



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Estrategia para observar protección de glutatión contra
mutagénesis dependiente de radicales libres, mediante la
prueba de Ames

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAÚL EDUARDO GARIBAY MALDONADO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
2016**



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.

Contenido

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	5
L-Glutatión reducido (GSH)	5
GHS en guisantes.....	9
Prueba de Mutagénesis de Ames.....	11
Fracción S9.	13
<i>Salmonella Typhimurium</i> TA102.	14
Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	17
Mecanismo de reparación.	18
Mecanismo de reparación en procariontes, Reparación por escisión de nucleótidos.	18
4-Nitroquinoleína-N-óxido (4NQO).....	19
Metabolismo de 4NQO.	19
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	20
La reacción de Fenton.	22
Piperlongumine (PLM).....	24
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Revisión de los marcadores moleculares.	25
Prueba de Ames.	26
Curva de dosis-respuesta de <i>S. typhimurium</i> TA102 con el mutágeno 4NQO, en la prueba de Ames.....	27
Curva de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 con GSH.	27
Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H ₂ O ₂	28
Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.....	28
Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.	28
Ensayo de evaluación de la preincubación sin H ₂ O ₂	29
Curvas de dosis-respuesta con FeCl ₂ y H ₂ O ₂ , mediante la prueba de Ames.	29
Curva de dosis-respuesta con FeCl ₂ y FeCl ₃ , mediante la prueba de Ames.	29
RESULTADOS	30

Curva de dosis-respuesta de <i>S. typhimurium</i> TA102 con el mutágeno 4NQO, en la prueba de Ames.....	30
Curva de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 con GSH.	30
Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H ₂ O ₂	31
Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.....	32
Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.	32
Ensayo de evaluación de la preincubación sin H ₂ O ₂	33
Curvas de dosis-respuesta con FeCl ₂ y H ₂ O ₂ , mediante la prueba de Ames.	33
Curva de dosis-respuesta con FeCl ₂ y FeCl ₃ , mediante la prueba de Ames.	35
DISCUSIÓN.....	36
Curvas de dosis-respuesta de <i>S. typhimurium</i> TA102 con los mutágenos 4NQO y H ₂ O ₂ en la prueba de Ames.	36
Efecto bacteriostático de GSH en <i>Salmonella typhimurium</i> TA102.	37
Inhibición de la mutagénesis al llevar a cabo la preincubación con la fracción S9.....	37
Interacción de GSH con H ₂ O ₂ y las ROS generadas en la reacción de Fenton.	38
Interacción de GSH con el hierro (Fe) en la reacción de Fenton.....	38
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS	39
AGRADECIMIENTOS.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS	44
Preparación de la fracción S9 de hígado de rata.....	44
Métodos para verificar la presencia de los marcadores genéticos y determinar la frecuencia de la reversión espontánea.	44
Experimento 1. Curva de dosis-respuesta de <i>S. typhimurium</i> TA102 con el mutágeno 4NQO.	46
Experimento 2. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.	48
Curvas de crecimiento de <i>Salmonella typhimurium</i> TA102 con GSH.....	49
Experimento 3. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	51
Experimento 4. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	52
Experimento 5. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	53
Experimento 6. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	54
Experimento 7. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	55
Experimento 8. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.	56
Experimento 9. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.	57

Experimento 10. Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H ₂ O ₂	58
Experimento 11. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.....	59
Experimento 12. Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H ₂ O ₂ , usando preincubación. .	60
Experimento 13. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.....	61
Experimento 14. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.....	63
Experimento 15. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.....	63
Experimento 16. Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.....	64
Experimento 17. Ensayo de evaluación de la preincubación con la fracción S9.....	67
Experimento 18. Ensayo de evaluación de la preincubación.....	68
Experimento 19. Ensayo de evaluación de la preincubación.....	69
Experimento 20. Ensayo de evaluación de la preincubación sin H ₂ O ₂	70
Experimento 21. Curvas de dosis-respuesta con FeCl ₂ y H ₂ O ₂	71
Experimento 22. Curva de dosis-respuesta con FeCl ₂ y FeCl ₃	73

RESUMEN

Roth *et al.* (2014) han demostrado que la forma reducida del glutatión (GSH), un tiol tripéptido no proteínico (Wu *et al.*, 2004), reduce significativamente la muerte celular de parénquima de cerebro y las meninges, mediante la neutralización de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS que pueden ser subproductos naturales de la respiración oxidativa (Adams *et al.*, 2012), y de agentes físicos o químicos externos pueden dañar el DNA y generar otros efectos nocivos (Loft *et Poulsen*, 1996). Se ha propuesto que el daño de las ROS se involucra en carcinogénesis y enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Loft *et Poulsen*, 1996).

Gracias a dicha neutralización, podríamos asumir que el GSH es capaz de reducir la muerte celular ocasionada por ROS y por lo tanto, reducir la necrosis de un tejido. La prueba bacteriana de la reversión de la mutación (Prueba de Ames) es un ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de químicos (Yoshida *et al.*, 2009). Las cepas de prueba de *Salmonella typhimurium* se han diseñado para detectar y clasificar mutágenos. Cada cepa, la cual ha sido seleccionada por su sensibilidad y especificidad, puede revertir al tipo silvestre mediante mutágenos particulares (Ames *et al.*, 1973). En particular, la cepa *Salmonella typhimurium* TA102 detecta eficientemente una gran variedad de mutágenos, entre ellos, varios hidroperóxidos (Maron *et Ames*, 1983) y otros mutágenos «oxidativos» (Wilcox *et al.*, 1990). Si el GSH neutraliza ROS, entonces podría mostrar potencial antimutagénico en la cepa de Ames (*S. typhimurium* TA102) sensible a mutágenos oxidativos. Se han realizado pruebas de Ames para medir la capacidad antimutagénica de GSH, empleado los mutágenos 4-Nitroquinoleína-N-óxido (4NQO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sin embargo, en ningún caso se ha observado exitosamente que el GSH inhiba la mutagénesis provocada por estos compuestos. Hemos observado que a ciertas concentraciones de GSH (mayores a 2 mM) se tienen un efecto bacteriostático en *S. typhimurium* TA102. Al emplear la fracción S9 en la prueba de Ames, observamos que hay inhibición de la mutagénesis por H₂O₂, probablemente porque dicha fracción posee a la enzima catalasa, la cual degrada al mutágeno. Proponemos que provocar la reacción de Fenton en el sistema de Ames podría ser la mejor elección para observar la antimutagénesis de GSH, pues dicha genera varios radicales, entre ellos algunos que son neutralizados por GSH.

Klapheck (1988) ha descrito que este compuesto se encuentra en altas concentraciones en las semillas de los guisantes (*Pisum sativum*), por lo que pensamos que, usar un extracto de este para reducir la mutagénesis de una cepa de Ames sensible a agentes oxidantes demostraría que su consumo puede ser benéfico para la salud. Sin embargo, con GSH sintético no hemos obtenido la respuesta deseada, por lo que consideramos innecesario realizar los ensayos con el extracto.

INTRODUCCIÓN

L-Glutatión reducido (GSH).

Los componentes que contienen tioles juegan un papel importante en los sistemas biológicos de protección contra el daño oxidativo, pues estos se involucran en la regulación del

metabolismo, la transducción de señales y la regulación de la expresión génica. Los oxidantes y los antioxidantes juegan un papel importante en la regulación redox mediante un desplazamiento en el equilibrio entre tioles celulares oxidados y reducidos (Winterbourn *et* Metodiewa, 1999).

La forma reducida de glutatión, es un tiol tripéptido (γ Glu-Cys-Gly; γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) no proteínico de baja masa molar que existe intercambiándose con la forma oxidada o disulfuro, GSSG (Fig. 1) (Forman *et al.*, 2009; Matamoros *et al.*, 1999; Noctor *et* Foyer, 1998; Wu *et al.*, 2004). El GSH participa en muchas reacciones relevantes, principalmente es importante porque el GSH neutraliza radicales libres y otras ROS (radical hidroxilo, radical peróxido lipídico, peroxinitrito y peróxido de hidrógeno) directa e indirectamente, mediante reacciones enzimáticas. Sin embargo, otros tioles también pueden proteger contra el daño oxidativo o inhibir la transducción de la señal. Ninguno de esos efectos puede explicarse mediante la acción de los tioles actuando a modo de precursores de GSH. Esto sugiere que pueden interactuar directamente con oxidantes más que por un mecanismo específico enzimático de GSH. Tal mecanismo puede involucrar la neutralización de radicales libres o una reacción directa con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Winterbourn *et* Metodiewa, 1999).

En tales reacciones, el GSH es oxidado a la forma GSSG (Wu *et al.*, 2004). La formación de cantidades excesivas de ROS, incluyendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y aniones superóxidos (O_2^-) es tóxica para la célula, por lo tanto, hay sistemas metabólicos desintoxicantes, los cuales son funcionalmente críticos y estrechamente controlados en la célula. La glutatión peroxidasa junto a la catalasa y superóxido dismutasa protegen a la célula del daño ocasionado por las ROS. La glutatión peroxidasa desintoxica peróxidos, con el GSH actuando como un donante de electrones en la reacción de reducción, produciendo GSSG como un producto final (Townsend *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). La mayoría de GSH en la defensa antioxidante es usado por tres miembros de la familia glutatión peroxidasa y por un miembro de las peroxirredoxinas (Prdx 6). Estas enzimas catalizan la reducción de H_2O_2 por GSH a H_2O y GSSG (Forman *et al.*, 2009). La reducción de GSSG se cataliza por la glutatión reductasa en un proceso que requiere NADPH (Townsend *et al.*, 2003), según la siguiente ecuación:



El GSSG es potencialmente tóxico para las células, sin embargo, las células normalmente contienen una alta actividad de la glutatión reductasa (Forman *et al.*, 2009). Gracias al residuo de cisteína, el GSH se oxida fácilmente, sin intervención enzimática a GSSG por sustancias electrofílicas, por ejemplo, radicales libres y ROS/nitrógeno (Wu *et al.*, 2004). El grupo tiol (-SH), también llamado sulfhidrilo (Forman *et al.*, 2009), del GSH es el responsable de su actividad biológica (Fig. 1), pues este grupo es un potente agente reductor (Masip *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2003), mientras que el enlace gamma entre el ácido glutámico y la cisteína prevé su degradación por proteasas (Masip *et al.*, 2006). La baja susceptibilidad del GSH a la autoxidación se relaciona con las interacciones que involucran los grupos funcionales del residuo de γ -glutamil y el tiol de cisteína (Ketterer, 1988).

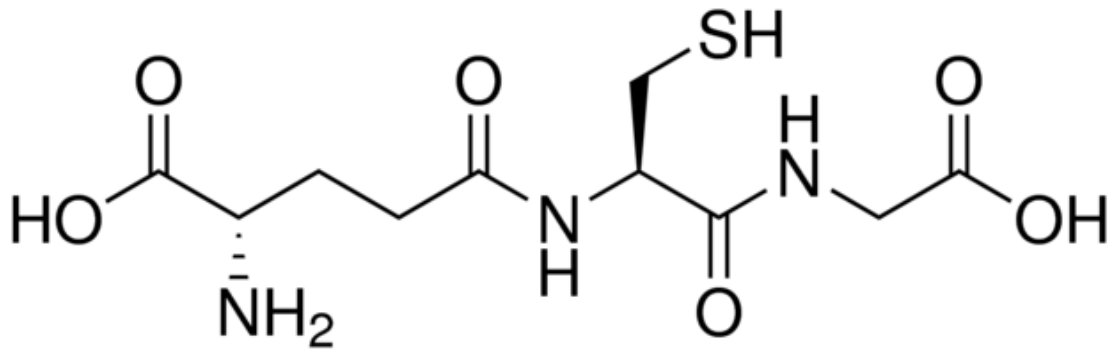
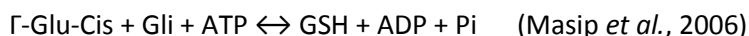
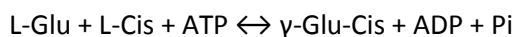


Fig. 1. Estructura de la molécula de GSH (Sigma-Aldrich, 2016: L-Glutathione reduced).

Únicamente una clase de peptidasa, γ -glutamil transpeptidasa (GGT) se sabe que hidroliza el GSH dividiendo el enlace gamma entre el glutamato y la cisteína y transfiriendo el residuo glutamilo a otro aminoácido (Masip *et al.*, 2006).

La relación de GSH:GSSG en el citoplasma es controlada cuidadosamente y el GSH se mantiene mayoritariamente en su estado reducido (Masip *et al.*, 2006). En promedio, la concentración de GSH en el citosol es de 1-11 mM, siendo superior a la mayoría de los componentes activos redox; en el núcleo la concentración de GSH es igual o mayor a la del citosol, mientras que en la mitocondria es aproximadamente 5-11 mM. La mayoría del GSH celular (85-90%) se encuentra en el citosol (Wu *et al.*, 2004), mientras que en el núcleo es, en general, el 5-10% del GSH total de la célula (Schafer *et Garry*, 2001). El citosol parece ser la principal ubicación de la biosíntesis de GSH (Schafer *et Garry*, 2001). En bacterias, la concentración de GSH se encuentra entre 0,1 a 10 mM (Masip *et al.*, 2006).

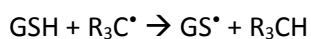
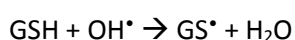
El GSH se sintetiza de L-glutamato con ayuda de dos enzimas citosólicas, γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS) y glutatión sintetasa (GS), reacciones dependientes de ATP (Schafer *et Garry*, 2001). La síntesis y la degradación de GSH son controladas por reacciones del ciclo γ -glutamilo (Pastore A *et al.*, 2001). El GSH se sintetiza en dos pasos:



En el núcleo, el GSH mantiene el estado redox de sulfhidrilos de proteínas críticas, que se requieren para la reparación y la expresión del DNA (Schafer *et Garry*, 2001). En el citoplasma, el GSH sirve de reductor de proteínas, ya sea directamente o mediante la reducción del sistema glutaredoxina de enzimas. El principal mecanismo, aunque posiblemente no el único, para la reducción de GSSG es la glutatión reductasa, la cual usa NADPH como agente reductor. La glutatión reductasa es el enlace entre las parejas redox en las células (GSH/GSSG y NAD(P)H/NAD(P)). Puesto que estos dos sistemas no intercambian electrones directamente en una tasa apreciable, pueden mantenerse dentro de la célula en diferentes potenciales redox como se requieran para una variedad de funciones celulares (Masip *et al.*, 2006). El GSH se presenta en casi todas las células eucariontes, con excepción de aquellas que carecen de mitocondrias o cloroplastos como *Entamoeba histolytica* (Fahey *et al.*, 1984), pero su producción entre procariontes se restringe a cianobacterias y proteobacterias, así como a unas

cuantas cepas bacterianas Gram positivas. No se ha encontrado GSH en ninguno de los otros grupos de eubacterias o arqueobacterias, con la excepción de las bacterias verdes del azufre (chlorobi), donde el GSH se presenta en bajas concentraciones de rango micromolar. Algunos de los procariontes que carecen de GSH parecen producir diferentes tioles de baja masa molecular, los cuales parecen funcionar a modo de GSH (Masip *et al.*, 2006). Muchos tejidos contienen GSH, los niveles pueden ser tan altos como 15 mM en el cristalino, 5-10 mM en el hígado, el cual es el principal sitio de biosíntesis, y 1-2 mM en muchos otros tejidos. Aunque muchos tejidos contienen GSH, no se presenta necesariamente en todas las células de esos tejidos. Por ejemplo, aunque la concentración total de GSH en el cerebro es de 1,5-2 mM, los estudios histoquímicos muestran que ninguna concentración se presenta en el estroma neuronal. En el pulmón se encuentra en las células interalveolares, pero no en las células alveolares, el riñón es rico en GSH en el túbulo proximal contorneado. En el cristalino se encuentra altamente concentrado en la periferia, pero se reduce en el interior (Ketterer, 1988). En condiciones estándares, el GSH tiene un vida media de 90 minutos. La inanición de azufre y el crecimiento con GSH como la única fuente de azufre incrementan fuertemente la degradación de GSH. El GSH se degrada mediante el complejo citosólico Dug. En células de mamífero, la degradación de GSH ocurre exclusivamente en el espacio extracelular. La enzima γ -Glutamyl-transpeptidasa (γ -GT) divide el GSH en cisteinglicina (Gys-Gly) y un residuo de glutamato, el cual es transferido a otro aceptador de aminoácidos. Posteriormente, Gys-Gly se divide por una dipeptidasa (Baudouin *et al.*, 2012).

Aunque no es esencial en *E. coli*, el GSH juega un papel muy importante en la protección contra estrés ambiental que incluye el choque osmótico, acidez, protección contra toxinas como el metilglioxal, componentes de cloro como el ácido hipocloroso y monoclaramina y el estrés oxidativo inducido por peróxidos. El GSH también se involucra en la prevención de la formación de disulfuros de proteínas aberrantes en el citoplasma (Masip *et al.*, 2006). La mutagénesis, que resulta de daño al DNA debida al ataque de radicales libres o de acción de electrófilos puede ser afectada por GSH. En el último caso, los conjugados de GSH que se forman, usualmente son productos no tóxicos que se excretan. Ocasionalmente, la química del conjugado de GSH es tal que también es un electrófilo que reacciona mejor con el DNA que con el electrófilo del cual ha derivado. En algunos casos, aunque el conjugado de GSH no es tóxico por sí mismo, al procesarse por la vía del ácido mercaptúrico y la β -liasa en el riñón, da lugar a derivados de tiol electrofílicos genotóxicos. Las reacciones de GSH con electrófilos son frecuentemente catalizadas, las enzimas involucradas son glutatión transferasas. Estas enzimas también tienen actividad de glutatión peroxidasa para peróxidos inorgánicos y por lo tanto, potencial para desintoxicar lípidos y peróxidos de DNA, que provienen de daño por radicales libres en presencia de oxígeno (Ketterer, 1988). Se ha sugerido que el GSH puede ser importante tanto en antimutagénesis como en anticarcinogénesis como un neutralizador de radicales libres puesto que el GSH dona un átomo de hidrógeno a ciertos radicales libres, notablemente a radicales hidroxilo y radicales de carbono (Ketterer, 1988):



Tales reacciones pueden proveer alguna protección contra los efectos potencialmente mutagénicos y cancerígenos de la irradiación. Entonces, al neutralizar el radical hidroxilo (OH^{*}), un radical altamente reactivo que resulta de la radiólisis del agua, puede desintoxicar uno de las principales fuentes de daño de los sistemas biológicos irradiados (Ketterer, 1988).

La peroxidación ha sido implicada en carcinogénesis. El peróxido de benzoilo y el peróxido de hidrógeno son promotores de tumores en el modelo de tumor de piel de Slaga *et al* (1983). Como los hidroperóxidos de lípidos y DNA pueden ser sustratos, las glutatión transferasas pueden ser anticancerígenas, no sólo mediante la conjugación de electrófilos genotóxicos, sino que también mediante la reducción de tales hidroperóxidos (Ketterer, 1988).

La inducción o la inhibición de la proliferación celular debido al estrés oxidativo parece ser dependiente de los niveles de oxidantes en la célula. Los niveles bajos de los oxidantes parecen estimular la proliferación mientras que los niveles altos la inhiben. El estrés oxidativo podría seleccionar entre células que son necesarias para el desarrollo del tejido y aquellas que son redundantes. Las células con un potencial embrionario que continuarán desarrollándose dentro del embrión y la placenta se protegen de la apoptosis inducida por el peróxido de hidrógeno gracias a su contenido de GSH (Schafer *et Garry*, 2001).

La apoptosis puede ocurrir con un moderado, pero letal estímulo oxidativo; mientras que la necrosis puede resultar de cambios oxidativos severos. La apoptosis requiere energía en forma de ATP para llevar a cabo el programa organizado de la muerte celular. Un estrés oxidativo severo puede agotar los almacenamientos de energía y dañar la maquinaria que produce la energía necesaria para implementar cambios estructurales asociados con la apoptosis (Schafer *et Garry*, 2001).

Ciertas plantas contienen homólogos tripéptidos de GSH, como el homoglutatión (γ Glu-Cys- β Ala), hidroximetilglutatión (γ Glu-Cys-Ser) y γ Glu-Cys-Glu, en los cuales la glicina del carboxilo terminal se reemplaza por otros aminoácidos. Las especies que producen γ -glu-cys- β -ala tienen actividad homoglutatión sintetasa, cuya afinidad por β -alanina es mucho mayor que por glicina. (Noctor *et Foyer*, 1998).

Roth *et al* (2014) han demostrado que GSH, administrado en ratones vía transcraneal gracias a la permeabilidad del cráneo para componentes de bajo peso molecular, reduce significativamente la muerte celular de parénquima de cerebro y las meninges, mediante la neutralización de radicales libres y otras ROS.

GSH en guisantes.

Además de la desintoxicación de ROS, el GSH tiene otras funciones en plantas, incluyendo el transporte y el almacenamiento de azufre, la síntesis de proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA), tolerancia al estrés biótico y abiótico y la desintoxicación de xenobióticos, contaminantes del aire y metales pesados (Matamoros *et al.*, 1999). Las leguminosas son un material vegetal interesante para el estudio del metabolismo de los tioles por distintas razones. Primero, hay un ciclo del ascorbato-GSH activo en los nódulos de las raíces, donde se requiere un continuo suministro de GSH para proteger la fijación de nitrógeno contra ROS. Segundo, las hojas, las raíces y las semillas de algunas leguminosas contienen un tiol tripéptido homólogo, homoglutatión (hGSH). Tercero, el GSH está involucrado en la morfogénesis de las

plantas, la división celular, el control del estado redox y la señalización del estrés y el ataque de patógenos. Todos estos procesos son importantes para la formación de los nódulos y su funcionamiento, por lo tanto el GSH debe ser una molécula crítica de los nódulos. Los tripeptidos tioles se encuentran en altas concentraciones en los nódulos (Matamoros *et al.*, 1999).

Según el trabajo de Bielawski *et Joy* (1986), en la plantas de guisantes (*Pisum sativum*) de tres semanas de edad, crecidas en la luz, los niveles de GSH son mayores en el ápice y en hojas en expansión ($1,5 \mu\text{mol}\cdot(\text{g FW})^{-1}$ (Gramos por peso fresco)) y menores en las hojas viejas y en raíces ($0,4\text{-}0,6 \mu\text{mol}\cdot(\text{g FW})^{-1}$). En el periodo de luz, los niveles en las hojas en expansión incrementan aproximadamente 40%, en comparación con los niveles de oscuridad, con un menor incremento en las raíces y ápice. En las plantas iluminadas, la proporción en la forma reducida es 86-88%, y estos valores se reducen durante el periodo de oscuridad, siendo 82 y 69% respectivamente. El GSH constituye el 65-70% de los tioles de bajo peso molecular en hojas, pero el 95% en las raíces. Los cloroplastos contienen aproximadamente 10% del GSH de las hojas, en una concentración de 1-2 mM; el GSH total en los cloroplastos y la proporción de GSSG incrementan en la luz, lo cual indica síntesis y oxidación activa del GSH en luz (Bielawski *et Joy*, 1986).

Tabla 1. Niveles de GSH en tejidos de plantas (Bielawski *et Joy*, 1986).

Tejido	Nivel ($\mu\text{mol}\cdot(\text{g FW})^{-1}$)
<i>Hojas de espinaca</i>	0,114 - 0,205
<i>Hoja de cebada</i>	0,5
<i>Hojas de pino</i>	0,15 – 0,4
<i>Cultivos celulares de tabaco</i>	0,05 – 0,15

Se han encontrado niveles altos de GSH en cloroplastos, de 2 mM a 4,5 mM (Bielawski *et Joy*, 1986). Las semillas de *Pisum sativum* únicamente contienen GSH. En comparación con otros tejidos en plantas superiores, las semillas difieren en su contenido de glutatión en dos formas: tienen un mayor contenido y un mayor porcentaje de GSSG. Se piensa que el GSSG puede causar inhibición de la síntesis de proteínas durante la dormancia (Kranner *et Grill*, 1993). La distribución de GSH y hGSH parece ser de significancia taxonómica, puesto que únicamente se ha encontrado hGSH en la tribu Phaseoleae, mientras que en las tribus Ononideae, Trifolieae, Viciae, Astragaleae y Loteae, toda la orden Fabales, ambos tripeptidos se encuentran (Tabla 1) (Klapheck, 1988). En todas las plantas de la tribu Viciae, que Klapheck (1988) analiza, el GSH fue el principal tiol en hojas y semillas. A pesar de encontrar rastros de hGSH en ambos órganos vegetales, en las raíces (*Pisum sativum*, *Lens culinaris* y *Cicer arietinum*) la cantidad de hGSH es mucho mayor que la cantidad de GSH, concluyendo que el radio de proporción de GSH/hGSH cambia enormemente dentro de diferentes tribus, así como dentro de diferentes órganos vegetales de la planta de una sola especie (Tabla 2) (Klapheck, 1988).

Tabla 2. Contenido de GSH y hGSH en hojas, raíces y semillas de diferentes legumbres. Los valores son las medias de dos experimentos independientes. La desviación fue menos que el 10% del valor. -, no detectado. Contenido, nmol (g FW)⁻¹ (Klapheck, 1988).

Género y especie	Hojas		Raíces		Semillas	
	GSH	hGSH	GSH	hGSH	GSH	hGSH
Vicieae						
<i>Pisum sativum</i> (Guisante)	316	2	48	59	2.800	-
<i>Lens culinaris</i> (Lenteja)	420	-	101	176	2.510	-
<i>Cicer arietinum</i> (Garbanzo)	580	13	49	139	910	-
<i>Lathyrus odoratus</i> (Guisante de olor)	254	-	187	-	1.450	10
<i>Vicia faba</i> (Haba)	181	-	47	-	1.170	-
Trifolieae						
<i>Trifolium incarnatum</i> (Trébol escarlata)	357	7	71	210	2.910	10
<i>Trifolium pratense</i> (Trébol rojo)	102	319	22	145	2.110	40
<i>Trigonella caerulea</i> (Alholva azul)	7	440	59	420	330	1.820
<i>Melilotus alba</i> (Trébol de olor blanco)	4	600	29	355	640	880
Phaseoleae						
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Judías, frijoles o porotos)	2	490	3	387	30	2.390
<i>Phaseolus coccineus</i> (Ayocote o ayecote)	-	440	2	153	20	4.400
<i>Glycine max</i> (Soja o soya)	2	400	15	317	10	1.350
<i>Vigna radiata</i> (Judía mungo, soja verde o loctao)	-	830	3	296	30	670

Prueba de Mutagénesis de Ames.

Existen varias pruebas para estudiar la seguridad de químicos (Yoshida *et al.*, 2009). Los sistemas de prueba bacterianos para las pruebas de sustancias químicas por potencial mutagénico son comúnmente y ampliamente usados en toxicología preclínica a modo de pruebas predictivas del potencial de carcinogénico (McMahon *et al.*, 1979). La prueba bacteriana de la reversión de la mutación (Ensayo de Ames) es un ensayo biológico para poner a prueba el potencial mutagénico de químicos (Yoshida *et al.*, 2009). Por su simplicidad y requisitos de tiempo, en particular, la metodología desarrollada por el doctor Ames y sus colegas, ha gozado de gran popularidad. La sensibilidad de la prueba ha incrementado mediante la incorporación de enzimas de hígado en la prueba, y la inclusión de nuevas cepas

de prueba más sensibles que contienen plásmidos factor-R (McMahon *et al.*, 1979). Se han puesto a prueba un gran número de compuestos en varias pruebas bacterianas, ahora en uso. Por ejemplo, McCann y sus colegas han analizado resultados con 300 compuestos y han concluido que la correlación entre la carcinogénesis *in vivo* y la mutagénesis bacteriana es excelente (McMahon *et al.*, 1979).

Las cepas de prueba de *Salmonella typhimurium* han sido diseñadas para detectar y clasificar mutágenos. Cada cepa, la cual ha sido seleccionada por su sensibilidad y especificidad, puede revertir al tipo silvestre mediante mutágenos particulares (Ames *et al.*, 1973). Un grupo de cepas que requieren histidina son usadas para las pruebas de mutagenicidad. Cada cepa de prueba contiene una mutación distinta en el operón de histidina. Además de la mutación de histidina, las cepas estándares de prueba contienen otra mutación que incrementa la capacidad de detectar mutágenos (Maron *et al.*, 1983). La prueba usa un número de cepas de *Salmonella* con mutaciones preexistentes que dejan a la bacteria incapaz de sintetizar el aminoácido requerido, histidina, y por lo tanto incapaz de crecer y formar colonias en su ausencia. Las nuevas mutaciones en el sitio de estas mutaciones preexistentes, o cerca en los genes, pueden restaurar la función genética y permitir que las células sinteticen histidina. Estas nuevas células pueden crecer en ausencia de histidina y formar colonias. Por esta razón, la prueba es conocida como «El ensayo de la reversión». Las cepas de *Salmonella*, usadas en la prueba, tienen mutaciones en varios genes en el operón de histidina; cada una de ellas se designa para responder a mutágenos que actúan mediante diferentes mecanismos. Las mutaciones adicionales fueron diseñadas en estas cepas para hacerlas más sensibles a una gran variedad de sustancias. La prueba se usa como un análisis inicial para determinar el potencial mutagénico de nuevos químicos y fármacos porque hay un alto valor de predicción para la carcinogenicidad de roedores cuando se obtiene una respuesta mutagénica en *Salmonella* (Mortelmans K *et al.*, 2000).

En 1973, Ames *et al.* desarrollaron el procedimiento haciéndolo en placas de Petri, el cual consiste en añadir amortiguador o mezcla S9, la bacteria dependiente de histidina (aproximadamente 10^8) y el químico que se desea poner a prueba en 2 mL de agar de superficie que contiene biotina y rastros de histidina (0,05 mM de cada uno). La mezcla se vierte en placas de medio mínimo de glucosa. Cuando el agar de superficie solidifica, las placas se incuban en posición invertida en una incubadora a 37°C, durante 48 horas, concluidas se cuentan las colonias. Cuando las bacterias dependientes de histidina crecen en medio mínimo de glucosa que contiene rastros de histidina, sólo aquellas que reviertan la dependencia de histidina (His⁺) son capaces de formar colonias. La pequeña cantidad de histidina permite que todas las bacterias se sometan a unas cuantas divisiones celulares; en muchos casos, este crecimiento es esencial para que ocurra la mutagénesis. Las colonias revertidas de histidina son puntuadas como colonias contra el ligero crecimiento de fondo. El número de colonias que revierten la mutación espontáneamente es relativamente constante para cada cepa. Sin embargo, cuando se añade en la placa un mutágeno, el número de colonias revertidas por placa se incrementa, usualmente dependiente de la dosis del mutágeno. Los valores de mutación obtenidos sólo pueden expresarse como el número de mutantes/placa, o número de mutantes/cantidad de químico añadido (Mortelmans *et al.*, 2000).

La prueba ha sido usada también la mutagénesis de un ambiente complejo y mezclas biológicas. Un número considerable de mutágenos detectados en la prueba de *Salmonella* han demostrado carcinogénesis subsecuentemente en pruebas animales. Algunos carcinógenos que se han reportado como negativos ahora han sido detectados usando nuevas cepas de prueba u otras modificaciones, por ejemplo, la adición de cofactores a la mezcla S9 permite la detección de ciertos colorantes azoicos (Maron *et al.*, 1983).

Cada cepa de prueba revierte espontáneamente en una frecuencia que es característica de la cepa. El número de colonias revertidas que aparecen espontáneamente durante la incubación de 48 horas, es dependiente del número final de auxótrofos en la placa y este número es una función de la concentración de histidina. Hay variabilidad en el número de colonias con reversión espontánea de un experimento a otro y de una placa a otra, por lo que se requieren tres controles para cada placa. Esto es esencial cuando los compuestos de prueba son mutágenos débiles. El número de colonias que revierten la mutación de modo espontáneo, puede cambiar ligeramente en placas con S9 (Maron *et al.*, 1983).

Tabla 3. Genotipos de las cepas de prueba de *Salmonella* usadas más frecuentemente (Mortelmans *et al.* Zeiger, 2000).

Mutación (cepa)	<i>bio chID uvrB dal</i>	LPS defecto	Plásmido
<i>hisG46</i> TA1535 TA100	Mutación deleción Mutación deleción	<i>rfa</i> <i>rfa</i>	Sin plásmido pKM101
<i>hisD3052</i> TA1538 TA98	Mutación deleción Mutación deleción	<i>rfa</i> <i>rfa</i>	Sin plásmido pKM101
<i>hisC3076</i> TA1537	Mutación deleción	<i>rfa</i>	Sin plásmido
<i>hisD6610</i>	Mutación deleción	<i>rfa</i>	pKM101
<i>hisO1242</i> TA97			
<i>hisG428</i> TA104 TA102	Mutación deleción Fenotipo silvestre	<i>rfa</i> <i>rfa</i>	Sin plásmido pKM101, pAQ1

Fracción S9.

Algunos químicos carcinógenos, tales como las aminas aromáticas o hidrocarburos aromáticos policíclicos, son biológicamente inactivos a menos que sean metabolizados a sus formas activas. En humanos y animales inferiores, el sistema de oxidación metabólica basado en citocromos P450, el cual está presente principalmente en el hígado y en menor grado en pulmones y riñones, es capaz de metabolizar un gran número de estos químicos a formas electrofílicas, reactivas con DNA. Algunos de los metabolitos intermediarios son mutágenos potentes en la prueba de Ames. Puesto que las bacterias son incapaces de metabolizar químicos mediante citocromos P450, como en los mamíferos y otros vertebrados, un componente para hacer que la prueba de Ames sea funcional, fue la inclusión de un sistema de activación metabólico exógeno de mamífero. Por lo tanto, un sistema de activación exógeno de mamífero se ha añadido en la placa junto con el químico de prueba y las bacterias (Mortelmans *et al.* Zeiger, 2000).

La fracción S9 se define como la fracción sobrenadante obtenida de un homogenado de órgano (generalmente hígado) mediante centrifugación a 9000 g durante veinte minutos en un medio adecuado; esta fracción contiene citosol y microsomas (Duffus *et al.*, 2007), y se emplea en el sistema de Ames en presencia de NADP⁺ y cofactores para la oxidación soportada por NADPH (Mortelmans *et Zeiger*, 2000). La fracción S9 es una preparación más cruda que los microsomas y contiene las enzimas de los microsomas así como otras enzimas. Los hepatocitos contienen todas las enzimas metabolizadoras del hígado que se encuentran *in vivo*. Los microsomas son más fáciles y baratos de usar, pero un incremento en el detalle se puede obtener con la fracción S9 y los hepatocitos. Los microsomas contienen las enzimas citocromos P450 (CYP) y otras enzimas de conjugación de fase II. Este metabolismo reduce la concentración de fármacos que circulan e incrementa su eliminación (Kerns *et Di*, 2003). Para una detección eficiente de una gran variedad de carcinógenos se requiere activación metabólica, siendo esencial la adición de la fracción S9. El hígado de ratas inducidas con fenobarbital y la β-naftoflavona es eficiente para la detección de diferentes clases de mutágenos (Maron *et Ames*, 1983), pues mejora la bioactivación de los químicos de prueba (Hakura *et al.*, 1999), incrementando el nivel de enzimas metabolizadoras. Los sistemas de activación metabólica son necesarios para poner a prueba el potencial genotóxico de los químicos. Los citocromos P450 en la fracción S9 de hígado juegan un papel importante en la activación de promutágenos a mutágenos (Hakura *et al.*, 1999).

Salmonella Typhimurium TA102.

La cepa TA102 tiene una mutación ocre (mutación de codón sentido a sin sentido) en un plásmido multicopia, –CAA- (Glutamina) por –TAA-, en el gen *hisG* (Crick, 1968; Levin *et al.*, 1982). Esta cepa detecta eficientemente una gran variedad de mutágenos, tales como formaldehído, glioxal, varios hidroperóxidos y mutágenos oxidativos, bleomicina, fenilhidracina, rayos X, luz UV, estreptonigrina y agentes de entrecruzamiento, tales como psoralenos y mitomicina C (Tabla 4). Estos mutágenos no se detectan fácilmente en las cepas de prueba estándares (Maron *et Ames*, 1983). Algunos de estos mutágenos inducen daño en la timina de DNA (Levin *et al.*, 1982). En general, las mutantes de histidina en el grupo estándar de cepas de *Salmonella* tienen los pares de bases G*C en el sitio crítico de la reversión. Sin embargo, la cepa TA102 tiene los pares de bases A*T en el sitio crítico de la reversión. La secuencia de mutación en las posiciones 839-853 se ha determinado como A-G-A-G-C-A-A-G-T-A-A-G-A-G-C-, en comparación con la secuencia silvestre/salvaje A-G-A-G-C-A-A-G-C-A-A-G-A-G-C- en las mismas posiciones determinadas por Barnes y Hudson. Esto confirma que la mutación es un ocre y se localiza en la posición 847 del inicio del mRNA de *Histidina* (Levin *et al.*, 1982). Los eventos de reversión de la mutación son Transversiones (Mortelmans *et Zeiger*, 2000).

Esta cepa difiere del resto de cepas anteriores en que la mutación ha sido introducida en un plásmido multicopia, así que aproximadamente 30 copias de un gen mutante está disponible para una retromutación (Mortelmans *et Zeiger*, 2000). El número de copias de pAQ1 Y pKM101 se han determinado mediante la incorporación relativa de timina en los plásmidos contra el DNA cromosómico (Levin *et al.*, 1982).

La cepa TA102 posee los siguientes marcadores moleculares:

Una mutación (*rfa*) causa una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubre la superficie de las bacterias e incrementa la permeabilidad de moléculas grandes como el benzopireno que no penetra en la pared celular normal (Maron *et* Ames, 1983; Mortelmans *et* Zeiger, 2000).

El cristal violeta es uno de un grupo grande de colorantes arilometanos; es usado comúnmente en tinciones con propósitos de laboratorio, probablemente más en la tinción de Gram (un procedimiento que distingue los dos grupos mayores en los cuales las bacterias pueden dividirse con base en las propiedades de su pared celular). Cuando una cepa contiene la mutación *rfa*, es excepcionalmente sensible a los efectos tóxicos del cristal violeta, lo que lo hace un buen agente para el diagnóstico de dicha mutación (Thomas *et* MacPhee, 1984).

La mutación (*uvrB*) es una delección de un gen que codifica para el sistema de reparación de escisión de DNA, que resulta en un gran incremento de la sensibilidad en la detección de muchos mutágenos, mediante la eliminación del sistema de reparación de escisión precisa, permitiendo más lesiones en el DNA para ser reparadas por el mecanismo de reparación del DNA con tendencia a errores. Esta delección a través del gen de biotina hace que la bacteria sea dependiente de biotina. La cepa TA102 no contiene la mutación *uvrB* puesto que ha sido construido principalmente para detectar mutágenos que requieren un sistema de reparación de escisión intacto. Sin embargo, es importante mencionar este aspecto, puesto que es necesario asegurarse de que la cepa posee esta característica intacta (Maron *et* Ames, 1983; Mortelmans *et* Zeiger, 2000).

La cepa TA102, (al igual que las cepas TA97, TA 98 y TA100) contiene el plásmido del factor R (Resistencia), pKM101. Este plásmido incrementa la mutagénesis inducida por radiación UV y químicos, mediante un incremento en la vía de reparación del DNA con tendencia a error, lo cual normalmente se presenta en estos organismos (tanto en *Escherichia coli* como en *Salmonella typhimurium*). El plásmido otorga resistencia a ampicilina, lo cual la convierte en un marcador para la detección de la presencia del plásmido. El plásmido pKM101 de 35,4 kilobases (kb), el cual se ha derivado del plásmido R46 mediante una serie de manipulaciones *in vivo*, probablemente surgió de una delección de 14 kb de una región de DNA. pKM101 codifica una β -lactamasa y el sistema conjugativo, cuya producción, codificada por el gen *bla*, permite que las bacterias huéspedes sean resistentes a una serie de derivados de penicilina, incluyendo la ampicilina, sin embargo, R46 codifica resistencia a ampicilina, estreptomina, espectinomina, sulfonamidas y tetraciclina, mientras pKM101 codifica sólo resistencia a ampicilina. Las bacterias que contienen el pKM101 tienen una nueva actividad endonucleasa de cadena simple y doble independiente de ATP. pKM101 es uno de un número de plásmidos que incrementan la susceptibilidad de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* a mutagénesis (sustitución de bases o mutagénesis por desplazamiento del marco de lectura), mediante una diversidad de agentes, incluyendo la luz ultravioleta, e incrementa la resistencia de estas bacterias a la muerte por rayos U.V. Los genes *muc* comprenden una región de 1,9 kb involucrada en mejorar la mutagénesis por rayos U.V. y químicos (Langer, Shanabruch *et* Walker, 1981; Maron *et* Ames, 1983; Mortelmans *et* Zeiger, 2000; Shanabruch *et* Walker, 1980). Parece que el plásmido pKM101 incrementa la capacidad de una célula bacteriana de llevar a cabo los procesos que colectivamente se conocen como reparación con tendencia a error. Esta hipótesis se sustenta con el hecho de que se ha observado que pKM101 reprime las

deficiencias de los mutantes *umuCD*⁻ (no mutado UV) en mutagénesis. El gen *umuC* es un buen candidato para un gen que codifica para una proteína que participa únicamente en la reparación con tendencia a error. La interpretación más simple es que pKM101 sule a la célula con un análogo de la proteína *umuC*, proveyendo a la célula con una cantidad incrementada de función química, la cual es normalmente requerida para una reparación con tendencia a error (Shanabruch et Walker, 1980).

La cepa TA102 también contiene el plásmido multicopia, pAQ1, el cual tiene la mutación *hisG428* y el gen de resistencia a tetraciclina (Fig. 2). Dicho plásmido ha sido introducido en la cepa TA102 con la finalidad de amplificar el número de sitios dianas, en la deleción *hisΔ(G)8476* del cromosoma. Para mejorar la capacidad de esta cepa para detectar agentes que causan entrecruzamientos en el DNA, el gen *uvrB* fue mantenido, haciendo que la bacteria tenga una reparación competente del DNA (Levin et al, 1982; Maron et Ames, 1983).

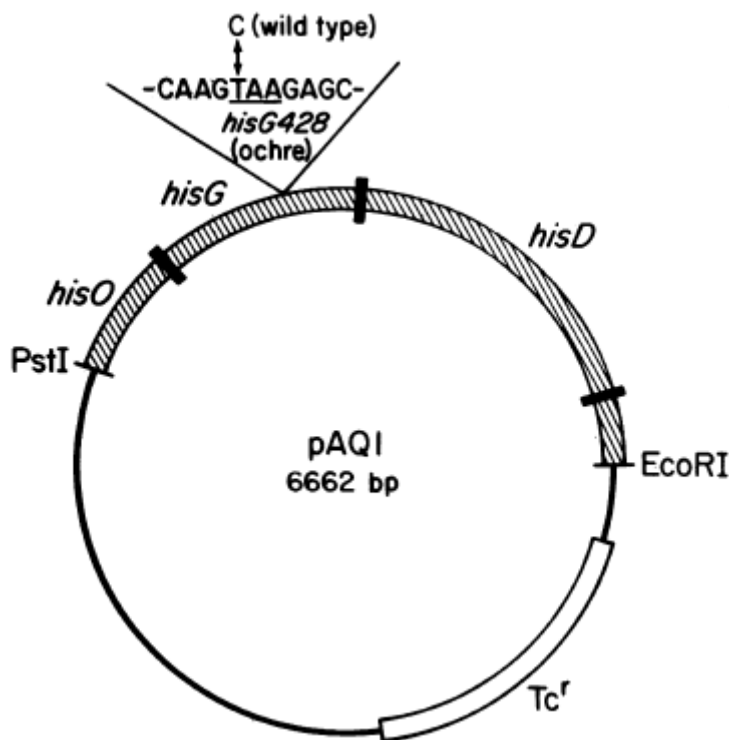


Fig. 2. Estructura del plásmido pAQ1 (Levin et al, 1982).

El número de colonias revertidas de *Salmonella typhimurium* TA102 por placa (sin mezcla S9) oscila entre 240-320 (los números pueden cambiar ligeramente con la fracción S9), según Maron et Ames, 1983; sin embargo, se ha reportado que hay grandes diferencias en los resultados de experimentos idénticos en distintos laboratorios, probablemente debido a que la mutación de histidina se encuentra en el plásmido multicopia pAQ1. El número de copias del plásmido puede variar, y esto depende de las condiciones de cultivo, lo que resulta en variaciones observadas en la frecuencia de la mutación y la eficiencia de los antimutágenos. Por lo tanto es importante caracterizarla lo más frecuente posible (Grey et Adlercreutz, 2003). El sistema de reparación con tendencia a error, codificado en el plásmido pKM101 incrementa marcadamente la frecuencia total de eventos de reversión espontánea. Además de que cuando *hisG428* se encuentra en múltiples copias en pAQ1, la frecuencia los eventos de

reversión aumenta cuarenta veces, el cual es el número aproximado de copias del plásmido pAQ1 (Levin *et al*, 1984).

Tabla 4. Mutágenos que revierten a TA102. Los números indican las colonias que revierten la mutación espontáneamente por placa (Levin *et al*, 1984).

Mutágeno	Colonias revertidas <i>His</i>⁺ por placa	
	TA102	TA2638
<i>(Espontánea)</i>	(240)	(38)
<i>Beomicina (1 µg)</i>	1.245	18
<i>Estreptonigrina (100 µg)</i>	1.130	557
<i>Peróxido de hidrógeno (100 µg)</i>	746	91
<i>t-Butil hidroperóxido (100 µg)</i>	3.073	266
<i>Hidroperóxido de cumeno (100 µg)</i>	1.780	119
<i>Neocarrinostatina (1 µg)</i>	1.946	209
<i>Fenilhidracina (250 µg)</i>	1.184	160
<i>Mitomicina C (500 ng)</i>	2.772	118
<i>Luz UV (19,8 J/m²)</i>	1.942	571
<i>Psoraleno (1 µg/mL y cerca de UV)</i>	2.512	257
<i>8-Metoxipsoraleno (1 µg/mL y cerca de UV)</i>	4.171	997
<i>Angelicina (20 µg/mL y cerca de UV)</i>	1.832	160
<i>Formaldehído (100 µg)</i>	369	44
<i>Glioxal (1 mg)</i>	637	128
<i>Ketoxal (200 µg)</i>	1.374	402
<i>Glutaraldehído (25 µg)</i>	389	93
<i>Malondialdehído (2 mg)</i>	141	24
<i>Paraquat (10 ng)</i>	40	0
<i>Diquat (10 ng)</i>	36	0

Especies reactivas de oxígeno (ROS).

Un radical libre puede definirse como «cualquier especie capaz de una existencia independiente que contiene uno o más electrones no apareados» y el término «especie reactiva de oxígeno (ROS)» ha sido adoptado para incluir moléculas tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el ácido hipocloroso (HOCl) y el oxígeno singulete (¹O₂), que, aunque no son radicales en su naturaleza, son precursores de radicales libres (Chapple, 1997). Las ROS pueden ser subproductos naturales de la respiración oxidativa, y pueden funcionar en la transducción de señales y la contención de patógenos durante la respuesta inmune innata (Adams *et al.*, 2012), y de agentes físicos o químicos externos pueden dañar el DNA y generar otros efectos nocivos (Loft *et Poulsen*, 1996). Se ha propuesto que el daño de las ROS se involucra en carcinogénesis y enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Loft *et Poulsen*, 1996), implicándose en la patogénesis de cien condiciones aproximadamente, que incluyen la artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria aguda, SIDA y la enfermedad periodontal, entre muchas otras (Chapple, 1997). Las ROS causan daño de tejidos mediante una variedad de mecanismos distintos, los cuales incluyen los siguientes: Daño al DNA; peroxidación de lípidos (a través de la activación de ciclooxigenasas y lipooxigenasas); daño a proteínas, que incluye ácido hialurónico de las encías y proteoglicanos; oxidación de enzimas importantes (por ejemplo, antiproteinasas tales como α1-antitripsina); estimulación de la liberación de

citocinas por monocitos y macrófagos, mediante el agotamiento de compuestos tioles intracelulares y activando el factor nuclear κB (Chapple, 1997). Las ROS son subproductos naturales de la respiración oxidativa y pueden funcionar en la transducción de señales y el despeje de patógenos durante la respuesta inmune innata (Adams *et al.*, 2012).

Mecanismo de reparación.

El DNA genómico está constantemente bajo ataque de factores endógenos y exógenos tales como las ROS que provienen del metabolismo celular normal o agentes físicos o químicos tales como la radiación ultravioleta, agentes alquilantes e inhibidores de topoisomerasa. Para mantener la integridad genómica de los efectos perjudiciales de los agentes dañinos (por ejemplo, las mutaciones o los rearrreglos cromosómicos) han evolucionado numerosos mecanismos de reparación (Ioannou *et al.*, 2015).

Los desajustes de bases que resultan de errores de replicación o que ocurren durante la replicación se corrigen mediante los sistemas de reparación de desajustes. Las lesiones de DNA, las cuales no son codificantes o con error en la codificación e incluye todos los tipos de bases, desoxirribosa y modificaciones en los enlaces fosfodiéster se eliminan del dúplex por los sistemas enzimáticos de reparación del DNA. En general, los sistemas de reparación de daño y desajustes usan la misma estrategia general para mantener la integridad de la información genética: un desajuste o un nucleótido se elimina y se reemplaza por el nucleótido correcto usando la hebra intacta del dúplex a modo de templado. Además, en este mecanismo básico, en la reparación de daño directo, los enlaces químicos que constituyen el daño pueden romperse para restaurar el nucleótido normal (Sancar, 1996).

Todos los daños producidos por el ataque de un radical en la molécula de DNA se reparan mediante procesos de reparación de ubiquitina llamados «Reparación de escisión de bases». Los componentes enzimáticos incluyen DNA N-glucosilasas, que reconocen las purinas y pirimidinas dañadas, endonucleasas apurínicas 5' que procesan rupturas de cadena, sitios de pérdida de base y los productos de la acción DNA glucosilasa/Liasa apurínica, y las DNA polimerasas y DNA ligasas (Wallace, 1997).

Mecanismo de reparación en procariontes, Reparación por escisión de nucleótidos.

La nucleasa de escisión de *E. coli* ha sido extensivamente caracterizada. La actividad resulta de acciones combinadas de tres subunidades, UvrA, UvrB y UvrC, y la enzima se refiere como escinucleasa (A)BC. Existen tres pasos formales en la reparación por escisión: reconocimiento del daño, incisiones duales y síntesis de la reparación y ligación. La escinucleasa elimina aductos tales como el diaducto cisplatina-1,2-d(GpG), el monoaducto psoraleno-timina, y el aducto venzo(α)pireno-guanina. La Subunidad UvrA de la escinucleasa (A)BC permite el reconocimiento. El reconocimiento del daño ocurre del siguiente modo: UvrA dimeriza a través de una cremallera de leucina no canónica y hace un complejo A_2B_1 con UvrB. Este complejo se une al DNA inespecíficamente con una alta afinidad, y esta unión activa la función ATPasa/helicasa de la subunidad UvrB, permitiendo al complejo sondar el DNA. UvrA es una proteína de unión específica para el DNA dañado con especificidad por DNA con daño en ambas cadenas. UvrB también es una proteína de unión a DNA dañado, pero con especificidad por DNA dañado en una sola cadena. La subunidad UvrA lleva a la subunidad UvrB al sitio

dañado. El complejo UvrB-DNA dañado es extremadamente estable. La subunidad UvrC, la cual no tiene especificidad por el DNA, reconoce el complejo UvrB-DNA con una alta especificidad y el complejo proteico UvrB y UvrC hace dos incisiones, en los enlaces fosfodiésteres del nucleótido dañado. (Sancar A, 1996; Selby C *et al* Sancar A, 1990). La reparación por escisión de nucleótidos es un proceso de múltiples pasos, que eventualmente conduce a la formación de una brecha en la cadena doble de DNA. Esta brecha se llena mediante la síntesis de reparación y sellada covalentemente mediante la DNA ligasa (Friedberg E *et al*, 1995).

4-Nitroquinoleína-N-óxido (4NQO).

La 4-nitroquinoleína-N-óxido es un carcinógeno sintético (no presente en condiciones naturales, sintetizado sólo para fines de investigación) soluble en agua, que ejerce un potente estrés oxidativo intracelular y el producto metabólico de este se une al DNA, predominantemente a los residuos de guanina. La 4NQO genera ROS, tales como el radical superóxido o H_2O_2 . La 4NQO puede someterse a ciclo redox y producir ROS. El ciclo redox es un proceso donde una reducción enzimática de un electrón del compuesto original es seguida por una autooxidación en presencia de oxígeno molecular. El oxígeno será reducido a un ion superóxido que puede dirigir la formación de otras ROS, tales como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Los radicales de anión nitro de compuestos nitroaromáticos y nitro heterocíclicos son intermediarios en la reducción enzimática de estos compuestos a aminas hidroxilo o aminas. Un radical nitróxido puede soportar un ciclo de redox que involucran oxígeno (Kanojia *et al* Milind, 2006).

La generación de ROS ha sido demostrada mediante la inducción del operón (Sox R/S) de la respuesta a superóxido, la cual ocurre cuando la proteína Sox R es desencadenada por una señal redox intracelular para activar la transcripción del gen Sox S, lo cual resulta en un aumento de la transcripción de Sox S e incrementa los niveles de la proteína Sox S. La proteína Sox S activa varios genes del «regulón» sox R/S. Se ha observado que, al usar la fusión de los genes lac de *E. coli* al promotor de Sox S, 4NQO es un potente inductor del sistema de regulación de sox RS de *E. coli* (Kanojia *et al* Milind, 2006).

Metabolismo de 4NQO.

La mutagénesis ocasionada por una variedad de agentes como la luz ultravioleta (UV), metil metano sulfonato (MMS) y 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) no es un proceso pasivo. Mejor dicho, requiere de la intervención de un sistema celular, cuyos procesos dañan al DNA, de tal modo que resulta en una mutación. Este tipo de procesamiento se conoce como «reparación con tendencia a error», un término propuesto en base a numerosas observaciones en *E. coli*, que sugieren que los eventos celulares involucrados en la producción de mutaciones del DNA dañado son cercanamente asociados con eventos que incrementan la resistencia a los efectos letales del daño en el DNA (Shanabruch *et al* Walker, 1980).

La acción carcinogénica de 4NQO se inicia mediante la reducción enzimática de su grupo nitro. 4NQO se reduce a 4-hidroxilaminoquinoleína-1-óxido (4HAQO) por NADH: 4NQO nitroreductasa y NAD(P)H: quinona reductasa. El producto de la reducción de cuatro electrones, 4HAQO es un metabolito carcinogénico de 4NQO implicado en la formación de aductos de DNA (Kanojia *et al* Milind, 2006). Cuando el 4HAQO se metaboliza a un producto electrofílico, selil-4HAQO, este reacciona con el DNA para formar monoadductos de quinoleína

estables, tales como 3-(desoxiadenosin-N6-il)-4AQO y N4 (guanosin-7il-4AQO), lo cuales son considerados responsables por su mutagenicidad y genotoxicidad (Arima *et al.*, 2006). 4HAQO puede ser metabolizado adicionalmente y acetilado mediante la sintetasa seril-tARN, para formar un complejo de seril-AMPenzima. Este complejo puede inducir grupos de quinoleína en DNA. La resistencia a la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por 4NQO es influenciada por la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP) y la glutatión S-transferasa P (GSTP1-1). La 4NQO es un sustrato para la glutatión S-transferasa (GSTs) incluyendo la GSTP1-1, la cual usa GSH para conjugación. El conjugado se llama QO-SG. Este conjugado puede ser expulsado de la célula por la proteína de resistencia a múltiples fármacos (MRP). Tanto la proteína MRP como la GSTP1-1 producen un alto nivel de protección para la formación de aductos de DNA y la citotoxicidad (Kanojia *et Milind*, 2006).

La 4NQO se une preferentemente a los residuos de guanina del DNA. La 4-Nitroquinoleína-N-óxido se somete a una activación metabólica mediante enzimas celulares y se modifica como se encontraba anteriormente. La 4NQO modificada ha mostrado que forma aductos de DNA en varias posiciones. El metabolito acetilado de 4NQO puede reaccionar mediante su tercera o cuarta posición con las posiciones N2 y C8 de guanina respectivamente. La alta mutagenicidad de 4NQO ha sido atribuida al aducto de guanina N2, no obstante, se ha encontrado que el aducto de C8 es débilmente tóxico en *E. coli*. Las mutaciones causadas por estos aductos resultan en una sustitución de guanina a pirimidina. Se ha mencionado que la 4NQO imita los rayos U.V. La radiación U.V. causa la formación de dímeros de pirimidinas, los cuales son aductos voluminosos de DNA y se reparan mediante la maquinaria de reparación de escisión de nucleótidos y se piensa que la 4NQO también forma dicho aductos; sin embargo, hay diferencias en los daños inducidos y las vías de reparación activadas en respuesta a los daños (Kanojia *et Milind*, 2006).

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un peligroso intermediario reactivo en el metabolismo normal de los organismos aeróbicos y es un precursor primario de la producción de radicales hidroxilo. Además, el H₂O₂ es muy peligroso en presencia de metales de transición a través de la reacción de Fenton catalizada por metales, la cual genera radicales hidroxilo de peróxido de hidrógeno y metales de unión al DNA, especialmente hierro (Han, 1992).

Imlay *et Linn* (1988) han concluido en su estudio del daño al DNA por peróxido de hidrógeno en *E. coli* que la reacción de Fenton contribuye a la mutagénesis y a la muerte celular; al igual que lo han hecho Carlsson *et al.* (1988). Los daños al DNA producidos por radicales libres son probablemente las lesiones del DNA más frecuentes que ocurren en células aeróbicas y estas lesiones probablemente son la causa de lo que se conoce como mutación espontánea. Sin embargo, los organismos aeróbicos han evolucionado complejos sistemas de protección antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos contra ROS con la finalidad de hacer frente al estrés oxidativo. Las actividades enzimáticas de protección producen desintoxicación de las ROS. La superóxido dismutasa cataliza la conversión de los aniones superóxido a H₂O₂, y la catalasa y la peroxidasa catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno a H₂O y O₂. La glutatión peroxidasa cataliza la conversión de peróxido a H₂O y de GSH a GSSG. Las actividades no enzimáticas de los antioxidantes se deben a unión con moléculas pequeñas. Estos antioxidantes no enzimáticos incluyen a GSH, cisteína y cisteinilglicina (Han, 1992).

El H_2O_2 se genera en numerosos procesos biológicos y está implicado como el principal transmisor de señales redox. Aunque siendo un fuerte oxidante, las barreras energéticas de alta activación hacen que no sea reactivo con la mayoría de las moléculas biológicas. Esta molécula reacciona directamente con los tioles, pero para los tioles de bajo peso molecular y los residuos de cisteína en la mayoría de las proteínas, la reacción es lenta. Las reacciones más favorecidas del H_2O_2 son con proteínas de centros de metales de transición, selenoproteínas y proteínas tioles selectas. Estas incluyen proteínas tales como las catalasas, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas, las cuales, así como proveen defensa antioxidativa, son consideradas como dianas para la transmisión de señales (Cadenas *et Packer*, 2013).

El H_2O_2 es un subproducto originado por las ROS durante la actividad metabólica celular normal que puede inducir rupturas de cadena simple o doble, distorsiones helicoidales y obstáculos para el apareamiento de bases. Estos mecanismos pueden alterar la información genética importante, interfiriendo con la replicación y la transcripción. La acumulación de lesiones oxidativas compromete la integridad del DNA, predisponiendo al cáncer y envejecimiento (Ioannou *et al.*, 2015).

Hoffman y Meneghini (1979) han encontrado que el H_2O_2 causa rupturas de una sola cadena en el DNA en fibroblastos de humano. Puesto que el H_2O_2 no ataca DNA purificado, se piensa que una especie intercelular ha mediado la producción de las lesiones. Una posibilidad fue que el mediador fuese hierro intracelular, el cual reacciona con el H_2O_2 mediante la reacción de Fenton, produciendo radicales hidroxilo, los cuales son muy reactivos. En este caso el radical hidroxilo sería la última especie que atacaría al DNA. Sus resultados indican que el daño en el DNA se produce por los radicales hidroxilos formados cuando el H_2O_2 reacciona con el Fe^{2+} unido a la cromatina, y este es responsable del efecto de muerte celular (Mello *et al.*, 1984). La degradación del DNA ocasionada por los hidroxilos toma la forma de rupturas de cadena simple, rupturas de cadena doble, liberación de bases, daño de bases y entrecruzamientos entre hebras. Los entrecruzamientos entre hebras, así como los entrecruzamientos entre DNA y proteína también se han encontrado en cromatina aislada pretratada con peróxido de hidrógeno (Ward *et al.*, 1985). Una cantidad importante de la letalidad del H_2O_2 involucra el daño al DNA mediante oxidantes generados de las reacciones de Fenton mediadas por hierro. Parece que el NADH puede conducir el proceso mediante la reposición Fe^{2+} de Fe^{3+} en bacterias e *in vivo*. Sin embargo, el NADH mejora la asociación del DNA con el hierro. Una gran porción del daño al DNA dependiente de H_2O_2 parece no deberse a los radicales hidroxilos difusibles. En vez, los oxidantes son producidos en los átomos de Fe^{2+} asociados con DNA, y parece que la localización de la unión con hierro puede determinar el sustrato y la naturaleza del ataque. Parece haber al menos dos clases de oxidantes de Fenton mediados por hierro. Los oxidantes de tipo I son moderadamente sensibles a H_2O_2 y etanol y parece que dividen el DNA preferencialmente dentro de las secuencias RTGR, TATTY, y CTTR (los nucleótidos, en negrita y subrayados, son los sitios de división); los oxidantes de tipo II, por el otro lado, hacen divisiones preferencialmente en la secuencia NGGG. Las características distintivas de estos radicales pueden deberse predominantemente a la localización del hierro que da lugar a ellos. Sin embargo, puede que los sitios de corte no necesariamente sean los sitios de unión con el hierro. El daño ocasionado por los oxidantes de Fenton puede ocurrir en las bases de DNA o en los azúcares. El daño en el azúcar se inicia mediante la sustracción de uno de los carbonos de desoxirribosa, y la consecuencia predominante es la eventual ruptura de la hebra y la

liberación de bases. En aproximadamente la mitad de esas alteraciones, un grupo terminal 5'-fosfatose localiza 3' de la división, un 3'-fosfoglucolato se localiza 5' de la división, y un propanol de base se libera, el cual subsecuentemente se descompone a la liberación de la base y malondialdehído. La mayoría de los otros daños en los azúcares dan 5'- y 3'-fosfomonoésteres flanqueando una brecha de un nucleósido. Otra alteración en el grupo del azúcar es una inversión de β a α en el carbón 1', el cual interrumpe la estructura B del DNA (Henle *et Linn*, 1997).

El ataque de radicales en las bases resulta principalmente en la adición del grupo OH a los enlaces dobles ricos en electrones, particularmente el enlace de la purina N-7-C-8 y de la pirimidina 5,6. También ocurre la sustracción del hidrógeno de los grupos timina-metilo (Henle *et Linn*, 1997). Las rupturas de cadena del DNA generalmente se producen mediante la interacción del radical hidroxilo con el carbono 4' del azúcar de desoxirribosa, conduciendo a la ruptura de la columna vertebral del fosfodiéster adyacente. El ataque de las bases purinas o pirimidinas ocurre principalmente mediante la adición de un OH a los enlaces π de las bases, al C5 y C6 de las pirimidinas y a C4 y C8 de las purinas, cuyos productos pueden ser estables. Los productos estables son los más importantes, porque pueden tener consecuencias biológicas. Los productos de timina más estables son 5,6-dihidroxi,5,6-hidrotimina (timina glicol); 5-hidroxi,5,6-hidrotimina; 6-hidroxi,5,6-dihidroxitimina y dihidrotimina. El principal producto de la interacción del radical hidroxilo con citosina es citosina glicol, sin embargo es inestable, conduciendo a la formación de productos más estables de uracilo. Estos han sido una fracción de un espectro de daños potenciales (Wallace, 1997).

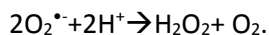
Se ha demostrado que los tioles reaccionan con el superóxido y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). No hay un consenso en la reactividad de los tioles con el superóxido (Winterbourn *et Metodiewa*, 1994).

La reacción de Fenton.

Los metales pesados son necesarios para el funcionamiento normal de las células y la supervivencia de los organismos. Estos son requeridos para el funcionamiento fisiológico y bioquímico del cuerpo, pero en concentraciones altas causan daño oxidativo (Hassan *et al.*, 2015). El hierro es un constituyente de un número de proteínas involucradas en el transporte de oxígeno o el metabolismo. Además puede ser transportado por todo el cuerpo, almacenado y disponible para la síntesis de proteínas de hierro. La capacidad del hierro de someterse a oxidación y reducción cíclica es un aspecto importante de su función. Sin embargo, dicha actividad redox puede generar radicales libres y otras fuertes especies oxidativas capaces de causar un amplio rango de daño biológico. Esto puede ocurrir a través de una variedad de mecanismos. El hierro puede promover la formación de radicales de compuestos fisiológicos y xenobióticos, por ejemplo, catalizando la autooxidación, puede iniciar la peroxidación de lípidos y reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir ROS más tóxicas (Winterbourn, 1995).

La química de Fenton/la reacción de Haber-Weiss es el mecanismo más estudiado por el cual los metales pesados producen ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) y por último causan estrés oxidativo. Tanto el activo redox como los metales inactivo pueden disminuir el sistema antioxidante, específicamente aquellos con enzimas que contienen un grupo tiol y antioxidantes y pueden conducir a muerte celular (Hassan *et al.*, 2015).

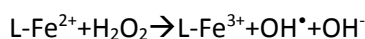
Los organismos aeróbicos reducen el oxígeno a agua en una secuencia de reacciones de protones acoplados y de transferencia de electrones necesarios para la síntesis de ATP. Un porcentaje bajo de oxígeno consumido se reduce incompletamente, formando superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Las enzimas (superóxido dismutasas, SOD) se han involucrado con la función específica de catalizar la reacción de superóxido a peróxido de hidrógeno:



La producción alta y/o deficiente neutralización del superóxido se ha implicado en muchos desordenes biológicos, y el término mal definido «estrés oxidativo» es regularmente usado en este contexto. Sin embargo, el $O_2^{\cdot-}$ es un oxidante pobre, teniendo una baja reactividad hacia la mayoría de las moléculas biológicas en comparación con su descomposición natural en presencia de superóxido dismutasas. Por esta razón, se piensa que la mayoría de los efectos deletéreos del superóxido se deben a la conversión a radicales más reactivos. Un probable candidato es el $\cdot OH$ puesto que reacciona con muchas moléculas biológicas. La química involucrada en convertir el superóxido en hidroxilo (u otros oxidantes poderosos) fue la base para algunas observaciones de Fenton (Wardman *et Candeias*, 1996).

En 1876, Fenton describió un producto coloreado obtenido en una mezcla de ácido tartárico con peróxido de hidrógeno y una baja concentración de una sal ferrosa, que más tarde se demostraría que es ácido dihidroximaleico. Posteriormente, Haber, Weiss y Willstätter propusieron la participación de radicales libres hidroxilos en el sistema hierro(II)/peróxido de hidrógeno, y Baxendale *et al* han propuesto que el superóxido reduce el hierro(III) formado en la reacción, lo que explica la naturaleza catalítica del metal (Wardman *et Candeias*, 1996).

La reacción de Fenton ha sido muy estudiada como una fuente de radicales e iniciador de daño biológico. En su forma simple, puede describirse como (donde el hierro es acomplejado a ligando L):



La reacción de Fenton estrictamente involucra el hierro y el nombre se deriva de las observaciones que Fenton hizo en los 1880s, donde una mezcla de hierro acidificado y H_2O_2 crea un poderoso oxidante. El término «como Fenton» también se usa para describir las reacciones comparables de otros metales de transición como el cobre (Cadenas *et Packer*, 2013).

La quelación de los metales de transición para limitar su actividad redox (tales como hierro en transferina o ferritina) es un mecanismo protector importante contra el daño ocasionado por H_2O_2 . Sin embargo, estos metales están en un estado dinámico en las células, y se han medido concentraciones micromolares de hierro de bajo peso molecular. Para mantener la química de Fenton en esas concentraciones, el metal oxidado necesita reciclarse. Se ha pensado que esta debería ser una importante función para el superóxido, sin embargo, los agentes reductores tales como el ascorbato o el GSH son más prominentes en esta función (Cadenas *et Packer*, 2013).

Piperlongumine (PLM).

El piperlongumine (5,6-dihidro-1-[(2E)-1-OXO-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H)-piridinona) es una molécula pequeña electrofílica alcaloide/amida y activa, de origen natural, de las especies *Piper* (Piperaceae) (Adams *et al.*, 2012; Bezerra *et al.*, 2013), que tiene propiedades anticancerígenas. Este compuesto mata selectivamente células de cáncer, pero deja a las células normales intactas. Se ha demostrado que el piperlongumine eleva los niveles de ROS y reduce los niveles de GSH en las líneas celulares de glioblastoma multiforme (Liu *et al.*, 2013). El incremento de los niveles de ROS mediante un tratamiento con piperlongumine mata células de cáncer que incluye melanomas, linfomas y glioblastomas (Kim *et al.*, 2014), e incluso células normales diseñadas para tener un genotipo cancerígeno (Raj *et al.*, 2011). Pei *et al.* (2013) han reportado que compuestos tales como parthenolide (PTL) y piperlongumine inducen una depleción casi completa del GSH en células de leucemia mieloide aguda. También, los hallazgos de Shanshan *et al.* (2013) desvelan que agentes como Parthenolide (PTL) y Piperlongumine (PLM) tienen un efecto inhibitor dramático en el sistema de GSH.

En particular, el piperlongumine es el mayor alcaloide de la pimienta larga (*Piper longum* L.), sus frutos verdes secos se usan a modo de tónico. La infusión de la raíz de *P. longum* se usa para inducir la expulsión de la placenta después del nacimiento. Otros usos tradicionales incluyen el tratamiento de tumores, enfermedades del bazo, la malaria, hepatitis vírica, bronquitis, la tos, el asma, infecciones respiratorias, dolor de estómago y la gonorrea (Bezerra *et al.*, 2013).

La glutatión S transferasa pi 1 (GSTP1) es uno de los dos principales blancos de piperlongumine, junto con la carbonil reductasa, las cuales son conocidas por la desintoxicación de xenobióticos. Además, la GSTP1 se involucra en la activación de otras proteínas antioxidantes, tales como la peroxirredoxina 1 (PRDX1). El piperlongumine ha mostrado una inhibición modesta de la actividad enzimática de la GSTP1 recombinante *in vitro*, consistente con la idea de que esta enzima es una diana del piperlongumine. Además, el tratamiento con piperlongumine disminuye los niveles de GSH, mientras incrementa las ROS en múltiples líneas celulares de humano (Parkinson *et Hergenrother*, 2011).

JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la «Hipótesis de los radicales libres», el proceso de envejecimiento es una acumulación progresiva de cambios oxidativos que conducen a enfermedades y la muerte. También se ha demostrado reducciones relacionadas con la edad en sistemas antioxidantes exógenos y endógenos, que incluyen a las vitaminas C y E, GSH y enzimas antioxidantes. Los tioles intracelulares como el GSH son esenciales para mantener el ambiente altamente reducido en el interior de la célula (Rossi R *et al.*, 2009).

Roth *et al.* (2014) han demostrado que GSH, administrándolo en ratones vía transcraneal gracias a la permeabilidad del cráneo para componentes de bajo peso molecular, reduce significativamente la muerte celular de parénquima de cerebro y las meninges, mediante la neutralización de radicales libres y otras ROS, y Klapheck (1988) que este compuesto se encuentra en altas concentraciones en las semillas de los guisantes (*Pisum sativum*), por lo tanto, usar un extracto de este para reducir la mutagénesis en una cepa de Ames sensible a agentes oxidantes demostraría que su consumo puede ser benéfico para la salud.

HIPÓTESIS

El GSH es un agente que protege contra la mutagénesis producida por procesos que requieren radicales libres.

OBJETIVO GENERAL

Mediante la prueba de Ames, plantear una estrategia experimental donde se observe la protección del GSH contra la mutagénesis dependiente de radicales libres, en la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer un mutágeno adecuado, que provoque daño oxidativo y pueda ser sustrato del GSH, determinando las concentraciones adecuadas que permitan visualizar mutagénesis sin ser citotóxico, mediante la prueba de Ames.

Estandarizar las modificaciones necesarias en la prueba Ames para observar la inhibición de la mutagénesis por GSH de origen sintético.

Emplear un agente bloqueador específico para GSH, con la finalidad de demostrar que la reducción de la mutagénesis se debe a la acción protectora del mismo.

Realizar las pruebas de protección anteriores, pero empleando un extracto de las semillas de guisante (*Pisum sativum*), para observar si hay inhibición de la mutagénesis; usando el agente inhibidor de GSH, que demuestre que el efecto de protección se debe al mismo y no a otro compuesto contenido en el extracto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nota: Toda la metodología se realiza en condiciones de esterilidad, ya sea usando un mechero de Bunsen o una cabina/campana de flujo laminar, y se emplea material estéril, con la finalidad de evitar contaminación. Para conocer los detalles de cada experimento realizado en este trabajo, revisar los anexos incluidos al final.

Revisión de los marcadores moleculares.

Se descongelará la cepa de *Salmonella typhimurium* TA102 en medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L), incubándose durante 24 horas a 37°C, diluyéndola, con la finalidad de obtener colonias de la misma.

Antes de hacer los experimentos necesarios, es importante revisar los marcadores moleculares, es decir, comprobar que la cepa posee ambos plásmidos (pKM101 y pAQ1), por lo que se someterá a distintas pruebas. Estas pruebas consisten en colocar a la bacteria en medio que contenga o carezca de cierto tratamiento que desvelará si posee cierto rasgo característico de la cepa. Antes, se seleccionan cinco colonias y se dejan creciendo en medio líquido NB No. 2 OXOID en agitación constante (150 rpm) a 37°C durante 16 horas aproximadamente. La primera prueba consiste en añadir los antibióticos ampicilina 25 µg/mL (presencia del plásmido pKM101) y/o tetraciclina 20 µg/mL (presencia del plásmido pAQ1), tanto juntos como por separado, incluyendo controles negativos de ambos, en placas de

medio completo sólido NB No. 2 OXOID. Posteriormente se inoculan las cinco muestras en la placa. Las cepas que contengan el plásmido no deben mostrar inhibición del crecimiento. Como la cepa TA102 es auxótrofa para histidina, se añade en medio mínimo una solución de histidina 0,8 mM y su control negativo respectivo, inoculando las cinco muestras en medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Solamente debe haber crecimiento en las cepas que contienen la solución de histidina. La tercera prueba consiste en revisar la sensibilidad a la luz ultravioleta, en medio completo NB No. 2 OXOID se colocan las cinco muestras en forma de estría, haciendo cuatro exposiciones (duración: 15 segundos) a la luz ultravioleta mediante un lámpara a una distancia de 33 a 35 centímetros, durante 15, 30, 45 y 60 segundos, cubriendo con papel aluminio. Si las cepas contienen el marcador *uvrB* solamente crecerán en la porción de la placa que no ha sido irradiada. La siguiente prueba consiste en observar la sensibilidad al cristal violeta, el cual desvela si contiene el marcador *rfa*, que es la modificación en la pared celular. En medio completo se inocularán las bacterias en forma de estrías los cinco cultivos y se toma un poco de cristal violeta y se traza una línea perpendicular. Una zona clara de inhibición alrededor de la línea de cristal violeta indica la presencia de la mutación. Finalmente se revisa la frecuencia en la reversión espontánea, que consiste en sembrar por triplicado cada una de las cinco muestras de bacterias, añadiendo 1×10^8 de células en cada placa, con agar de superficie complementado con una solución de histidina (concentración final: $2,5 \times 10^{-3}$ mM). Una vez que haya solidificado, se incuba a 37°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se cuenta el número de colonias que revierten la mutación. El número de colonias revertientes por placa en esta cepa (TA102) oscila entre 240-320.

Una vez terminado este proceso, de las cinco muestras iniciales, se elige la cual cumpla con las características de la cepa. Se inoculará en medio completo con ampicilina (25 µg/mL) y tetraciclina (20 µg/mL) durante veinticuatro horas, mediante diluciones.

Es importante establecer las concentraciones de trabajo, del mutágeno, GSH y el inhibidor de GSH. Por lo tanto se hacen curvas de dosis (concentración del reactivo)-respuesta (número de colonias que revierten la mutación). En este caso, se realiza la prueba de la frecuencia de la reversión espontánea/prueba de Ames (Maron *et al.* Ames, 1983), añadiendo el tratamiento deseado, considerando triplicados y controles negativos (incluyendo el solvente de algún reactivo).

Prueba de Ames.

Para realizar dicha prueba se requiere de un cultivo de 16 horas, para ello hay que inocular una colonia de *Salmonella typhimurium* TA102 caracterizada en un tubo estéril con medio líquido Nutrient Broth No. 2 OXOID, usando un palillo de madera estéril, posteriormente se incuba a 37°C con agitación constante de 150 rpm.

En el experimento, se manejan distintos controles:

1. Control de bacterias: Se añaden 10^8 bacterias en el agar de superficie para considerar el número de colonias que revierten la mutación normalmente.
2. Control de solvente: Para determinar que el solvente no tiene ningún efecto adverso o inconveniente, se añade un poco junto con las bacterias (10^8) en el agar de superficie, que en

este caso fueron dimetil sulfóxido (DMSO) para 4NQO y Piperlongumine (PLM), y H₂O para GSH y H₂O₂.

Para realizar el ensayo, se vierten 2 mL de agar de superficie a 45°C en un tubo de ensayo estéril (uno por tratamiento), las bacterias (100 µL=10⁸) y el tratamiento correspondiente, en placas de Petri con medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Cada tratamiento se realiza por triplicado. Es necesario trabajar en condiciones de esterilidad, utilizando una cabina/campana de flujo laminar. Cuando el agar de las placas solidifique, estas se incuban invertidas a 37°C durante 48 horas (Figura 3). Después de transcurrido este tiempo, se cuentan las colonias obtenidas en cada placa, usando un contador de colonias New Brunswick Scientific.

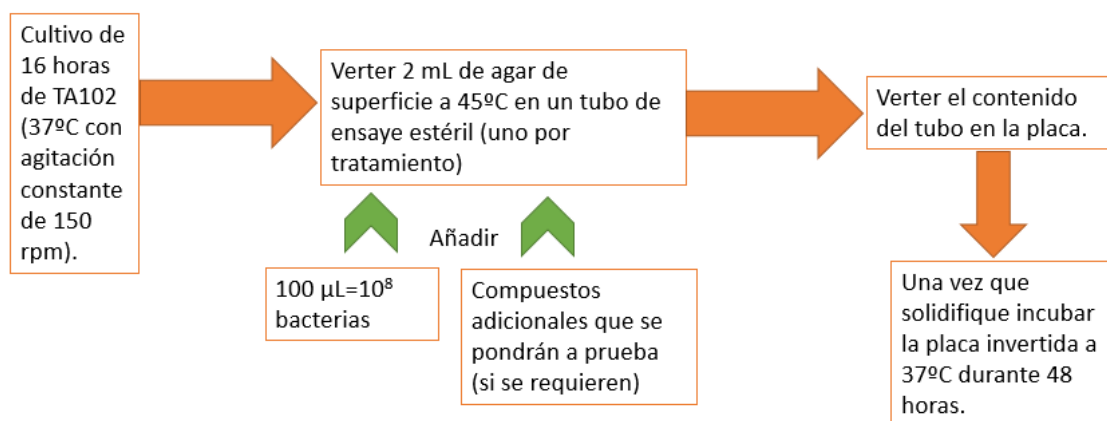


Figura 3. Diagrama de flujo del procedimiento empleado en la prueba de Ames. Es importante recordar que todos los tratamientos se hacen por triplicado.

Curva de dosis-respuesta de *S. typhimurium* TA102 con el mutágeno 4NQO, en la prueba de Ames.

Es importante evaluar la frecuencia de la reversión espontánea de TA102 al someterse a distintas concentraciones del mutágeno 4-Nitroquinoleína-N-óxido (4NQO). Las concentraciones de 4NQO usadas son las siguientes: 0,4; 0,6; 0,8; 1 y 1,2 µg/placa. Para ver más detalles, buscar el experimento 1 en el anexo.

Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA102 con GSH.

Hemos observado citotoxicidad de GSH, por lo que hemos decidido hacer curvas de crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA102 probando distintas concentraciones del compuesto. Este experimento requiere un cultivo de 16 horas (medio líquido Nutrient Broth No. 2 OXOID, 37°C a 150 rpm). Se han hecho cultivos líquidos en siete matraces: 10 mM; 8 mM; 6 mM; 4 mM; y 2 mM de GSH; además de un control de crecimiento normal y un blanco. Se añaden 3,5 mL de medio líquido Nutrient Broth No. 2 OXOID en matraces nefelométricos; el volumen correspondiente para obtener la concentración deseada de GSH, a partir de una solución de 33,3 mM, excepto para el control y el blanco; 100 µL de bacterias (10⁸) y se completa con H₂O MiliQ estéril, para tener un volumen final de 5 mL en todos los matraces. Posteriormente se realiza una lectura inicial de absorbancia en un espectrómetro (Spectronic 20, Milton Roy Company). Los matraces se incuban a 37°C a 150 rpm. Cada 30 minutos se

realizan las lecturas durante más de 10 horas. Los valores de absorbancia se grafican para observar el crecimiento.

Para averiguar la clase de efecto citotóxico de GSH, se ha sembrado *S. typhimurium*, que previamente se encontraba a una concentración alta de GSH (150 mM) y que no mostraba crecimiento, en una placa de Petri de medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L), incubándose a 37°C durante 24 horas.

Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H₂O₂.

Debido que no es posible observar un efecto antimutagénico de GSH, hemos decidido emplear un mutágeno que carezca de un metabolismo tan complejo, por lo que el H₂O₂, parece una mejor opción. Al igual que se ha hecho con 4NQO, se realiza una curva de dosis-respuesta, con la prueba de Ames, con la finalidad de dar con una concentración que muestre mutagénesis, sin ser citotóxico. Las concentraciones usadas han sido: 0,44975; 0,044975 y 0,0044975 mM. Para más detalles, ver el experimento 10 en el anexo.

Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.

Se realiza una prueba de Ames, haciendo una preincubación con la fracción S9, donde se vierten las bacterias (10⁸), GSH (0,2; 0,1 y 0,05 mM) y el cóctel de la fracción S9 (Fracción S9 al 10%; Solución de MgCl₂ 8 mM KCl 33 mM; Glucosa 6 fosfato 6 mM; NADP 4 mM; Amortiguador de fosfatos 0,1 M pH: 7,4) en un tubo de 2 mL, estéril, y se colocan en una incubadora a 37°C con agitación constante (150 rpm) durante 5 minutos. Después de que ha transcurrido ese tiempo, se vierten 0,44975 mM de H₂O₂ y se vuelve a incubar, durante 15 minutos. Al terminar la preincubación, el contenido se vierte en un tubo de ensaye con 2 mL de agar de superficie a 45°C, se mezcla perfectamente y se vierte en una placa de medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Al solidificar, se incuban las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. Después se cuenta el número de colonias usando un contador New Brunswick Scientific. Para más detalles, ver el experimento 15 en el anexo.

Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.

Como en el ensayo con GSH, se ha visto que reduce la mutagénesis ocasionada por H₂O₂, el siguiente paso es asegurarse de que tal efecto es gracias al GSH y no a otro componente, es necesario incluir un inhibidor del mismo, llamado Piperlongumine (PLM).

En este experimento, los elementos se preincubaron a distintos tiempos, con la finalidad de permitir que ocurran las interacciones deseadas. El GSH (0,2 mM) se incuba con PLM (probando 20, 60 y 120 µM, por separado) en un tubo de 2 mL estéril a 37°C a 150 rpm, durante 5 minutos, para permitir que el inhibidor bloquee el GSH. Después se añaden en el mismo tubo 10⁸ bacterias y el cóctel de la fracción S9 (Fracción S9 al 10%; Solución de MgCl₂ 8 mM KCl 33 mM; Glucosa 6 fosfato 6 mM; NADP 4 mM; Amortiguador de fosfatos 0,1 M pH: 7,4) y se vuelve a incubar a 37°C a 150 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, se añade al mismo tubo 0,44975 mM de H₂O₂, y se incuba el tubo a 37°C a 150 rpm durante 15 minutos. Una vez que se concluya la preincubación, se vierte el contenido del tubo de 2 mL en un tubo de ensaye con 2 mL de agar de superficie a 45°C; se mezcla, se vacía y se extiende en una placa de Petri de medio mínimo sólido de Vogel-Bonner (2% de dextrosa/glucosa). Al solidificar el

agar, se incubaba a 37°C durante 48 horas. Después se cuenta el número de colonias usando un contador New Brunswick Scientific. Para más detalles, ver el experimento 16 en el anexo.

Ensayo de evaluación de la preincubación sin H₂O₂.

En nuestros resultados hemos observado que el H₂O₂ produce toxicidad durante la preincubación, por lo que esta se lleva a cabo del modo siguiente: Se añaden, en un tubo de 2 mL, 0,2 mM de GSH y 120 µM del inhibidor de GSH, Piperlongumine (PLM), a 37°C a 150 rpm durante 5 minutos; luego se agregan las bacterias (10⁸) en el mismo tubo y se vuelve a incubar a 37°C a 150 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se añaden 0,44975 mM de H₂O₂ con los demás elementos, pero solo se mezclan perfectamente, es decir, no se preincuba con el peróxido de hidrógeno. Después se vierte el contenido en un tubo de ensaye con 2 mL de Agar de superficie a 45°C y a su vez en una placa de Petri de medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Al solidificar, se incuban las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. Finalmente se cuenta el número de colonias usando un contador New Brunswick Scientific.

Para más detalles, ver el experimento 20.

Curvas de dosis-respuesta con FeCl₂ y H₂O₂, mediante la prueba de Ames.

Ahora, se plantea llevar a cabo la reacción de Fenton, por lo que se incluirá una solución de cloruro ferroso (FeCl₂) en la mezcla. Se ha realizado una preincubación de 5 minutos con las bacterias (10⁸) y 4 concentraciones de H₂O₂ (0,44975; 0,2794; 0,0931 y 0,044975 mM por separado) a 37°C a 150 rpm. Al terminar, se agrega la solución de FeCl₂ (50; 100 y 200 µM por separado) y se vierte el contenido en un tubo de ensaye con 2 mL de Agar de superficie a 45°C y a su vez en una placa de Petri de medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Al solidificar, se incuban las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. En esta ocasión no se han hecho triplicados y en los tratamientos se obtienen todas las combinaciones posibles entre H₂O₂ y FeCl₂ (por ejemplo: H₂O₂ 0,44975 mM con FeCl₂ 50 µM; H₂O₂ 0,2794 mM con FeCl₂ 50 µM; H₂O₂ 0,44975 mM con FeCl₂ 100 µM). Finalmente se cuenta el número de colonias usando un contador New Brunswick Scientific. Para más detalles, ver el experimento 21.

Curva de dosis-respuesta con FeCl₂ y FeCl₃, mediante la prueba de Ames.

En este experimento se realizan curvas de dosis respuesta con distintas concentraciones de cloruro ferroso (FeCl₂) y cloruro férrico (FeCl₃), por separado. La finalidad es hallar una concentración que no inhiba el crecimiento bacteriano. Para ello, se agregan 10⁸ bacterias con 7 concentraciones (200, 400, 600, 800, 1000, 1500 y 2000 µM por separado) de FeCl₂ o FeCl₃, en un tubo de ensaye con 2 mL de agar de superficie a 45°C, se mezclan y se vierten en una placa de Petri de medio mínimo sólido (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. No se han hecho triplicados. Al igual que en los anteriores experimentos, después de que el agar solidifique, se incuban las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. Después de que transcurra este tiempo, se cuenta el número de colonias usando un contador New Brunswick Scientific. Para ver más detalles, buscar el experimento 22 en el anexo.

RESULTADOS

Curva de dosis-respuesta de *S. typhimurium* TA102 con el mutágeno 4NQO, en la prueba de Ames.

Se ha obtenido una correlación entre la dosis empleada de 4NQO y la respuesta de mutagénesis mediante el número de colonias observadas (Gráfico 1). Para poder fijar la concentración de trabajo. Con 0,6 y 0,8 µg por placa se obtienen en promedio entre 1.200 a 1.500 colonias, por lo cual se decide usar 0,7 µg por placa en los ensayos.

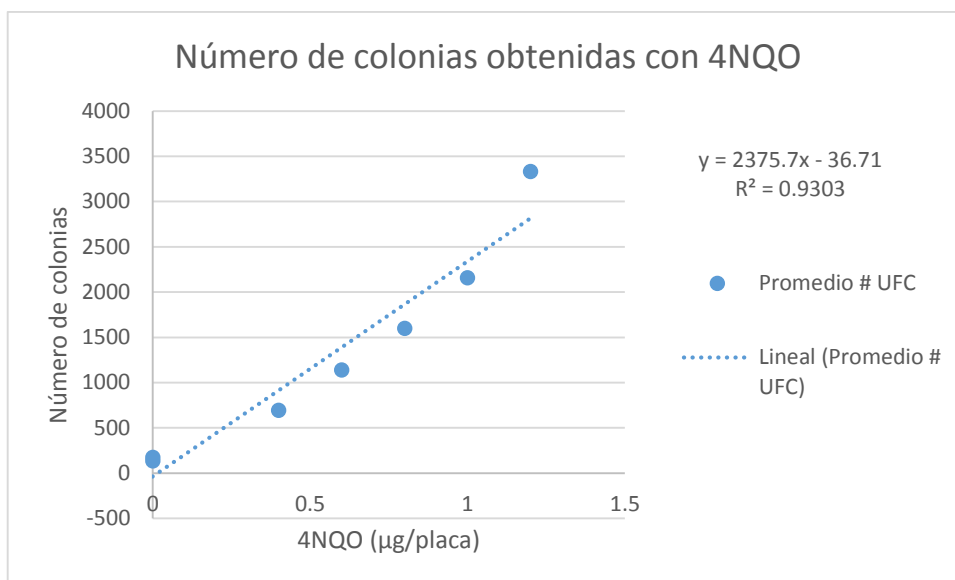


Gráfico 1. Se observa la regresión lineal entre la concentración de 4NQO y el número de colonias de reversión espontánea observadas.

Para más detalles, ver el experimento 1 en el anexo.

Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA102 con GSH.

Según los resultados observados, las concentraciones altas (150 a 2 mM) inhiben el crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA102. Mientras que concentraciones de 1 mM o menores, parecen no tener ningún efecto adverso (Gráfico 2). Por lo tanto se usarán concentraciones que no inhiban el crecimiento y donde se observe un efecto de protección contra ROS.

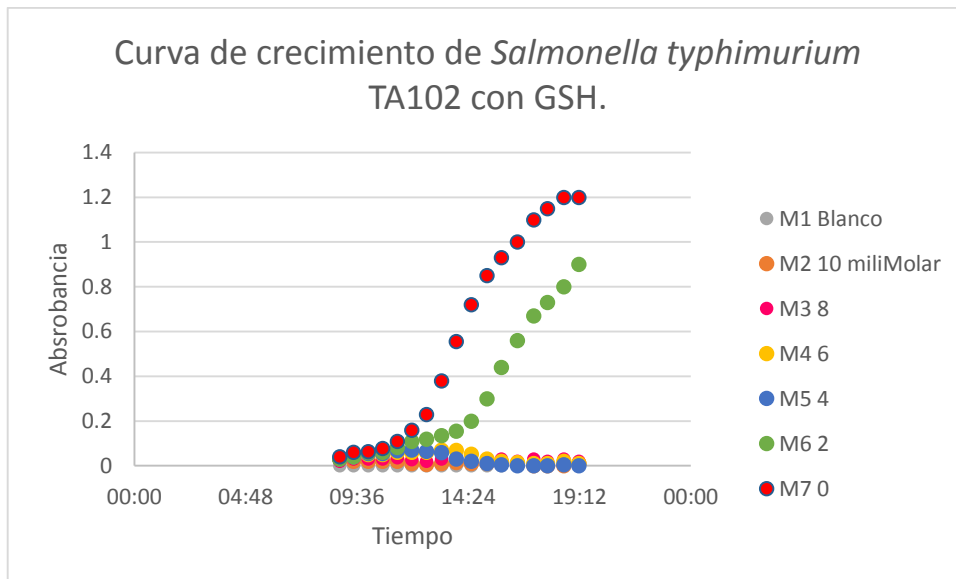


Gráfico 2. Curvas de crecimiento de *S. typhimurium* sometida a distintas concentraciones de GSH.

Como se ha mencionado anteriormente en la metodología, se buscaba conocer la clase de efecto citotóxico de GSH, sembrando *Salmonella typhimurium* TA102, que previamente se encontraba a una concentración alta de GSH (150 mM) y que no mostraba crecimiento, en una placa de Petri de medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L), con la finalidad de diluir el GSH. Hemos observado crecimiento (colonias) de la bacteria, por lo que se presume que el GSH tiene un efecto bacteriostático.

Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H₂O₂.

Se ha obtenido una correlación entre la concentración de H₂O₂ y la mutagénesis mediante al número de colonias observadas (Gráfico 3). En esta ocasión, también se fija la concentración que se usará en los ensayos de Ames.

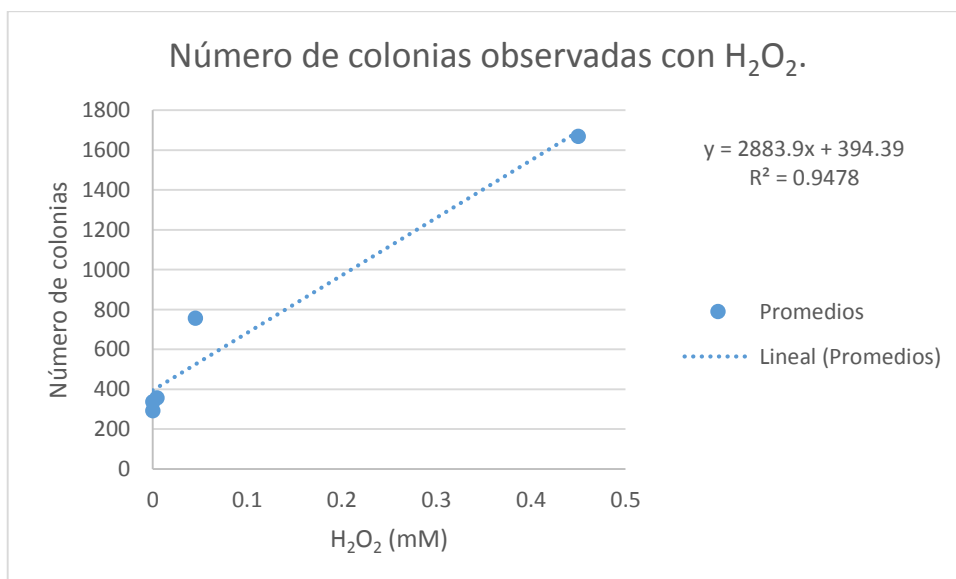


Gráfico 3. Curva de dosis-respuesta con H₂O₂, que muestra el número de colonias revertidas obtenidas al exponerse con peróxido de hidrógeno.

Para más detalles, ver el experimento 10 en el anexo.

Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.

En este experimento se han preincubado juntos las bacterias, fracción S9 y GSH (0,2; 0,1 y 0,05 mM, por separado) durante 5 minutos a 37°C a 150 rpm y se ha añadido H₂O₂ (0,44975 mM), incubándose durante 15 minutos, con la finalidad de permitir que GSH interactúe con las células y pueda entrar en ellas, antes de que el mutágeno interactúe con las mismas. Esperando así que el GSH pueda inhibir al mutágeno antes de que este último tenga un efecto en la mutagénesis. Se puede observar reducción en el número de colonias revertidas con este tratamiento (Gráfico 4).

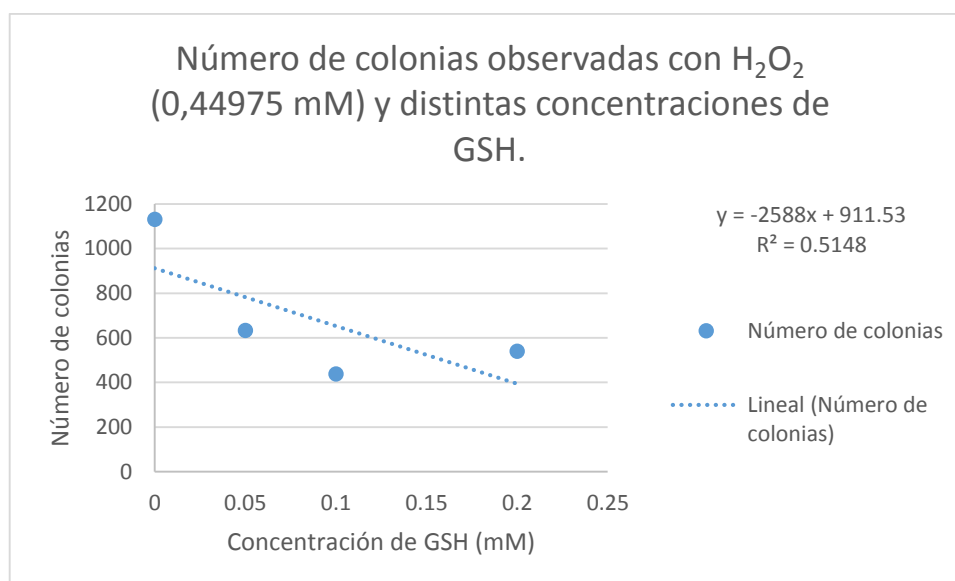


Gráfico 4. Curva que muestra el número de colonias obtenidas al exponerse a GSH (0,2; 0,1 y 0,05 mM), fracción S9 y H₂O₂ (0,44975 mM).

Para más detalles, ver el experimento 15 en el anexo.

Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.

Aunque se ha observado una disminución de la mutagénesis, el tratamiento con el inhibidor de GSH, PLM, no ofrece el efecto que se espera. Pues la hipótesis de este experimento es que el H₂O₂ aumenta el número de colonias observadas (de 744 a 1179,33 colonias en promedio), el GSH se encarga de reducir este número (de 1179,33 a 897,33 colonias en promedio) y el PLM, al bloquear al GSH, mantiene el número de la mutagénesis. Sin embargo, los números obtenidos indican que no hay tal protección por GSH (619,33; 702; 642, 67 colonias en promedio para 120, 60 y 20 μM de PLM respectivamente). Por lo que se concluye que hay otro elemento en el cóctel que es responsable de la disminución de la mutagénesis o que PLM no está inhibiendo a GSH (Gráfico 5).

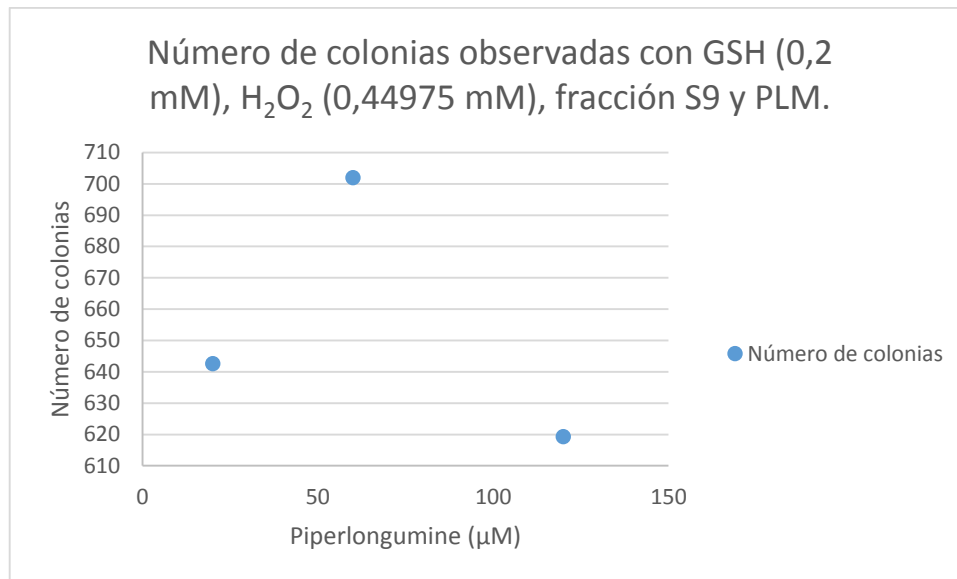


Gráfico 5. Número de colonias (promedios) observadas con GSH 0,2 mM; H₂O₂ 0,44975 mM; fracción S9 (10%) y PLM (20, 60 y 120 µM).

Para más detalles, ver el experimento 16 en el anexo.

Ensayo de evaluación de la preincubación sin H₂O₂.

No se ha observado reducción de la mutagénesis por GSH, pues el mutágeno, H₂O₂, aumenta el número de colonias observadas (de 661,33 a 2.378,67 colonias en promedio), el GSH no reduce este número (2.573,33 colonias en promedio) y al usar el inhibidor, PLM, esta cifra se mantiene (2.817,33 colonias en promedio). Por lo que se concluye que el GSH no está bloqueando la mutagénesis por H₂O₂.

Para más detalles, ver el experimento 20 en el anexo.

Curvas de dosis-respuesta con FeCl₂ y H₂O₂, mediante la prueba de Ames.

Anteriormente, ya hemos observado que al someter a las bacterias a H₂O₂, las curvas del número de colonias obtenidas son lineares, pero con el tratamiento de FeCl₂, se puede apreciar una pequeña reducción en el número de colonias, especialmente a altas concentraciones de H₂O₂, asemejándose a una curva logarítmica, por lo que podría estar ocurriendo la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton y por lo tanto, toxicidad. Además de que la preincubación aplicada hace que la técnica sea más sensible (Gráficos 6, 7 y 8). Por lo visto, es mejor buscar las concentraciones óptimas en un espectro mayor, y eliminando la preincubación, estableciendo el rango de concentraciones que se pueden usar en los experimentos.

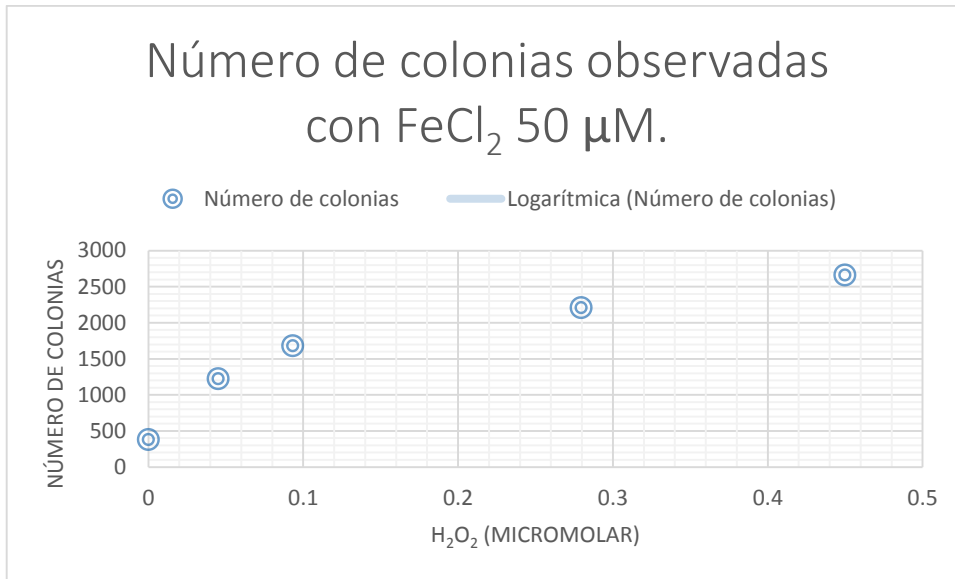


Gráfico 6. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 50 μM de FeCl₂.

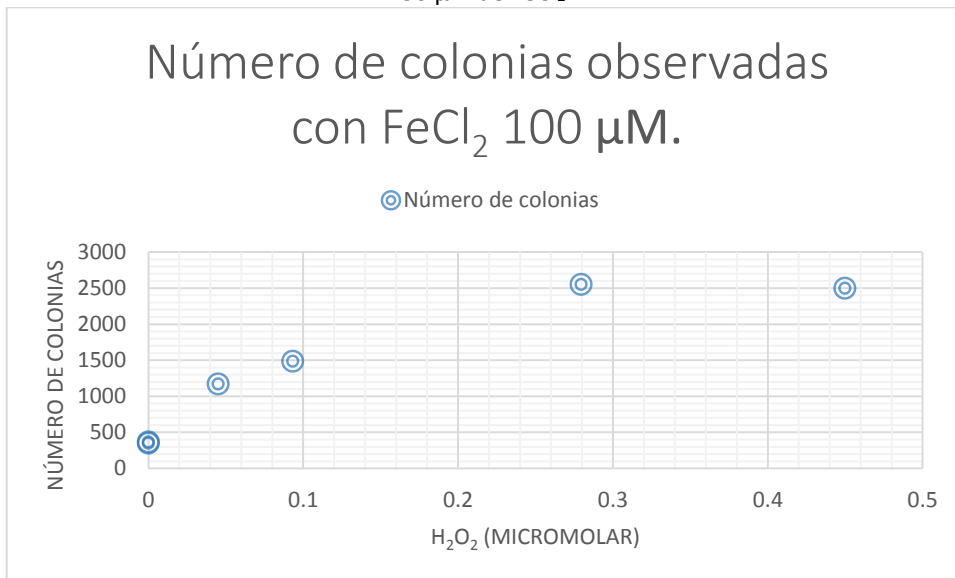


Gráfico 7. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 100 μM de FeCl₂.

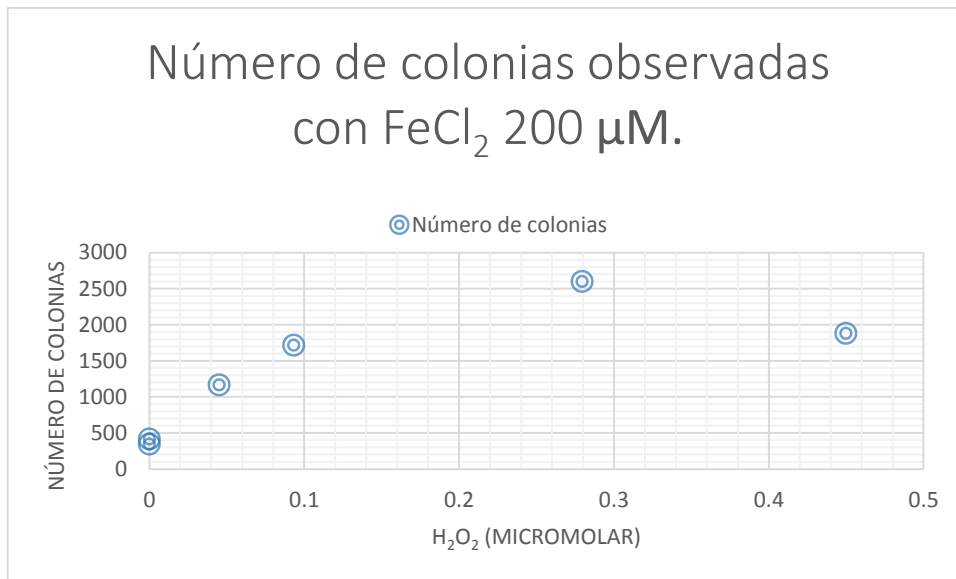


Gráfico 8. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 200 μM de FeCl₂.

Para más detalles, ver el experimento 21 en el anexo.

Curva de dosis-respuesta con FeCl₂ y FeCl₃, mediante la prueba de Ames.

En el último experimento realizado se ha buscado el rango de concentraciones de FeCl₂ que no sean citotóxicas, usando concentraciones mayores en comparación con el experimento anterior. También se ha incluido cloruro férrico (FeCl₃) para comparar el comportamiento. Con ambas soluciones, podemos concluir que no causan ningún efecto citotóxico en comparación con el control (número de colonias obtenidas sin tratamiento alguno), pareciendo factible usar cualesquiera (Gráficos 9 y 10).

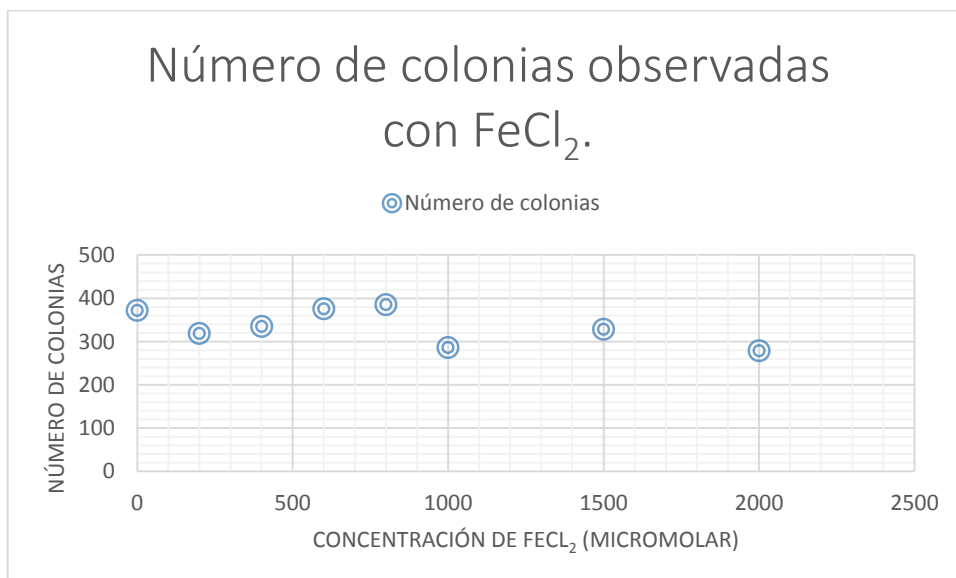


Gráfico 9. Número de colonias obtenidas al tratarse con distintas concentraciones de FeCl₂ (200, 400, 600, 800, 1.000, 1.500, 2.000 μM).

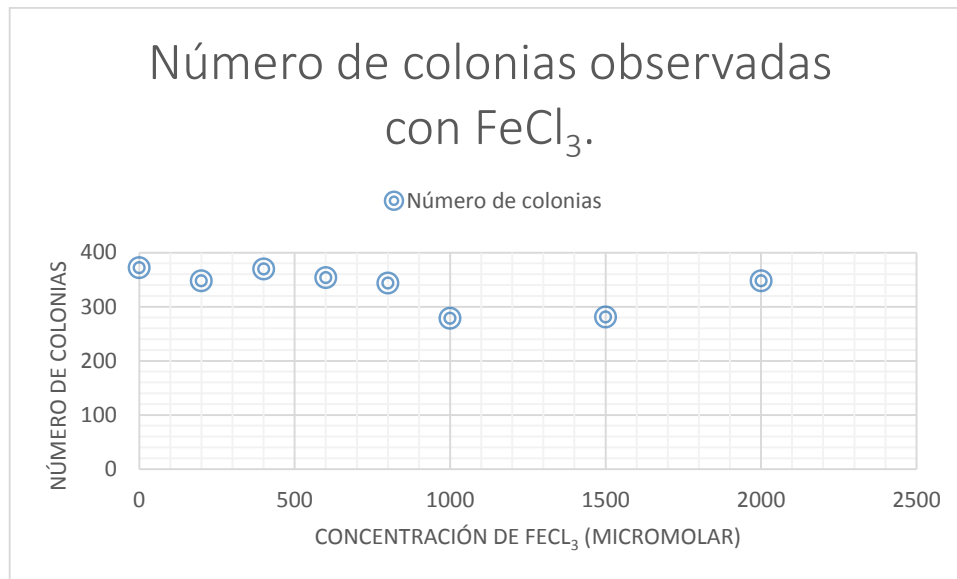


Gráfico 10. Número de colonias obtenidas al tratarse con distintas concentraciones de FeCl₃ (200, 400, 600, 800, 1.000, 1.500, 2.000 μM).

Para más detalles, ver el experimento 22 en el anexo.

DISCUSIÓN

Curvas de dosis-respuesta de *S. typhimurium* TA102 con los mutágenos 4NQO y H₂O₂ en la prueba de Ames.

Hemos decidido cambiar de mutágeno (de 4NQO a H₂O₂), por cuanto el metabolismo del carcinógeno 4NQO es complejo. La actividad carcinógena de este compuesto parece estar relacionada con la reducción de los intermediarios tales como el radical nitro y la nitrosoquinoleína 1-óxido o a 4HAQO. El 4NQO reacciona espontáneamente con tioles. 4HAQO, el producto de la reducción de 4 electrones del metabolismo de 4NQO, oxida al GSH bajo condiciones fisiológicas y tioles proteicos (Varnes *et Biaglow*, 1979). En el trabajo de Varnes *et Biaglow* (1979), se observa que la toxicidad de 4NQO en células V79 puede disminuir significativamente mediante la adición de GSH en el medio de cultivo celular. El superóxido y el peróxido pueden formarse en el curso de la oxidación de los aniones radicales nitro de 4NQO, los cuales son intermediarios de la reducción de 4NQO. Tales radicales pueden ser citotóxicos de varios modos: (a) pueden reaccionar con oxígeno y producir superóxido, H₂O₂ y posiblemente radicales hidroxilo; (b) pueden perturbar la transferencia celular de electrones, mediante la habilidad de reducir ferricitocromos; y pueden desproporcionarse para formar nitrosoquinoleína 1-óxido, el cual es próximo a ser carcinógeno. El radical libre hidroxilamina es otro intermediario posible en la reducción de 4NQO a 4HAQO. El GSH puede inhibirla formación de radicales libres reactivos de oxígeno en soluciones de 4NQO. 4HAQO es el mayor metabolito de 4NQO en muchos tejidos y se cree que es el carcinógeno más próximo porque reacciona espontáneamente con DNA en presencia de oxígeno y puede metabolizarse a ésteres reactivos de DNA (Varnes *et Biaglow*, 1979). Las GSH transferasas son una familia de enzimas que desintoxican y catalizan la conjugación de GSH con numerosos electrófilos reactivos. Se ha demostrado que la reacción entre 4NQO y GSH ocurre enzimáticamente o no

enzimáticamente. La reacción de 4NQO con GSH produce un conjugado acompañado de la formación de nitrito (Stanley J *et al*, 1989). Los datos presentados por Stanley J *et al* (1989), establecen que el azufre de cisteína del GSH reemplaza el grupo nitro de 4NQO, formando 4-(glutatión-S-il)-quinoleína 1-óxido. A pesar de que en los anteriores trabajos se ha observado inhibición de la toxicidad de 4NQO por GSH, en el presente trabajo no ha sido así, ya que en algunos casos la mezcla de ambos resultaba tóxica (concentraciones mayores a 0,5 mM de GSH), opuesto a lo encontrado en la literatura; por lo que usar H₂O₂, el cual creíamos que ocasionaba un daño directo al DNA, sería una mejor opción.

Efecto bacteriostático de GSH en *Salmonella typhimurium* TA102.

En este trabajo se ha observado un efecto bacteriostático de GSH (concentraciones mayores a 1 mM), en *Salmonella typhimurium* TA102, aunque se desconocen las causas de tal fenómeno, podemos intuir que modifica el metabolismo celular, impidiendo la proliferación. Schairer *et al.* (2013) también han informado dicho efecto a pH fisiológico. Venketaraman *et al.* (2005) han observado que GSH tiene un efecto bacteriostático en la cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis*, H37Rv, a 5 mM, mientras que en este trabajo, en *Salmonella typhimurium*, a 2 mM ya se observa tal efecto. Según Kumar *et al.* (2011), el GSH impide el crecimiento cuando se encuentra en altas concentraciones a nivel intracelular, como sugiere la incapacidad de las células de levadura de sobre expresar Hgt1, un transportador específico de GSH, para crecer en medio que contiene GSH. Las condiciones extremas de GSH, bajas o altas, pueden causar alteraciones en el metabolismo del hierro, además de que los niveles altos de GSH bloquean la secreción y el plegamiento oxidativo de proteínas (Kumar *et al.*, 2011). Se ha mostrado que en ciertas líneas celulares, los tioles pueden causar apoptosis en un patrón bifásico, con un poco de apoptosis en concentraciones altas (mayores a 2 mM) o bajas (menos de 0,05 mM) del tiol, pero incrementa enormemente los niveles de apoptosis en concentraciones intermedias (0,05 a 1 mM) del tiol (Held *et al.*, 1996), sin embargo, en las pruebas que hemos realizado, en *Salmonella typhimurium* TA102, las concentraciones tóxicas son mayores a 1 mM. Según los resultados de Held *et al.* (1996), el GSH causa peroxidación pero el daño incrementa continuamente con la concentración del mismo, además de que en algunos resultados citados por Held *et al.* (1996), el GSH presenta un patrón bifásico de toxicidad, y al igual que ellos concluyen, es probable que las diferencias en el tipo celular, la composición del medio, el pH, y otros factores, pueden explicar las discrepancias. Si el GSH se oxida lentamente causa una ligera toxicidad, o ninguna, mientras que si se oxida rápidamente, pero reacciona con H₂O₂ más rápidamente de lo que se somete a oxidación, puede causar toxicidad.

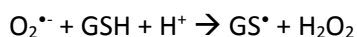
Inhibición de la mutagénesis al llevar a cabo la preincubación con la fracción S9.

En el ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9 (experimento 16), es posible pensar que la fracción S9 es responsable de reducir la mutagénesis, pues el inhibidor de GSH demuestra que la protección observada en ese experimento no se debe a la acción del GSH. Así como en algunos otros ensayos, donde hemos observado que al añadir la fracción S9 en el cóctel de la preincubación se puede abolir la mayoría de la mutagénesis ocasionada por H₂O₂, como ya se ha reportado, pues la fracción S9 contiene a la enzima catalasa, la cual puede degradarlo (Ariza *et Pueyo*, 1991). Además de que la catalasa de la fracción S9 fue 400 U/50 µL, que es una cantidad 8 veces mayor a la necesaria (50 U = 50 µmol/min) para suprimir aproximadamente el 90% de la mutageneidad de

acuerdo al estudio de Ariza *et Pueyo* (1991). Cuando se añadía el H₂O₂ y la fracción S9 al mismo tiempo, el peróxido de hidrógeno actuaba, mostrando un aumento en el número de colonias revertidas; sin embargo, cuando se preincubaba la fracción con las bacterias durante cinco minutos, antes de exponerse al mutágeno, se reducía considerablemente la mutagenicidad, este efecto se observa perfectamente en los experimentos 13-17.

Interacción de GSH con H₂O₂ y las ROS generadas en la reacción de Fenton.

De acuerdo a los resultados de Han (1992), el GSH no reduce significativamente la mutagénesis inducida por H₂O₂. Es probable que el H₂O₂ exógeno, el cual genera radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton, no se convierta a H₂O por el sistema antioxidante de GSH. Es probable que el GSH reduzca la mutagénesis mediante la inhibición de los aniones radicales superóxido endógenos en la cepa *S. typhimurium* TA104. Además, según los resultados de Han (1992), GSH no disminuye la mutagénesis inducida por H₂O₂, probablemente porque el GSH no inhibe la mutagénesis de los radicales hidroxilos formados por H₂O₂. De acuerdo al trabajo de Winterbourn *et Metodiewa* (1994), el superóxido reacciona con GSH y lo hace mediante un proceso en cadena sin la producción de H₂O₂. Además muestran que al reaccionar el superóxido con GSH, este último se convierte en GSSG y una pequeña cantidad de ácido sulfónico. El mecanismo general que se asume para esta reacción involucra la transferencia inicial de un electrón de GSH al superóxido, formando H₂O₂ y el radical tiilo (GS[•]), como se muestra a continuación en la siguiente reacción:



Sin embargo, este mecanismo puede resultar en H₂O₂, formado cuando se añade GSH al sistema de generación de superóxido. Alternativamente, en la reacción inicial, puede formarse un radical intermediario unido a tres electrones, que rompe el radical sulfinil (SO[•]) (Winterbourn *et Metodiewa*, 1994). Lo cual sugiere que no existe seguridad en que ocurra esta reacción en nuestro sistema planteado en la prueba de Ames. Además de que el superóxido puede regenerarse en el proceso. Aunque las concentraciones intracelulares de GSH son capaces de neutralizar al superóxido, esta no es una función útil. El resultado neto es una cadena en la cual varias moléculas de GSH se consumen por un superóxido original generado. Sin embargo, el GSH, en una célula aeróbica puede amplificar el estrés oxidativo debido a la generación de superóxido (Winterbourn *et Metodiewa*, 1994). Se necesita a la superóxido dismutasa [una enzima que cataliza la dismutación de los radicales superóxido: O₂^{•-} + O₂^{•-} + 2H⁺ → O₂ + H₂O₂ (McCord *et Fridovich*, 1969)] para prever que esto ocurra. El GSH y la superóxido dismutasa tienen una función sinérgica en la protección antioxidante celular, con el GSH neutralizando una gran variedad de radicales y la superóxido dismutasa removiendo el superóxido que se genera en este proceso (Winterbourn *et Metodiewa*, 1994).

Interacción de GSH con el hierro (Fe) en la reacción de Fenton.

Por otro lado, se ha demostrado que el cobre y la producción del radical hidroxilo dependiente de H₂O₂ son casi completamente inhibidas mediante la adición de GSH. Se piensa que la razón detrás de este fenómeno es que la formación del complejo GSH-Cu(I), no genera el radical hidroxilo, cuando reacciona con H₂O₂. Sin embargo, cuando el hierro reacciona con H₂O₂ en presencia de GSH, se generan radicales hidroxilo y radicales tiilo. Lo que sugiere que el complejo GSH-Fe(II) podría reaccionar con H₂O₂ para formar especies capaces de oxidar

componentes celulares; sin embargo, cuando la mezcla GSH-Fe(II) reacciona con H₂O₂, en presencia de DNA, el daño oxidativo es pequeño (Spear *et Aust*, 1995).

CONCLUSIONES

No hemos observado la protección de GSH sintético contra la mutagénesis dependiente de radicales libres, en la cepa *S. typhimurium* TA102 mediante la prueba de Ames. Sin embargo, provocar la reacción de Fenton es la mejor opción para observar tal efecto.

El GSH posee un efecto bacteriostático, lo cual ha limitado nuestras opciones en cuanto a elegir las concentraciones para hacer los ensayos.

Los mutágenos 4NQO y H₂O₂ tienen una correlación dosis-respuesta, sin embargo, aparentemente ninguno puede ser sustrato de GSH, por lo que se ha planteado provocar la reacción de Fenton, para generar radicales libres que lo sean, como el superóxido.

Al parecer, el piperlongumine (PLM) es un inhibidor de GSH (Shanshan *et al.*, 2013; Pei *et al.*, 2013), sin embargo, no hemos obtenido resultados donde veamos protección de GSH contra ROS y que PLM inhiba al primero.

Hemos observado que la fracción S9 posee propiedades antimutagénicas, quizá gracias a que contiene a la enzima catalasa.

Como no hemos podido probar que GSH sintético neutraliza la mutagénesis por ROS en la cepa *Salmonella typhimurium* TA102 de Ames, ha sido innecesario emplear el extracto de semillas de *Pisum sativum*, que contiene altas concentraciones de GSH.

PERSPECTIVAS

Se piensa que el *OH es la especie responsable de la ruptura de cadena simple de DNA y la generación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Por tal motivo se ha planteado provocar la reacción de Fenton, la cual genera distintos radicales, entre los cuales se encuentra el superóxido, un intermediario en la reacción, por lo que el GSH puede neutralizarlo y reducir en cierto grado la mutagénesis ocasionada por los radicales hidroxilos. Para ello se han usado soluciones de cloruro ferroso (FeCl₂) y cloruro férrico (FeCl₃), con el propósito anteriormente mencionado. Como un exceso de hierro en la célula es tóxico, se buscaban concentraciones donde no se observase tal efecto y pudiese usarse en la reacción de Fenton. Una vez producida, el GSH debería ser capaz de neutralizar algunos de los radicales libres generados, por lo que reduciría en cierto grado la mutageneidad en la cepa de Ames *S. typhimurium* TA102, al exponerse a H₂O₂ y FeCl₂ o FeCl₃.

Klapheck (1988) ha descrito altas concentraciones de GSH y hGSH en legumbres, específicamente las concentraciones de GSH en las semillas de guisante *Pisum sativum* son muy altas, por lo que integrar el uso de un extracto del mismo en las pruebas de Ames realizadas sería una buena opción para buscar una fuente natural y accesible de GSH. Además, al comprobar la protección de GSH de las semillas de *P. sativum* contra ROS, el consumo podría tener un efecto benéfico hacia la salud.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por el apoyo y la orientación brindada. A todos lo que me han ayudado durante la estancia en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams D, Dai M, Pellegrino G, Wagner B, Stern A, Shamji A *et* Schreiber S. 2012. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. PNAS. 109 (38): 15115-15120.
2. Ames B, Lee F *et* Durston W. 1973. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc Nat Acad Sci. 70 (3): 782-786.
3. Arima Y, Nishigori C, Takeuchi T, Oka S, Morimoto K, Utani A *et* Miyachi Y. 2006. 4-Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblast through reactive oxygen species. Toxicological sciences. 91 (2): 382-392.
4. Ariza R *et* Pueyo C. 1991. The involvement of reactive oxygen species in the direct-acting mutagenicity of wine. Mutation Research, Elsevier. 251: 115-121.
5. Baudouin P *et al.* 2012. Glutathione degradation is a key determinant of glutathione homeostasis. J Biol Chem. 287(7): 4552-4561.
6. Bezerra D, Pessoa C, Moraes M, Saker N, Silveira E *et* Costa L. 2013. Overview of the therapeutic potential of piperlongumine (piperlongumine). European journal of pharmaceutical sciences. 48: 453-463.
7. Bielawski W *et* Joy K. 1986. Reduced and oxidised glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. Planta. 169: 267-272.
8. Cadenas E *et* Packer L. Methods in Enzymology. Hydrogen peroxide and cell signaling, part C. Winterbourn C. H₂O₂ regulation of cell signaling. 2013. Elsevier. EUA. Volumen 528. Páginas: 3-19.
9. Carlsson J *et al.* 1988. Catalase inhibition by sulfide and hydrogen peroxide-induced mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strain TA102. Mutation research, Elsevier. 202: 59-64.
10. Chapple C. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. Clinical Periodontology. 27:287-296.
11. Cortinas C *et* Ostrosky P. 1980. Manual de métodos para la identificación de mutágenos carcinógenos y químicos ambientales. Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM. Volumen 1. Javier Espinosa. Métodos para la detección de mutaciones génicas en *Salmonella typhimurium*. 31-43.
12. Crick F. 1968. The origin of the genetic code. Medical research council, Journal of molecular biology. 38: 367-379.
13. Duffus J *et al.* 2007. Glossary of terms used in toxicology, Segunda edición. Pure and applied Chemistry. 79(7):1153-1344.
14. Fahey R *et al.* 1984. *Entamoeba histologica*: a eukaryote without glutathione metabolism. Science. 224: 70-72.
15. Forman H, Zhang H *et* Rinna A. 2009. Glutathione: Overview of tis protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med. 30 (1-2): 1-12.
16. Foyer C *et* Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: A proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta. 133: 21-25.

17. Friedberg E *et al.* 1995. DNA repair and Mutagenesis. American Society for Microbiology Press. Estados Unidos. Capítulo 5. Pág. 192.
18. Grey C *et Adlercreutz* P. 2003. Ability of antioxidants to prevent oxidative mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation research, Elsevier. 527: 27-36.
19. Hakura A *et al.* 1999. Advantage to use of human liver S9 in the Ames test. Mutation research. Elsevier. 438: 29-36.
20. Han J. 1992. Effects of various chemical compounds on spontaneous and hydrogen peroxide-induced reversion in strain TA104 of *Salmonella typhimurium*. Mutation research. Elsevier. 266: 77-84.
21. Hassan W *et al.* 2015. Metallic content of one hundred (100) medicinal plants. Nutritional disorders and therapy. 5 (4): 1000177.
22. Held K *et al.* 1996. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. Radiation research society. 146: 542-553.
23. Henle E *et Linn* S. 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. The journal of biological chemistry. 31 (272): 19095-19098.
24. Hoffman M *et Meneghini* R. Action of hydrogen peroxide on human fibroblast in culture. Photochemistry and photobiology. 30: 151-155.
25. Imlay J, Chin S *et Linn* S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. Science. 240(4852):640-642.
26. Ioannou D *et al.* 2015. Spatial positioning of all 24 chromosomes in the lymphocytes of six subjects: evidence of reproducible positioning following DNA damage with hydrogen peroxide and ultraviolet B. PlosONE. 10(3).
27. Kanojia D *et Milind Vaidya*. 2006. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. Oral Oncology. 42: 655-667.
28. Kerns E *et Di* L. 2003. Pharmaceutical profiling in drug discovery. Drug discovery today. 8(7):316-323.
29. Ketterer B. 1988. Protective role of the glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. Mutation research. Elsevier. 202:343-361.
30. Kim T *et al.* 2014. Piperlongumine treatment inactivates peroxiredoxin 4, exacerbates endoplasmic reticulum stress, and preferentially kill high grade glioma cells. Neuro-Oncology. 0:1-11.
31. Klapheck S. 1988. Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. Physiologia plantarum. 74: 727-732.
32. Kranner I *et Grill* D. 1993. Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds. Physiologia plantarum. 88: 557-562.
33. Kumar *et al.* 2011. Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. The EMBO journal. 30 (10): 2044-2056.
34. Langer P, Shanabruch W *et Walker* G. 1981. Functional organization of plasmid pKM101. Journal of Bacteriology. 145 (3): 1310-1316.
35. Liu J *et al.* 2013. Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation. Biochemical and biophysical research communications, Elsevier. 437: 87-93.
36. Levin D *et al.* 1982. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A*T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 7445-7449.

37. Levin D *et al.* 1984. Spontaneous and mutagen-induced deletions: Mechanistic studies in *Salmonella* tester strain TA102. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:4457-4461.
38. Loft S *et Poulsen* H. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. Springer-Verlag. 74: 297-312.
39. Maron D *et Bruce* Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, Elsevier Biomedical Press. 113: 173-215.
40. McCord J *et Fridovich* I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The journal of Biological Chemistry.* 224(22): 6049-6055.
41. McMahon R, Cline J *et Thompson* C. 1979. Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer research.* 39: 682-693.
42. Masip L, Veeravalli K *et Georgiou* G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants & redox signaling.* 8 (5): 753-762.
43. Matamoros M, Moran J, Iturbe I, Rubio M *et Becana* M. 1999. Glutathione and Homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiology.* 121: 879-888.
44. Mello A *et al.* 1984. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemistry.* 218: 273-275.
45. Mortelmans K *et Zeiger* E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation research.* Elsevier. 455: 29-60.
46. Noctor G *et Christine* Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Physiology.* 49: 249-279.
47. Parkinson E *et Hergenrother* P. 2011. Runaway ROS as a selective anticancer strategy. *ChemMedChem.* 6:1957-1959.
48. Pastore A *et al.* 2001. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clinical Chemistry.* 47 (8): 1467-1469.
49. Pei S *et al.* 2013. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *Journal of biological chemistry.* 288(47): 33542-33558.
50. Raj L *et al.* 2011. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature.* 475: 231-234.
51. Rossi R *et al.* 2009. Cysteinylation and homocysteinylation of plasma protein thiols during ageing of health human beings. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 13(9B): 3131-3140.
52. Roth T *et al.* 2014. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature.* 505: 223-228.
53. Sancar A. 1996. DNA excision repair. *Annual Review Biochemistry.* 65: 43-81.
54. Schafer F *et Garry* Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical Biology & Medicine.* 30 (11): 1191-1212.
55. Schairer D *et al.* 2013. Evaluation of the antibiotic properties of glutathione. *Journal of Drugs in Dermatology.* 12(11): 1272-1277.
56. Selby C *et Sancar* A. 1990. Structure and function of the (A)BC excinuclease of *Escherichia coli*. *Mutation research*, Elsevier. 236: 203-211.

57. Shanshan P *et al.* 2013. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cell. *The journal of Biological Chemistry*. 288(47): 33542-33558.
58. Shanabruch W *et Walker G.* 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA⁺ /exA⁺* -dependent mutagenesis. *Molec. Gen. Genet.* Springer-Verlag. 179: 289-297.
59. Slaga T. 1983. Overview of tumor promotion in animals. *Environmental health perspectives*. 50: 3-14.
60. Spear N *et Aust S.* 1995. Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 321(1):111-116.
61. Stanley J *et al.* 1989. Identification of the glutathione conjugate of 4-nitroquinoline 1-oxide formed in the reaction catalyzed by murine glutathione transferases. *Carcinogenesis*. 10(3):587-591.
62. Thomas S *et MacPhee D.* 1984. Crystal violet: a direct-acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. *Mutation research*. Elsevier. 140: 165-167.
63. Townsend D, Tew K *et Tampiero H.* 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacology*. 57: 145-155.
64. Varnes M *et Biaglow J.* 1979. Interactions of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide with the non-protein thiols of mammalian cells. *Cancer research*. 39: 2960-2965.
65. Venketaraman V *et al.* 2005. Glutathione and nitrosoglutathione in macrophage defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 73(3): 1886-1889.
66. Wallace S. Oxidative damage to DNA and its repair. Scandalios J. 1997. *Oxidative stress and the Molecular Biology of antioxidant defenses*. Cold spring harbor laboratory press. USA. Pág: 50, 52.
67. Ward J *et al.* 1985. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiation research*. 103: 383-392.
68. Wardman P *et Candeias L.* 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiation research society*. 145 (5): 523-531.
69. Wilcox P *et al.* 1990. Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 terter strains. 5(3):285-291.
70. Winterbourn. 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology letters*, Elsevier. 82/83: 969-974.
71. Winterbourn C *et Metodiewa D.* 1994. The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 314(2): 284-290.
72. Winterbourn C *et Metodiewa D.* 1999. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free radical Biology & Medicine*. 27(3/4): 322-328.
73. Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton J *et Turner N.* 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*. 134: 489-492.
74. Yoshida R, Kitamura D *et Maenosono S.* 2009. Mutagenicity of water-soluble ZnO nanoparticles in Ames test. *The journal of Toxicological sciences*. 34(1): 119-122.

ANEXOS

Preparación de la fracción S9 de hígado de rata.

Para obtener dicha fracción se realiza la preparación de la mezcla como lo reportan Maron D y Ames B (1983). Los hígados (Tratamiento de fenobarbital y β -naftoflavona) se homogeneizan usando un aparato Potter-Elvehjem con un pistilo de teflón o con un homogeneizador Polytron. El homogeneizado se centrifuga a 9000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decanta y se guarda, distribuyéndose en tubos de 1-2 mL y se almacenan a -80°C . Las concentraciones de proteínas son 40 mg/mL aproximadamente.

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

Antes de nada, es necesario revisar que la cepa *Salmonella typhimurium* TA102 contenga los marcadores genéticos característicos, que son necesarios para las pruebas de mutagénesis, pues estos suelen perderse por distintas causas. Esta metodología se realiza cada dos semanas. La cepa se descongela en medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L), mediante diluciones, y se deja incubar durante 24 horas aproximadamente a 37°C . Posteriormente se seleccionan cinco colonias de TA102, además de una colonia de *Salmonella typhimurium* fenotipo salvaje/silvestre (wild type), y se incuban en tubos separados a 37°C en medio líquido Nutrient Broth No. 2 OXOID, en agitación constante de 150 revoluciones por minuto (rpm), durante 16 horas aproximadamente. Las cinco muestras y el control se sometan a las pruebas descritas por Ames (Maron *et al.* Ames, 1983).

- a) Requerimiento de Histidina. Sembrar por medio de estrías (Figura 4) cada uno de los cultivos de 16 horas sobre las placas de Petri que contienen medio mínimo (2% de dextrosa/glucosa) de Vogel-Bonner. Hacer lo mismo sobre medio mínimo complementado con un exceso de histidina (Concentración final 0,8 mM). Solamente deber haber crecimiento en las placas complementadas con histidina-biotina. El fenotipo silvestre debe presentar crecimiento sin y con histidina en el medio.

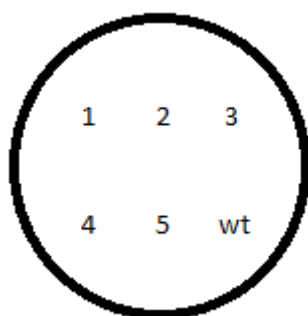


Figura 4. Esquema del patrón de la inoculación en placas de Petri.

- b) Sensibilidad al cristal violeta. Para verificar el marcador «rfa» (modificación en la pared celular), se determina la sensibilidad de las cepas al cristal violeta; se realizan estrías, de los cultivos en placas de Petri con medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L). Se añade un poco de la solución de cristal violeta (1 mg/mL), en forma de una estría perpendicular (Fig. 5). Se incuban durante 24 horas a 37°C . Una zona clara de inhibición donde se ha añadido el cristal violeta indica

la presencia de la mutación. El fenotipo silvestre no debe presentar inhibición del crecimiento.

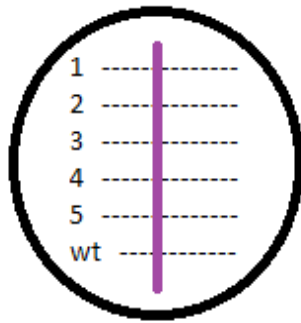


Figura 5. Esquema del patrón de inoculación de las muestras en placas de Petri con cristal violeta (línea vertical de dicho color).

- c) Presencia del plásmido de resistencia a antibióticos. Se determina verificando la resistencia de las cepas a ampicilina y tetraciclina. Para ello se complementan placas de medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L) con solución de ampicilina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La resistencia a ambos antibióticos se pone a prueba teniéndolos juntos y separados. Se coloca una estría por cada muestra de *S. typhimurium* (Fig. 6). Después de incubar de 24 horas a 37°C, las cepas que contienen el plásmido no deben mostrar inhibición del crecimiento.

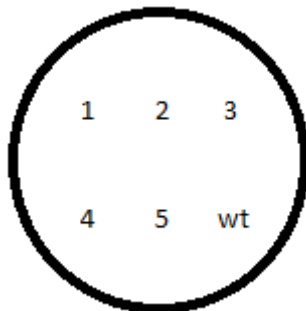


Figura 6. Esquema del patrón de la inoculación de las cepas en placas de Petri.

- d) Sensibilidad a la luz Ultravioleta. En una placa de Petri con medio completo sólido (NB No.2 OXOID 8 g/L; Bacto Agar BD DIFCO 15g/L y NaCl 5g/L), se colocan por medio de estrías las muestras de las colonias (Fig. 7). Se hacen exposiciones de 15, 30, 45 y 60 segundos a cada una de las estrías, tapando con un papel aluminio y se irradia con una lámpara germicida de luz UV de 15 W a una distancia de 33-35 centímetros. Se incuban durante 24 horas a 37°C. Si las cepas contienen el marcador UVrB, solamente crecerán en la porción de la placa que no ha sido irradiada. En este caso, tanto la cepa fenotipo silvestre y la cepa TA102 deben tener un crecimiento normal, puesto que carecen de dicha delección.

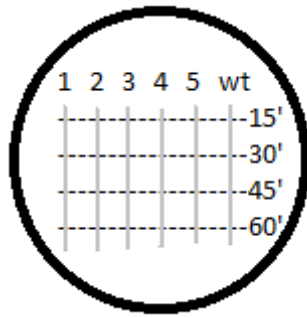


Figura 7. Esquema del patrón de inoculación de las cepas, en la placa de Petri, con los tiempos de exposición a la luz ultravioleta.

- e) Frecuencia de la reversión espontánea. Colocar 100 μL (1×10^8 células bacterianas) del cultivo en un tubo de ensaye que contiene 2 mL de agar de superficie a 45°C complementado con la solución de histidina 0,5 mM (concentración final= 2×10^{-3} mM), mezclar su contenido y distribuirlo perfectamente sobre medio mínimo de Vogel-Bonner. Cada muestra se hace por triplicado. Dejar solidificar e incubar las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. El control de la cepa fenotipo silvestre no se requiere. Se cuentan las colonias revertidas que resulten y se verifica la presencia de una densa capa de pequeñas colonias (con ayuda de un microscopio óptico) que resultan como consecuencia de los restos de histidina presentes en el agar de superficie. Esta capa de colonias tiende a desaparecer cuando el compuesto que se está probando es tóxico.

Cuando una o más muestras cumplen con los marcadores requeridos, es decir, que posean resistencia a tetraciclina y ampicilina; sean auxotróficas de histidina; posean permeabilidad en la pared celular; puedan crecer después de haber sido expuestas a luz UV y el número de colonias que reversionen la mutación sea adecuado, entonces es posible usarlas para los ensayos de Ames.

Experimento 1. Curva de dosis-respuesta de *S. typhimurium* TA102 con el mutágeno 4NQO.

Se evalúa la frecuencia de la reversión espontánea de TA102 expuestas a distintas concentraciones del mutágeno 4-Nitroquinoleína-N-óxido (4NQO), usando la prueba de Ames previamente descrita, con la finalidad de dar con una concentración adecuada, la cual debe originar un número de colonias revertidas al menos tres veces mayor al de la reversión común, lo cual facilitará hacer comparaciones (Gráfico 11). Se han manejado cinco concentraciones de 4NQO (0,4; 0,6; 0,8; 1 y 1,2 $\mu\text{g/placa}$).

Número de placa	DMSO	4NQO ($\mu\text{g/placa}$)	Número de colonias	Promedios
1		0	102	137,3333333
2		0	145	
3		0	165	
4	10 μL	0	165	174,6666667
5	10 μL	0	176	

6	10 µL	0	183	
7		1,2	3388	3334,666667
8		1,2	3584	
9		1,2	3032	
10		1	1940	2160
11		1	2292	
12		1	2248	
13		0,8	1800	1599,666667
14		0,8	1484	
15		0,8	1515	
16		0,6	1308	1142,333333
17		0,6	948	
18		0,6	1171	
19		0,4	643	697
20		0,4	696	
21		0,4	752	

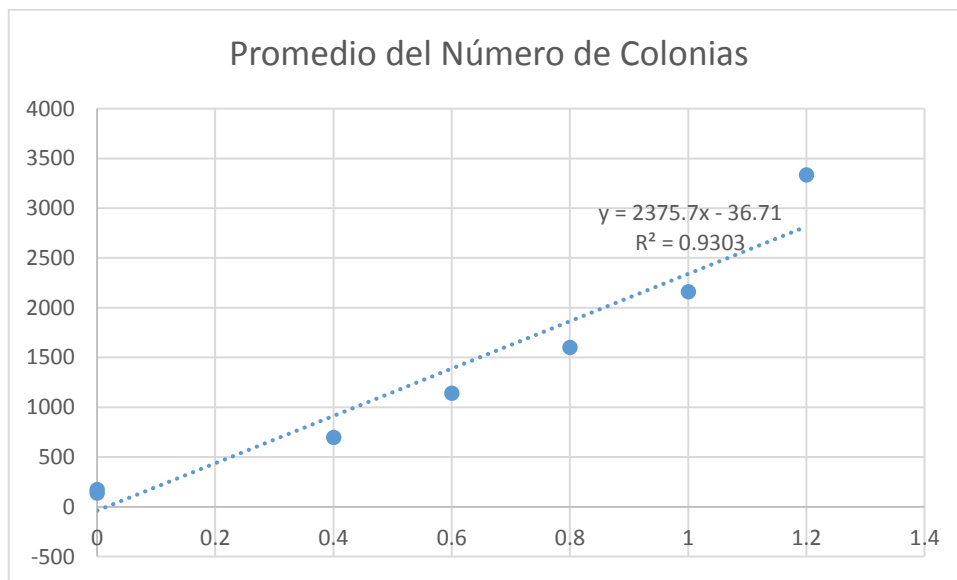


Gráfico 11. Determinación de la concentración óptima de 4NQO. En este gráfico se muestra la correlación entre la concentración de 4NQO con el número de colonias revertientes. El índice de correlación tiene un valor de 0,9303.

Experimento 2. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.

También se determina la concentración de GSH óptima para los experimentos, donde se pueda ver un efecto de protección contra los radicales libres, mediante la prueba de Ames. Por lo que se añade el mutágeno 4NQO (0,5 µg por placa) y tres concentraciones de GSH (1,875 mM; 1,25 mM y 0,625 mM), por separado. Siempre considerando incluir controles del número de colonias revertidas sin tratamiento y con el solvente del mutágeno (DMSO). Curva de crecimiento con GSH.

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	458	415,333333
2		0	0	Sí	417	
3		0	0	Sí	371	
4	10 µL	0	0	Sí	348	364
5	10 µL	0	0	Sí	373	
6	10 µL	0	0	Sí	371	
7		0,5	0	Sí	689	632,666667
8		0,5	0	Sí	578	
9		0,5	0	Sí	631	
10		0	150	No	0	0
11		0	150	No	0	
12		0	150	No	0	
13		0,5	150	No	0	0
14		0,5	150	No	0	
15		0,5	150	No	0	
16		0	100	Sí	441	426
17		0	100	Sí	575	
18		0	100	Sí	262	
19		0,5	100	Sí	459	433,333333
20		0,5	100	Sí	514	
21		0,5	100	Sí	327	
22		0	50	Sí	325	350,666667
23		0	50	Sí	398	
24		0	50	Sí	329	
25		0,5	50	Sí	404	376,333333

26		0,5	50	Sí	364
27		0,5	50	Sí	361

Curvas de crecimiento de *Salmonella typhimurium* TA102 con GSH.

Al observar que el GSH es tóxico en las concentraciones usadas del experimento 2, ha sido necesario realizar una curva logarítmica de crecimiento con distintas concentraciones del compuesto, con la finalidad de buscar una concentración que no sea tóxica y que pueda tener un efecto de protección contra ROS.

La curva de crecimiento se ha realizado con la cepa *Salmonella typhimurium* TA102, usando medio líquido Nutrient Broth No. 2 OXOID, con 10^8 bacterias de un cultivo de 16 horas. Se han hecho cultivos líquidos en siete matraces:

- Cinco matraces con bacterias (10^8) y con concentraciones de GSH distintas para cada uno (150 mM; 100 mM; 10 mM; 1 mM y 0,1 mM).
- Un control de crecimiento normal (sólo 10^8 bacterias).
- Un blanco (únicamente medio de cultivo líquido).

El volumen final fue 5 mL para cada matraz. Los matraces se encontraban en agitación constante (150 rpm) a 37°C. Para determinar el crecimiento bacteriano, se mide la absorbancia con un espectrómetro (Spectronic 20, Milton Roy Company). Las lecturas se han realizado cada treinta minutos, durante más de 10 horas (Tabla 5, gráfico 12).

Tabla 5. Valores de absorbancia de *S.typhimurium* con distintas concentraciones de GSH (150, 100, 10 1 y 0,1 mM).

Tiempo	Hora	Blanco	GSH 150 mM	GSH 100 mM	GSH 10 mM	GSH 1 mM	GSH 0,1 mM	Bacterias sin GSH
0	9:18	0	0	0,01	0	0,02	0,03	0,005
1	9:59	0	0	0	0,01	0,04	0,05	0,03
2	10:38	0	0	0,02	0,01	0,06	0,06	0,05
3	11:15	0	0	0,02	0,015	0,08	0,09	0,06
4	11:53	0,05	0	0,02	0,02	0,1	0,014	0,09
5	12:31	0	0	0,02	0,01	0,12	0,18	0,12
6	13:09	0	0	0,01	0,01	0,18	0,27	0,19
7	13:46	0	0	0,01	0,01	0,25	0,42	0,3
8	14:24	0	0	0,01	0,02	0,4	0,59	0,46
9	15:04	0	0	0,01	0,01	0,6	0,76	0,64
10	15:44	0,05	0	0	0,02	0,76	0,86	0,79

11	16:23	0,01	0	0,005	0,01	0,86	0,96	0,88
12	17:01	0,03	0	0,01	0,015	0,96	1,05	0,99
13	17:39	0,01	0	0,01	0,01	1,09	1,2	1,09
14	18:17	0,01	0	0,01	0,01	1,1	1,17	1,1
15	18:56	0,01	0	0,01	0,01	1,14	1,19	1,14
16	19:35	0,01	0	0,01	0,02	1,19	1,2	1,19

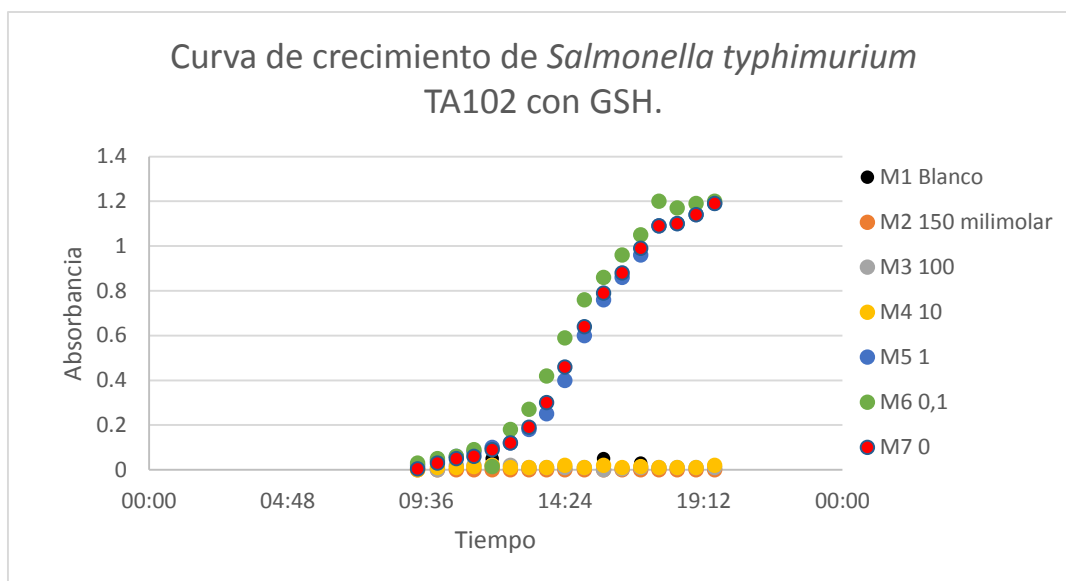


Gráfico 12. Curva de crecimiento de TA102 con distintas concentraciones de GSH. Es posible notar que las concentraciones altas (150, 100 y 10 mM) son tóxicas, mientras que las concentraciones menores permiten el crecimiento normal, comparando con el control.

Como las concentraciones altas de GSH (150 mM; 100 mM y 10 mM) han sido tóxicas, se ha realizado una segunda curva, con el objetivo de determinar la concentración de GSH que permite el crecimiento bacteriano. Puesto que la toxicidad de GSH se encuentra entre 10 y 1 mM, las concentraciones de GSH han sido las siguientes: 10 mM; 8 mM; 6 mM; 4 mM; y 2 mM, además de un control de crecimiento normal y un blanco, tal como se ha hecho en la curva de crecimiento anterior. En esta ocasión, las lecturas también se han realizado cada treinta minutos, durante más de diez horas (Tabla 6, gráfico 13).

Tabla 6. Valores de absorbancia de *S. typhimurium* con distintas concentraciones de GSH (10, 8, 6, 4, 2 mM).

Tiempo	Hora	Blanco	GSH 10 mM	GSH 8 mM	GSH 6 mM	GSH 4 mM	GSH 2 mM	Bacterias sin GSH
0	8:51	0	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04
1	9:27	0	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04	0,06
2	10:05	0	0,02	0,03	0,05	0,055	0,059	0,064

3	10:42	0	0,02	0,03	0,05	0,055	0,06	0,078
4	11:20	0	0,02	0,037	0,06	0,068	0,082	0,11
5	11:58	0	0,01	0,028	0,06	0,07	0,109	0,159
6	12:36	0	0,006	0,02	0,06	0,065	0,12	0,23
7	13:15	0	0,01	0,03	0,07	0,059	0,135	0,38
8	13:53	0	0,015	0,03	0,069	0,03	0,155	0,555
9	14:32	0	0,01	0,02	0,052	0,02	0,2	0,72
10	15:12	0	0,01	0,03	0,03	0,01	0,3	0,85
11	15:50	0	0,01	0,03	0,02	0,005	0,44	0,93
12	16:31	0	0,01	0,02	0,015	0	0,56	1
13	17:13	0	0	0,03	0,01	0	0,67	1,1
14	17:49	0	0	0,021	0,01	0	0,73	1,15
15	18:31	0	0,,01	0,03	0,02	0,005	0,8	1,2
16	19:10	0	0,01	0,02	0,01	0	0,9	1,2

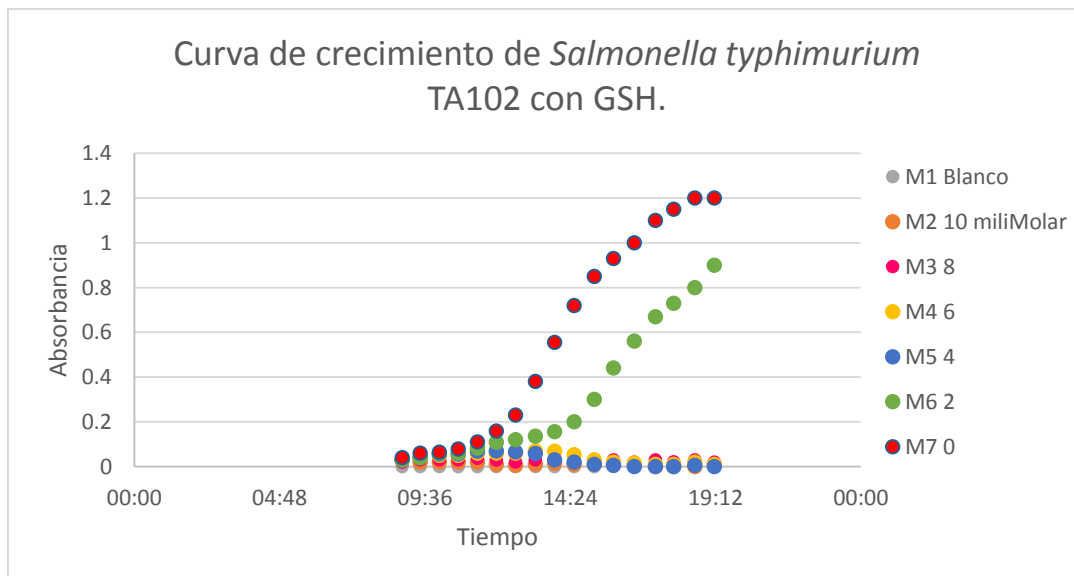


Gráfico 13. Curva de crecimiento de TA102 con distintas concentraciones de GSH. Las concentraciones más altas inhiben el crecimiento bacteriano (10, 8, 6 y 4 mM), la concentración 2 mM parece tener un efecto negativo contra el crecimiento, ralentizando el mismo.

Experimento 3. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Se ha hecho una prueba de Ames usando el mutágeno 4NQO (0,7 μg) y dos concentraciones de GSH por separado (1 y 4 mM). Buscando la concentración ideal de GSH.

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	105	247
2		0	0	Sí	308	
3		0	0	Sí	328	
4	10 µL	0	0	Sí	268	316,666667
5	10 µL	0	0	Sí	310	
6	10 µL	0	0	Sí	372	
7		0,7	0	Sí	690	
8		0,7	0	Sí	514	612
9		0,7	0	Sí	632	
10		0	4	Sí	73	
11		0	4	Sí	115	98,3333333
12		0	4	Sí	107	
13		0,7	4	No	0	
14		0,7	4	No	0	
15		0,7	4	No	0	0
16		0	1	Sí	284	
17		0	1	Sí	229	
18		0	1	Sí	297	270
19		0,7	1	No	0	
20		0,7	1	No	0	
21		0,7	1	No	0	

Experimento 4. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Como las concentraciones de GSH han sido tóxicas al estar en contacto con el mutágeno 4NQO, se evalúan concentraciones menores de GSH (0,5 y 0,1 mM).

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	243	230
2		0	0	Sí	222	
3		0	0	Sí	225	
4	10 µL	0	0	Sí	202	199,3333333
5	10 µL	0	0	Sí	232	

6	10 µL	0	0	Sí	164	
7		0,7	0	Sí	746	442
8		0,7	0	Sí	580	
9		0,7	0	No	0	
10		0	0,5	Sí	301	287,666667
11		0	0,5	Sí	289	
12		0	0,5	Sí	273	
13		0	0,1	Sí	278	278
14		0	0,1	Sí	328	
15		0	0,1	Sí	228	
16		0,7	0,5	No	0	0
17		0,7	0,5	No	0	
18		0,7	0,5	No	0	
19		0,7	0,1	Sí	500	601,333333
20		0,7	0,1	Sí	628	
21		0,7	0,1	Sí	676	

Experimento 5. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Al observarse toxicidad con la concentración 0,5 mM de GSH, y 0,1 no ha sido una concentración que redujese el número de colonias revertidas, se evalúan tres concentraciones de GSH (0,4; 0,3 y 0,2 mM).

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	No	0	0
2		0	0	No	0	
3		0	0	No	0	
4	10 µL	0	0	No	0	0
5	10 µL	0	0	No	0	
6	10 µL	0	0	No	0	
7		0,7	0	No	0	0
8		0,7	0	No	0	
9		0,7	0	No	0	
10		0	0,2	No	0	0

11		0	0,2	No	0	
12		0	0,2	No	0	
13		0	0,3	No	0	0
14		0	0,3	No	0	
15		0	0,3	No	0	
16		0	0,4	No	0	0
17		0	0,4	No	0	
18		0	0,4	No	0	
19		0,7	0,2	No	0	0
20		0,7	0,2	No	0	
21		0,7	0,2	No	0	
22		0,7	0,3	No	0	0
23		0,7	0,3	No	0	
24		0,7	0,3	No	0	
25		0,7	0,4	No	0	0
26		0,7	0,4	No	0	
27		0,7	0,4	No	0	

Experimento 6. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Por fallos experimentales, se ha repetido el quinto experimento.

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	38	32,3333333
2		0	0	Sí	39	
3		0	0	Sí	20	
4	10 µL	0	0	Sí	49	85
5	10 µL	0	0	Sí	173	
6	10 µL	0	0	Sí	33	
7		0,7	0	Sí	72	139,666667
8		0,7	0	Sí	38	
9		0,7	0	Sí	309	
10		0	0,2	Sí	7	6,6666667
11		0	0,2	Sí	13	

12		0	0,2	No	0	
13		0	0,3	Sí	183	62
14		0	0,3	Sí	1	
15		0	0,3	Sí	2	
16		0	0,4	Sí	1	1,66666667
17		0	0,4	Sí	4	
18		0	0,4	Sí	0	
19		0,7	0,2	Sí	25	125
20		0,7	0,2	Sí	318	
21		0,7	0,2	Sí	32	
22		0,7	0,3	No	0	103,666667
23		0,7	0,3	No	0	
24		0,7	0,3	Sí	311	
25		0,7	0,4	No	0	0
26		0,7	0,4	No	0	
27		0,7	0,4	No	0	

Experimento 7. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Por segunda vez, se ha repetido el quinto experimento.

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	425	384,333333
2		0	0	Sí	366	
3		0	0	Sí	362	
4	10 µL	0	0	Sí	319	366,666667
5	10 µL	0	0	Sí	414	
6	10 µL	0	0	Sí	367	
7		0,7	0	Sí	662	680
8		0,7	0	Sí	660	
9		0,7	0	Sí	718	
10		0	0,2	Sí	366	367,333333
11		0	0,2	Sí	395	
12		0	0,2	Sí	341	

13		0	0,3	Sí	341	301,666667
14		0	0,3	Sí	286	
15		0	0,3	Sí	278	
16		0	0,4	Sí	284	302,333333
17		0	0,4	Sí	294	
18		0	0,4	Sí	329	
19		0,7	0,2	Sí	652	603,333333
20		0,7	0,2	Sí	586	
21		0,7	0,2	Sí	572	
22		0,7	0,3	Sí	488	489,333333
23		0,7	0,3	Sí	518	
24		0,7	0,3	Sí	462	
25		0,7	0,4	Sí	620	476,666667
26		0,7	0,4	Sí	572	
27		0,7	0,4	Sí	238	

Experimento 8. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.

En esta ocasión, se prueban con el ensayo de Ames, dos concentraciones de 4NQO (0,7 y 0,85 µg por placa), contra tres concentraciones de GSH (0,3; 0,4 y 0,6 mM).

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	539	531,333333
2		0	0	Sí	506	
3		0	0	Sí	549	
4	10 µL	0	0	Sí	552	539,333333
5	10 µL	0	0	Sí	559	
6	10 µL	0	0	Sí	507	
7		0,7	0	Sí	576	663
8		0,7	0	Sí	736	
9		0,7	0	Sí	677	
10		0,85	0	Sí	722	652
11		0,85	0	Sí	664	
12		0,85	0	Sí	570	

13		0	0,3	Sí	362	387,333333
14		0	0,3	Sí	442	
15		0	0,3	Sí	358	
16		0	0,4	Sí	412	444,666667
17		0	0,4	Sí	526	
18		0	0,4	Sí	396	
19		0	0,6	Sí	432	439,333333
20		0	0,6	Sí	484	
21		0	0,6	Sí	402	
22		0,85	0,3	Sí	808	708,666667
23		0,85	0,3	Sí	762	
24		0,85	0,3	Sí	556	
25		0,85	0,4	Sí	748	748,666667
26		0,85	0,4	Sí	790	
27		0,85	0,4	Sí	708	
28		0,85	0,6	Sí	672	613,333333
29		0,85	0,6	Sí	588	
30		0,85	0,6	Sí	580	
31		0,7	0,6	Sí	710	690
32		0,7	0,6	Sí	690	
33		0,7	0,6	Sí	670	

Experimento 9. Ensayo de dosis-respuesta con 4NQO y GSH.

Se ha repetido el octavo experimento, con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos anteriormente.

Número de placa	DMSO	4NQO (µg/placa)	GSH (Mm)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	430	458,666667
2		0	0	Sí	498	
3		0	0	Sí	448	
4	10 µL	0	0	Sí	408	377,333333
5	10 µL	0	0	Sí	446	
6	10 µL	0	0	Sí	278	

7		0,7	0	Sí	584	619,333333
8		0,7	0	Sí	700	
9		0,7	0	Sí	574	
10		0,85	0	Sí	734	699,333333
11		0,85	0	Sí	738	
12		0,85	0	Sí	626	
13		0	0,3	Sí	468	420,666667
14		0	0,3	Sí	400	
15		0	0,3	Sí	394	
16		0	0,4	Sí	444	345
17		0	0,4	Sí	464	
18		0	0,4	Sí	127	
19		0	0,6	Sí	344	335,333333
20		0	0,6	Sí	322	
21		0	0,6	Sí	340	
22		0,85	0,3	Sí	410	554
23		0,85	0,3	Sí	594	
24		0,85	0,3	Sí	658	
25		0,85	0,4	Sí	566	624
26		0,85	0,4	Sí	588	
27		0,85	0,4	Sí	718	
28		0,85	0,6	Sí	556	613,333333
29		0,85	0,6	Sí	650	
30		0,85	0,6	Sí	634	
31		0,7	0,6	Sí	209	470,333333
32		0,7	0,6	Sí	610	
33		0,7	0,6	Sí	592	

Experimento 10. Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H₂O₂.

Por cuanto no se han obtenido resultados donde se observe la protección de GSH contra la mutagénesis ocasionada por ROS, se ha decidido cambiar el mutágeno por H₂O₂, el cual no posee un metabolismo tan complejo como 4NQO. Por lo tanto se han estandarizado las

concentraciones de este, mediante una curva de dosis-respuesta, con 3 concentraciones (0,44975; 0,044975 y 0,0044975 mM).

Número de Placa	Agua miliQ	Peróxido de hidrógeno (Mm)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	Sí	357	336,666667
2		0	Sí	329	
3		0	Sí	324	
4	400 µL	0	Sí	301	292,666667
5	400 µL	0	Sí	254	
6	400 µL	0	Sí	323	
7		0,44975	Sí	2016	1668,666667
8		0,44975	Sí	1498	
9		0,44975	Sí	1492	
10		0,044975	Sí	766	756,666667
11		0,044975	Sí	736	
12		0,044975	Sí	768	
13		0,0044975	Sí	315	357
14		0,0044975	Sí	402	
15		0,0044975	Sí	354	

Experimento 11. Ensayo de dosis-respuesta con GSH.

Se ha seleccionado la concentración 0,0449 mM de H₂O₂, por lo que lo siguiente es evaluar cómo es la interacción con GSH, usando tres concentraciones del último: 0,8; 0,5 y 0,2 mM.

Número de Placa	Agua miliQ	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	Sí	390	407,666667
2		0	0	Sí	412	
3		0	0	Sí	421	
4	400 µL	0	0	Sí	370	383,666667
5	400 µL	0	0	Sí	373	
6	400 µL	0	0	Sí	408	
7		0,0449	0	Sí	1344	1138,666667
8		0,0449	0	Sí	996	

9		0,0449	0	Sí	1076	
10		0	0,8	Sí	367	341
11		0	0,8	Sí	363	
12		0	0,8	Sí	293	
13		0	0,5	Sí	1529	814,33333
14		0	0,5	Sí	458	3
15		0	0,5	Sí	456	
16		0	0,2	Sí	460	289,33333
17		0	0,2	No	0	3
18		0	0,2	Sí	408	
19		0,0449	0,8	Sí	774	973
20		0,0449	0,8	Sí	1017	
21		0,0449	0,8	Sí	1128	
22		0,0449	0,5	Sí	906	895,33333
23		0,0449	0,5	Sí	726	3
24		0,0449	0,5	Sí	1054	
25		0,0449	0,2	Sí	988	900,66666
26		0,0449	0,2	Sí	844	7
27		0,0449	0,2	Sí	870	

Experimento 12. Curva de dosis-respuesta con el mutágeno H₂O₂, usando preincubación.

Como no se ha observado reducción de la mutagénesis por GSH, se ha añadido la preincubación con el cóctel de la fracción S9 (Fracción S9 al 10%; Solución de MgCl₂ 8 mM KCl 33 mM; Glucosa 6 fosfato 6 mM; NADP 4 mM; Amortiguador de fosfatos 0,1 M pH: 7,) descrita por Maron y Ames (1983), puesto que pensamos que al GSH le toma más tiempo entrar en la célula que al H₂O₂ y esta fracción contiene enzimas (glutación peroxidasa) que podrían participar en tal reacción. Al hacer más sensible la técnica, se pretende evaluar si el H₂O₂ es tóxico mediante la preincubación, probando las concentraciones del décimo experimento. La preincubación consiste en añadir las bacterias 10⁸ y los demás elementos en un tubo de 2 mL, durante cierto tiempo (en este caso 20 minutos) a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar la preincubación se prosigue el ensayo normalmente. Las concentraciones de H₂O₂ usadas son las siguientes: 0,44975; 0,044975 y 0,0044975 mM.

Número de Placa	Agua miliQ	Peróxido de hidrógeno (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	Sí	416	398

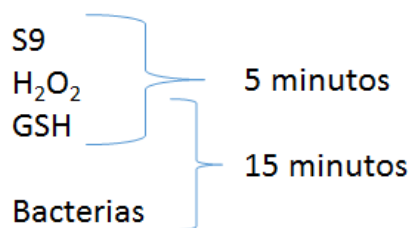
2		0	Sí	382	378,666667
3		0	Sí	396	
4	400 µL	0	Sí	375	
5	400 µL	0	Sí	382	1014,666667
6	400 µL	0	Sí	379	
7		0,44975	Sí	980	
8		0,44975	Sí	988	794
9		0,44975	Sí	1076	
10		0,044975	Sí	720	
11		0,044975	Sí	856	475,333333
12		0,044975	Sí	806	
13		0,0044975	Sí	513	
14		0,0044975	Sí	456	457
15		0,0044975	Sí	457	

Experimento 13. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.

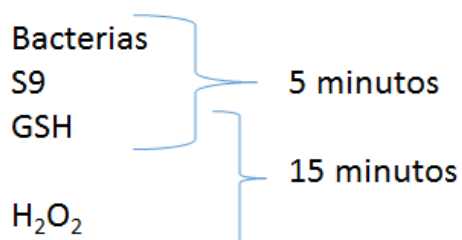
Al observar que el H₂O₂ no es tóxico en las concentraciones usadas, se busca una estrategia en la preincubación que ofrezca la interacción apropiada para ver protección de la mutagénesis.

Se han planteado dos modos de preincubación:

Primera clase de preincubación.



Segunda clase de preincubación.



Se evalúa una concentración de H₂O₂ (0,44975 mM) con tres de GSH (0,8; 0,5 y 0,2 mM). La preincubación es a 37°C con agitación constante.

Número de Placa	Clase de preincubación	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	Estándar	0	0	Sí	411	416,3333 33
2	Estándar	0	0	Sí	382	
3	Estándar	0	0	Sí	456	
4	Estándar	0,44975	0	Sí	926	913,3333 33
5	Estándar	0,44975	0	Sí	890	
6	Estándar	0,44975	0	Sí	924	
7	Estándar	0	0,8	Sí	483	391
8	Estándar	0	0,8	Sí	407	
9	Estándar	0	0,8	Sí	283	
10	Estándar	0,44975	0,8	Sí	1436	1394,666 67
11	Estándar	0,44975	0,8	Sí	1382	
12	Estándar	0,44975	0,8	Sí	1366	
13	Segunda	0,44975	0,5	Sí	515	469,3333 33
14	Segunda	0,44975	0,5	Sí	490	
15	Segunda	0,44975	0,5	Sí	403	
16	Segunda	0,44975	0,2	Sí	406	301,6666 67
17	Segunda	0,44975	0,2	Sí	167	
18	Segunda	0,44975	0,2	Sí	332	
19	Primera	0,44975	0,8	Sí	506	468
20	Primera	0,44975	0,8	Sí	472	
21	Primera	0,44975	0,8	Sí	426	
22	Primera	0,44975	0,5	Sí	458	548,6666 67
23	Primera	0,44975	0,5	Sí	490	
24	Primera	0,44975	0,5	Sí	698	
25	Primera	0,44975	0,2	Sí	556	537,3333 33
26	Primera	0,44975	0,2	Sí	626	
27	Primera	0,44975	0,2	Sí	430	

Experimento 14. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.

Se ha seleccionado la segunda clase de preincubación, donde el H₂O₂ se añade después de que el resto de elementos tengan interacción durante 5 minutos. Se repite el ensayo con una concentración de H₂O₂ (0,44975 mM) con tres de GSH (0,5; 0,2 y 0,1 mM).

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	0	0	Sí	401	386,666667
2	0	0	Sí	380	
3	0	0	Sí	379	
4	0,44975	0	Sí	1298	1194,666667
5	0,44975	0	Sí	1050	
6	0,44975	0	Sí	1236	
7	0	0,5	Sí	510	487
8	0	0,5	Sí	439	
9	0	0,5	Sí	512	
10	0,44975	0,5	Sí	528	586
11	0,44975	0,5	Sí	590	
12	0,44975	0,5	Sí	640	
13	0,44975	0,2	Sí	534	535,333333
14	0,44975	0,2	Sí	588	
15	0,44975	0,2	Sí	484	
16	0,44975	0,1	Sí	439	434,666667
17	0,44975	0,1	Sí	417	
18	0,44975	0,1	Sí	448	

Experimento 15. Ensayo de dosis-respuesta con GSH, usando preincubación con la fracción S9.

Como aparentemente, cuanto menor es la concentración de GSH, mejor es la protección, se prueban concentraciones menores que las usadas en el experimento anterior (0,2; 0,1 y 0,05), con 0,44975 mM de H₂O₂ (Gráfico 14).

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	0	0	Sí	538	531,666667
2	0	0	Sí	474	

3	0	0	Sí	583	
4	0,44975	0	Sí	844	1131,33333
5	0,44975	0	Sí	1272	
6	0,44975	0	Sí	1278	
7	0	0,2	Sí	580	600
8	0	0,2	Sí	588	
9	0	0,2	Sí	632	
10	0,44975	0,2	Sí	639	539
11	0,44975	0,2	Sí	449	
12	0,44975	0,2	Sí	529	
13	0,44975	0,1	Sí	599	437,333333
14	0,44975	0,1	Sí	615	
15	0,44975	0,1	Sí	98	
16	0,44975	0,05	Sí	551	632,666667
17	0,44975	0,05	Sí	732	
18	0,44975	0,05	Sí	615	

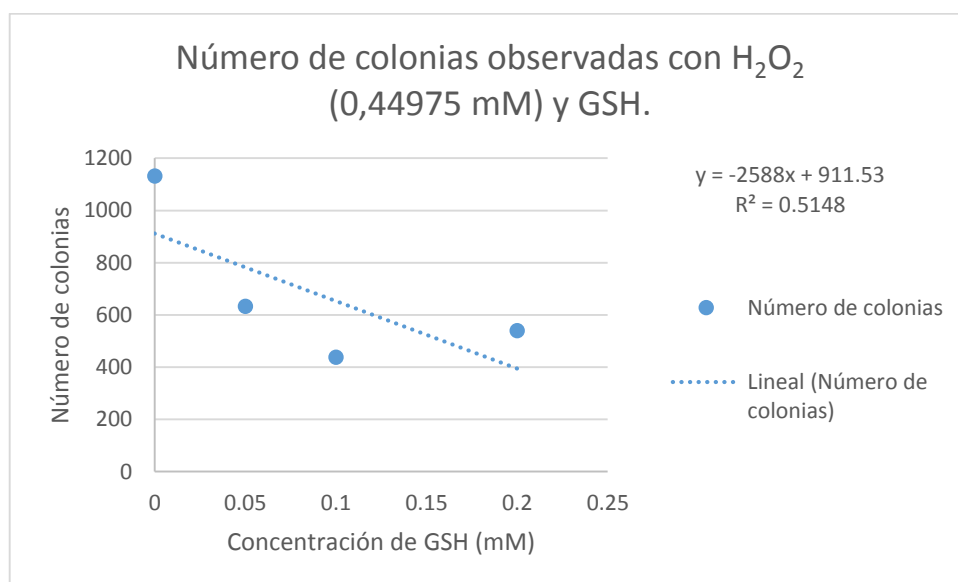


Gráfico 14. Número de colonias obtenidas al someterse a 0,44975 mM de H₂O₂ y distintas concentraciones de GSH.

Experimento 16. Ensayo de dosis-respuesta con PLM, usando preincubación con la fracción S9.

Al observarse reducción del número de colonias revertidas con el tratamiento de GSH y la fracción S9, se ha empleado un inhibidor específico para asegurar que el efecto de protección

se debe a GSH. Entonces se pretende fijar una concentración óptima de PLM, usando 20, 60 y 120 μM para observar el comportamiento contra 0,44975 mM de H_2O_2 y 0,2 mM de GSH. Se ha usado el método de preincubación presente en la tabla 7.

Número de placa	DMSO	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	PLM (μM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1		0	0	0	Sí	820	744
2		0	0	0	Sí	738	
3		0	0	0	Sí	674	
4	10 μL	0	0	0	Sí	696	653,3333 33
5	10 μL	0	0	0	Sí	604	
6	10 μL	0	0	0	Sí	660	
7		0,44975	0	0	Sí	1174	1179,333 33
8		0,44975	0	0	Sí	1014	
9		0,44975	0	0	Sí	1350	
10		0	0,2	0	Sí	984	897,3333 33
11		0	0,2	0	Sí	972	
12		0	0,2	0	Sí	736	
13		0	0	120	Sí	578	644
14		0	0	120	Sí	564	
15		0	0	120	Sí	790	
16		0	0	60	Sí	680	692
17		0	0	60	Sí	712	
18		0	0	60	Sí	684	
19		0	0	20	Sí	692	688
20		0	0	20	Sí	666	
21		0	0	20	Sí	706	
22		0,44975	0,2	0	Sí	768	736
23		0,44975	0,2	0	Sí	732	
24		0,44975	0,2	0	Sí	708	
25		0	0,2	120	Sí	644	678,6666 67
26		0	0,2	120	Sí	876	
27		0	0,2	120	Sí	516	
28		0	0,2	60	Sí	634	684

29		0	0,2	60	Sí	714	
30		0	0,2	60	Sí	704	
31		0	0,2	20	Sí	642	716
32		0	0,2	20	Sí	688	
33		0	0,2	20	Sí	818	
34		0,44975	0	120	Sí	450	466
35		0,44975	0	120	Sí	486	
36		0,44975	0	120	Sí	462	
37		0,44975	0	60	Sí	574	532
38		0,44975	0	60	Sí	536	
39		0,44975	0	60	Sí	486	
40		0,44975	0	20	Sí	666	579,3333
41		0,44975	0	20	Sí	512	33
42		0,44975	0	20	Sí	560	
43		0,44975	0,2	120	Sí	686	619,3333
44		0,44975	0,2	120	Sí	562	33
45		0,44975	0,2	120	Sí	610	
46		0,44975	0,2	60	Sí	656	702
47		0,44975	0,2	60	Sí	712	
48		0,44975	0,2	60	Sí	738	
49		0,44975	0,2	20	Sí	702	642,6666
50		0,44975	0,2	20	Sí	552	67
51		0,44975	0,2	20	Sí	674	

Tabla 7. Método de preincubación empleado en este experimento.

Elemento	Incubación
GSH + PLM	5 minutos
RE + S9	5 minutos
H ₂ O ₂	15 minutos
	Tiempo total: 20 minutos.

Experimento 17. Ensayo de evaluación de la preincubación con la fracción S9.

Se evalúa si la fracción S9 tiene algún papel en la protección contra el mutágeno. Por lo que se prueban 0,44975 mM H₂O₂ y 120 µM de PLM sometidas a preincubación (Tabla 8) con dicha fracción y sin esta.

Número de placa	Fracción S9 al 10% (Preincubación)	Peróxido de hidrógeno (mM)	PLM (µM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	Sí	0	0	Sí	447	472
2	Sí	0	0	Sí	426	
3	Sí	0	0	Sí	543	
4	Sí	0,44975	0	Sí	542	416,666 667
5	Sí	0,44975	0	Sí	158	
6	Sí	0,44975	0	Sí	550	
7	Sí	0	120	Sí	405	478,333 333
8	Sí	0	120	Sí	512	
9	Sí	0	120	Sí	518	
10	Sí	0,44975	120	Sí	472	503,333 333
11	Sí	0,44975	120	Sí	558	
12	Sí	0,44975	120	Sí	480	
13	No	0	0	Sí	339	357,333 333
14	No	0	0	Sí	346	
15	No	0	0	Sí	387	
16	No	0,44975	0	Sí	2084	1922,66 667
17	No	0,44975	0	Sí	1888	
18	No	0,44975	0	Sí	1796	
19	No	0	120	Sí	383	371,333 333
20	No	0	120	Sí	389	
21	No	0	120	Sí	342	
22	No	0,44975	120	Sí	1852	1677,33 333
23	No	0,44975	120	Sí	1664	
24	No	0,44975	120	Sí	1516	

Tabla 8. Método de preincubación empleado en este experimento.

Método de preincubación:
Placas 1, 2 y 3: RE + S9 durante 25 minutos.
Placas 4, 5 y 6: RE + S9 durante 5 minutos; después con H ₂ O ₂ por 20 minutos.
Placas 7, 8 y 9: RE + S9 durante 5 minutos; después con PLM por 20 minutos.
Placas 10, 11 y 12: RE + S9 durante 5 minutos; después con PLM por 5 minutos y finalmente H ₂ O ₂ por 20 minutos.

Experimento 18. Ensayo de evaluación de la preincubación.

Al observar que la fracción S9 interviene en los resultados, se realizan ensayos de preincubación sin esta. Se emplean 0,44975 mM de H₂O₂, 0,2 mM de GSH y 120 µM de PLM con una preincubación de 25 minutos a 37°C a 150 rpm.

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	PLM (µM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	0	0	0	Sí	526	520
2	0	0	0	Sí	490	
3	0	0	0	Sí	544	
4	0,44975	0	0	Sí	616	584
5	0,44975	0	0	Sí	680	
6	0,44975	0	0	Sí	456	
7	0	0,2	0	Sí	402	456,666667
8	0	0,2	0	Sí	502	
9	0	0,2	0	Sí	466	
10	0	0	120	Sí	500	474
11	0	0	120	Sí	454	
12	0	0	120	Sí	468	
13	0,44975	0,2	0	No	0	0
14	0,44975	0,2	0	No	0	
15	0,44975	0,2	0	No	0	
16	0,44975	0	120	Sí	486	480,666667
17	0,44975	0	120	Sí	432	
18	0,44975	0	120	Sí	524	
19	0	0,2	120	Sí	448	494
20	0	0,2	120	Sí	542	
21	0	0,2	120	Sí	492	

22	0,44975	0,2	120	No	0	0
23	0,44975	0,2	120	No	0	
24	0,44975	0,2	120	No	0	

Tabla 9. Método de preincubación empleado en este experimento.

Número de placas.	Primer contenido y duración.	Segundo contenido y duración.	Tercer contenido y duración.
1, 2 y 3	10 ⁸ bacterias (25 minutos)		
4, 5 y 6	10 ⁸ bacterias + H ₂ O ₂ (25 minutos)		
7, 8 y 9	10 ⁸ bacterias + GSH (25 minutos)		
10, 11 y 12	10 ⁸ bacterias + PLM (25 minutos)		
13, 14 y 15	10 ⁸ bacterias + GSH (5 minutos)	H ₂ O ₂ (20 minutos)	
16, 17 y 18	10 ⁸ bacterias + PLM (5 minutos)	H ₂ O ₂ (20 minutos)	
19, 20 y 21	GSH + PLM (5 minutos)	10 ⁸ bacterias (20 minutos)	
22, 23 y 24	GSH + PLM (5 minutos)	10 ⁸ bacterias (5 minutos)	H ₂ O ₂ (15 minutos)

Experimento 19. Ensayo de evaluación de la preincubación.

Como en el experimento anterior se ha observado toxicidad en los tratamientos con GSH y H₂O₂, se ha repetido el experimento para corroborar la veracidad de los resultados.

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	PLM (μM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	0	0	0	Sí	388	394,666667
2	0	0	0	Sí	392	
3	0	0	0	Sí	404	
4	0,44975	0	0	No	0	0
5	0,44975	0	0	No	0	
6	0,44975	0	0	No	0	
7	0	0,2	0	Sí	530	384,333333
8	0	0,2	0	Sí	412	
9	0	0,2	0	Sí	211	
10	0	0	120	Sí	332	376
11	0	0	120	Sí	394	
12	0	0	120	Sí	402	
13	0,44975	0,2	0	No	0	0

14	0,44975	0,2	0	No	0	
15	0,44975	0,2	0	No	0	
16	0,44975	0	120	No	0	
17	0,44975	0	120	No	0	
18	0,44975	0	120	No	0	416
19	0	0,2	120	Sí	386	
20	0	0,2	120	Sí	450	
21	0	0,2	120	Sí	412	
22	0,44975	0,2	120	No	0	0
23	0,44975	0,2	120	No	0	
24	0,44975	0,2	120	No	0	

Tabla 10. Método de preincubación empleado en este experimento.

Número de placas.	Primer contenido y duración.	Segundo contenido y duración.	Tercer contenido y duración.
1, 2 y 3	10 ⁸ bacterias (25 minutos)		
4, 5 y 6	10 ⁸ bacterias + H ₂ O ₂ (25 minutos)		
7, 8 y 9	10 ⁸ bacterias + GSH (25 minutos)		
10, 11 y 12	10 ⁸ bacterias + PLM (25 minutos)		
13, 14 y 15	10 ⁸ bacterias + GSH (5 minutos)	H ₂ O ₂ (20 minutos)	
16, 17 y 18	10 ⁸ bacterias + PLM (5 minutos)	H ₂ O ₂ (20 minutos)	
19, 20 y 21	GSH + PLM (5 minutos)	10 ⁸ bacterias (20 minutos)	
22, 23 y 24	GSH + PLM (5 minutos)	10 ⁸ bacterias (5 minutos)	H ₂ O ₂ (15 minutos)

Experimento 20. Ensayo de evaluación de la preincubación sin H₂O₂.

Al parecer, el H₂O₂ produce cierta toxicidad durante la preincubación, por lo que la preincubación se lleva a cabo con los demás elementos, pero el H₂O₂ (0,44975 mM) se añade justo antes de verter el contenido a la placa de medio mínimo.

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	GSH (mM)	PLM (μM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias	Promedios
1	0	0	0	Sí	734	661,33333 3
2	0	0	0	Sí	574	
3	0	0	0	Sí	676	
4	0,44975	0	0	Sí	2256	2378,6666

5	0,44975	0	0	Sí	2668	715,33333 3
6	0,44975	0	0	Sí	2212	
7	0	0,2	0	Sí	722	
8	0	0,2	0	Sí	760	
9	0	0,2	0	Sí	664	592
10	0	0	120	Sí	578	
11	0	0	120	Sí	642	
12	0	0	120	Sí	556	
13	0,44975	0,2	0	Sí	2756	2573,3333 3
14	0,44975	0,2	0	Sí	2480	
15	0,44975	0,2	0	Sí	2484	
16	0,44975	0	120	Sí	2428	1565,3333 3
17	0,44975	0	120	No	0	
18	0,44975	0	120	Sí	2268	
19	0	0,2	120	Sí	656	
20	0	0,2	120	Sí	472	574
21	0	0,2	120	Sí	594	
22	0,44975	0,2	120	Sí	2360	
23	0,44975	0,2	120	Sí	2896	2817,3333 3
24	0,44975	0,2	120	Sí	3196	

Experimento 21. Curvas de dosis-respuesta con FeCl₂ y H₂O₂.

Se han probado 4 concentraciones de H₂O₂ (0,44975; 0,2794; 0,0931 y 0,044975 mM) contra 3 de FeCl₂ (50; 100 y 200 μM), mediante la prueba de Ames. En esta ocasión no se han hecho triplicados. Se ha realizado una preincubación de 5 minutos con bacterias y H₂O₂ (Gráfico 15, 16 y 17).

Número de placa	Peróxido de hidrógeno (mM)	FeCl ₂ (μM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias
1	0	0	Sí	347
2	0,44975	0	Sí	2512
3	0,2794	0	Sí	2072
4	0,0931	0	Sí	1992
5	0,044975	0	Sí	1480

6	0	50	Sí	383
7	0	100	Sí	368
8	0	200	Sí	416
9	0,44975	50	Sí	2664
10	0,44975	100	Sí	2496
11	0,44975	200	Sí	1884
12	0,2794	50	Sí	2212
13	0,2794	100	Sí	2552
14	0,2794	200	Sí	2600
15	0,0931	50	Sí	1684
16	0,0931	100	Sí	1484
17	0,0931	200	Sí	1716
18	0,044975	50	Sí	1224
19	0,044975	100	Sí	1172
20	0,044975	200	Sí	1168

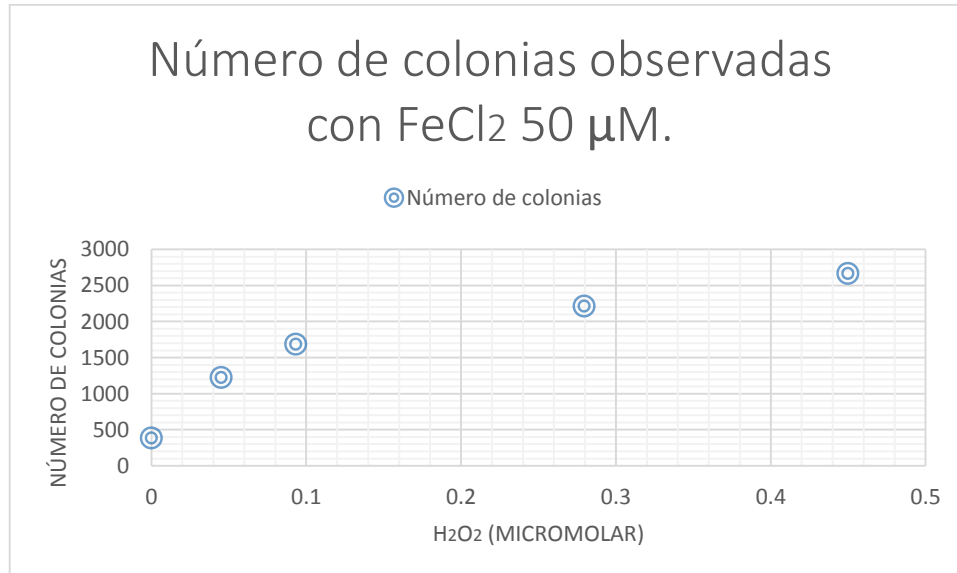


Gráfico 15. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 50 μM de FeCl₂.

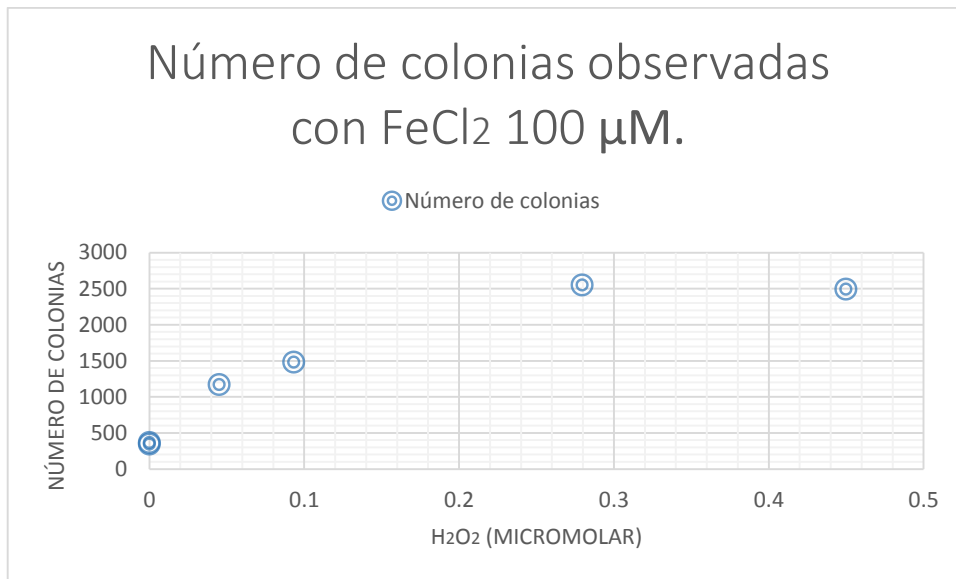


Gráfico 16. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 100 μM de FeCl₂.

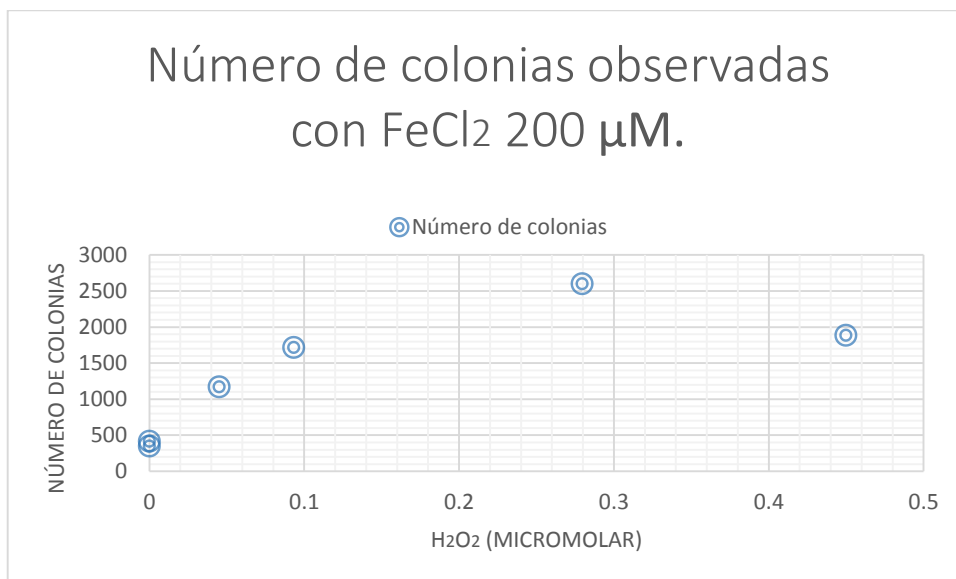


Gráfico 17. Número de colonias obtenidas a distintas concentraciones de H₂O₂, con un tratamiento con 200 μM de FeCl₂.

Experimento 22. Curva de dosis-respuesta con FeCl₂ y FeCl₃.

Con la finalidad de observar que FeCl₂ no es citotóxico y buscar la concentración óptima, se realiza un ensayo de Ames con 7 concentraciones (200, 400, 600, 800, 1000, 1500 y 2000 μM) (Gráfico 18). Se ha incluido FeCl₃ en el ensayo, considerando las mismas concentraciones (Gráfico 19). No se han hecho triplicados.

Número de placa	FeCl ₂ (μM)	FeCl ₃ (μM)	Crecimiento de fondo	Número de colonias
1	0	0	Sí	372

2	200	0	Sí	319
3	400	0	Sí	335
4	600	0	Sí	376
5	800	0	Sí	385
6	1000	0	Sí	286
7	1500	0	Sí	328
8	2000	0	Sí	279
9	0	200	Sí	348
10	0	400	Sí	370
11	0	600	Sí	354
12	0	800	Sí	344
13	0	1000	Sí	279
14	0	1500	Sí	281
15	0	2000	Sí	348

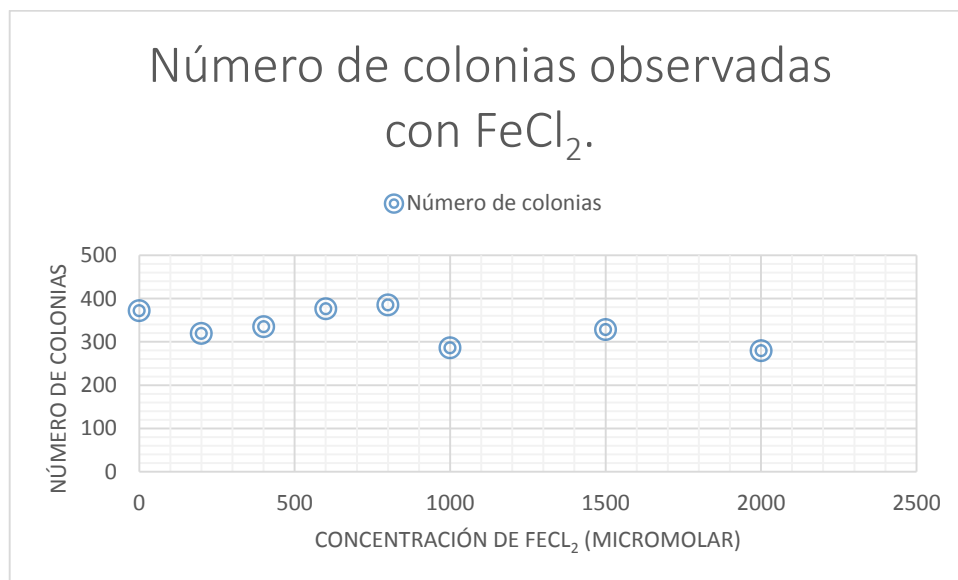


Gráfico 18. Número de colonias obtenidas al tratarse con distintas concentraciones de FeCl_2 (200, 400, 600, 800, 1.000, 1.500, 2.000 μM).

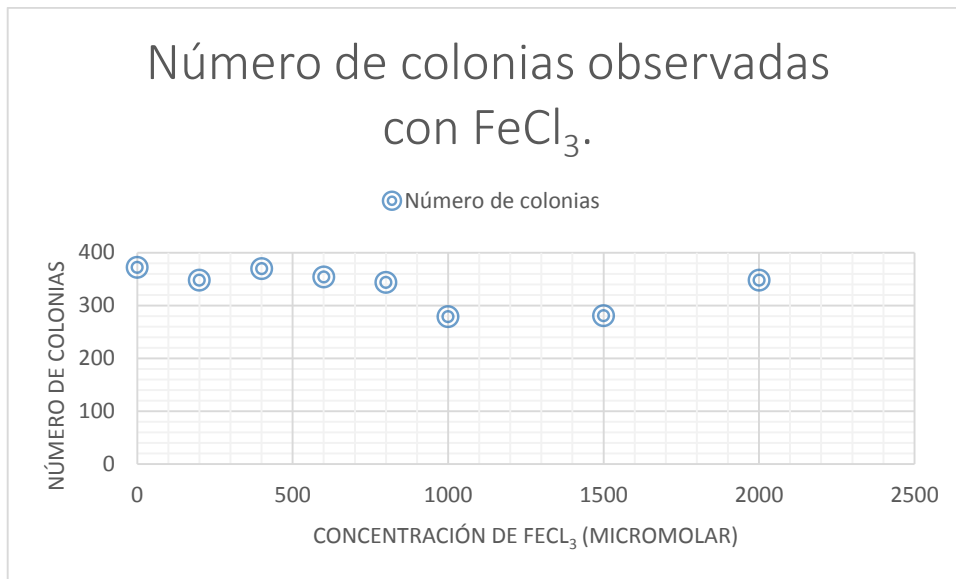


Gráfico 19. Número de colonias obtenidas al tratarse con distintas concentraciones de FeCl₃ (200, 400, 600, 800, 1.000, 1.500, 2.000 μ M).