

**MODULACIÓN POR SOLVENTES DE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA EN EL  
SOS CHROMOTEST POR LA MITOMICINA C Y LA 4-NITROQUINOLINA-1-  
OXIDO: SU IMPORTANCIA EN ESTUDIOS DE ANTIMUTAGÉNESIS.**

**NATHALIA QUINTERO RUIZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**MODULACIÓN POR SOLVENTES DE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA EN EL  
SOS CHROMOTEST POR LA MITOMICINA C Y LA 4-NITROQUINOLINA-1-  
OXIDO: SU IMPORTANCIA EN ESTUDIOS DE ANTIMUTAGÉNESIS.**

**NATHALIA QUINTERO RUIZ**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga**

**DIRECTOR:**

**JORGE LUIS FUENTES, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA**

**2010**

*A mis padres, Érika y Alberto,  
quienes han construido un hogar en  
el que siempre encuentro apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Al profe, Dr. Jorge Luis Fuentes Lorenzo, gracias por la confianza a lo largo del desarrollo de este proyecto, por los consejos, el ánimo y la exigencia; estoy segura de que la formación que recibí en su laboratorio será muy importante en mi futuro laboral. Igualmente agradezco sus lecciones de responsabilidad y el reconocimiento que dio siempre a mis esfuerzos.

Al Dr. Rodrigo Torres por su colaboración incondicional durante el desarrollo de ésta tesis.

A la Dr. Montserrat Llagostera Casal de la Universidad Autónoma de Barcelona por facilitarnos gentilmente la cepa de *E. coli* PQ37.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (Grant 5154) y a COLCIENCIA (Grant RC-432-2004) por la financiación del proyecto.

A mi familia, a mis padres y a mi hermano, por todo el amor, la confianza y el esfuerzo, sin los cuales no habría logrado cumplir esta meta.

A todos mis amigos y colegas, Juancho, Pipe, Viwis, Susy, Stefy, Naty, Adri, Mely, Chalo, Cesar, a mi compañerita de batalla linis que siempre me dio ánimo en los momentos más difíciles y a Christian que me apoyó incondicionalmente durante este tiempo. A todos ustedes gracias por su compañía en los buenos y malos momentos que tuvieron estos años. Pues es por ustedes que siempre tendré los mejores recuerdos de la universidad.

A los integrantes del laboratorio de microbiología y mutagénesis ambiental, por su compañía en las largas jornadas de trabajo especialmente a Gloria quien me ayudo incondicionalmente al entrar en el laboratorio y a Lina, Nathalia, Laura, Sergio y Molkary por su valiosa amistad, porque se sufrió pero se gozo.

A todos los docentes de la escuela de biología por sus enseñanzas y porque de una u otra forma contribuyeron con mi formación, a Yamile por toda la colaboración prestada durante estos años. Y a todas las personas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PÁG.</b>
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1 CARCINOGENESIS Y QUIMIOPREVENCIÓN	16
1.2 ANTIMUTÁGENOS	20
1.3 EL SOS CHROMOTEST	21
1.4 MODULACIÓN POR SOLVENTES DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA	27
1.5 MUTÁGENOS Y ANTIMUTÁGENOS USADOS EN EL ESTUDIO	29
1.5.1 Mitomicina C	29
1.5.2 4-Nitroquinolina-1-Oxido	30
1.5.3 Vitamina E	32
2. METODOLOGÍA	34
2.1 MEDIOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	34
2.2 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO	36
2.3 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD	36
2.4 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD	40
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	41
3. RESULTADOS	43
3.1 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DEL GEN <i>SUL</i> A FRENTE A LOS MUTÁGENOS MMC y 4-NQO.	43
3.2 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS SOLVENTES	44
3.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA MMC Y LA 4-NQO POR SOLVENTES.	48

3.4 EFECTO DE LA MODULACIÓN POR SOLVENTES SOBRE LOS ESTIMADOS DE ANTIGENOTOXICIDAD	52
4. DISCUSIÓN	54
5. CONCLUSIONES	56
6. RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFIA	58

## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
Figura 1. Modelo multiestado de la carcinogénesis química según Surh (1999).	16
Figura 2. Estructura química de los mutágenos de referencia. 2a. Mitomicina C. 2b. 4-nitroquinolina-1-óxido.	31
Figura 3. Estructura química de la vitamina E, $\alpha$ -tocoferol CH <sub>3</sub> O	33
Figura 4. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> frente al mutágeno mitomicina C (MMC) en células de <i>E. coli</i> PQ37.	43
Figura 5. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> frente al mutágeno 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) en células de <i>E. coli</i> PQ37.	44

## LISTA DE TABLAS

	<b>PÁG.</b>
Tabla 1. Guía de los diferentes mecanismos de acción de los inhibidores de la mutagénesis y carcinogénesis según De Flora y Ferguson (2005).	18
Tabla 2. Antioxidantes naturales y sintéticos que muestran efecto antimutagénico en el SOS Chromotest.	24
Tabla 3. Antimutagenicidad de diferentes extractos biológicos y compuestos detectados con el SOS Chromotest.	25
Tabla 4. Datos publicados sobre la modulación de la mutagénesis con los solventes usados en este estudio.	27
Tabla 5. Información de los solventes utilizados en el presente estudio.	35
Tabla 6. Tratamientos utilizados en el ensayo de genotoxicidad de los solventes.	37
Tabla 7. Valores medios de actividad enzimática $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ G) y fosfatasa alcalina (FA) y del factor de inducción SOS ( <i>I</i> ) obtenidos para células de <i>E. coli</i> PQ37 tratadas con diferentes solventes orgánicos.	46
Tabla 8. Efecto modulador de solventes orgánicos sobre el daño inducido por la mitomicina C (MMC) y la 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) en células de <i>E. coli</i> PQ37.	49
Tabla 9. Efecto de los solventes sobre la antigenotoxicidad de la vitamina E contra el daño inducido por la 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) en células de <i>E. coli</i> PQ37.	53

## RESUMEN

**TITULO: MODULACIÓN POR SOLVENTES DE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA EN EL SOS CHROMOTEST POR LA MITOMICINA C Y LA 4-NITROQUINOLINA-1-OXIDO: SU IMPORTANCIA EN ESTUDIOS DE ANTIMUTAGÉNESIS\*.**

**AUTOR: NATHALIA QUINTERO RUIZ\*\***

**PALABRAS CLAVE:** Solventes, modulación de la mutagénesis, mitomicina C, 4-nitroquinolina-1-oxido, SOS Chromotest.

En el presente trabajo se estudió la toxicidad y genotoxicidad de diferentes solventes orgánicos (acetona, diclorometano, dimetilsulfoxido, etanol, éter, metanol y tetracloruro de carbono) mediante el ensayo SOS Chromotest y se determinó el efecto modulador de estos solventes sobre la genotoxicidad inducida por los mutágenos de referencia mitomicina C (MMC) y 4-nitroquinolina-1-oxido (4-NQO), mediante procedimientos de coincubación.

Se encontró que ninguno de los solventes fue genotóxico en el ensayo. Sin embargo, algunos solventes (dimetilsulfoxido, etanol, éter y tetracloruro de carbono) resultaron tóxicos en el modelo de acuerdo a los datos de inhibición de la síntesis de proteínas (fosfatasa alcalina). Los datos además mostraron que todos los solventes estudiados interfieren con la genotoxicidad inducida por los mutágenos de referencia.

Acetona, metanol y diclorometano fueron los solventes que no resultaron tóxicos ni genotóxicos y que mostraron efecto modulador sobre la actividad de los mutágenos. Dichos solventes al ser usados para disolver un antimutágeno de referencia (vitamina E), mostraron que conducían a sobreestimados de la actividad antimutagénica de esta. Los resultados son discutidos considerando la importancia de estos hallazgos en estudios de antimutágenos.

Los datos obtenidos evidencian la necesidad de una adecuada escogencia del solvente usado para disolver compuestos que serán ensayados con el ensayo SOS Chromotest; dado el potencial que estos presentan para modular la mutagénesis.

---

\* Proyecto de Grado.

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.).

## ABSTRACT

**TITLE: MODULATION BY SOLVENTS OF THE MITOMYCIN C AND 4-NITROQUINOLINE-1-OXIDE INDUCED GENOTOXICITY IN THE SOS CHROMOTEST: ITS IMPORTANCE IN ANTIMUTAGENESIS STUDIES\***

**AUTHOR: NATHALIA QUINTERO RUIZ\*\***

**KEYWORDS:** Solvents, mutagenesis modulation, mitomycin C, 4-nitro-quinoline-oxide, SOS Chromotest

In this work, the toxicity and genotoxicity of different organic solvents (acetone, dichloromethane, dimethylsulfoxide, ethanol, ether, methanol, and carbon tetrachloride) were studied using the SOS Chromotest employing the tester strain *Escherichia coli* PQ37. The modulatory effect of these solvents on the genotoxicity induced by mutagens such as mitomycin C (MMC) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) were also studied.

It was found that none of the solvents were genotoxic in that test. However, according to the data on inhibition of protein synthesis (alkaline phosphatase), some solvents (dimethylsulfoxide, ethanol, ether, and carbon tetrachloride) were toxic in the assay SOS Chromotest. The data also showed that all studied solvents interfere with the genotoxicity induced by the reference mutagens.

Acetone, methanol and dichloromethane were the solvents that resulted not toxic and genotoxic, as well as shown a modulatory effect on mutagen activities. When solvents were used to dissolve the reference antimutagen (vitamin E), they showed overestimate of the anti-mutagenic activity of vitamin E. The results are discussed considering the importance of these findings in antimutagenic studies.

The data obtained shows the need for proper choice of solvent used to dissolve compounds to be tested with the assay SOS Chromotest, since these have the potential to modulate mutagenesis.

---

\* Basic Science thesis.

\*\* Faculty of Science, Biology School, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.).

## INTRODUCCIÓN

Los antimutágenos son agentes que reducen la tasa de mutaciones espontáneas e inducidas en la célula (Kada & Shimoï 1987, Kuroda & Inoue 1988). El control de la mutabilidad celular mediante antimutágenos, puede proporcionar métodos para la prevención de enfermedades relacionadas con las mutaciones como el cáncer, el envejecimiento, y otras enfermedades degenerativas. En este contexto, los antimutágenos han sido clasificados en diferentes categorías y subcategorías con base en la fase que estos intervienen los procesos de mutagénesis y carcinogénesis; así como en los patrones de modulación de los mecanismos de defensa del huésped. Tal clasificación, soporta la aplicación racional de estrategias de quimioprevención para el control del cáncer y de enfermedades degenerativas (De Flora & Ramel 1988, De Flora 1998, De Flora & Ferguson 2005).

La prospección y estudio de antimutágenos naturales hace uso principalmente de ensayos bacterianos *in vitro*, dado su sensibilidad, sencillez y flexibilidad para diseñar procedimientos experimentales que permiten dilucidar los mecanismos antimutagénicos de los compuestos estudiados (De Flora *et al.* 1992a). Entre los ensayos usados para estudios de antimutagénesis se destaca el SOS Chromotest (Quillardet *et al.* 1982). Este ensayo bacteriano permite estimar indirectamente el daño primario producido en el ADN por los mutágenos, midiendo la inducción de un gen reportero ( $\beta$ -galactosidasa) bajo el control de la respuesta SOS en la enterobacteria *Escherichia coli* (Quillardet & Hofnung 1993). El ensayo es un excelente candidato no solo por las ventajas mencionadas anteriormente, sino porque además permite incrementar la eficiencia de los tamizajes o “*screening*” masivo de compuestos naturales (Fuentes *et al.* 2006a).

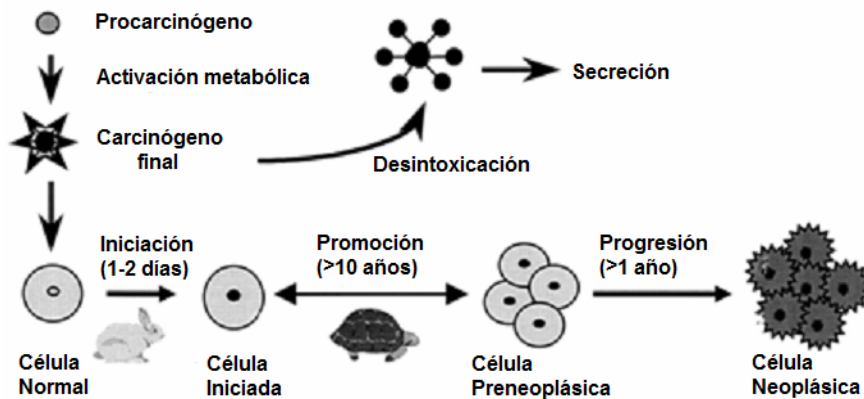
A pesar de las ventajas anteriormente mencionadas, el uso de ensayos *in vitro* en estudios de antimutágenos puede verse limitado cuando los compuestos ensayados son tóxicos para la célula (Ej.: inducen muerte celular y/o inhibición de la síntesis de macromoléculas) o cuando se producen interacciones durante los ensayos; ya sea entre los solventes usados para disolver compuestos y los mutágenos, o entre los solventes, mutágenos y antimutágenos. Existen evidencias experimentales que indican que algunos solventes pueden modular la actividad mutagénica. Tal efecto modulador se expresa como sinergismo, antagonismo o efectos aditivos en las células bacterianas; lo que conduce a sobreestimados o subestimados de la actividad mutagénica de diferentes xenobióticos en el ensayo SOS Chromotest (Gebel & Koenig 1999, Eder & Deininger 2000, 2002).

Dado que los eventos de toxicidad y de modulación por solventes pueden afectar los resultados de los estudios antimutagénicos; es nuestra intención establecer las condiciones óptimas para el “*screening*” antimutagénico cuando se requiere el uso de solventes orgánicos. El presente trabajo tiene como objetivos: estudiar la toxicidad y genotoxicidad de diferentes solventes (acetona, diclorometano, dimetilsulfoxido, etanol, éter, metanol y tetracloruro de carbono) en el ensayo SOS Chromotest; así como, determinar su efecto modulador sobre la genotoxicidad inducida por los mutágenos de referencia: mitomicina C (MMC) y 4-nitroquinolina-1-oxido (4-NQO). Los solventes que no resultaron tóxicos ni genotóxicos para las células de *E. coli* y que mostraron efecto modulador sobre la actividad de los mutágenos; fueron usados para disolver un compuesto antimutagénico estándar (vitamina E) a concentraciones que modulan y no modulan la actividad mutagénica de la 4-NQO. Los resultados de tales ensayos de antigenotoxicidad, soportan la necesidad de establecer condiciones experimentales adecuadas para el “*screening*” de antimutágenos con el SOS Chromotest cuando las sustancias ensayadas son miscibles únicamente en solventes orgánicos.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 CARCINOGENÉISIS Y QUIMIOPREVENCIÓN

Actualmente se acepta que el cáncer es un proceso con múltiples estadios (iniciación, transformación, promoción, progresión y metástasis), fruto de la acumulación en una célula de sucesos genéticos y epigenéticos (Surh 1999, Williams 2001). El riesgo celular de acumular mutaciones potencialmente oncogénicas depende de la frecuencia con la que se produzcan lesiones en el ADN y de la capacidad que tengan las células de reparar dichas lesiones. El equilibrio adecuado entre ambos procesos garantiza una determinada estabilidad genética (Laval *et al.* 1998, Kawanishi *et al.* 2001, Peltomäki 2001). En la Figura 1, se resume el modelo multiestado que explica el proceso de carcinogénesis química.



**Figura 1. Modelo multiestado de la carcinogénesis química según Surh (1999).**

El efecto mutagénico que tienen diferentes agentes ambientales y los mutagénos celulares endógenos generados como fruto del metabolismo oxidativo de nuestras células, pueden claramente alterar la mencionada estabilidad genética y estar en la base de distintos procesos tumorales (Ames 2001, Kawanishi *et al.* 2001).

En este contexto, la quimioprevención (uso de sustancias químicas específicas, naturales o sintéticas, o sus mezclas para suprimir, retardar o revertir el proceso de carcinogénesis) es uno de los nuevos enfoques de control del cáncer como alternativa a la terapia que está cobrando cada día mayor relieve (Surh 1999, Sporn & Suh 2000, Morse & Stoner 2006).

El control de la dieta puede ser una vía para lograr una adecuada quimioprevención ya que las deficiencias nutricionales pueden aumentar la probabilidad que se den lesiones en el ADN (Gentile *et al.* 2001, Weisburger 2001, Greenwald 2002, Reddy *et al.* 2003, Surh 2003). Una quimioprevención efectiva puede alcanzarse además, con el uso de suplementos dietéticos con base en fitoquímicos extraídos de plantas medicinales, para los cuales se han demostrado tanto efecto quimiopreventivo como antitumoral (Park & Pezzuto 2002, Dashwood 2002, Reddy *et al.* 2003, Bjelakovic *et al.* 2004, Balunas & Kinghorn 2005, Issa *et al.* 2006).

Por definición, los agentes quimiopreventivos son compuestos capaces de inhibir las fases iniciales del proceso carcinogénico (Sporn & Suh 2000, Greenwald 2002, Morse & Stoner 2006). Los agentes quimiopreventivos que inhiben las fases de iniciación, promoción y progresión del proceso carcinogénico (ver Williams 2001) son también conocidos como antimutágenos (Weisburger 2001); los cuales serán tratados con más detalle en el acápite 1.2.

Sobre la base de los diferentes mecanismos de acción de los inhibidores de la mutagénesis y carcinogénesis se ha propuesto una detallada guía que clasifica

tales mecanismos en diferentes categorías y sub-categorías, considerando principalmente la etapa de intervención en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis y en los patrones de la modulación de los mecanismos de defensa del huésped (De Flora & Ramel 1988, De Flora 1998; Gentile *et al.* 2001, De Flora & Ferguson 2005). Esta guía (Tabla 1) establece una amplia variedad de mecanismos moduladores de la respuesta genotóxica, de la iniciación, de la promoción, de la progresión, de la angiogénesis y de la invasión del tumor; redirigiendo la búsqueda de antitumorales hacia aquellos compuestos con potencial quimiopreventivo (Gentile *et al.* 2001, Lohman *et al.* 2001).

**Tabla 1. Guía de los diferentes mecanismos de acción de los inhibidores de la mutagénesis y carcinogénesis según De Flora y Ferguson (2005).**

<b>PREVENCIÓN PRIMARIA</b>	
1) Inhibición de la mutación y la iniciación del cáncer en el medio extracelular o en células no blanco	Desmutagénesis
a) Inhibición de la absorción de los mutágenos / cancerígenos	
b) Inhibición de la formación endógena de mutágenos y carcinógenos	
c) Dilución y / o la desactivación de mutágenos y carcinógenos fuera de la célula	
d) Favorecimiento de la absorción de agentes de protección	
e) Estimulación de la captura y de desintoxicación en las células no blanco	
2) Inhibición de la mutación y la iniciación del cáncer en células blanco	Bio-antimutagénesis
a) Modificación del transporte trans membrana	
b) Modulación del metabolismo	
c) Bloqueo o competición	
d) Inhibición de la replicación celular	
e) Mantenimiento de la estructura del ADN y modulación del metabolismo del ADN y reparación	
f) Control de la expresión de genes	

---

### 3) Inhibición de la promoción del tumor

- a) Inhibición de los efectos genotóxicos
- b) Actividad antioxidante y captura de radicales libres
- c) Actividad antiinflamatoria
- d) Inhibición de las proteasas
- e) Inhibición de la proliferación celular
- f) Inducción de la diferenciación celular
- g) Modulación de la apoptosis celular
- h) Modulación de la señal de transducción
- i) Protección de las comunicaciones intercelulares

---

### PREVENCION SECUNDARIA

---

#### 1) Inhibición de la progresión del tumor

- a) Inhibición de los efectos genotóxicos
- b) Actividad Antioxidante y captura de radicales libres
- c) Inhibición de las proteasas
- d) Modulación de la señal de transducción
- e) Efectos en el estatus hormonal
- f) Efectos en el sistema inmune
- g) Inhibición de la angiogénesis
- h) Actividad antineoplásica por medios mecánicos, físicos, químicos, o biológicos.

---

### PREVENCION TERCIARIA

---

#### 1) Inhibición de la invasión y metástasis

- a) Actividad antioxidante y captura de radicales libres
- b) Modulación de la señal de transducción
- c) Inhibición de la proliferación celular
- d) Modulación de células apoptóticas
- e) Inducción de la diferenciación celular
- f) Inhibición de la angiogénesis
- g) Efectos sobre las moléculas de adhesión celular
- h) Inhibición de las proteasas involucradas en la degradación basal de la membrana y modulación de la interacción con la matriz extracelular
- i) Activación de genes antimetástasis

---

Prevención primaria: dirigida a organismos aparentemente sanos, es posible inhibir la mutación e inducción del cáncer por medio de mecanismos protectivos ya sea en el ambiente extracelular o intracelular.

Prevención secundaria: cuando la lesión pre-maligna ha sido detectada, es posible inhibir la progresión del tumor por medio de los mismos mecanismos y en adición afectando el estatus hormonal y el sistema inmune en varias formas. Además de inhibición de angiogénesis del tumor (en pacientes en preclínica o estadios tempranos).

Prevención terciaria: se dirige a pacientes con cáncer después de la terapia, se sale de la clásica definición de quimioprevención y explota mecanismos similares. Es posible que afecte moléculas de adhesión-celular, active genes anti metástasis e inhiba proteasas envueltas en la degradación de la membrana.

## 1.2 ANTIMUTÁGENOS

El término antimutágeno fue originalmente usado para describir un agente que reduce el rendimiento aparente de mutaciones espontaneas y/o inducidas, independientemente del mecanismo involucrado (Clarke & Shankel 1975); mientras antimutagénesis se refiere al proceso mediante el cual se reduce la frecuencia de dichas mutaciones (Kada & Shimoi 1987, Kuroda & Inoue 1988).

Los antimutágenos se pueden clasificar en desmutágenos y bio-antimutágenos dependiendo de su modo general de acción. Los primeros son sustancias que actúan directamente sobre los mutágenos, ya sea desactivándolos química o bioquímicamente antes de que puedan atacar el material genético, los segundos lo hacen interfiriendo con los procesos celulares involucrados en la fijación del daño genético en mutaciones (Kada & Shimoi 1987, Kuroda & Inoue 1988).

Existen dos áreas de estudio muy importantes con relación a los antimutágenos, especialmente los de fuentes naturales. Una primera dirección, investiga sobre los mecanismos mutagénicos y antimutagénicos a nivel celular y molecular. Una segunda dirección, se centra en el control de la mutabilidad celular por antimutágenos con el fin de proveer métodos para la prevención de mutaciones que conduzcan al desarrollo de cáncer, envejecimiento, y de otras enfermedades relacionadas con los efectos genotóxicos (Kada & Shimoi 1987). En esta última dirección, resulta además de vital importancia identificar posibles efectos secundarios de los compuestos antimutagénicos de origen natural; los cuales en muchos casos, muestran una amplia variedad de propiedades biológicas (De Flora & Ramel 1988). En tal sentido, los estudios sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares de la actividad de estos agentes, y de la interacción entre mutágenos, antimutágenos y mecanismos de defensa del huésped; aportarían la base científica racional para un análisis de riesgo-beneficio efectivo durante la selección

de agentes seguros en quimioprevención del cáncer y otras enfermedades relacionadas con la mutación (De Flora & Ramel 1988, De Flora *et al.* 1992a).

En general, los estudios de antimutagénesis desarrollados con ensayos *in vitro* que utilizan células como modelos de ensayo, permiten dilucidar mejor los mecanismos de acción de los compuestos estudiados. En tal sentido, los ensayos que usan microorganismos son de particular importancia dado su sensibilidad, sencillez y flexibilidad para diseñar procedimientos experimentales que permiten dilucidar los mecanismos antimutagénicos de los compuestos estudiados (Kada & Shimoi 1987, De Flora *et al.* 1992a). Sin embargo, es evidente que un refinamiento de las técnicas disponibles para el estudio de estos agentes sigue siendo la base para lograr eficacia en los procesos de prospección de estos compuestos y para dilucidar sus mecanismos de acción (De Flora *et al.* 1992b).

### **1.3 EL SOS CHROMOTEST**

Entre los ensayos desarrollados para la detección de carcinógenos que nos permiten el estudio de compuestos antimutagénicos se encuentra el SOS Chromotest (Quillardet *et al.* 1982). A tales fines, este ensayo es uno de los mejores candidatos dado que puede ser semi-automatizado permitiendo una mayor eficiencia durante el “*screening*” masivo de compuestos naturales (Fuentes *et al.* 2006a).

El SOS Chromotest mide la inducción de la respuesta SOS en la enterobacteria *Escherichia coli* (cepa PQ37) como respuesta a agentes que causan daño en su ADN. Esta cepa contiene una fusión transcripcional entre el gen *sulA* (regulado bajo la respuesta SOS) y el gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -G) del operón Lactosa; el cual fue previamente deletado del cromosoma de la cepa PQ37. El gen *sulA* codifica un péptido involucrado en la formación del septo

celular de manera que la actividad  $\beta$ -G depende exclusivamente de la expresión del gen *sulA*. La cepa PQ37 es constitutiva para la actividad fosfatasa alcalina (FA) y cuenta con una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en la reparación por escisión de bases, aumentando la respuesta a ciertos agentes. Tiene además una mutación en el gen *rfa* que la hace deficiente en lipopolisacáridos de membrana permitiendo una mejor difusión de ciertas sustancias químicas en la célula (Quillardet *et al.* 1982, Quillardet & Hofnung 1985, Quillardet & Hofnung 1993).

Durante el ensayo se desarrollan en paralelo mediciones de las actividades enzimáticas  $\beta$ -G y FA, siendo esta última una medida indirecta de la citotoxicidad del compuesto ensayado. La relación  $\beta$ -G/FA se denomina factor de inducción (*I*) e indica el grado de inducción SOS en un compuesto de prueba (Quillardet & Hofnung 1985).

El SOS Chromotest tiene varias ventajas prácticas sobre otros ensayos *in vitro* entre las que se encuentran: *i*) no requiere de laboratorios muy especializados para su desarrollo, *ii*) es relativamente rápido ya que se obtienen resultados en pocas horas, *iii*) los ensayos enzimáticos no requiere de esterilidad, *iv*) tiene una alta sensibilidad comparable a la del test de Ames y *v*) los resultados son altamente reproducibles, entre otras (Von der Hude *et al.* 1988, Mersch-Sundermann *et al.* 1994, White & Rasmussen 1996).

El ensayo ha sido ampliamente usado en estudios de evaluación de impacto ambiental de compuestos xenobióticos (Quillardet *et al.* 1985, Quillardet & Hofnung 1993, Von der Hude *et al.* 1988, Ohta *et al.* 1984, Miertus *et al.* 1987, Mersch-Sundermann *et al.* 1994, White & Rasmussen 1996). Sin embargo, se evidencia un creciente interés de la comunidad científica internacional en el uso de este ensayo para la identificación de antimutágenos de diferentes orígenes (ver Tablas 2 y 3).

Un aspecto importante a tener en cuenta durante los estudios antimutagénicos que utilizan ensayos bacterianos, son aquellas variaciones metodológicas con relación al protocolo original (Quillardet & Hofnung 1985), que en ocasiones se requieren desarrollar (De Flora *et al.* 1992b). La aplicación de estas variaciones ha demostrado que el efecto de los moduladores puede ser completamente alterado (ya sea para inhibición o incremento) al modificar las condiciones experimentales, por lo cual el empleo de dichas variaciones metodológicas puede proporcionar información más completa sobre la gama de posibles efectos en las bacterias, así como un mejor conocimiento de los mecanismos de modulación (De Flora *et al.* 1992b).

En el caso del ensayo SOS Chromotest, son propuestos tres tipos de procedimientos para estudios de antimutágenos: co-tratamiento, pre-tratamiento y pos-tratamiento. En el co-tratamiento las células son expuestas al mutágeno y al compuesto simultáneamente. Este procedimiento permite evidenciar la actividad del compuesto eficientemente pero aporta poca información sobre sus mecanismos de acción. Por el contrario, los otros dos procedimientos permiten una primera aproximación al mecanismo de acción de los compuestos antigenotóxicos ya sea como desmutágenos o bio-antimutágenos. Así, en el pre-tratamiento las células se exponen al compuesto prueba previo al tratamiento con el mutágeno garantizando de esta manera su interacción directa con el mutágeno ya sea intracelularmente o extracelularmente. Durante el pos-tratamiento las células son expuestas primero al mutágeno y luego de un tiempo prudencial de exposición se añade el compuesto prueba. Bajo tales condiciones experimentales, el ADN ya fue dañado cuando la célula se expone al compuesto prueba; de manera que este sólo podría proteger la célula mediante la reparación de tales daños (Fuentes *et al.* 2006a, 2006b).

**Tabla 2. Antioxidantes naturales y sintéticos que muestran efecto antimutagénico en el SOS Chromotest.**

Compuesto	Mutágeno	Enfoque	Clasificación del antimutágenos	Fuente
Acido ascórbico <sup>†</sup>	NF, FZ UVR, NQO	Co-incubación Pre- y post- incubación	Agente de bloqueo	Gajeswska <i>et al.</i> 1990 Sato <i>et al.</i> 1991
Butyl-hidroxyanisol <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
Butyl-hidroxytolueno <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
5-cloro-uracilo <sup>†</sup>	UVR, MNNG	Pre- y post- incubación	Agente de bloqueo	Sato <i>et al.</i> 1991
Dodecil-galato <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
Ethoxiquina <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
5-fluoro-uracilo <sup>†</sup>	UVR, NQO, MNNG	Pre- y post- incubación	Agente de bloqueo y supresor	Sato <i>et al.</i> 1991
Ésteres de ácido gálico <sup>†</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Co-incubación	Agente de bloqueo	Nakayama 1994
Glutación <sup>†</sup>	NQO, MNNG	Pre- y post- incubación	Agente de bloqueo	Sato <i>et al.</i> 1991
Ligninas <sup>†</sup>	NQO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Co-incubación	Agente de bloqueo	Mikulasova & Kosikova 2003
Octil-galato <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
Galato de propilo <sup>‡</sup>	B[a]P	Co-incubación	Agente de bloqueo	Potenberg <i>et al.</i> 1988
Vitamina E	NDEA	Co-incubación	Agente de bloqueo	Fortes-Aiub <i>et al.</i> 2009

**Leyenda de los mutágenos:** **B[a]P:** Benzo[amina]pireno, **FZ:** Furazolidone, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno, **MNNG:** N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, **NDEA:** N-nitrosodietilamina, **NF:** Nitrofurasono, **NQO:** 4-nitroquinolina-1-oxido, **UVR:** Radiación ultravioleta. El enfoque indicado en la tabla es pre-incubación, co-incubación y post-incubación como lo describe Fuentes *et al* (2006b). La clasificación de antimutágenos fue descrita por Morse & Estoner 1993.

**Tabla 3. Antimutagenicidad de diferentes extractos biológicos y compuestos detectados con el SOS Chromotest.**

Extracto, Fracción o compuesto	Especies	Mutágenos	Enfoque	Clasificación del antimutágeno	Fuente
<b>Plantas</b>					
AE <sup>†</sup> , FF <sup>†</sup> , CE <sup>‡</sup> , EAE <sup>‡</sup> , ME <sup>‡</sup> , PEE <sup>‡</sup> Norbixin <sup>†</sup>	<i>Acacia salicina</i>	B[a]P, NFA	Co-incubación	Agente de bloqueo	Bouhleb <i>et al.</i> 2007
Turmeric <sup>†</sup> , curcumin <sup>†</sup>	<i>Bixa Orellana</i>	UVR	Co-incubación	Agente de bloqueo	Junior <i>et al.</i> 2005
AE <sup>†</sup>	<i>Curcuma longa</i>	NQO	Co-incubación	No sugerido	Polasa <i>et al.</i> 1997
AE <sup>†</sup> , FF <sup>†</sup> , EAE <sup>‡</sup> , ME <sup>‡</sup>	<i>Cymbopogon citratus</i>	γ-radiación	Pre- y post-incubación	Agente de bloqueo	Fuentes <i>et al.</i> 2006a
MCF <sup>‡</sup> , stigmasterol <sup>‡</sup>	<i>Cyperus rotundus</i>	AFB1, NFA	Co-incubación	Agente de bloqueo	Kilani <i>et al.</i> 2005
EO <sup>†</sup> , citral <sup>†</sup> , carvona <sup>†</sup> , limoneno <sup>†</sup>	<i>Gleditsia sinensis</i>	NQO, MNNG	Co-incubación	No sugerido	Lim <i>et al.</i> 2005
EO <sup>†</sup> , timol <sup>†</sup> , carvacrol <sup>†</sup>	<i>Lippia alba</i>	BLM	Co-incubación	Agente de bloqueo	López <i>et al.</i> 2010
AE <sup>‡</sup> , FF <sup>‡</sup> , HE <sup>‡</sup> , CE <sup>‡</sup> , EAE <sup>‡</sup> , ME <sup>‡</sup> , EO <sup>‡</sup> miricetina-3- <i>o</i> -galactósido <sup>‡</sup> , miricetina-3- <i>o</i> -rhamnoside <sup>‡</sup>	<i>Lippia origanoides</i>	BLM	Co-incubación	Agente de bloqueo	Vicuña <i>et al.</i> 2010
AE <sup>†</sup>	<i>Myrthus communis</i>	AFB1, NFA	Co-incubación	Agente de bloqueo	Hayder <i>et al.</i> 2004
AE <sup>†</sup> , TT <sup>†</sup>	<i>Phyllanthus orbicularis</i>	γ-radiación	Pre- y post-incubación	Agente de bloqueo y supresión	Hayder <i>et al.</i> 2008
Ácido gálico <sup>‡</sup> , 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucosa <sup>‡</sup>	<i>Pinus caribaea</i>	γ-radiación	Pre- y post-incubación Pre-, co- y post- incubación	Agente de bloqueo	Fuentes <i>et al.</i> 2006a Fuentes <i>et al.</i> 2006a Fuentes <i>et al.</i> 2006b
EO <sup>†</sup>	<i>Pistacia lentiscus</i>	AFB1, NFA	Co-incubación	Agente de bloqueo y supresión	Abdelwahed <i>et al.</i> 2007
AE <sup>‡</sup> , emodina <sup>‡</sup>	<i>Pituranthus chloranthus</i>	NFA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Co-incubación	No sugerido	Neffati <i>et al.</i> 2009
FF <sup>†</sup> , EAE <sup>‡</sup> , ME <sup>‡</sup>	<i>Polygonum cuspidatum</i>	1-NP	Co- y post-incubación	Agente de bloqueo y supresión	Su <i>et al.</i> 1995
AE <sup>†</sup> , CF <sup>‡</sup> , EAF <sup>‡</sup> , BF <sup>‡</sup> , PEE <sup>‡</sup> , CE <sup>‡</sup> , Derivados emodina <sup>‡</sup>	<i>Rhamnus alaternus</i>	AFB1, NFA	Co-incubación	Agente de bloqueo y supresión	Ammar <i>et al.</i> 2007
	<i>Rumex acetosa</i>	NQO, MNNG	Co-incubación	Agente de bloqueo	Ammar <i>et al.</i> 2008
				No sugerido	Lee <i>et al.</i> 2005

	<b>Microorganismos</b>				
Preparación probiótica†	<i>Bacillus</i> sp.	NQO	Co-incubación	Agente de bloqueo	Caldini <i>et al.</i> 2002
Preparación probiótica†	<i>Lactobacillus</i> sp.	NQO, MNNG	Co-incubación	Agente de bloqueo	Caldini <i>et al.</i> 2008
Preparación probiótica†		NQO			Fang <i>et al.</i> 2008
Preparación probiótica†	<i>Saccharomyces</i> sp.	NQO, FU, NA	Co-incubación	Agente de bloqueo	Toma <i>et al.</i> 2005
	<b>Animales</b>				
BF‡, 5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol‡	<i>Asterina pectinifera</i>	NQO, MNNG	Co-incubación	No sugerido	Han <i>et al.</i> 2000

**Leyenda del extracto:** **AE:** Extracto acuoso, **CE:** extracto clorofórmico, **EE:** Extracto etanólico, **EAE:** Extracto de acetato de etilo, **EO:** Aceite esencial, **HE:** Extracto de hexano, **ME:** Extracto metanólico, **PEE:** Extracto de éter de petróleo, **Leyenda de las fracciones:** **BF:** Fracción butanólica, **CF:** Fracción de cloroformo, **EAF:** Fracción de acetato de etilo, **FF:** Fracciones de flavonoides, **MCF:** Fracción de cloruro de metileno, **TT:** Fracción de taninos. Los extractos o fracciones fueron ensayadas usando agua (†) o dimetilsulfoxido (‡) como solventes. **Leyendas de los mutágenos** **AFB1:** Aflatoxina B1, **B[a]P:** Benzo[amina]pireno, **BLM:** Bleomicina, **FU:** Furazolidona, **FZ:** Furazolidona, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogeno, **MNNG:** 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina, **NA:** Ácido nalidíxico, **NDEA:** N-nitrosodietilamina, **NFA:** nifuroxazide, **NF:** Nitrofurasona, **NPD:** 4-nitro-*o*-fenilendiamina, **1-NP:** 1-nitropyreno, **NQO:** 4-nitroquinolina-1-oxido,  **$\gamma$ -radiación:** Radiación gamma, **UVR:** Radiación ultravioleta, **SA:** azida de sodio. Los enfoques indicados en la tabla son pre-incubación, co-incubación y post-incubación como o describe Fuentes *et al* (2006b). La clasificación de antimutágenos fue descrita por Morse & Estoner 1993.

## 1.4 MODULACIÓN POR SOLVENTES DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA

Existen claras evidencias acerca de la capacidad de algunos solventes orgánicos para modular la actividad mutagénica, tanto en modelos procariontas como eucariotas (Tabla 4).

**Tabla 4. Datos publicados sobre la modulación de la mutagénesis con los solventes usados en este estudio.**

Solvente	Mutágeno usado (Efecto observado)	Ensayo	Fuente
Acetona	AA (↑), B[a]P (↑)	Ames	Anderson & McGregor (1980)
	B[a]P (↓)	Ames	Maron <i>et al.</i> (1981)
Dimetilsulfoxido	AA (NE), NF (NE)	MPI	DeMarini <i>et al.</i> (1991)
	DMN (↓)	Ames	Yahagi <i>et al.</i> (1977)
	DMC (↓), DEC (↓)	Ames	Hermann <i>et al.</i> (1978)
	AA (↑↓), B[a]P (↑)	Ames	Anderson & McGregor (1980)
	B[a]P (↓)	Ames	Maron <i>et al.</i> (1981)
	PDA (↑)	Ames	Burnett <i>et al.</i> (1982)
Etanol	AA (↓), NF (↓)	MPI	DeMarini <i>et al.</i> (1991)
	MMS (↑)	YMR	Zimmermann & Rohlfs (1991)
	CIS derivatives (↓)	Ames	Uno & Morita (1993)
	CIS (↓), K <sub>2</sub> RhCl <sub>5</sub> (↑), PL (↑)	SC	Gebel & Koenig (1999)
	EVK (NE)	SC	Eder & Deininger (2000)
	B[a]P (↓)	Ames	Maron <i>et al.</i> (1981)
	Trp-P-1 (↑)	Ames	Arimoto <i>et al.</i> (1982)
	BLM (↑), MMC (↑), MMS (↑), UVR (↑)	CA	Lin <i>et al.</i> (1989)
	EVK (↑)	SC	Eder & Deininger (2000)
	UA (↑)	SC	Eder & Deininger (2002)
Metanol	Trp-P-1 (↑)	Ames	Arimoto <i>et al.</i> (1982)
	AA (↓), NF (↓)	MPI	DeMarini <i>et al.</i> (1991)
	EVK (↑)	SC	Eder & Deininger (2000)

**Leyenda del mutágeno:** AA: 2-aminoantraceno, AF: 2-aminofluoreno, B[a]P: Benzo[amino]pireno, BLM: Bleomicina, CIS: Cisplatino, DMC: Cloruro de dimetil carbamida, DEC: Cloruro de dietil carbamida, DMN: *N,N*-dimetilnitrosamina, EVK: etil vinil cetona, MMC: Mitomicina C, MMS: Metil Metano Sulfonato, NF: 2-nitrofluoreno, PDA: *p*-fenilendiamina, PL:  $\beta$ -propiolactona, Trp-P-1: 3-amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3*b*]indol, UVR: radiación ultravioleta, UA:  $\alpha,\beta$ -aldehídos insaturados.  
**Leyenda del ensayo:** Ames: ensayo *Salmonella*/microsoma, CA: Ensayo de aberraciones cromosómicas, YMR: Ensayo de recombinación mitótica en levadura, MPI: Ensayo microgen de inducción de pro fagos, SC: SOS Chromotest. Incremento (↑) o disminución (↓) del efecto mutagénico de los solventes en los mutágenos. NE: No se detectó efecto modulador de la mutagénesis.

Se ha demostrado que el dimetilsulfoxido (DMSO), el solvente más usado como disolvente de mutágenos, reduce la mutagenicidad del cloruro de dimetil carbamida, cloruro de dietil carbamida, benzo [amino] pireno y de derivados del cisplatino, mientras aumenta la mutagenicidad de la  $\rho$ -fenilendiamina en estudios con el ensayo de reversión génica en *Salmonella* (Yahagi *et al.* 1977, Hermann *et al.* 1978, Maron *et al.* 1981, Burnett *et al.* 1982, Uno & Morita 1993). Este solvente además reduce la mutagenicidad del 2-aminoantraceno y del 2-nitrofluoreno en el ensayo (microgen) de inducción de profagos (DeMarini *et al.* 1991), mientras incrementa la mutagenicidad del metil metano sulfonato en el ensayo de recombinación mitótica en levadura (Zimmermann & Rohlfis 1991). Por último, el DMSO incrementa la genotoxicidad del  $K_2RhCl_5$  y de la  $\beta$ -propiolactona (BLP) mientras disminuye el efecto genotóxico del cisplatino en el SOS Chromotest (Gebel & Koenig 1999).

Otro solvente ampliamente usado como disolvente, el etanol, también evidencia efecto modulador de la mutagénesis. Usando el ensayo de Ames, se comprobó que el etanol incrementa la mutagenicidad del 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3b]indol mientras reduce la del benzo[amino]pireno (Maron *et al.* 1981, Arimoto *et al.* 1982). Este solvente además incrementa la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por los mutágenos bleomicina, mitomicina C, metil metano sulfonato y la radiación ultravioleta (Lin *et al.* 1989). Por último, este solvente incrementa la genotoxicidad de la etil vinil cetona y de  $\alpha,\beta$ -aldehídos insaturados en el SOS Chromotest (Eder & Deininger, 2000, 2002).

Aunque con menos evidencias experimentales, los solventes acetona y metanol también pueden modular la actividad mutagénica. La acetona reduce la mutagenicidad del benzo[amino]pireno en el ensayo de Ames (Maron *et al.* 1981). Por su parte, el metanol incrementa la mutagenicidad de la 3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3b]indol en el ensayo de Ames (Arimoto *et al.* 1982) y de la etil vinil cetona en el SOS Chromotest (Eder & Deininger 2000); mientras reduce la

mutagenicidad del 2-aminoantraceno y 2-nitrofluoreno en el ensayo (microgen) de inducción de profagos (DeMarini *et al.* 1991).

Todos estos estudios claramente indican que los solventes orgánicos usados como disolventes de mutágenos pueden afectar su potencia mutagénica, ya sea potenciándola o reduciéndola. Un estudio desarrollado en nuestro laboratorio (Vicuña *et al.* 2010) dirigido a evaluar la antigenotoxicidad de aceites esenciales de especies del género *Lippia* con el SOS Chromotest, mostró que el DMSO puede conducir a sobreestimados de la antimutagenicidad, posiblemente por un efecto sinérgico con el aceite esencial. Este hallazgo, unido a los datos presentados en la Tabla 4, soportan la necesidad de estudiar las interacciones solvente/mutágeno/antimutágenos con el fin de evitar sobreestimados y/o subestimados de la antimutagenicidad; en especial durante estudios de antimutágenos que son solo miscibles en solventes orgánicos.

## **1.5 MUTÁGENOS Y ANTIMUTÁGENOS USADOS EN EL ESTUDIO**

### **1.5.1 Mitomicina C**

Las mitomicinas son un grupo de antibióticos aislados del microorganismo *Streptomyces caespitosus*. Dentro de este grupo de compuestos, la mitomicina C (MMC) es el citotóxico natural más usado en la quimioterapia clínica del cáncer debido a su amplio espectro antitumoral (Tomasz & Palom 1997, Paz *et al.* 1999). Este compuesto, es un componente importante en la quimioterapia combinada para el cáncer de pecho, pulmón y próstata y una de las pocas drogas efectivas contra cáncer colorectal (Tomasz & Palom 1997).

El blanco molecular de la MMC es la molécula de ADN produciendo alquilaciones mono y bifuncionales en residuos de guanina y enlaces cruzados entre y dentro de

cadena de ADN, específicamente enlazando las secuencias CpG y GpG, respectivamente (Tomasz & Palom 1997, Paz *et al* 1999).

Tanto las lesiones mono como bifuncionales sobre el ADN se producen sólo después de una activación reductiva de la MMC *in vivo*, mediada por diferentes flavoreductasas (Paz *et al.* 1999). Dado que la activación reductiva de la MMC es eficiente bajo condiciones de hipoxia, se asume que este compuesto presenta selectividad antitumoral para regiones hipóxicas características de tumores sólidos; regiones que a su vez son relativamente resistentes al tratamiento con radiación o agentes quimioterapéuticos comunes que requieren O<sub>2</sub> (Tomasz & Palom 1997, Paz *et al.* 1999).

Además de su actividad antitumoral, la MMC tiene una variedad de efectos biológicos en células de mamíferos o microorganismos, incluyendo inhibición selectiva de la síntesis de ADN, recombinación, roturas cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas e inducción de reparación de ADN en bacterias (Tomasz & Palom 1997).

#### **1.5.2 4-Nitroquinolina-1-Oxido**

La 4-nitroquinolina-1-oxido (4-NQO) es un potente antimicrobiano altamente mutagénico y carcinogénico (Okabayashi & Yoshimoto 1962, Orstein & Rein 1979, Ryu *et al.* 1999), que produce roturas en las hebras de ADN y aductos por transferencia de carga; daños que son potentes inductores de la respuesta SOS en *Escherichia coli* (Mersch-Sundermann *et al.* 1991, Nair *et al.* 2000, Cenci *et al.* 2002). La 4-NQO se conoce como radiomimético de la luz UV (Nair *et al.* 2000) y no requiere activación metabólica para inducir daño sobre la molécula de ADN.

Se ha demostrado que el grupo nitro en la posición 4 del esqueleto de la quinolina en la 4-NQO, es indispensable para su actividad biológica (Okabayashi &

Yoshimoto 1962). Orstein & Rein (1979) sugieren la existencia de un mecanismo de unión de la 4-NQO al ADN en dos pasos: primero se da una intercalación de la 4-NQO o alguno de sus metabolitos con el ADN. Esta intercalación es energéticamente posible gracias a la intervención de 6 o 7 metabolitos de la nitroquinolina que facilitan el establecimiento de enlaces covalentes. La intercalación de la 4-NQO ocurre preferentemente en secuencias Pyr(3'-5')Pur en relación a las secuencias Pur(3'-5')Pyr.

Se cree que la activación metabólica de la 4-NQO (tanto en los sistemas microbianos como mamíferos) ocurre a través de la reducción inicial del grupo nitro a su correspondiente derivado hidroxilamina 4-hydroxyaminoquinolina-1-óxido (4HAQO), intermediario que es después activado por una seril-tRNA-sintetasa, que facilita la acilación de la 4-HAQO por un complejo enzimático seril-AMP (Singer & Grunberger 1983, Harvey & Parry 1998); conduciendo a un metabolito mutagénico *in vivo*, la seril 4-HAQO, quien incorpora los grupos quinoleína en la molécula de ADN (Harvey & Parry 1998).

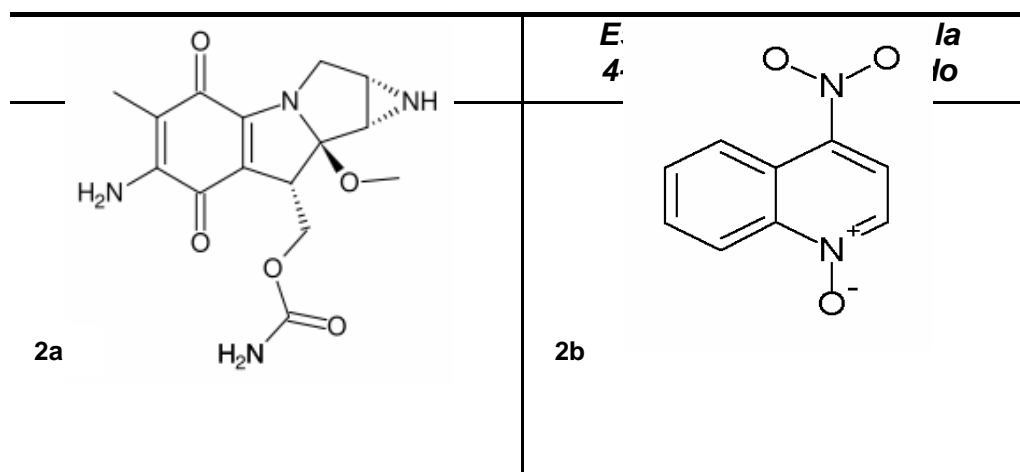


Figura 2. Estructura química de los mutágenos de referencia. 2a. Mitomicina C. 2b. 4-nitroquinolina-1-óxido.

### 1.5.3 Vitamina E

Compuestos agrupados bajo el término común de vitaminas son necesarios para los organismos vivos porque cumplen con numerosas e importantes funciones biológicas; entre las que se encuentran efectos protectores contra diferentes mutágenos (Odin 1997).

La vitamina E es una familia de antioxidantes lipofílicos: los tocoferoles, que contienen un anillo cromanol y una cadena isoprenoides. Cada tocoferol individual difiere en la posición y número de sustituciones de metilo en el anillo aromático (Serafini 2000). Entre los tocoferoles naturales, el  $\alpha$ -tocoferol ( $R_1=R_2=R_3=CH_3$ ) es biológicamente más activo y abundante en comparación con los otros isómeros ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Odin 1997, Serafini 2000). La vitamina E proporciona estabilidad a las membranas celulares y regula su fluidez (Serafini 2000).

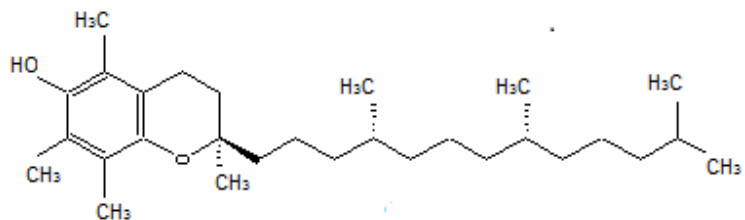
La vitamina E es reconocida como el mayor antioxidante lipo soluble de la membrana biológica. Este protege todos los lípidos de membrana y ácidos grasos insaturados contra la degradación oxidativa, neutralizando el proceso de peroxidación de las especies de radicales libres (Odin 1997, Serafini 2000). La acción antioxidante de la vitamina E también es significativa frente a compuestos que alteran la estabilidad del material genético (Odin 1997). Nikolic *et al.* (2004) demostró que la vitamina E impide la formación de aductos de ADN productos de la peroxidación lipídica.

La vitamina E muestra además efecto inmuno-modulador, el cual fue relacionado con sus propiedades anti-oxidantes. Sin embargo, hoy se cree que otros mecanismos diferentes al antioxidante, deben estar implicados en su efecto inmuno-modulador. Los aceites de semillas (soja, girasol y maíz), frutos secos, cereales integrales, germen de trigo, etc.; son fuentes importantes de esta vitamina (Serafini 2000).

---

***Estructura química de la Vitamina E***

---



---

**Figura 3. Estructura química de la vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol CH<sub>3</sub>O**








## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MEDIOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS

El medio Luria-Bertani (LB), los antibióticos (ampicilina, MMC y tetraciclina) y la 4-NQO, se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (ST. Louis, Missouri, USA). Los sustratos para la  $\beta$ -galactosidasa (2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, ONPG) y para la fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato, PNPP) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los solventes utilizados en este estudio se obtuvieron de diferentes casas comerciales: La Acetona (CAS No. 1.00014.4000) y el tetracloruro de carbono (CAS No. 1.02222.2500) de Merck (Darmstadt, Alemania), el Dimetilsulfoxido (CASNo. D5879-1L) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), por último el diclorometano (CASNo. 9324-03), el etanol (CASNo. 9014-03), el éter (CAS No. 9240-03), y el metanol (CAS No. 9070-03C), al igual que el resto de los químicos usados fueron adquiridos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). En la Tabla 5, se muestran datos detallados de cada uno de ellos.

**Tabla 5. Información de los solventes utilizados en el presente estudio.**

<i>Solvente</i>	<i>Estructura molecular</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Referencia</i>	<i>Masa molecular</i>	<i>Pureza</i>	<i>Densidad</i>	<i>Molaridad</i>	<i>Polaridad</i>	<i>Solubilidad en agua</i>
Acetona		Merck	1.00014.4000	58,08 uma	99,8%	0,79 g/ml	13,56 M	Polar	Miscible
Diclorometano		J.T. Baker	9324-03	84,93 uma	99,5%	1,32 g/ml	15,44 M	Apolar	1,3g/100ml, 20°C
Dimetilsulfoxido		Sigma-Aldrich	D5879-1L	78,13 uma	99,5%	1,10 g/ml	14,01 M	Polar	Miscible
Etanol		J.T. Baker	9014-03	46,07 uma	99,9%	0,79 g/ml	17,11 M	Polar	Miscible
Éter		J.T. Baker	9240-03	74,12 uma	99,9%	0,71 g/ml	9,61 M	Apolar	
Metanol		J.T. Baker	9070-03.C	32,04 uma	98,8%	0,80 g/ml	24,67 M	Polar	Totalmente miscible
Tetracloruro de carbono		Merck	1.02222.2500	153,82 uma	99,8%	1,59 g/ml	10,32 M	Apolar	0,1g/100ml

Para un solvente la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) es una medida de la propiedad de mantener cargas opuestas separadas y el momento dipolar ( $\mu$ ) es la medida de la intensidad de la fuerza de atracción entre dos átomos en una molécula. Las dos son propiedades complementarias de una sustancia que usualmente son usadas para la caracterización de la polaridad.

## 2.2 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO

El presente estudio utilizó como modelo biológico la enterobacteria *Escherichia coli* cepa PQ37 (*F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac ΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) usada para la detección de carcinógenos genotóxicos (Quillardet *et al.* 1982); la cual fue gentilmente suministrada por la Dra. Montserrat Llagostera Casal del Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

El cultivo base para los ensayos biológicos se realizó creciendo la cepa PQ37 en medio Luria Bertani (10 g Triptona/L, 5 g Extracto de Levadura/L, 10 g Cloruro de Sodio/L, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 µg/L) y tetraciclina (17 µg/ml) con agitación (100 rpm) a una temperatura de 37 °C durante toda la noche. Para ello se tomó una alícuota de 2 ml de la cepa conservada y se inoculó en 20 ml de medio LB. Al día siguiente, se diluyó el cultivo en medio fresco (2 ml de cultivo crecido en 20 ml de LB), y se dejó crecer bajo idénticas condiciones experimentales a las descritas anteriormente hasta que alcanzó una densidad óptica  $DO_{600nm}$  de 0.4.

## 2.3 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD

La genotoxicidad de los solventes (acetona, diclorometano, DMSO etanol, éter, metanol y tetracloruro de carbono) fue evaluada usando el ensayo SOS Chromotest siguiendo el procedimiento descrito por Quillardet *et al.* (1982) con las modificaciones propuestas por Fuentes *et al.* (2006a). El cultivo de la cepa PQ37, crecido hasta una  $DO_{600nm}$  = 0.4, fue diluido 10 veces en medio LB a doble fuerza (20 g Triptona/L, 10 g Extracto de Levadura/L, 20 g Cloruro de Sodio/L, pH 7.4) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y tetraciclina a

una concentración 34 µg/ml. Este fue dispensado a razón de 200 µL por tubo eppendorf, que contenía igual volumen de la sustancia (solvente o mutágeno) a evaluar preparada a diferentes concentraciones. Las células fueron expuestas al compuesto durante 30 min. a 8°C para la incorporación de la sustancia a las célula, y luego se incubaron durante 2 horas a 37 °C para la inducción del gen reportero. En cada experimento se incluyó un control negativo (agua destilada) y dos controles positivos (MMC 0,6 µg/ml y 4-NQO 2,3 µM/ml). Las concentraciones de trabajo de los mutágenos fueron determinadas experimentalmente por medio de curvas de genotoxicidad de estos compuestos realizadas previamente. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

**Tabla 6. Tratamientos utilizados en el ensayo de genotoxicidad de los solventes.**

Tratamientos	Células	Solvente	Agua Destilada	Mutágeno
Control (-)	200 µl	-	200 µl	-
Control (+)MMC	200 µl	-	-	200 µl
Control (+)4NQO	200 µl	-	-	200 µl
Concentración 1	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 2	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 3	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 4	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 5	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 6	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 7	200 µl	200 µl	-	-
Concentración 8	200 µl	200 µl	-	-

MMC: mitomicina C, 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido.

**Ensayos Enzimáticos.** Los ensayos enzimáticos  $\beta$ -galactosidasa y la fosfatasa alcalina se desarrollaron en placas para ELISA de 96 pozos (Brand GMBH, Alemania). Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado para cada experimento y siguiendo los procedimientos descritos a continuación:

**Ensayo Enzimático  $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -G).** En cada pocillo de las placas para ELISA se mezclaron 142  $\mu$ l de Buffer Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  1 mM, SDS 0.1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 40 mM, pH 7.0) con 15  $\mu$ L de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurriera la lisis celular. Posteriormente, se inició la reacción enzimática con la adición de 30  $\mu$ L de la solución Stock del sustrato  $\beta$ -galactosidasa (ONPG) preparado a 4 mg/ml en Buffer T (Tris-HCL 1M pH 8.8), y se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de color. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M), 5 minutos después se añadieron 50  $\mu$ L de la solución TRIS (2M) para estabilizar el pH. Finalmente se homogenizó la mezcla de reacción.

**Ensayo Enzimático Fosfatasa Alcalina (FA).** Para este ensayo se realizó previamente una mezcla que contenía: 7  $\mu$ L de cloroformo, 5  $\mu$ L de SDS (0.1 %) y 130  $\mu$ L de Buffer T. La mezcla se preparó al momento de realizar el ensayo, se dejó reposar por 30 minutos, y el cloroformo que no se disolvió se retiró antes de servir la mezcla en cada pocillo de las placas a razón de 142  $\mu$ L. A cada pocillo se adicionó 15  $\mu$ L de células de cada tratamiento e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente para que ocurriera la lisis celular. Posteriormente, la reacción enzimática se inició con la adición de 30  $\mu$ L de la solución Stock del sustrato de la fosfatasa alcalina (PNPP) preparado a 4 mg/ml en Buffer T, y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo de color. La reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de la solución de HCl (2M), finalmente se estabilizó el pH a los 5 minutos adicionando 50  $\mu$ L de la solución TRIS (2M). Por

último, se homogenizó la mezcla de reacción.

La lectura de cada ensayo enzimático se desarrolló a una densidad óptica de 420 nm ( $DO_{420nm}$ ) usando un espectrofotómetro iMark microplate reader (BIO-RAD, California, USA).

### **Cálculo del Factor de Inducción SOS.**

Las unidades enzimáticas de la actividad  $\beta$ G y FA fueron calculadas de acuerdo con Quillardet y Hofnung (1985) de la siguiente manera:

$$\text{Unidades Enzimáticas} = \frac{1000 * A_{420}}{t} \quad \text{Ecuacion 1.}$$

Donde  $A_{420}$  es la medida de la densidad óptica de la mezcla de incubación leída a 420nm, y  $t$  es el tiempo de incubación en presencia del sustrato (ONPG o PNPP) en minutos. La Relación (R) de las unidades de la  $\beta$ G y FA refleja la inducción del gen *sulA* incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas.

$$R = \frac{\text{unidades } \beta\text{-galactosidasa}}{\text{unidades fosfatasa alcalina}} \quad \text{Ecuacion 2.}$$

El criterio de genotoxicidad usado fue el factor de inducción SOS ( $I$ ) que representa los datos de inducción del gen *sulA* normalizados en cada tratamiento (mutágeno, solvente, etc.) y se consideró como una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN por estos tratamientos. Se calculó así:

$$I = \frac{R_t}{R_{nt}} \quad \text{Ecuacion 3.}$$

Donde  $R_t$  son las células tratadas y  $R_{nt}$  son las células no tratadas.

La interpretación de los resultados se realizó considerando lo siguiente: *i)* “no genotóxico”, valores de *I* menores de 1.5 *ii)* “inconclusos”, valores de *I* entre 1.5 – 2.0 y *iii)* “genotóxico”, valores mayores de 2.0 y una clara relación dosis-efecto.

## 2.4 ENSAYO DE ANTIGENOTOXICIDAD

La identificación de los solventes con actividad moduladora frente a los mutágenos MMC y 4NQO, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de co-incubación descrito por Fuentes *et al.* (2006b). El procedimiento se desarrolló básicamente como el protocolo de genotoxicidad pero las células fueron co-tratadas con diferentes concentraciones de las sustancias probadas (solventes orgánicos, vitamina E o ambos) y mutágenos (MMC y 4NQO) simultáneamente.

Para tales ensayos, se tomaron dos tubos cada uno con 5 ml del cultivo de la cepa PQ37 diluido 10 veces en medio LB 2X y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Las células (pellet) se re-suspendieron en LB 2X, uno suplementado con Mitomicina C 0,6 µg/ml y el otro con 4-Nitroquinolina-1-oxido 2,3 µM/ml. Las células se dispensaron a razón de 200 µL en tubos eppendorf que contenían igual volumen de la sustancia de prueba. El tiempo de exposición fue de 30 minutos a 8°C, y el tiempo de recuperación de la bacteria fue de 2 horas a 37 °C. Para cada concentración se desarrollaron al menos 3 experimentos independientes con 4 replicas cada uno. Las mediciones de la actividad enzimática para la β-G y la FA se desarrollaron siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

Para determinar si los solventes afectan los estimados de antigenotoxicidad de un antimutágeno estándar (vitamina E), se preparó una solución stock de esta sustancia (8mM) según lo indicado por Fortes-Aiub *et al.* (2009). La vitamina E se preparó en un rango de dosis antigenotóxico entre 0.02 y 2 mM, disolviéndola en solventes compatibles (acetona, diclorometano y metanol) con el SOS Chromotest

y a porcentajes finales en la mezcla de reacción que modulan o no modulan la actividad mutagénica de la 4-NQO. Se incluyó siempre para su comparación un ensayo con la vitamina E disuelta en agua destilada.

El criterio de antigenotoxicidad usado fue el porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG), el cual representa la capacidad de la sustancia probada para proteger el ADN, y se mide como una reducción significativa del factor de inducción (*I*) en los tratamientos combinados (sustancia + mutágeno) según se indica la ecuación 4:

$$\%IG = 1 - \frac{I_{CO} - I_{BASAL}}{I_{MUT} - I_{BASAL}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde  $I_{CO}$  representa el Factor de inducción SOS en la células co-tratadas (sustancia prueba + mutágeno),  $I_{BASAL}$  representa el factor de inducción SOS basal y por último  $I_{MUT}$  el factor de inducción SOS en las células tratadas con mutágeno.

Los valores negativos del %IG fueron considerados cero, así este indicador fue definido para valores entre cero y 100%.

## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se calcularon los valores promedio de la  $\beta$ -galactosidasa, de fosfatasa alcalina y del factor de inducción (*I*) con sus correspondientes errores estándar. La normalidad de los datos fue probada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de varianza se comprobó mediante una prueba de F-máxima. Los valores medios se compararon mediante la prueba *t*-student. El análisis de correlación Producto-momento (Pearson) se utilizó para examinar la relación dosis-respuesta en el estudio de genotoxicidad. Para todos los análisis

estadísticos, se consideró una  $p < 0,05$ . Para todos los análisis mencionados se utilizó el paquete de software STATISTICA V.6 (Version 6.0, StatSoft Inc (2003), Tulsa, OK, USA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 CINÉTICA DE INDUCCIÓN DEL GEN *SUL* A FRENTE A LOS MUTÁGENOS MMC y 4-NQO.

La cinética de inducción del gen *sulA* frente a los mutágenos MMC y 4-NQO se muestra en las Figuras 4 y 5, respectivamente. Los resultados indican que la cinética de inducción del gen *sulA* frente a los mutágenos MMC y 4-NQO dependen de la dosis de los mismos, con niveles máximos de inducción a concentraciones de 0.6  $\mu\text{g/ml}$  y 2.3  $\mu\text{M/ml}$ , respectivamente.

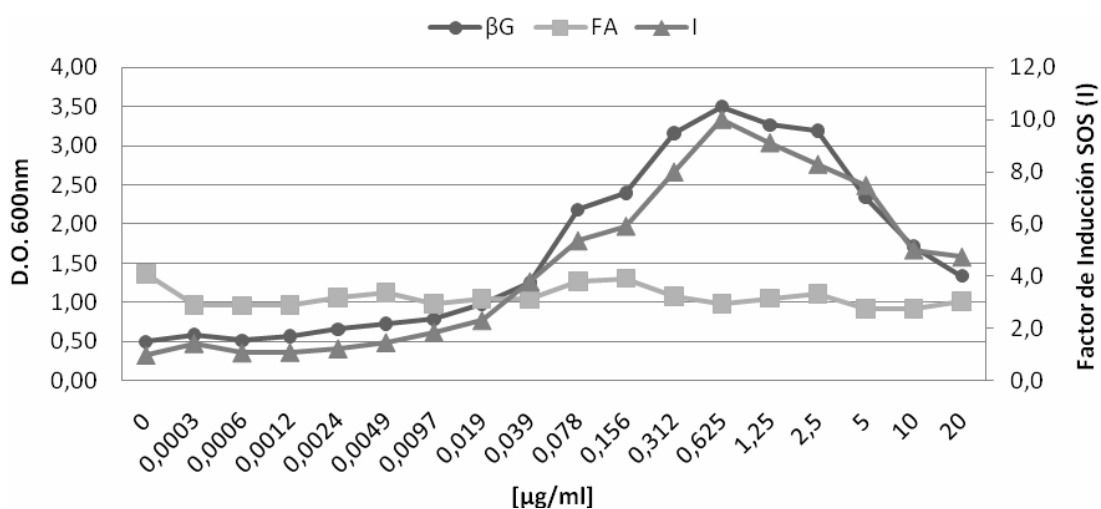
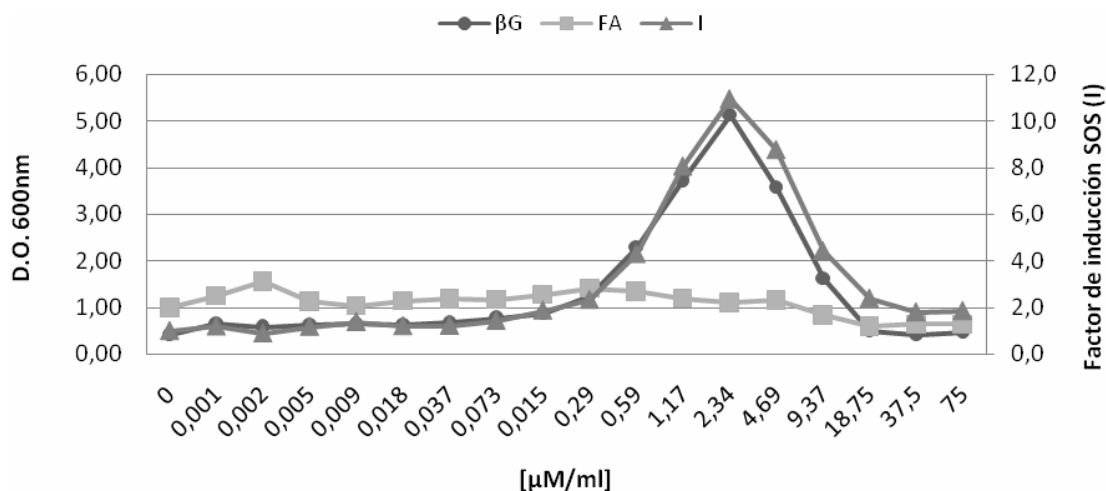


Figura 4. Cinética de inducción del gen *sulA* frente al mutágeno mitomicina C (MMC) en células de *E. coli* PQ37.



**Figura 5. Cinética de inducción del gen *sulA* frente al mutágeno 4-nitroquinolina-1-oxido (4-NQO) en células de *E. coli* PQ37.**

Para el rango de concentraciones estudiadas, no se evidenció una reducción significativa de la actividad constitutiva de la fosfatasa alcalina por el tratamiento con MMC, sugiriendo que este mutágeno no afecta la síntesis de proteínas. Por el contrario, la 4-NQO produce una ligera pero significativa ( $p \leq 0.000017$ ) disminución de la actividad constitutiva fosfatasa alcalina a partir de una dosis de 18.75  $\mu\text{M/ml}$ .

Con base en los resultados obtenidos las dosis 0.6  $\mu\text{g/ml}$  (MMC) y 2.3  $\mu\text{M/ml}$  (4-NQO) fueron escogidas para los co-tratamientos durante los ensayos de antigenotoxicidad dado que estas muestran los mayores niveles de inducción SOS y no resultaron tóxicas para las células de *E. coli*.

### 3.2 TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE LOS SOLVENTES

La toxicidad de los solventes fue medida indirectamente por la inhibición de la actividad constitutiva de la fosfatasa alcalina en células de *E. coli* cepa PQ37

(Tabla 7). Solventes como la acetona, el diclorometano y el metanol no reducen significativamente la actividad fosfatasa alcalina en el rango de dosis estudiado. Por el contrario, el DMSO, el etanol, el eter y el tetracloruro de carbono reducen significativamente la actividad fosfatasa alcalina a partir de las dosis 438 mM (3.12 %), 266 mM (1.56 %), 150 mM (1.56 %) y 161 mM (1.56 %), respectivamente. La inhibición de la síntesis de proteínas por los tratamientos con etanol, DMSO, eter y tetracloruro de carbono, fue también evidenciada por inhibición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa; solo que, para el DMSO, el eter y el tetracloruro de carbono, fue significativa a partir de las dosis 875 mM (6.25 %), 37 mM (0.39 %) y 322 mM (3.12 %), respectivamente.

Un caso interesante resultó el metanol, quien redujo significativamente la actividad  $\beta$ -galactosidasa (y sus correspondientes valores de  $I$ ) a partir de la concentración 3080 mM (12.5%); pero no afectó la actividad constitutiva de la fosfatasa alcalina. Estos datos sugieren que tal efecto inhibitorio no está relacionada con afectaciones de la síntesis celular de proteínas, sino que es posible que este solvente module la expresión del gen *sulA* al nivel genético.

La genotoxicidad de los solventes fue medida mediante el factor de inducción SOS ( $I$ ) en la cepa *E. coli* PQ 37 (Tabla 7). Solventes como la acetona, el diclorometano, DMSO, etanol, eter y metanol no mostraron incremento significativo para los valores de  $I$ , indicando que no inducen la respuesta SOS en *E. coli*. Por su parte, el tetracloruro de carbono incrementa de manera significativa el valor del factor de inducción SOS ( $I = 3.1 \pm 0.6$ ) para la dosis más alta (5158 mM (50 %)). Sin embargo, no se evidenció una relación dosis-respuesta para el rango de concentraciones probadas mediante el análisis de correlación ( $R = 0.13$ , n.s.).

**Tabla 7. Valores medios de actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ G) y fosfatasa alcalina (FA) y del factor de inducción SOS (I) obtenidos para células de *E. coli* PQ37 tratadas con diferentes solventes orgánicos.**

C (%)	Tratamientos	Unidades $\beta$ G	Unidades FA	I
	Agua destilada	0.51 $\pm$ 0.15	0.51 $\pm$ 0.18	1.1 $\pm$ 0.2
	MMC (0,625 $\mu$ g/ml)	3.04 $\pm$ 0.27	0.41 $\pm$ 0.10	8.6 $\pm$ 2.0 *
	4-NQO (2,34 $\mu$ M/ml)	7.31 $\pm$ 0.54	0.61 $\pm$ 0.14	13.6 $\pm$ 2.8 *
0.19	Acetona (26 mM)	0.53 $\pm$ 0.16 n.s.	0.66 $\pm$ 0.15 n.s.	1.0 $\pm$ 0.5 n.s.
0.39	Acetona (53 mM)	0.50 $\pm$ 0.08 n.s.	0.50 $\pm$ 0.09 n.s.	0.9 $\pm$ 0.1 n.s.
0.78	Acetona (106 mM)	0.52 $\pm$ 0.15 n.s.	0.48 $\pm$ 0.08 n.s.	1.1 $\pm$ 0.4 n.s.
1.56	Acetona (212 mM)	0.53 $\pm$ 0.11 n.s.	0.47 $\pm$ 0.13 n.s.	1.4 $\pm$ 0.6 n.s.
3.12	Acetona (424 mM)	0.34 $\pm$ 0.06 n.s.	0.42 $\pm$ 0.09 n.s.	0.8 $\pm$ 0.3 n.s.
6.25	Acetona (848 mM)	0.39 $\pm$ 0.12 n.s.	0.41 $\pm$ 0.15 n.s.	1.0 $\pm$ 0.3 n.s.
12.5	Acetona (1697 mM)	0.47 $\pm$ 0.13 n.s.	0.46 $\pm$ 0.11 n.s.	1.0 $\pm$ 0.3 n.s.
25.0	Acetona (3393 mM)	0.62 $\pm$ 0.08 n.s.	0.65 $\pm$ 0.12 n.s.	0.9 $\pm$ 0.1 n.s.
50.0	Acetona (6787 mM)	0.68 $\pm$ 0.32 n.s.	0.79 $\pm$ 0.17 n.s.	0.8 $\pm$ 0.3 n.s.
	Agua destilada	0.50 $\pm$ 0.07	0.52 $\pm$ 0.15	1.0 $\pm$ 0.1
	MMC (0,625 $\mu$ g/ml)	2.92 $\pm$ 0.48	0.37 $\pm$ 0.08	6.9 $\pm$ 0.4 *
	4-NQO (2,34 $\mu$ M/ml)	6.80 $\pm$ 0.93	0.56 $\pm$ 0.17	14.2 $\pm$ 3.7 *
0.19	Diclorometano (30 mM)	0.52 $\pm$ 0.08 n.s.	0.67 $\pm$ 0.29 n.s.	0.9 $\pm$ 0.5 n.s.
0.39	Diclorometano (60 mM)	0.44 $\pm$ 0.05 n.s.	0.38 $\pm$ 0.12 n.s.	1.3 $\pm$ 0.4 n.s.
0.78	Diclorometano (120 mM)	0.41 $\pm$ 0.11 n.s.	0.36 $\pm$ 0.09 n.s.	1.0 $\pm$ 0.2 n.s.
1.56	Diclorometano (240 mM)	0.42 $\pm$ 0.09 n.s.	0.45 $\pm$ 0.21 n.s.	1.0 $\pm$ 0.4 n.s.
3.12	Diclorometano (480 mM)	0.45 $\pm$ 0.10 n.s.	0.48 $\pm$ 0.14 n.s.	0.9 $\pm$ 0.3 n.s.
6.25	Diclorometano (970 mM)	0.41 $\pm$ 0.13 n.s.	0.77 $\pm$ 0.27 n.s.	0.4 $\pm$ 0.1 n.s.
12.5	Diclorometano (1930 mM)	0.35 $\pm$ 0.07 n.s.	0.63 $\pm$ 0.20 n.s.	0.5 $\pm$ 0.2 n.s.
25.0	Diclorometano (3860 mM)	0.37 $\pm$ 0.06 n.s.	0.55 $\pm$ 0.21 n.s.	0.8 $\pm$ 0.1 n.s.
50.0	Diclorometano (7720 mM)	0.44 $\pm$ 0.06 n.s.	0.73 $\pm$ 0.27 n.s.	0.8 $\pm$ 0.2 n.s.
	Agua destilada	0.70 $\pm$ 0.15	0.59 $\pm$ 0.12	1.0 $\pm$ 0.1
	MMC (0,625 $\mu$ g/ml)	4.27 $\pm$ 0.73	0.38 $\pm$ 0.13	9.9 $\pm$ 2.1 *
	4-NQO (2,34 $\mu$ M/ml)	7.58 $\pm$ 1.29	0.45 $\pm$ 0.12	16.1 $\pm$ 4.4 *
0.19	DMSO (27 mM)	0.71 $\pm$ 0.10 n.s.	0.60 $\pm$ 0.12 n.s.	1.1 $\pm$ 0.1 n.s.
0.39	DMSO (55 mM)	0.55 $\pm$ 0.15 n.s.	0.42 $\pm$ 0.14 n.s.	1.3 $\pm$ 0.4 n.s.
0.78	DMSO (109 mM)	0.58 $\pm$ 0.18 n.s.	0.45 $\pm$ 0.13 n.s.	1.0 $\pm$ 0.3 n.s.
1.56	DMSO (219 mM)	0.65 $\pm$ 0.16 n.s.	0.54 $\pm$ 0.14 n.s.	1.1 $\pm$ 0.2 n.s.
3.12	DMSO (438 mM)	0.51 $\pm$ 0.10 n.s.	0.33 $\pm$ 0.10 **	1.6 $\pm$ 0.7 n.s.
6.25	DMSO (875 mM)	0.48 $\pm$ 0.10 **	0.29 $\pm$ 0.12 **	1.6 $\pm$ 0.7 n.s.
12.5	DMSO (1751 mM)	0.36 $\pm$ 0.08 **	0.24 $\pm$ 0.09 **	1.5 $\pm$ 0.4 n.s.
25.0	DMSO (3502 mM)	0.44 $\pm$ 0.14 **	0.29 $\pm$ 0.09 **	1.4 $\pm$ 0.6 n.s.
50.0	DMSO (7004 mM)	0.30 $\pm$ 0.11 **	0.27 $\pm$ 0.08 **	0.8 $\pm$ 0.2 n.s.
	Agua destilada	0.79 $\pm$ 0.11	0.60 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.1
	MMC (0,625 $\mu$ g/ml)	5.08 $\pm$ 0.64	0.52 $\pm$ 0.08	7.3 $\pm$ 1.0 *
	4-NQO (2,34 $\mu$ M/ml)	9.39 $\pm$ 1.24	0.50 $\pm$ 0.07	14.5 $\pm$ 2.2 *
0.19	Etanol (33 mM)	0.76 $\pm$ 0.12 n.s.	0.54 $\pm$ 0.10 n.s.	1.2 $\pm$ 0.2 n.s.
0.39	Etanol (67 mM)	0.75 $\pm$ 0.09 n.s.	0.70 $\pm$ 0.11 n.s.	0.9 $\pm$ 0.1 n.s.

C (%)	Tratamientos	Unidades βG	Unidades FA	I
0.78	Etanol (133 mM)	0.67 ± 0.07 n.s.	0.61 ± 0.13 n.s.	1.0 ± 0.1 n.s.
1.56	Etanol (266 mM)	0.56 ± 0.07 **	0.48 ± 0.08 **	1.0 ± 0.2 n.s.
3.12	Etanol (532 mM)	0.50 ± 0.09 **	0.32 ± 0.08 **	1.3 ± 0.2 n.s.
6.25	Etanol (1065 mM)	0.41 ± 0.04 **	0.45 ± 0.15 **	1.2 ± 0.3 n.s.
12.5	Etanol (2130 mM)	0.40 ± 0.05 **	0.26 ± 0.04 **	1.4 ± 0.4 n.s.
25.0	Etanol (4260 mM)	0.51 ± 0.06 **	0.32 ± 0.07 **	1.4 ± 0.3 n.s.
50.0	Etanol (8520 mM)	0.34 ± 0.07 **	0.28 ± 0.05 **	1.1 ± 0.2 n.s.
	Agua destilada	0.81 ± 0.09	0.67 ± 0.08	1.0 ± 0.0
	MMC (0,625 µg/ml)	5.00 ± 0.36	0.43 ± 0.07	9.6 ± 1.0 *
	4-NQO (2,34 µM/ml)	9.19 ± 0.81	0.57 ± 0.08	13.9 ± 3.2 *
0.19	Eter (19 mM)	0.81 ± 0.18 n.s.	0.78 ± 0.15 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.
0.39	Eter (37 mM)	0.61 ± 0.06 **	0.59 ± 0.08 n.s.	0.9 ± 0.1 n.s.
0.78	Eter (75 mM)	0.60 ± 0.07 **	0.65 ± 0.08 n.s.	0.8 ± 0.1 n.s.
1.56	Eter (150 mM)	0.62 ± 0.09 **	0.53 ± 0.09 **	1.0 ± 0.1 n.s.
3.12	Eter (300 mM)	0.55 ± 0.14 **	0.47 ± 0.12 **	0.9 ± 0.1 n.s.
6.25	Eter (600 mM)	0.39 ± 0.10 **	0.27 ± 0.05 **	1.3 ± 0.4 n.s.
12.5	Eter (1200 mM)	0.32 ± 0.05 **	0.29 ± 0.09 **	0.9 ± 0.3 n.s.
25.0	Eter (2400 mM)	0.44 ± 0.14 **	0.34 ± 0.08 **	1.0 ± 0.4 n.s.
50.0	Eter (4800 mM)	0.54 ± 0.12 **	0.35 ± 0.08 **	1.1 ± 0.2 n.s.
	Agua destilada	0.56 ± 0.06	0.68 ± 0.19	1.0 ± 0.3
	MMC (0,625 µg/ml)	3.22 ± 0.37	0.96 ± 0.34	4.2 ± 1.0 *
	4-NQO (2,34 µM/ml)	6.28 ± 0.59	1.15 ± 0.38	6.5 ± 1.0 *
0.19	Metanol (45 mM)	0.65 ± 0.13 n.s.	0.64 ± 0.12 n.s.	1.3 ± 0.6 n.s.
0.39	Metanol (90 mM)	0.53 ± 0.08 n.s.	0.44 ± 0.06 n.s.	1.4 ± 0.3 n.s.
0.78	Metanol (190 mM)	0.61 ± 0.07 n.s.	0.69 ± 0.15 n.s.	1.0 ± 0.2 n.s.
1.56	Metanol (380 mM)	0.55 ± 0.07 n.s.	0.62 ± 0.21 n.s.	1.1 ± 0.2 n.s.
3.12	Metanol (770 mM)	0.55 ± 0.07 n.s.	0.70 ± 0.20 n.s.	1.0 ± 0.3 n.s.
6.25	Metanol (1540 mM)	0.46 ± 0.09 n.s.	0.67 ± 0.28 n.s.	1.2 ± 0.5 n.s.
12.5	Metanol (3080 mM)	0.38 ± 0.05 **	0.82 ± 0.17 n.s.	0.5 ± 0.1 n.s.
25.0	Metanol (6170 mM)	0.37 ± 0.05 **	0.86 ± 0.44 n.s.	0.7 ± 0.2 n.s.
50.0	Metanol (12330 mM)	0.28 ± 0.05 **	0.91 ± 0.34 n.s.	0.4 ± 0.2 n.s.
	Agua destilada	0.95 ± 0.10	0.60 ± 0.08	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	6.09 ± 0.29	0.48 ± 0.11	8.7 ± 2.0 *
	4-NQO (2,34 µM/ml)	12.95 ± 0.60	0.60 ± 0.08	14.1 ± 2.1 *
0.19	Tetracloruro de carbono (20 mM)	0.96 ± 0.07 n.s.	0.80 ± 0.12 n.s.	0.8 ± 0.2 n.s.
0.39	Tetracloruro de carbono (40 mM)	1.02 ± 0.09 n.s.	0.78 ± 0.17 n.s.	0.9 ± 0.2 n.s.
0.78	Tetracloruro de carbono (81 mM)	0.99 ± 0.11 n.s.	0.54 ± 0.08 n.s.	1.2 ± 0.2 n.s.
1.56	Tetracloruro de carbono (161 mM)	0.87 ± 0.08 n.s.	0.46 ± 0.06 **	1.2 ± 0.2 n.s.
3.12	Tetracloruro de carbono (322 mM)	0.67 ± 0.06 **	0.37 ± 0.09 **	1.3 ± 0.2 n.s.
6.25	Tetracloruro de carbono (645 mM)	0.48 ± 0.11 **	0.32 ± 0.10 **	1.1 ± 0.3 n.s.
12.5	Tetracloruro de carbono (1289 mM)	0.48 ± 0.06 **	0.35 ± 0.08 **	0.9 ± 0.2 n.s.
25.0	Tetracloruro de carbono (2579 mM)	0.61 ± 0.05 **	0.43 ± 0.07 **	0.9 ± 0.1 n.s.
50.0	Tetracloruro de carbono (5158 mM)	2.04 ± 0.21 *	0.42 ± 0.03 **	3.1 ± 0.6 *

**C (%)**: Concentración del solvente calculado a partir del porcentaje de pureza de cada solvente como se expresa en la tabla 4. Valores promedio de la actividad β-galactosidasa y fosfatasa alcalina y el factor de inducción fueron calculados a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno y su correspondiente error estándar. Significancia ( $p < 0.05$  usando la prueba  $t$ -Student), Incremento (\*) y disminución (\*\*) significativa respecto al control negativo, n.s.: no se encontró diferencia significativa.

### **3.3 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA MMC Y LA 4-NQO POR SOLVENTES.**

En la Tabla 8, se muestra la capacidad de los diferentes solventes estudiados para modular la genotoxicidad de los mutágenos MMC y 4-NQO. Todos los solventes estudiados interfieren con la genotoxicidad inducida por los mutágenos estudiados. En general, dosis elevadas de los solventes reducen completamente los valores de *I* en células co-tratadas (mutageno + solvente) con respecto al control positivo; mientras que dosis bajas de estos solventes no muestran efecto inhibitorio o se evidencian ligeros incrementos en los valores de *I*.

El efecto modulador de la actividad genotóxica de la MMC (expresado como %IG) producido por acetona, diclorometano, DMSO, etanol, éter, metanol y tetracloruro de carbono, fue significativo a partir de las dosis 1.56, 6.25, 6.25, 3.12, 12.5, 6.25 y 12.5 %, respectivamente. Se observaron resultados muy similares al usar el mutageno 4-NQO, excepto para la acetona, el diclorometano y el éter que inhiben significativamente la genotoxicidad inducida por este mutágeno a partir de las dosis 3.12, 12.5 y 6.25 %, respectivamente.

**Tabla 8. Efecto modulador de solventes orgánicos sobre el daño inducido por la mitomicina C (MMC) y la 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) en células de *E. coli* PQ37.**

<b>C (%)</b>	<b>Tratamientos celulares</b>	<b>I<sup>†</sup> (% GI)</b>	<b>Tratamientos celulares</b>	<b>I<sup>††</sup> (% GI)</b>
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	7.4 ± 0.9	4-NQO (2,34 µmol/ml)	9.8 ± 0.8
0.19	Acetona (26 mM) + MMC	9.1 ± 2.5 ( 0 %) n.s.	Acetona ( 26 mM) + 4-NQO	13.7 ± 3.0 ( 0 %) n.s.
0.39	Acetona (53 mM) + MMC	8.9 ± 2.4 ( 0 %) n.s.	Acetona ( 53 mM) + 4-NQO	11.1 ± 3.3 ( 0 %) n.s.
0.78	Acetona (106 mM) + MMC	6.2 ± 1.0 ( 18 %) n.s.	Acetona ( 106 mM) + 4-NQO	11.2 ± 3.4 ( 0 %) n.s.
1.56	Acetona (212 mM) + MMC	5.1 ± 1.2 ( 36 %) *	Acetona ( 212 mM) + 4-NQO	8.8 ± 2.2 ( 11 %) n.s.
3.12	Acetona (424 mM) + MMC	1.5 ± 0.3 ( 92 %) *	Acetona ( 424 mM) + 4-NQO	1.6 ± 0.5 ( 93 %) *
6.25	Acetona (848 mM) + MMC	1.1 ± 0.1 ( 98 %) *	Acetona ( 848 mM) + 4-NQO	1.2 ± 0.2 ( 98 %) *
12.5	Acetona (1697 mM) + MMC	1.1 ± 0.1 ( 99 %) *	Acetona (1697 mM) + 4-NQO	1.0 ± 0.2 (100 %) *
25.0	Acetona (3393 mM) + MMC	0.7 ± 0.2 (100 %) *	Acetona (3393 mM) + 4-NQO	0.9 ± 0.1 (100 %) *
50.0	Acetona (6787 mM) + MMC	0.8 ± 0.1 (100 %) *	Acetona (6787 mM) + 4-NQO	0.8 ± 0.1 (100 %) *
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	0.9 ± 0.2
	MMC (0,625 µg/ml)	5.8 ± 0.9	4-NQO (2,34 µmol/ml)	9.0 ± 2.8
0.19	Diclorometano (30 mM) + MMC	6.2 ± 1.9 ( 0 %) n.s.	Diclorometano (30 mM) + 4-NQO	10.5 ± 3.9 ( 0 %) n.s.
0.39	Diclorometano (60 mM) + MMC	9.3 ± 2.2 ( 0 %) n.s.	Diclorometano (60 mM) + 4-NQO	10.4 ± 2.6 ( 0 %) n.s.
0.78	Diclorometano (120 mM) + MMC	8.5 ± 2.4 ( 0 %) n.s.	Diclorometano (120 mM) + 4-NQO	10.6 ± 2.7 ( 0 %) n.s.
1.56	Diclorometano (240 mM) + MMC	6.9 ± 1.3 ( 0 %) n.s.	Diclorometano (240 mM) + 4-NQO	12.0 ± 2.1 ( 0 %) n.s.
3.12	Diclorometano (480 mM) + MMC	5.1 ± 0.6 ( 14 %) n.s.	Diclorometano (480 mM) + 4-NQO	10.9 ± 2.9 ( 0 %) n.s.
6.25	Diclorometano (970 mM) + MMC	3.3 ± 0.8 ( 52 %) *	Diclorometano (970 mM) + 4-NQO	6.4 ± 2.1 ( 32 %) n.s.
12.5	Diclorometano (1930 mM) + MMC	1.4 ± 0.2 ( 92 %) *	Diclorometano (1930 mM) + 4-NQO	3.4 ± 1.2 ( 70 %) *
25.0	Diclorometano (3860 mM) + MMC	0.8 ± 0.2 (100 %) *	Diclorometano (3860 mM) + 4-NQO	0.5 ± 0.1 (100 %) *
50.0	Diclorometano (7720 mM) + MMC	0.7 ± 0.2 (100 %) *	Diclorometano (7720 mM) + 4-NQO	0.5 ± 0.1 (100 %) *
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	10.1 ± 2.9	4-NQO (2,34 µmol/ml)	12.4 ± 2.0
0.19	DMSO (27 mM) + MMC	10.2 ± 1.1 ( 0 %) n.s.	DMSO (27 mM) + 4-NQO	12.6 ± 2.7 ( 0 %) n.s.
0.39	DMSO (55 mM) + MMC	10.2 ± 2.1 ( 0 %) n.s.	DMSO (55 mM) + 4-NQO	12.0 ± 2.0 ( 0 %) n.s.
0.78	DMSO (109 mM) + MMC	10.7 ± 2.1 ( 0 %) n.s.	DMSO (109 mM) + 4-NQO	16.6 ± 3.5 ( 0 %) n.s.
1.56	DMSO (219 mM) + MMC	10.7 ± 1.8 ( 0 %) n.s.	DMSO (219 mM) + 4-NQO	14.5 ± 3.1 ( 0 %) n.s.

3.12	DMSO (438 mM) + MMC	7.6 ± 1.5 ( 28 %) n.s.	DMSO (438 mM) + 4-NQO	10.8 ± 1.6 ( 14 %) n.s.
6.25	DMSO (875 mM) + MMC	4.0 ± 0.6 ( 67 %) *	DMSO (875 mM) + 4-NQO	5.7 ± 0.7 ( 59 %) *
12.5	DMSO (1751 mM) + MMC	1.3 ± 0.3 ( 97 %) *	DMSO (1751 mM) + 4-NQO	1.0 ± 0.2 (100 %) *
25.0	DMSO (3502 mM) + MMC	1.6 ± 0.6 ( 93 %) *	DMSO (3502 mM) + 4-NQO	0.9 ± 0.3 (100 %) *
50.0	DMSO (7004 mM) + MMC	1.3 ± 0.2 ( 97 %) *	DMSO (7004 mM) + 4-NQO	0.8 ± 0.2 (100 %) *
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	5.9 ± 1.0	4-NQO (2,34 µmol/ml)	14.0 ± 2.6
0.19	Etanol (33 mM) + MMC	5.9 ± 1.2 ( 0 %) n.s.	Etanol (33 mM) + 4-NQO	15.5 ± 2.9 ( 0 %) n.s.
0.39	Etanol (67 mM) + MMC	5.9 ± 0.9 ( 0 %) n.s.	Etanol (67 mM) + 4-NQO	14.6 ± 2.8 ( 0 %) n.s.
0.78	Etanol (133 mM) + MMC	6.4 ± 0.8 ( 0 %) n.s.	Etanol (133 mM) + 4-NQO	16.2 ± 6.2 ( 0 %) n.s.
1.56	Etanol (266 mM) + MMC	6.5 ± 1.1 ( 0 %) n.s.	Etanol (266 mM) + 4-NQO	11.7 ± 3.7 ( 18 %) n.s.
3.12	Etanol (532 mM) + MMC	1.8 ± 0.7 ( 84 %) *	Etanol (532 mM) + 4-NQO	6.8 ± 1.7 ( 55 %) *
6.25	Etanol (1065 mM) + MMC	1.4 ± 0.5 ( 93 %) *	Etanol (1065 mM) + 4-NQO	1.0 ± 0.3 (100 %) *
12.5	Etanol (2130 mM) + MMC	1.2 ± 0.5 ( 96 %) *	Etanol (2130 mM) + 4-NQO	1.0 ± 0.1 (100 %) *
25.0	Etanol (4260 mM) + MMC	1.1 ± 0.6 ( 98 %) *	Etanol (4260 mM) + 4-NQO	0.9 ± 0.5 (100 %) *
50.0	Etanol (8520 mM) + MMC	0.6 ± 0.2 (100 %) *	Etanol (8520 mM) + 4-NQO	0.8 ± 0.3 (100 %) *
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	8.2 ± 2.1	4-NQO (2,34 µmol/ml)	13.3 ± 1.1
0.19	Eter (19 mM) + MMC	8.4 ± 1.0 ( 0 %) n.s.	Eter (19 mM) + 4-NQO	16.5 ± 4.6 ( 0 %) n.s.
0.39	Eter (37 mM) + MMC	8.4 ± 1.1 ( 0 %) n.s.	Eter (37 mM) + 4-NQO	13.5 ± 2.8 ( 0 %) n.s.
0.78	Eter (75 mM) + MMC	8.5 ± 0.9 ( 0 %) n.s.	Eter (75 mM) + 4-NQO	18.4 ± 4.3 ( 0 %) n.s.
1.56	Eter (150 mM) + MMC	8.3 ± 1.6 ( 0 %) n.s.	Eter (150 mM) + 4-NQO	17.3 ± 2.4 ( 0 %) n.s.
3.12	Eter (300 mM) + MMC	8.4 ± 1.5 ( 0 %) n.s.	Eter (300 mM) + 4-NQO	14.2 ± 2.2 ( 0 %) n.s.
6.25	Eter (600 mM) + MMC	5.9 ± 1.6 ( 32 %) n.s.	Eter (600 mM) + 4-NQO	9.1 ± 1.3 ( 34 %) *
12.5	Eter (1200 mM) + MMC	2.8 ± 1.0 ( 75 %) *	Eter (1200 mM) + 4-NQO	1.3 ± 0.2 ( 98 %) *
25.0	Eter (2400 mM) + MMC	1.7 ± 0.5 ( 90 %) *	Eter (2400 mM) + 4-NQO	1.2 ± 0.2 ( 99 %) *
50.0	Eter (4800 mM) + MMC	1.6 ± 0.3 ( 92 %) *	Eter (4800 mM) + 4-NQO	1.3 ± 0.3 ( 98 %) *

	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	6.9 ± 1.9	4-NQO (2,34 µmol/ml)	10.8 ± 1.2
0.19	Metanol (45 mM) + MMC	7.8 ± 1.0 ( 0 %) n.s.	Metanol (45 mM) + 4-NQO	14.0 ± 2.7 ( 0 %) n.s.
0.39	Metanol (90 mM) + MMC	7.8 ± 0.7 ( 0 %) n.s.	Metanol (90 mM) + 4-NQO	15.6 ± 4.8 ( 0 %) n.s.
0.78	Metanol (190 mM) + MMC	7.6 ± 1.2 ( 0 %) n.s.	Metanol (190 mM) + 4-NQO	16.3 ± 2.7 ( 0 %) n.s.
1.56	Metanol (380 mM) + MMC	6.6 ± 1.0 ( 6 %) n.s.	Metanol (380 mM) + 4-NQO	15.0 ± 5.2 ( 0 %) n.s.
3.12	Metanol (770 mM) + MMC	5.4 ± 0.8 ( 25 %) n.s.	Metanol (770 mM) + 4-NQO	11.0 ± 2.6 ( 0 %) n.s.
6.25	Metanol (1540 mM) + MMC	1.2 ± 0.3 ( 97 %) *	Metanol (1540 mM) + 4-NQO	1.7 ± 0.5 ( 93 %) *
12.5	Metanol (3080 mM) + MMC	0.7 ± 0.4 (100 %) *	Metanol (3080 mM) + 4-NQO	1.3 ± 0.2 ( 97 %) *
25.0	Metanol (6170 mM) + MMC	0.6 ± 0.3 (100 %) *	Metanol (6170 mM) + 4-NQO	1.2 ± 0.3 ( 99 %) *
50.0	Metanol (12330 mM) + MMC	0.5 ± 0.2 (100 %) *	Metanol (12330 mM) + 4-NQO	0.7 ± 0.1 (100 %) *
	Agua destilada	1.0 ± 0.1	Agua destilada	1.0 ± 0.1
	MMC (0,625 µg/ml)	6.6 ± 0.9	4-NQO (2,34 µmol/ml)	10.7 ± 1.2
0.19	Tetracloruro de carbono (20 mM) + MMC	5.9 ± 1.0 ( 11 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (20 mM) + 4-NQO	19.9 ± 6.2 ( 0 %) n.s.
0.39	Tetracloruro de carbono (40 mM) + MMC	6.0 ± 0.7 ( 11 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (40 mM) + 4-NQO	11.0 ± 2.1 ( 0 %) n.s.
0.78	Tetracloruro de carbono (81 mM) + MMC	6.0 ± 0.5 ( 11 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (81 mM) + 4-NQO	20.3 ± 6.4 ( 0 %) n.s.
1.56	Tetracloruro de carbono (161 mM) + MMC	5.3 ± 1.2 ( 23 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (161 mM) + 4-NQO	17.6 ± 5.8 ( 0 %) n.s.
3.12	Tetracloruro de carbono (322 mM) + MMC	5.1 ± 1.3 ( 27 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (322 mM) + 4-NQO	15.4 ± 5.2 ( 0 %) n.s.
6.25	Tetracloruro de carbono (645 mM) + MMC	4.7 ± 2.8 ( 34 %) n.s.	Tetracloruro de carbono (645 mM) + 4-NQO	13.7 ± 7.1 ( 0 %) n.s.
12.5	Tetracloruro de carbono (1289 mM) + MMC	4.0 ± 2.0 ( 47 %) *	Tetracloruro de carbono (1289 mM) + 4-NQO	2.0 ± 1.7 ( 90 %) *
25.0	Tetracloruro de carbono (2579 mM) + MMC	1.0 ± 0.1 (100 %) *	Tetracloruro de carbono (2579 mM) + 4-NQO	0.9 ± 0.2 (100 %) *
50.0	Tetracloruro de carbono (5158 mM) + MMC	2.2 ± 0.6 ( 80 %) *	Tetracloruro de carbono (5158 mM) + 4-NQO	2.3 ± 0.8 ( 87 %) *

**C (%):** Concentración del solvente calculado a partir del porcentaje de pureza de cada solvente como se expresa en la tabla 4. Promedio del valor I calculado a partir de un mínimo de tres experimentos con cuatro replicas cada uno y su correspondiente error estándar. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) fue calculado como se indica en materiales y métodos. \* Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control positivo fue encontrada usando una prueba de t-Student. **n.s.**, no se encontró diferencia significativa.

### **3.4 EFECTO DE LA MODULACIÓN POR SOLVENTES SOBRE LOS ESTIMADOS DE ANTIGENOTOXICIDAD**

Bajo la hipótesis de que la modulación de la mutagenicidad por solventes puede interferir significativamente con la actividad antimutagénica cuando el SOS chromotest es usado para estos fines y con el objetivo de conocer si este fenómeno puede afectar las estimaciones de antimutagénesis; en el presente estudio se ensayó la antigenotoxicidad de la vitamina E, un antimutágeno estandar, bajo condiciones en las que la acetona, el diclorometano y el metanol modulan y no modulan la actividad mutagénica de la 4-NQO. Estos solventes fueron seleccionados ya que no mostraron efecto inhibitorio de la síntesis de proteínas en células de *E. coli* cepa PQ37.

En este ensayo se consideró como concentración permisiva aquella dosis del solvente que no modula de manera significativa el efecto genotóxico de la 4-NQO y como concentración no permisiva aquellas dosis ( aquí 25%) del solvente que modulan significativamente el efecto genotóxico del mutágeno, los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 9.

Al comparar el tratamiento A (vitamina E disuelta en agua destilada), con los tratamientos B (vitamina E disuelta en el solvente a concentración permisiva) y C (vitamina E disuelta en el solvente a concentración no permisiva), se evidencia para estos dos últimos tratamientos un efecto sinérgico sobre los estimados de antigenotoxicidad de la vitamina E. Contrariamente a lo esperado, las dosis permisivas de los solventes también mostraron un efecto sinérgico sobre la antigenotoxicidad de la vitamina E. Esto nos indica, que el uso de solventes orgánicos puede conducir a sobreestimados de antigenotoxicidad cuando usamos el ensayo SOS Chromotest.

**Tabla 9. Efecto de los solventes sobre la antigenotoxicidad de la vitamina E contra el daño inducido por la 4-nitroquinolina-1-oxido (4-NQO) en células de *E. coli* PQ37.**

	Factor de Inducción SOS (%IG)		
	A	B	C
<i>Acetona</i>			
Agua destilada	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
4-NQO (2,34 µM/ml)	15.5 ± 4.8	14.3 ± 1.8	18.6 ± 6.9
Vitamina E (0.016 mM)	16.6 ± 3.7 (0 %) n.s.	4.7 ± 1.9 (72.7 %) *	0.6 ± 0.2 (100 %) *
Vitamina E (0.031 mM)	16.5 ± 4.9 (0 %) n.s.	4.6 ± 0.4 (73.7 %) *	0.6 ± 0.0 (100 %) *
Vitamina E (0.062 mM)	16.2 ± 4.9 (0 %) n.s.	3.3 ± 1.2 (83.5 %) *	0.6 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (0.125 mM)	9.1 ± 2.6 (12.9 %) *	0.9 ± 0.1 (100 %) *	0.8 ± 0.6 (100 %) *
Vitamina E (0.250 mM)	3.3 ± 1.1 (55.7 %) *	0.3 ± 0.1 (100 %) *	0.4 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (0.500 mM)	0.3 ± 0.1 (99.3 %) *	0.2 ± 0.1 (100 %) *	0.2 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (1.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.3 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (2.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.7 ± 0.3 (100 %) *
<i>Diclorometano</i>			
Agua destilada	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1
4-NQO (2,34 µM/ml)	15.5 ± 4.8	11.1 ± 2.7	17.5 ± 3.9
Vitamina E (0.016 mM)	16.6 ± 3.7 (0 %) n.s.	4.6 ± 1.8 (64.6 %) *	0.9 ± 0.2 (99.1 %) *
Vitamina E (0.031 mM)	16.5 ± 4.9 (0 %) n.s.	3.2 ± 1.3 (77.9 %) *	0.7 ± 0.1 (97.0 %) *
Vitamina E (0.062 mM)	16.2 ± 4.9 (0 %) n.s.	3.7 ± 1.3 (73.2 %) *	0.9 ± 0.3 (97.6 %) *
Vitamina E (0.125 mM)	9.1 ± 2.6 (12.9 %) *	1.4 ± 0.2 (95.7 %) *	1.0 ± 0.3 (97.8 %) *
Vitamina E (0.250 mM)	3.3 ± 1.1 (55.7 %) *	0.4 ± 0.1 (100 %) *	1.3 ± 0.5 (100 %) *
Vitamina E (0.500 mM)	0.3 ± 0.1 (99.3 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	1.4 ± 0.4 (100 %) *
Vitamina E (1.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	1.5 ± 0.3 (100 %) *
Vitamina E (2.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	1.2 ± 0.3 (100 %) *
<i>Metanol</i>			
Agua destilada	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2
4-NQO (2,34 µM/ml)	15.5 ± 4.8	14.3 ± 1.4	13.4 ± 2.1
Vitamina E (0.016 mM)	16.6 ± 3.7 (0 %) n.s.	2.0 ± 0.5 (92.6 %) *	0.4 ± 0.0 (100 %) *
Vitamina E (0.031 mM)	16.5 ± 4.9 (0 %) n.s.	2.2 ± 1.0 (90.7 %) *	0.2 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (0.062 mM)	16.2 ± 4.9 (0 %) n.s.	1.4 ± 0.2 (97.0 %) *	0.2 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (0.125 mM)	9.1 ± 2.6 (12.9 %) *	0.9 ± 0.2 (100 %) *	0.2 ± 0.0 (100 %) *
Vitamina E (0.250 mM)	3.3 ± 1.1 (55.7 %) *	0.3 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *
Vitamina E (0.500 mM)	0.3 ± 0.1 (99.3 %) *	0.2 ± 0.0 (100 %) *	0.2 ± 0.1 (100 %) *
Vitamina E (1.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.0 (100 %) *	1.1 ± 0.1 (99.5 %) *
Vitamina E (2.000 mM)	0.1 ± 0.0 (100 %) *	0.1 ± 0.1 (100 %) *	1.2 ± 0.1 (98.7 %) *

**A, B, C:** La vitamina E fue disuelta en agua, solvente a concentración permisiva y solvente a concentración no permisiva, respectivamente. Se presenta el valor medio del factor de inducción SOS (I) calculado a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno y su correspondiente error estándar. Porcentaje de inhibición de la genotoxicidad (%IG) fue calculado como se indica en materiales y métodos. \*reducción significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control positivo fue encontrada usando una prueba de t-Student. n.s., no se encontró diferencia significativa.

## 4. DISCUSIÓN

Este estudio se enfoca en factores que pueden afectar los resultados durante estudios de antimutagenicidad con el ensayo SOS Chromotest. Tres temas fueron abordados: i) toxicidad y genotoxicidad de los solventes, ii) modulación de la mutagenicidad por solventes y iii) modulación por solventes de la antigenotoxicidad.

Los solventes estudiados no fueron genotóxicos, en concordancia con estudios previos en los que usaron el SOS Chromotest (Von der Hude *et al.*, 1988, Quillardet and Hofnung 1993, Mersch-Sundermann *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos solventes como el tetracloruro de carbono, el DMSO, el etanol y el éter, fueron tóxicos para la célula bacteriana en las dosis más altas, lo que se evidenció por medio de los datos de inhibición de la actividad enzimática constitutiva, fosfatasa alcalina. El procedimiento estándar del SOS Chromotest (Quillardet y Hofnung 1985) utiliza cantidades máximas de solventes como DMSO y etanol de 20  $\mu\text{L}$ /ensayo (600 $\mu\text{L}$  de células), lo que es equivalente al 3.3% del solvente en la mezcla final. Si comparamos esta dosis con las presentadas en la Tabla 7, se puede ver que ambos solventes son tóxicos para la cepa PQ37 a la dosis de 3.12%. Ya que se conoce muy poco (o nada) acerca de la toxicidad de los solventes en el SOS Chromotest, los datos reportados en la Tabla 7 resultan útiles para establecer condiciones no-limitantes durante el “*screening*” de antimutágenos naturales.

La modulación por solventes de la mutagénesis química ha sido bien documentada en la literatura (Tabla 4). Usando el SOS Chromotest, se ha demostrado que algunos solventes como el DMSO, el etanol, el metanol y el propanol, pueden interferir con la genotoxicidad de diferentes mutágenos químicos

(Gebel & Koenig 1999, Eder and Deininger 2000, 2002). El presente trabajo ha demostrado que varios de estos solventes, y otros no estudiados previamente, reducen significativamente la genotoxicidad inducida por la MMC y la 4-NQO a dosis altas; dosis a las cuales algunos de estos solventes (DMS, etanol, éter y tetracloruro de carbono) son además tóxicos para la célula. Estos hallazgos, pueden ser limitantes para usar el SOS Chromotest durante “*screening*” antimutagénico de sustancias biológicas, si estas sustancias son miscibles solo en solventes orgánicos. Bajo estas condiciones, los ensayos pueden conducir a sobreestimados de antimutagénesis de los extractos biológicos o de los compuestos como se evidenció con los datos presentados en la Tabla 9.

Los resultados también muestran la antigenotoxicidad de la vitamina E a condiciones en las que los solventes interfieren y no interfieren con la actividad mutagénica, sugiriendo que el efecto sinérgico entre los solventes y antimutágenos puede ocurrir aun a dosis muy bajas del solvente. Adicionalmente, algunos solventes (acetona, diclorometano, y metanol) a bajas dosis pueden operar con efectos sinérgicos o aditivos en la actividad mutagénica, lo que podría sobreestimar las propiedades antigenotóxicas de las sustancias probadas. Así el presente trabajo soporta la necesidad de establecer las dosis a las que los solventes no interfieren con la actividad mutagénica, puesto que en las interacciones mutágeno-solvente ciertos solventes pueden afectar el potencial mutagénico. Además, se llama la atención sobre la necesidad de establecer las dosis que no afectan los estimados de antigenotoxicidad cuando usamos el SOS Chromotest para “*screening*” de antimutágenos. También es evidente la necesidad de dilucidar los mecanismos por los cuales se dan estas interacciones.

## 5. CONCLUSIONES

- Las cinéticas de inducción del gen *sulA* en células de *E. coli* cepa PQ37 frente a los mutágenos de referencia MMC y 4-NQO son dependientes de la dosis, mostrando máximos niveles de inducción para las dosis 0.6 µg/ml y 2.3 µM/ml, respectivamente.
- Aunque los solventes estudiados no fueron genotóxicos para la cepa *E. coli* PQ37, algunos de ellos (tetracloruro de carbono, DMSO, etanol y éter) inhiben la actividad fosfatasa alcalina sugiriendo que afectan la síntesis celular de proteínas dependiendo de su concentración final en el ensayo.
- Solventes orgánicos como los aquí estudiados modulan la genotoxicidad y antigenotoxicidad detectada con el SOS Chromotest de forma dosis dependiente; y esta actividad moduladora puede claramente conducir a sobreestimados de la antigenotoxicidad durante estudios de antimutágenos naturales con este ensayo.

## **6. RECOMENDACIONES**

Las conclusiones anteriores evidencian la necesidad de una adecuada escogencia del solvente usado para disolver compuestos que serán ensayados con el SOS Chromotest; dado el potencial que estos presentan para modular la mutagénesis.

Es necesario realizar otros estudios donde se investiguen las interacciones entre mutágeno-solvente-antimutágeno con el fin de establecer las condiciones adecuadas para estudios de antimutágenos naturales y conocer los mecanismos moleculares de dicha interacción.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdelwahed A., Bouhlel I., Skandrani I., Valenti K., Kadri M., Guiraud P., Steiman R., Mariotte A-M., Ghedira K., Laporte F., Dijoux-Franca M-G., Chekir-Ghedira L. 2007. Study of anyimutagenis and antioxidant activities of Gallic acid and 1,2,3,4,5,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions* 165, 1-3.
- Ames B N. 2001. DNA damage from micronutient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research* 475, 7-20.
- Ammar R. B., Bouhlel I., Valenti K., Sghaier M. B., Kilani S., Mariotte A-M., Dijoux-Franca M-G., Laporte F., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2007. Transcriptional response of genes involved in cell defense system in human cells stressed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and pre-treated with (Tunisian) *Rhamnus alaternus* extracts: Combination with polyphenolic compounds and classic *in vitro* assays. *Chemico-Biological Interactions* 168, 171-183.
- Ammar R. B., Sghaier M. B., Boubaker J., Bhourri W., Naffeti A., Skandrani I., Bouhlel I., Kilani S., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2008. Antioxidant activity and inhibition of aflotoxin B<sub>1</sub>-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extrtacts from *Rhamnus alaternus* L. *Chemico Biological Interactions* 174, 1-10.
- Anderson D., McGregor D. B. 1980. The effect of solvents upon the yield of revertants in the Salmonella/activation mutagenicity assay. *Carcinogenesis* 1,363-366

- Arimoto S., Nakano N., Ohara Y., Tanaka K., Hayatsu H. 1982. A solvent effect on the mutagenicity of tryptophan-pyrollysate mutagens in the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutation research* 102, 105-112.
- Balunas M.J., Kinghorn A. D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78, 431-441.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Simonetti R G, Gluud C. 2004 Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 364, 1219-1228.
- Bouhlel I., Mansour H. B., Limem I., Sghaier M. B., Mahmoud A., Chibani J. B., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2007. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 56-63.
- Burnett C., Funchs C., Corbett J. Menkart J. 1982. The effect of dimethylsulfoxide on the mutagenicity of the hair dye *p*-phenylenediamine. *Mutation Research Letters* 103:1, 1-4.
- Caldini G., trotta F., Cenci G. 2002. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains. *Research in Microbiology* 153, 165-171.
- Caldini G., Trotta F., Corsetti A., Cenci G. 2008. Evidence for in vitro anti-genotoxicity of cheese non-starter lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 51-59.
- Cenci G., Rossi J., Trotta F., Caldini G. 2002. Lactic acid bacteria isolated from dairy products inhibit getotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-Chromotest. *Systematic and Applied Mricobiology* 25, 483-490.

- Clarke C. H., Shankel D. M. 1975. Antimutagenesis in Microbial Systems. Bacteriological Reviews 39,33-53.
- Dashwood R H. 2002. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an “A-yo-Z” guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. Mutation research 511, 89-112.
- De Flora S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutation research 402, 151-158.
- De Flora S., Bronzetti G., Sobels F. H. 1992a. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. Mutation Research 267, 153-155.
- De Flora S., Camoirano A., D’Agostino F., Balansky R. 1992b. Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. Mutation Research 267, 183-192.
- De Flora S, Ferguson L R. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. Mutation research 591, 8-15.
- De Flora S., Ramel C. 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasification and overview. Mutation Research 202, 285-306.
- DeMarini D. M., Lawrence B. K., Brooks H. G., Houk V. S. 1991. Compatibility of organic solvents with the microscreen prophage-induction assay: solvent-mutagen interactions. Mutation research 263, 107-113.
- Eder E., Deininger C. 2000. The role of alcohols as solvents in the genotoxicity testing of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones in the SOS chromotest. Mutation research 470, 29-37.

- Eder E., Deininger C. 2002. The influence of the solvent DMSO and ethanol on the genotoxicity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes in the SOS chromotest. *Mutation research* 516, 81-89.
- Fang W., Lu J., Ai-Ping L., Xing-Hua G., Fa-Zheng F. 2008. Analysis of Antigenotoxicity of *Lactobacillus Salivarius* by High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 36:6, 740-744.
- Fortes-Aiub C. A., Ribero-Pinto L. F., Felzenszwalb I. 2009. DNA-repair genes and vitamin E in the prevention of N-nitrosodiethylamine mutagenicity. *Cell Biology and Toxicology* 25, 393-402.
- Fuentes J.L, Vernhe M., Cuetara E.B., Sánchez-Lamar A., Santana J.L., Llagostera M. 2006a. Tannins from Barks of *Pinus caribaea* Morelet Protect *Escherichia coli* Cells Against DNA Damage Induced by  $\gamma$ -Rays. *Fitoterapia* 77, 116-120.
- Fuentes J L, Alonso A, Cuétara E, Vernhe M, Alvarez N, Sánchez-Lamar A, Llagostera M. 2006b. Usefulness of SOS Chromotest in the study of medicinal plant as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology* 82, 323-329.
- Gajewska J., Szczyпка M., Tudek B., Szymczyk. 1990. Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans: nitrofurazone and furazolidone. *Mutation research* 232, 191-197.
- Gebel T., Koenig A. 1999. Impact of dimethyl sulfoxide and examples of combined genotoxicity in the SOS chromotest, *Mutation research* 444, 405-411.

- Gentile J. M., Gentile G., Lohman P.H.M., Ferguson L.R. 2001. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. *Mutation Research* 480-481, 1-7.
- Greenwald P. 2002. Science, medicine and the future Cancer chemioprevention. *Clinical review* 324, 714-718.
- Han Y-H., Ham J-H., Lee N-J., Park C-H., Shin Y-H., Lee D-U. 2000. Antimutagenic Activity of 5 $\alpha$ -Cholest-7-en-3 $\beta$ -ol, a New Component from the Starfish *Asterina pectinifera*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23, 1247-1249.
- Harvey J. S., Parry J.M. 1998. The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilu edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutation research* 399, 31-42.
- Hayder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ammar R. B., Mahmoud A., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2004. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation research* 564, 89-95.
- Hayder N., Bouhleb I., Skandrani I., Kadri M., Steiman R., Guiraud P., Mariotte A-M., Ghedira K., Dijoux-Franca M-G., Chekir-Ghedira L. 2008. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in Vitro* 22, 567-581.
- Hermann M. Bedouelles H., Hofnung M. 1978. Influence of solvents in the Salmonella microsome assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 53: 2, 198-199.

- Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. 2006. The role of phytochemicals inhibition cancer and inflammation: New directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 405-419.
- Junior A. C. T. S., Asad L. M. B. O. Oliveira E. B., Kovary K., Asad N. R., Felzenszwalb I. 2005. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. *Genetics and Molecular Research* 4:1, 94-99.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research* 488, 65-76.
- Kada T., Shimoi K. 1987. Desmutagens and Bio-antimutagens – Their modes of action. *BioEssays* 7:3, 113-116.
- Kilani S., Bouhlel I., Ben R., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. 2005. 'Evaluation of the antimutagenic and antiradical potentials of extracts from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus*'. *Toxicological & Environmental Chemistry* 87:3, 415–425.
- Kuroda Y., Inoue T. 1988. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutation research* 202, 387-391.
- Laval J, Jurado J, Saporbaev M, Sidorkina O. 1998. Antimutagenic role of base excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutation Research* 402, 93-102.

- Lee N-J., Choi J-H., Koo B-S., Ryu S-Y., Han Y-H., Lee S-I1., Lee D-U. Antimutagenicity and Cytotoxicity of the Constituents from the Aerial Parts of *Rumex acetosa*. 2005. Biological & pharmaceutical Bulletin 28:11, 2158-2161.
- Lim J-C., Park J. H., Budesinsky M., Kasal A., Han Y-H., Koo B-S., Lee S-I1., Lee D-U. 2005. Antimutagenic Constituents from the Thorns of *Gleditsia sinensis*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 53:5, 561-564.
- Lin Y-C., Ho I-C., Lee T-C. 1989. Etanol and acetaldehyde potentiate the clastogenicity of ultraviolet light, methyl methasulfonate, mitomicina C and bleomycin in Chinese hamster ovary cells. Mutation research 216, 93-99.
- Lohman P. H. M., Gentile J. M., Gentile G., Ferguson L. R. 2001. Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. Mutation Research 486, 1-4.
- López M. A., Stashenko E. E., Fuentes J.L. 2010. Chemical composition of the *Lippia alba* essential oils and its antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. Enviado a Enviromental toxicology and pharmacology.
- Maron D., Katzenellenbogen, B J., Ames B. N. 1981. Compatibility of organic solvents with the Salmonella/microsome test. Mutation Research/Genetic Toxicology 88:4, 343-350.
- Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Mochayedi S. 1991. Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay (SOS chromotest). Mutation Research 252, 51-60.

- Mersch-Sundermann V., Schneider U., Klopman G., Rosenkranz H. S., 1994. SOS Induction in *Escherichia coli* and Salmonella Mutagenicity: a Comparison Using 330 Compounds. *Mutagens* 9, 205-224.
- Miertus S., Svorc J., Sturdjk E., Vojtekovii H., 1987. Use of Specific Bacteria for the Determination of Mutagenic and Carcinogenic Compounds. *Analytical Chemistry* 59,504-508.
- Mikulasova M., Kosikova B. 2003. Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivates. *Mutation research* 535, 171-180.
- Morse M. A., Stoner G. D. 1993. Cancer chemoprevention: principles and prospects. *Carcinogenesis* 14:9, 1737–1746.
- Morse M. A., Stoner G. D. 2006. Chemoprevention of chemical carcinogenesis and human cancer. In *Molecular Carcinogenesis*. Charper 21, Taylor & Francis Group, LLC (Ed). p 445-478.
- Nair P.P., Davis K. E., Shami S. Lagerholm S. 2000. The induction of SOS function in *Escherichia coli* K-12/PQ37 by 4-nitroquinoline oxide (4-NQO) and fecapentaenes-12 and -14 is bile salt sensitive: implications for colon carcinogenesis. *Mutation research* 447, 179-185.
- Nakayama T. 1994. Suppression of Hydroperoxide-induced Cytotoxicity by Polyphenols. *Cancer research* 54, 1991-1993.
- Neffati A., Bouhlel I., Sghaier M. B., Boubaker J., Limem I., Kilani S., Skandrani I., Bhourri W., Le Dauphin J., Barillier D., Mosrati R., Chekir-Ghedira L., Ghedira K. 2009. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthus chloranthus* essential oils. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27, 187-194.

- Nikolic B., Stanojevic J., Mitic D., Vukovic-Gacic B., Knezevic J., Simic D. 2004. Comparative study of the antimutagenic potential of Vitamin E in different *E. coli* strains. *Mutation Research* 564, 31-38.
- Odin A. P. 1997. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutation research* 386, 39-67.
- Ohta T., Nakamura N., Moriya M., Shirasu Y., Kada T., 1984. The SOS-function-Inducing Activity of Chemical Mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 131,101-109.
- Okabayashi T., Yoshimoto A. 1962. Reduction of 4-nitroquinoline 1-oxide by Microorganisms. *Chemical and farmaceutical bulletin* 10:12, 1221-1226.
- Ornstein R.L., Rein R. 1979. Nucleic acid base and carcinogen metabolite specificities during intercalative interactions between DNA and 4-nitroquinoline 1-oxide. *Chemico-Biological Interactions* 27, 291-311.
- Park E J, Pezzuto J M. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21, 231-255.
- Paz M. M., Das A., Tomasz M. 1999. Mitomycin C linked to DNA minor groove binding agents: synthesis, reductive activation, DNA binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7, 2713-2726.
- Peltomäki P. 2001. DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research* 488, 77-85.

- Polasa K., Nadamuni A. N., Krishnaswamy R. 1997. Inhibition of SOS response in *E. coli* PQ37 by heated turmeric and curcumin. *Mutation Research* 379(S1), S206.
- Potenberg J., Von der Hude W., Bauszus M., Basler A., Kahl R. 1988. Enhancement and inhibition of benzo [a]pyrene-induced SOS function in *E.coli* by synthetic antioxidants. *Mutation research* 207, 7-11.
- Quillardet P., Bellecombe C., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Validation Study with 83 Compounds. *Mutation Research* 147, 79-95.
- Quillardet P., Hofnung M., 1985. The SOS Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: procedures. *Mutation research* 147, 65-78.
- Quillardet P., Hofnung M., 1993. The SOS Chromotest: a review. *Mutation research* 297, 235-279.
- Quillardet P, Huisman O, D'ari R, & Hofnung M. 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79, 5971-5975.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola K D. 2003. Natural products for cancer prevention: a Global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 99, 1-13.
- Ryu J-C., Youn J-Y., Kim Y-J., Kwon O-S., Song Y-S., Kim H-T., Cho K-H., Chang I-M. 1999. Mutation spectrum of 4-nitroquinoline *N*-oxide in the *lacI* transgenic Big Blue Rat2 cell line. *Mutation research* 445,127-135.

- Sato T., Chikazawa K., Yamamori H., Ose Y., Nagase H., Kito H. 1991. Evaluation of the SOS Chromotest for the detection of antimutagens. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 17, 258-263.
- Serafini M. 2000. Dietary vitamin E and T cell-mediated function in the elderly: effectiveness and mechanism of action. *International Journal of developmental Neuroscience* 18, 401-410.
- Singer B., Grunberger D. 1983. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum, New York.
- Sporn M B, Suh N. 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21:3, 525-530.
- Su H-Y., Cherng S-H., Chen C-C., Lee H. 1995. Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutation research* 329, 205-212.
- Surh Y-J. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research* 428, 305-327.
- Surh Y-J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Reviews* 3,768-780
- Toma M. M., Raipulis J., Kalnina I., Rutkis R. 2005. Does Probiotic Yeast Act as Antigenotoxin?. *Food Technology and Biotechnology*. 43:3, 301–305.
- Tomasz M., Palom Y. 1997. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacology & Therapeutics* 76:1-3, 73-87.

- Uno Y., Morita M. 1993. Mutagenic activity of some activity of some platinum and palladium complexes. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 298:4, 269-275.
- Vicuña G. C., Stashenko E. E., Fuentes J. L. 2010. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.10.008.
- Von der Hude W., Behm C., Gürtler R., Basler A., 1988. Evaluation of the SOS Chromotest. *Mutation Research* 203,81-94.
- Weisburger J. H. 2001. Antimutagenesis and anticarcinogenesis, from the past to the future. *Mutation Research* 480-481, 23-35.
- White P.A., Rasmussen J.B., 1996. SOS Chromotest Results in a Broader Context: Empirical Relationships Between Genotoxic Potency, Mutagenic Potency, and Carcinogenic Potency. *Environmental and Molecular Mutagénesis*, 27, 270-305.
- Williams G. M. 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to Human cancer risk assessment. *Toxicology* 166, 3-10.
- Yahagi T., Nagao M., Seino Y., Matsushima T., Sugimura T., Okada M. 1977. Mutagenicities of N-nitrosamines on salmonella. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 48:2, 121-129.

- Zimmermann F. K., Rohlfs A. 1991. The influence of solvent stress on MMS-induced genetic change in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutation research 250, 239-249.