μ l

*SOLUCION DE CLORUROS (1.65 KCl M +0.4 M MgCl₂) PARA ENSAYOS DE MUTAGENESIS CON S9

Ingredientes	para 100.0 ml
Cloruro de Potasio (KCl).....	12.30 g
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂ * 6 H ₂ O).....	8.14 g
Agua destilada H ₂ O.....	100.0 ml

Disolver los ingredientes en agua. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos. Almacenar en botellas de vidrio con tapón de rosca a 4°C.

BIBLIOGRAFIA.

- ARRIAGA ALBA, M., BARRON, M.F., FLORES P.R., y CALDERON, J.E. 1994. Efecto mutagénico de quinolonas con prueba de Ames. *Enfer. Infec. Microbiol.* 14 (4): 315 (# 70).
- AMES, B. N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221: 1256 - 1263.
- AMES, B. N. 1985. Anticarcinogens, oxygen radicals and risk assessment. International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Kansas University p.p. 15.
- BAIRD, W. B. and BIRBAUN Y. 1979. Inhibition of 2-fluorenamine-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by vitamin A. *J. Natl. Cancer Inst.* 63 (4) : 1093 - 1096.
- BARRON MORENO F. 1995. Valoración de riesgo genotóxico a quinolonas (ácido pipemídico y norfloxacin) en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* polA-/polA+. Tesis Profesional de Biología. E.N.E.P. Iztacala.
- BOUTWELL, R. K. 1983. Diet and anticarcinogenesis in the mouse skin two stage model. *Cancer Research. Suppl.* 43: 2154 - 2468s.
- BURTON, G. and INGOLD, K. 1984. β -carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569 - 573.
- CLARK, C.H. and SHANKEL, D.M. 1975. Antimutagenesis in microbial systems. *Bacteriol. Rev.* 39 (1): 331 - 53.
- CLERCH, B., BARDE, J. and LAGOSTERA M. 1992. The role of the excitation and error-prone repair system in mutagenesis by fluorinated quinolones in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 281 (3): 207 - 213.

- CHANARAT, N. 1992. Role of lipid peroxidation and antioxidants in aging process and thalassemia. *Kitasato. Arch. Exp. Med.* 65 (4): 245 - 249.
- CHU, D. and FERNANDES, P. 1989. Structure-Activity relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (2): 131 - 135.
- CURTIS, H. 1992. *Biología. Cuarta edición.* Editorial Panamericana. México. p.p. 245, 878.
- DEMARINI, D. and LAWRENCE, B. 1992. Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: Role of DNA breaks. *Mutation Research.* 267: 1 - 17.
- DOBO, K. and EASTMOND, D. A. 1994. Role of oxigen radicals in the chromosomal loss and breakage induced by the quinone-forming compounds, hidroquinone and terbutilhidroquinona. *Env. Molec. Mutagen.* 24: 293 - 300.
- DRLICA, K. 1987. The Nucleoid *In Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. F. C. NEIDHART., J. L. INGRAHAM., K. B. LOW., B. MAGASANIK., M. SCHAECHTER., and L. E. UNBARGER. American Society for Microbiology. Washington, D. C. p.p. 91 - 102.
- FEIG, D.I., REID, T.M., and LOEB, L.A. 1994. Reactive oxigen in tumorigenesis. *Cancer Res.* 54 (7 suppl) 1890s-1894s.
- FISHER, P. y BENDER, A. 1972. Valor nutritivo de los alimentos. LIMUSA-WILEY, S.A. México. p.p. 97-102, 158-159.
- FRITZ, M. 1950. *La Química de las materias colorantes naturales.* Ediciones Aguilar, S.A. España. p.p. 18-20.

- GENDREL, D., RAYMOND, J., LEGGALL, M.A., BERGERET, M. and BADOUAL, J. 1993. Use of pefloxacin after failure of initial antibiotic treatment in children with sever salmonellosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (3): 209 - 211.
- GOCKE, E. 1991. Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. Mutation Research. 248: 135 - 143.
- HAN, J. S. 1992. Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide-induced reversion in strain TA104 of *Salmonella typhimurium*. Mutation Research. 266 (2): 77 - 84.
- IKEDA, K, and TOKASAKA, T 1993. *In vitro* activity of ototopical drogs against middle ear patchens. Am. J. Otol. 14 (2): 170 - 171.
- JUNG, R., ENGELHART, G., HERBOLT, B., JACKH, R., and MULLER, W. 1992. Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research 278: 265 - 270.
- KADA, T. 1986. TASHIRO, I., TASHIRO, O and SHIRASO, Y. Antimutagens and their mode of action. En Shankel, D., Hartman, P.E., Kada, T., Hollander, A. Walson y Kundy Ed. Basic Life Science. 19 Plenum Press: 181 - 16.
- KARRER, P. and JUKER, E. 1950. Carotenoids. Elsevier Publishing Company Inc. U.S.A. p.p. 126-150.
- KERSCHNER, V.L. 1984. Nutrición y Terapéutica dietética. Tercera edición. Editoria El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. p.p.119-120, 125-126.
- KRAUSE. 1970. Nutrición y Dietética en clínica. Cuarta edición. Editorial Interamericana. México. p.p. 108-110, 112-113.

- LAWRENCE, J. M. 1990. Handbook of vitamins. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p.p. 100 - 137.
- LEHNINGER, L.A. 1983. Bioquímica. Segunda edición. OMEGA, S.A. España. p.p. 302-303, 359, 610.
- LEVIN, D., HOLLSTEIN, M., GRISTMAN, M., SXHWIERS, E. and AMES, B. 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with AT pairs at the site of mutation, detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 7445-7449.
- LEVIN, D., HOLLSTEIN, M., CHRISTMAN, M., and AMES, B. 1984. Detection of oxidative mutagens with a new *Salmonella* tester strain (TA102). Methods in Enzymology. 105: 249 - 254.
- LEVIN, D., MARNETT, L. and AMES, B. 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 4457 - 4461.
- MARON, D.M., and AMES, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella typhimurium* Mutagenicity test. Mutation Res. 113: 173- 215.
- MERCK INDEX. 1983. Decima edición. Merck & CO; Inc. USA. p.p. 1437, 1857.
- NIKI, E., YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, M., KOMURO, E., and MIYAMA, Y. 1989. Inhibition of oxidation of biomembranes by tocopherol. Annal of New York Academy of Sciences. 570: 23 - 31.
- ONG, T.M., WHONG, W.Z., STEWART, J. and BROCKMAN, H.E. 1986. Chlorophilin: A potent antimutagen agains enviromental and dietary complex mixtures. Mutation. Res. 173: 111 - 115.

- PINO, A., MAURA, A., VILLA, F., and MASCIANGELO, L. 1991. Evaluation of DNA damage induced by norfloxacin in liver and kidney of adult rats and in fetal tissues after transplacental exposure. *Mutation. Res.* 264 (2): 81 - 85.

- RODWELL, W.S. 1973. *Nutrición y dietoterapia*. Editorial Pax-México. México. p.p. 88-90.

- SANI, B.P., DAWSON, M.I., HOBBS, P.D., CHAN, R. L. and SCHIFF, L.J. 1984. Relationship between binding affinities to cellular retinoc acid - binding protein ad biological potency of a new series of retinoids. *Cancer. Res.* 44: 190 - 195.

- SAHAM, F.D, and WASHINGTON, J.A. Antibacterial Suceptibility Tests: Dilution Methods. In. BALLOWS, A. 1992. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM. fifth edition. p.p. 1117 - 1125.

- STICH, H.P. 1985. International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. Kansas University p.p. 40.

- SUTCLIFFE, J., GOOTZ, T., and BARRETT, J. 1989. Biochemical characteristics and physiological significance of major DNA topoisomerases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33 (12): 2027 - 2033.

- VERNA. A.K., SHAPAS, B.G., RICE. H.M., and BOUTWELL, R.K. 1979. Correlation of the inhibition by retinoides of tumor promoter induced mous epidermal ornithine decarboxylases activity on skin tumor promotion. *Cancer Research.* 39: 419 - 425.

- WATANABE, K., SAKAMOTO, K., and SASAKI, T. 1995. Collaborative study of interlaboratory variability in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA2638 and *Escherichia coli* WP2/pKM101 and WP2/*uvrA*/pKM101. *Mutagenesis.* 10 (3): 235 - 241.

- WATTENBERG, L. W. and LEON, J.L. 1970. Inhibition of carcinogenic action by flavones. *Cancer Res.* 30 1922-1925.
- WHITE, A. 1970. *Principios de Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill. México. p.p. 1048-1049.
- YAVELOW, J., FINLAY, T.H., KENEDY, A.R. and TROLL, W. 1983. Bowman-brik soybean proteas inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* (suppl.) 43: 2454 - 2459.
- YAVELOW, J., GIDLUND, M. and TROLL, W. 1982. Protease inhibitors from legums, effectively inhibit superoxid generation in response to TPA. *Carcinogenesis* 3 (2): 135 - 138.
- WAITZ, J. A., DOERN, G. B., FINEGOLD, M. D., GAVAN, T. L. and HACJETT, J. L. 1990. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Second Edition. NCCLS Document M7-A2 10(8):8-12.