

## INHIBIDORES DE LA NITROSACIÓN ENDÓGENA

Patricia Ramirez Victoria

### RESUMEN

Los compuestos nitrosos (CN) comprenden a las nitrosaminas y nitrosamidas que se producen por la nitrosación de aminas y alquilamidas secundarias respectivamente. Muchos de los CN inducen cáncer en animales de laboratorio y están involucrados en la etiología de diferentes tipos de cáncer en humanos. La exposición a los CN es principalmente a través de la comida, del hábito de fumar o masticar tabaco y por su formación *in vivo* llevada a cabo en el estómago. La nitrosación endógena se puede producir por dos tipos de reacciones: la reacción catalizada por ácidos y la reacción mediada por bacterias. Muchas sustancias químicas así como constituyentes de la dieta como las vitaminas, polifenoles y mezclas complejas como los jugos de frutas y verduras pueden inhibir la reacción de nitrosación a través de distintos mecanismos. Este artículo revisará brevemente algunos de estos inhibidores.

**Palabras Clave:** Nitrosación endógena, antimutagénesis, inhibidores, mutágenos, carcinógenos.

### Endogenous nitrosation inhibitors

### ABSTRACT

Nitroso compounds (NOC) comprise nitrosamines and nitrosamides, produced by the nitrosation of secondary amines and alkylamides, respectively. Most NOC induce cancer in laboratory animals and are involved in the etiology of several human cancers. People are exposed to NOC mainly in foods, by smoking or chewing tobacco products, and by the *in vivo* formation of NOC in the stomach. Endogenous nitrosation can occur via two major routes, namely the acid/catalyzed reaction and the bacterially mediated reaction. Many chemical substances and dietary constituents, such as vitamins, polyphenols and complex mixtures as fruit and vegetables juices may inhibit the nitrosation reaction through several mechanisms. This paper will review briefly some of these inhibitors.

**Key Words:** Endogenous nitrosation, antimutagenesis, inhibitors, mutagens, carcinogens.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 29 DE ABRIL DEL 2003 Y ACEPTADO EL 20 DE OCTUBRE DEL 2003.

### INTRODUCCIÓN

La nitrosación es un proceso por el cual especies nitrosantes como el trióxido de nitrógeno ( $N_2O_3$ ) o el tetraóxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ) interactúan con aminas primarias, secundarias o terciarias así como con amidas secundarias para dar como resultado compuestos nitroso<sup>1</sup>. Sus efectos tóxicos, carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, así como su metabolismo han sido estudiados extensamente demostrando el papel que juegan en la etiología de diversos tipos de cáncer<sup>2</sup>.

### COMPUESTOS N-NITROSO Nitrosaminas y nitrosamidas

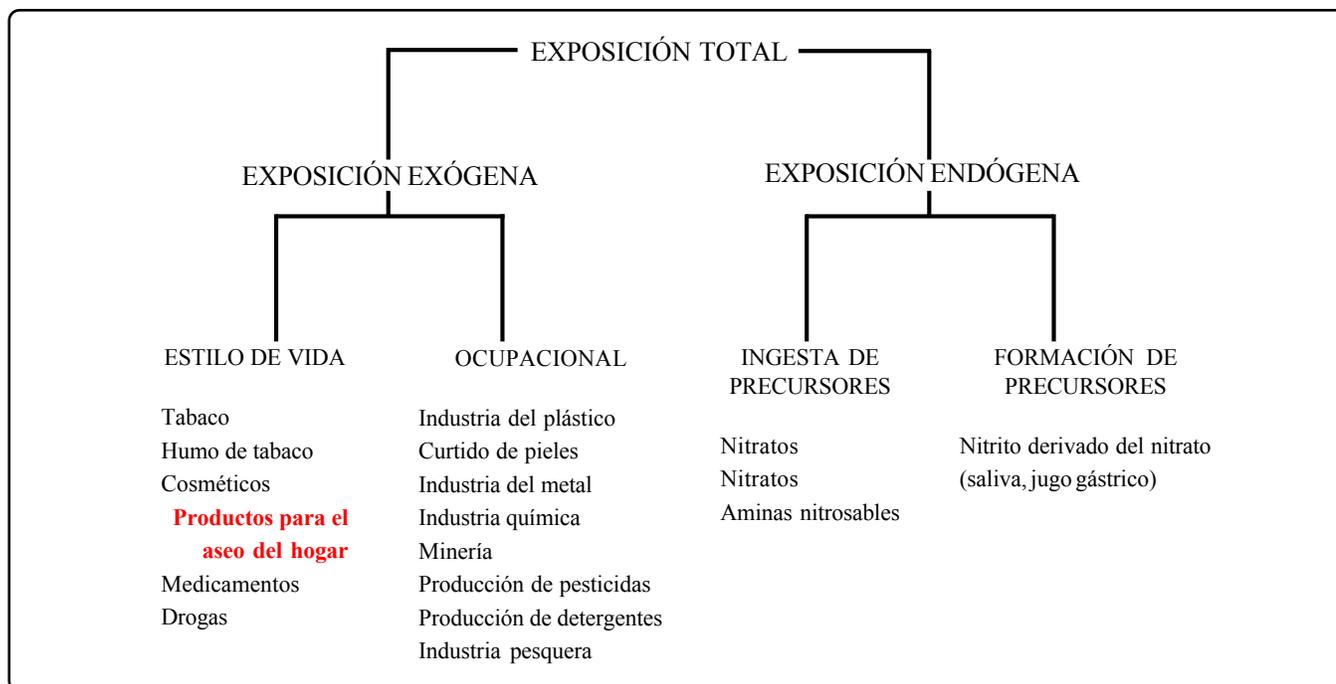
Los compuestos nitroso se dividen en nitrosaminas ( $R_1NNOR_2$ ) -originadas por la reacción del nitrito con aminas secundarias-, y nitrosamidas ( $R_1NNO.COR_2$ ) producidas por la reacción con amidas, ureas, carbamatos y guanidinas. Las primeras, son químicamente estables bajo condiciones fisiológicas y ejercen

sus efectos adversos después de su activación metabólica catalizada por oxidasas de función mixta. Las nitrosamidas por su parte, son inestables a pH fisiológico y actúan de manera directa, no necesitan activación metabólica para reaccionar como derivados alquilantes. Esta diferencia está correlacionada a la tendencia de las nitrosamidas a producir tumores en el órgano o tejido en el que se originan, mientras que las nitrosaminas pueden iniciar tumores en sitios distantes<sup>3</sup>.

### Incidencia y exposición

La exposición a los compuestos nitroso suele ser a través de dos vías: (a) exposición exógena.-sucede por la ingesta de estos compuestos, preformados en el ambiente. Se puede subdividir en dos tipos, exposición de acuerdo al "estilo de vida" y exposición "ocupacional". La segunda vía, (b) se da mediante la exposición endógena.-resultante de la formación *in vivo* de los CN a través de aminas nitrosables y agentes nitrosantes<sup>3</sup>. La Figura 1 muestra las principales fuentes de exposición a estos compuestos.

## VERTIENTES



**Figura 1. Principales fuentes de exposición a compuestos nitroso.**

### Metabolismo

El primer paso en el metabolismo de las nitrosaminas es la hidroxilación del carbono  $\alpha$  produciendo  $\alpha$ -hidroxinitrosaminas. Estos metabolitos se descomponen espontáneamente para dar sucesivamente monoalquilnitrosaminas, alquildiazohidroxidos y iones nitrógeno. Los alquildiazohidroxidos pueden alquilar nucleófilos directamente o después de la pérdida de agua para producir a los metabolitos más reactivos, los diazoalcanos. Estos metabolitos alquilan a las bases de ADN, especialmente en las posiciones N-7 y O<sup>6</sup> de la guanina y la O<sup>4</sup> de la timina. Existen estudios que han demostrado que los pares O<sup>6</sup>-alquilguanina con timina producen mutaciones por sustitución de bases G:C6A:T que se cree inician el proceso carcinogénico. Por su parte, el metabolismo de nitrosamidas a intermediarios alquilantes ocurre por la hidrólisis catalizada por bases y varía de acuerdo con el pH<sup>4</sup> (Figura 2).

### Nitrosación endógena y la prueba de la N-nitrosoprolina (NPRO)

La nitrosación endógena puede ocurrir a través de dos mecanismos: (i) reacciones químicas, generadas particularmente por las condiciones ácidas del estómago y (ii) reacciones mediadas por bacterias que involucran a macrófagos y posiblemente células endoteliales. La nitrosación a través de reacciones químicas ha sido considerada como la ruta más importante para la formación endógena de los compuestos nitroso<sup>5</sup>.

La nitrosación gástrica se inicia a partir de la ingestión de los nitratos usados como preservativos en carnes, pescado, embutidos, quesos, productos fermentados y en general en alimentos perecederos. Después de que el nitrato ha sido absorbido por el tracto digestivo se presume que una cuarta

parte del total ingerido es secretado a la saliva por un mecanismo de transportes de aniones en donde aparentemente sólo el 5% del nitrato es reducido a nitrito por bacterias presentes en la cavidad oral. Al tragar la saliva, ésta eleva la concentración de nitrito gástrico presente en condiciones normales de acidez estomacal (120  $\mu\text{g}/\text{lt}$ ) favoreciendo la reacción de nitrosación<sup>6</sup>.

La prueba de nitrosoprolina (NPRO) descrita a continuación es el método que demostró por primera vez la formación de compuestos nitroso a partir de aminas y amidas en el estómago de humanos. La prueba consistió en alimentar a un hombre en ayunas con 325 mg de nitrato y 500 mg L-prolina. Al analizar la orina secretada 24 hrs. después encontraron 160 nmol (23  $\mu\text{g}$ ) de prolina nitrosada que se originó bajo las condiciones ácidas normales del estómago. Ésta fue la primera demostración clara de que los humanos pueden formar CN *in vivo*. La nitrosación de la prolina es un indicador de la formación gástrica de nitrosaminas y de la capacidad nitrosante del estómago, pero no de los niveles gástricos de aminas y amidas. La nitrosación gástrica puede producir nitrosamidas u otros compuestos inestables que actúan directamente en el estómago para iniciar un proceso carcinogénico, o quizá producir CN estables que induzcan cáncer en otros sitios del organismo<sup>7</sup>.

### ANTIMUTAGÉNESIS

La palabra antimutagénesis se ha empleado para referir dos eventos: (i) la inactivación de mutágenos y carcinógenos antes de que puedan reaccionar con el ADN, y (ii) la restauración del ADN después de que ha sido dañado por mutágenos. Antimutágeno es el término para describir a un agente que reduce las mutaciones espontáneas o inducidas no importando el mecanismo involucrado para prevenirlas. Se han dividido en

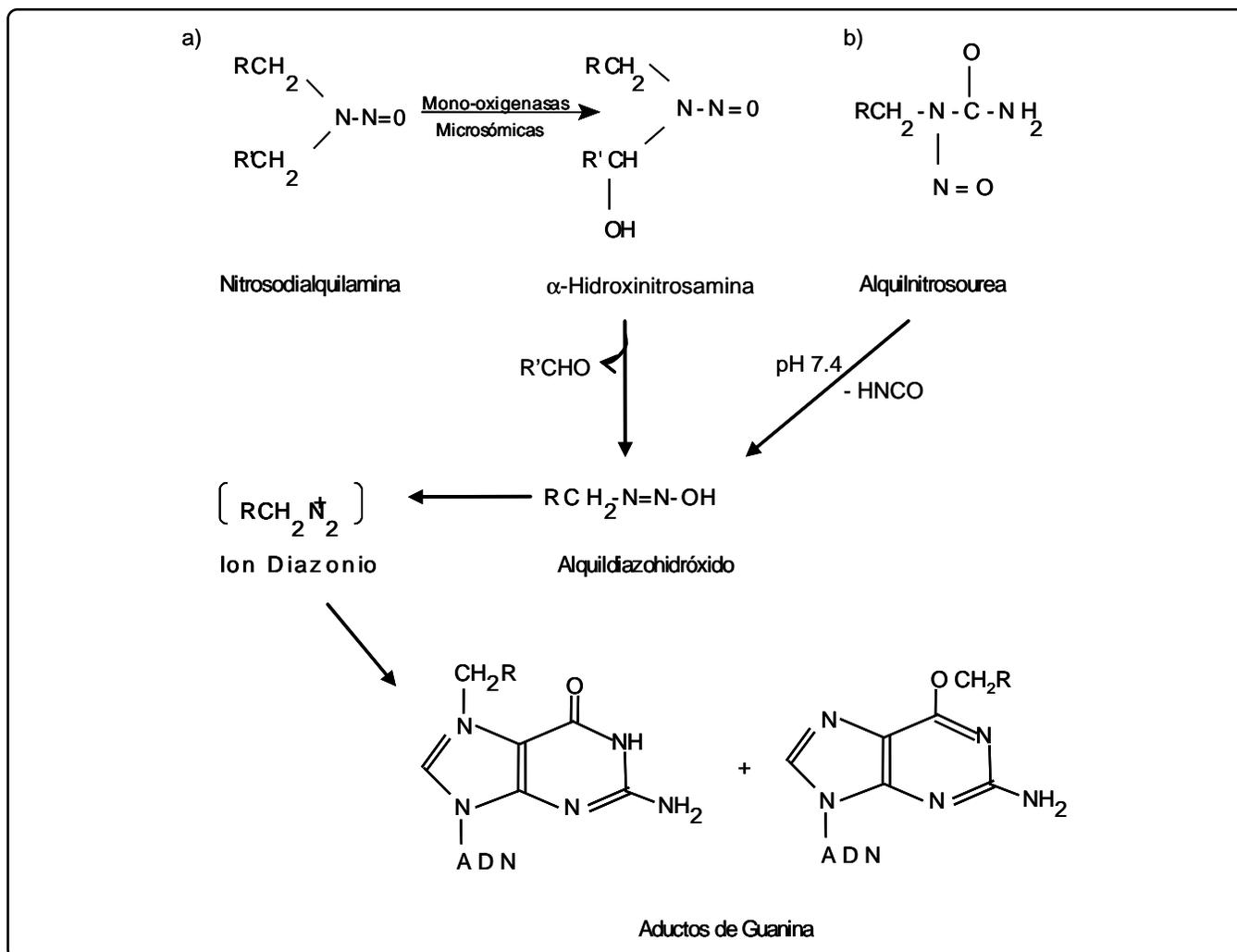


Figura 2. Bioactivación de los compuestos nitroso. a) El primer paso dentro del metabolismo de las nitrosaminas es la hidroxilación del carbón  $\alpha$  a través de las enzimas microsomales del citocromo P450 (sistema de monooxigenasas). Durante este proceso se forma una  $\alpha$ -hidroxinitrosamina, que a su vez se descompone para producir un alquildiazohidróxido que genera finalmente un ion diazonio (estructura en corchetes), que son los intermediarios alquilantes responsables de los efectos biológicos inducidos a las macromoléculas. b) Por su parte, la descomposición de las nitrosamidas a intermediarios alquilantes ocurre por hidrólisis catalizada por bases y varía de acuerdo con el pH. Estos metabolitos alquilan a las bases de ADN especialmente en las posiciones N-7 y O<sup>6</sup> de la guanina y la O<sup>4</sup> de la timina.

3 principales categorías: (i) agentes que inhiben la formación de mutágenos o de sus precursores; (ii) agentes bloqueadores que evitan que mutágenos o sus especies reactivas den en blancos celulares, y (iii) agentes supresores que actúan reparando las lesiones inducidas al ADN. A ésta última categoría se les conoce también como bioantimutágenos y se dividen en: (a) agentes que incrementan la fidelidad de la duplicación del ADN, (b) agentes que promueven la reparación del daño al ADN y (c) inhibidores de la reparación propensa a error<sup>8</sup>.

### INHIBIDORES DE COMPUESTOS NITROSOS

Los antecedentes de que los CN inducen diferentes tipos de cáncer han generado el interés por realizar estudios que evalúen el efecto inhibitorio de compuestos químicos de origen natural o sintético que exhiban propiedades antimutagénicas en contra de mutágenos. Dentro de estos inhibidores se incluyen a las

vitaminas, fenoles, tioles, metales, mezclas complejas y oxidasas de función mixta, entre otros.

#### (1) Vitaminas

*Vitamina C (Vit. C)*. Fue la primera sustancia de origen natural que demostró inhibir la nitrosación de los CN. Esta inhibición es más efectiva para las aminas con una tasa de nitrosación lenta como la dimetilamina (DMA) y para las aminas que se nitrosan a una velocidad moderada como la morfolina (MOR) y piperazina (PIP). En aminas de nitrosación rápida como la metilnilina (MAN) la inhibición es incompleta<sup>9</sup>.

La actividad mutagénica de la nitrosodimetilamina (NDMA), nitrosodietilamina (NDEA) y nitrosomorfolina (NMOR) en cepas TA1530 y TA100 de *S. typhimurium* se redujo en presencia de Vit.C. Contrariamente a lo que se esperaba, las concentraciones

altas de la vitamina (5.8 y 7.4 mM) fueron menos efectivas que la concentración baja (0.1 mM)<sup>10</sup>.

En células del criseto dorado, la Vit.C redujo el número de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) inducidos por la metilnitrosoguanidina (MNNG) cuando ambos compuestos fueron añadidos simultáneamente a las células. Sin embargo, el postratamiento 40 min después de la adición del mutágeno, mostró que la Vit.C no interfirió con la actividad de la MNNG, por el contrario, su efecto fue sinérgico induciendo un mayor número de ICH. Se observó también que si ambas sustancias eran incubadas 30 min previos a su administración, se obtenía una menor cantidad de rupturas de ADN comparada con la cantidad de fragmentos inducidos por la MNNG en la ausencia de la Vit.C<sup>11</sup>.

El ácido ascórbico (AA) como también se le conoce a la vitamina C, demostró inhibir la formación de NPRO en individuos de áreas con alta incidencia en cáncer. Se trataron a los sujetos simultáneamente con AA (45-90 mg) y prolina (PRO) (500 mg). Al cabo de 24 hrs. se observó en la orina recolectada que hubo una reducción de NPRO del 20% al 30% con respecto a los sujetos a los que no se les administró AA. Pretratamientos con 450 mg de AA previo a la administración de la PRO inhibieron 44% la formación de NPRO. Una inhibición mayor (79%) se obtuvo cuando se pretrataron a los sujetos simultáneamente con AA (470 mg) y prolina<sup>12</sup>.

Estudios en *D. melanogaster* demostraron el efecto antimutagénico del AA en contra de dos precursores de la nitrosación, la metil urea y el nitrito de sodio. Dosis de 17 mM de AA produjo una reducción en la frecuencia de mutaciones totales por ala mayor al 50%. Los autores concluyeron que la nitrosación se llevó al cabo en el tracto digestivo de las moscas de la misma manera que sucede en el estómago de mamíferos. Esta fue la primera evidencia de que la reacción de nitrosación *in vivo* se lleva al cabo en un organismo diferente a los mamíferos<sup>13</sup>.

Entre las hipótesis que sugieren los posibles mecanismos de acción del ácido ascórbico como agente inhibidor de la nitrosación están: (i) reducir el nitrito a nitrato, el cual no es un agente nitrosante, por lo tanto, no puede actuar directamente para formar los compuestos nitroso; (ii) destruir los radicales libres ayudando a inhibir el papel de los mutágenos en la promoción del cáncer; (iii) competir con aminos secundarias capturando la mayor cantidad de nitrito disponible, y (iv) prevenir el metabolismo oxidativo de los compuestos probados vía el sistema del citocromo P450, inhibiendo la producción de metabolitos electrofilicos<sup>14</sup>.

**Vitamina E (Vit.E).** Es un término colectivo que comprende 8 diferentes compuestos sintetizados en las plantas. El más efectivo es el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC). Se ha observado que la actividad antimutagénica de la Vit.E hacia la mutagénesis inducida por la MNNG en cepas de *E. coli* depende del estado de la célula. Si las

células están en fase log, el  $\alpha$ -TOC reduce el efecto de la MNNG, pero si las células están en fase estacionaria, no tiene ningún efecto sobre la mutagénesis inducida. Su potencial antimutagénico fue más marcado en la cepa mutada que en la cepa silvestre lo que llevó a los autores a la conclusión de que los efectos antimutagénicos de la Vit.E están conectados a su influencia sobre la función de la polimerasa III<sup>15</sup>.

Por otro lado, la inhibición de los efectos genotóxicos de la NMOR fue detectada en ratas de la cepa Wistar que fueron alimentadas con soluciones de la nitrosamina. Simultáneamente se adicionó a la dieta 100 mg  $\alpha$ -TOC. Al término del experimento se detectó que el inhibidor disminuyó significativamente el número de rompimientos en la cadena de DNA, así como las aberraciones cromosómicas ocasionados por la NMOR. El estudio sugirió que los mecanismos por los cuales el  $\alpha$ -TOC inhibe la formación de los compuestos nitroso son similares a los del ácido ascórbico<sup>16</sup>. Resultados similares se obtuvieron en ensayos con las líneas celulares V79 y Caco-2 (células de carcinoma de colon en humanos) en donde los efectos citotóxicos de la NMOR y MNNG fueron disminuidos por la presencia de la Vit.E, sugiriendo que la actividad antioxidante fue uno de los principales mecanismos de acción<sup>17</sup>.

**Vitamina A (Vit.A).** Es un término no específico para referir a dos familias de diferentes compuestos, uno comprende a varios tipos de vitamina A preformada (ésteres de retinil, retinol y retinal) y la otra incluye a varios tipos de provitamina A encabezados por el  $\beta$ -caroteno. En estudios *in vivo*, la administración oral de retinil palmitato disminuyó la inducción de rompimientos de cadena simple en el ADN provocados por la NDMA<sup>18</sup> así como la inducción de micronúcleos generados por la 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) en hepatocitos de ratas. Por su parte, el  $\beta$ -caroteno ha demostrado bloquear la actividad mutagénica de la nitrosodietilamina (NDEA) disminuyendo el índice de ICH en cultivos de glándulas mamarias de ratones<sup>19</sup>.

También se ha analizado la capacidad quimiopreventiva del ácido retinóico-9-cis (9cRA) en contra de los tumores en ratas generados por la metilnitrosourea (MNU). Observándose que el 9cRA no disminuye significativamente la presencia de tumores. Sin embargo al alternar el tratamiento con melatonina y 9cRA la reducción de tumores fue significativa<sup>20</sup>.

## (2) Compuestos aislados de plantas

**Ácidos fenólicos.** En el ensayo con *S. typhimurium* la actividad antimutagénica de los ácidos caféico, gálico, clorogénico y tánicos hacia la mutagenicidad de MNNG y MNU ha sido demostrada. Los estudios polarográficos y espectrofotométricos revelaron una interacción entre estos CN de acción directa y los fenoles, especialmente cuando estos últimos estuvieron presentes en exceso, sugiriendo que uno de los mecanismos por el cual inhiben la mutagenicidad de los CN es compitiendo por el nitrito disponible en el medio<sup>21</sup>. Sin embargo, hay datos que sugieren que la inhibición de la MNU por el ácido elálgico no parece ser causado por un mecanismo de competencia. Los

estudios realizados *in vitro* con ADN hidrolizado mostraron que el ácido eláxico no evitó la metilación de la guanina en la posición *N*-7 pero sí inhibió la metilación en la posición *O*<sup>6</sup>. La inhibición ocurrió solo cuando la doble hebra del DNA fue usada como sustrato. Estos resultados sugirieron que el ácido eláxico inhabilita la mutagenicidad de la MNU a través de un mecanismo de unión afín entre éste y el dúplex de DNA<sup>22</sup>.

*Isotiocianatos*. En experimentos a corto plazo, hembras de ratón A/J recibieron durante 4 días, 5 mmol de varios(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-fenil-NCS seguido por una dosis de NNK (10 mmol por inyección i.p.). Dieciséis semanas después se cuantificó la presencia de tumores en pulmón y se observó que el fenetil-NCS y el arilalquil isotiocianato provocaron una marcada reducción en la formación de tumores. Los estudios moleculares mostraron que la metilación del DNA en la posición *O*<sup>6</sup> era inhibida con mejor eficiencia por los isotiocianatos de cadena larga. Se observó una relación directamente proporcional entre el tamaño de la cadena metil de los isotiocianatos y el porcentaje de inhibición hacia el NNK<sup>23</sup>.

Ratas machos de la cepa F344 que fueron tratadas con *N*-nitrosobenzilmetilamina (NBMA) (0.5 mg/kg.) desarrollaron tumores esofágicos al cabo de 25 semanas de tratamiento. En el grupo experimental alimentado además de NBMA con fenetil-NCS (3 mmol/g) se observó una disminución significativa en el número y tamaño de tumores obtenidos. A dosis altas de fenetil-NCS (6 mmol/g) no se detectaron tumores. De acuerdo con los autores, los isotiocianatos utilizados bloquearon la formación de lesiones preneoplásicas y neoplásicas en el esófago de ratas mediante la disminución en la formación de *N*-7- y *O*<sup>6</sup>-metilguanina<sup>24</sup>.

El mecanismo plausible del efecto anticarcinogénico de los isotiocianatos es la modulación en el metabolismo del carcinógeno. Las evidencias se basan en las observaciones de: (a) la formación de aductos de DNA y las modificaciones a nucleótidos; (b) las tasas de activación del carcinógeno y los niveles enzimáticos de la Fase 1 y (c) la actividad de las enzimas de la Fase 2 y los niveles de glutatión<sup>25</sup>.

*Catequinas*. Se realizó en *S. typhimurium* un estudio con 5 catequinas, la epicatequina (EC), la epigalocatequina (EGC), la galato epigalocatequina (EGCG) y la galato epicatequina (GEC) para analizar su efecto sobre la nitrosación de las aminas secundarias DMA, MOR y MAN. Las aminas fueron incubadas con nitrito de sodio en presencia o ausencia de los agentes inhibidores. Los resultados mostraron que las cinco catequinas inhibieron por arriba del 50% la nitrosación de la DMA y la MOR pero solo inhibieron parcialmente la rápida nitrosación de la MAN. En casos excepcionales, las inhibiciones fueron más efectivas que las del mismo ácido ascórbico. El estudio mostró además que la inhibición de la formación de la NDMA fue a una razón molar de 1:2 catequina/nitrito respectivamente<sup>26</sup>.

En una serie de experimentos paralelos, las nitrosaminas ya

formadas NDMA, NMOR y nitrosometilnilina (NMAN) fueron incubadas con EGCG. Al final del tratamiento no se detectó ningún tipo de degradación de estas nitrosaminas. Esta observación indicó que las catequinas no inhibieron la nitrosación por descomposición de las nitrosaminas ya formadas, sino impidiendo la formación del compuesto nitroso. Por lo tanto, el mecanismo de acción antimutagénica sugerido para las catequinas, es la competencia con las aminas secundarias para utilizar el nitrito<sup>26</sup>.

Este mismo mecanismo se sugirió en estudios realizados en *D. melanogaster*, en donde las catequinas inhibieron el efecto de la combinación nitrito de sodio-metil urea, reduciendo la frecuencia de mutaciones somáticas en un 60%<sup>27</sup>.

### (3) Metales

*Selenio*. En un estudio realizado en células de páncreas de criseto dorado y en células del colon en ratas, se reportó que el selenio redujo la frecuencia de rompimientos de hebra simple del DNA inducido por el *N*-nitroso-bis(2-oxopropil)amina<sup>28</sup>. En cepas silvestres y mutadas de *S. cerevisiae*, el selenito de sodio suprimió por completo la tasa de mutación espontánea. Por su parte, el dióxido de selenito y la selenometionina, disminuyeron la tasa de revertantes en la cepa TA100 de la misma especie<sup>29</sup>.

En estudios de pre- co- y post-tratamientos realizados en las cepas TA100 y TA1535 de *S. typhimurium* se analizó el efecto del selenito de sodio y cafeína en contra de la mutagenicidad inducida por la MNU y MNNG. Los resultados del pretratamiento mostraron una relación dosis-respuesta entre el selenito de sodio y la mutagenicidad de los CN, a mayor dosis de selenito de sodio, menor número de mutaciones. En el cotratamiento, el selenito de sodio (0.029 mM) disminuyó en un 50% el número de revertantes producidos por la MNNG. En el post-tratamiento no tuvo ninguna influencia sobre la mutagenicidad de los CN. El mecanismo por el cual el selenito de sodio inhibió la acción mutagénica de la MNU y MNG todavía no se conoce. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere que existe una interacción extracelular mutágeno-antimutágeno antes de que los primeros ejerzan sus acción mutagénica<sup>30</sup>.

*Cobalto*. Se observó en un estudio que el clorito de cobalto redujo la frecuencia de mutaciones espontáneas en la cepa mutante NIG 1124 de *Basilus subtilis* que se caracteriza por tener alterada su ADN polimerasa III. Los autores sugirieron que las frecuencias de error en la replicación del ADN fueron reducidas por la presencia del CoCl<sub>2</sub>. Sin embargo, no se determinó el mecanismo exacto por el cual se llevó al cabo este proceso. Posteriormente, se sugirió que existe una posible interacción del cobalto con la proteína recA la cual tiene un papel importante en la reparación del ADN<sup>31</sup>.

*Cobre*. En ADN de ratas, la formación de aductos *O*<sup>6</sup>-MeG y 7*N*-MeG producidos por la NDMA fue suprimida significativamente por la administración de acetato cúprico. Asimismo, en células de hígado de rata, la tasa de metilación de núcleos producidos

por la MNU también fue reducida. Algunos estudios han demostrado que ciertos iones metálicos son reconocidos por reaccionar con sitios nucleofílicos formando complejos de iones-bases y es probablemente esta característica la que evita que los ácidos nucleicos sean atacados por agentes genotóxicos<sup>32</sup>.

#### (4) Mezclas Complejas

*Extractos de verduras y frutas.* Es conocido el hecho de que en la dieta se encuentra una gran cantidad de sustancias que actúan previniendo o modulando los efectos negativos de los mutágenos. Existen diferentes estudios que muestran a estas mezclas como posibles candidatos a contrarrestar el efecto de la nitrosación.

Se demostró en *D. melanogaster*, que pretratamientos a larvas de 48 hrs. de edad con extractos de *Capsicum spp.* inhibieron entre 50% a 99% la frecuencia de mutaciones causada por los metabolitos resultantes de la mezcla de metil urea y nitrito de sodio. Esta inhibición fue directamente proporcional al contenido de AA presente en los extractos, sugiriendo que su actividad antimutagénica pudo ser causada por la Vit.C. La concentración promedio de AA fue de 85 mg/100 g de chile fresco. Sin embargo, no se descartó otro tipo de inhibidores<sup>33</sup>.

La formación de NPRO en humanos ha sido inhibida por diferentes extractos de frutas y verduras como el chile verde, la piña, el tomate, la fresa, la zanahoria y el apio. Dieciséis sujetos consumieron durante 18 días consecutivos una dieta estándar baja en nitratos y AA. Cada tercer día se les adicionó 5.24 nmol de nitrato y 4.35 mmol de PRO seguido por 100 ml de agua destilada. En los días restantes, además del nitrato y la PRO se les alimentó con 100 ml de los jugos antes mencionados. 24 hrs. después de los tratamientos se analizó el contenido de NPRO de acuerdo a los estándares para esta prueba en donde se mostró que a excepción del jugo de apio, todos los extractos inhibieron significativamente la formación de la NPRO, siendo los jugos de piña, tomate y chile verde los que inhibieron tan efectivamente como el AA. Al parecer la nitrosación endógena fue bloqueada gracias a al contenido de ascorbato presente en los jugos<sup>34</sup>.

*Extractos de té.* Para estudiar la inhibición de aminas secundarias fueron utilizados 5 tipos de té verde, 1 de té tostado, 1 de té fermentado y uno de té negro. En los experimentos *in vitro* se incubaron por separado DMA, MOR y MAN con una solución de nitrito de sodio con la presencia o ausencia de los agentes inhibidores (0.1 g eq. de hoja/ml). Los resultados mostraron que las 5 variedades de té verde inhibieron eficientemente la formación de NDMA, NMOR y NMAN; mientras que las variedades restantes elevaron ligeramente la formación de la NDMA e inhibieron con menor eficacia la formación de NMOR y NMAN. Los autores asumen que el efecto inhibitorio de los extractos se debió principalmente a la presencia de catequinas ya que los análisis de su contenido mostraron la presencia de EGC y EGCG de 95 hasta 108 mg/g principalmente en las variedades de té verde, lo que concuerda con el efecto de inhibición que muestran hacia algunas aminas secundarias<sup>26</sup>.

Estudios realizados en humanos demostraron que el consumo de 1 g de té verde por día bloquea parcialmente la síntesis endógena de la NPRO y el consumo de 3-5 g disminuye la formación de la NPRO hasta los niveles basales<sup>35</sup>.

#### (5) Otros

*Clorofilina (CLO).* Estudios realizados en *S. typhimurium* demostraron que la CLO disminuyó significativamente el número de revertantes provocados por la NNK y NNN pero influyó ligeramente en los resultados con NDMA. Los mismos experimentos, pero excluyendo ahora diferentes cofactores de la mezcla S9, demostraron que la CLO quizá reemplazó a la glucosa-6-fosfato en el ciclo de la NADPH sugiriendo que interactuó con el sistema de transporte de electrones involucrados en la activación de los compuestos. Utilizando el ensayo *hprt* V79 se demostró también que la CLO inhibió el efecto de la NNK, NNN y NDMA pero no el de MNU, estos resultados apoyan la hipótesis de que la modificación de la mutagenicidad de nitrosaminas ocurrió principalmente durante la activación metabólica de los compuestos<sup>36</sup>.

En células somáticas de *D. melanogaster* que mostraron un alto efecto genotóxico provocado por la NDMA, NDEA, NPIP y NMOR se demostró que la clorofilina disminuyó significativamente la frecuencia de manchas totales obtenidas con estos compuestos. Sin embargo el mecanismo por el cual se realizó esta inhibición no está bien esclarecido<sup>37</sup>.

*O<sup>6</sup>-alquilguanina alquiltransferasa.* Conocida como AGT o ATasa, es una enzima codificada por el gen metilguanina metiltransferasa (MGMT). Repara los aductos O<sup>6</sup>-meG y O<sup>6</sup>-meT del DNA. Este tipo de lesiones es causado principalmente por agentes alquilantes y compuestos nitroso. Se han sugerido dos mecanismos por los cuales la AGT inhibe la mutagénesis provocada por los CN: (1) removiendo el grupo metilo de los metabolitos carcinogénicos<sup>38</sup> y (2) por afinidad de unión estequiométrica 1:1 entre AGT:DNA<sup>39</sup>.

*Alquilaminas.* Las alquilaminas n-propil-, n-butil-, n-hexil-, n-octil- y n-nonilamina, inhibieron la mutagenicidad de la NDMA en *Salmonella*, el efecto fue mayor cuanto mayor era la cadena alquil del compuesto. Las actividades mutagénicas de otras nitrosaminas como la NDEA, nitrosopirrolidina (NPYR) y NMOR fueron reducidas solo por la n-hexilamina, pero su mutagenicidad no fue alterada en la misma proporción que la NDMA. Los compuestos serotina alquilamina, triptamina, epinefrina y norepinefrina fueron también capaces de reducir la mutagenicidad de la NDMA aparentemente bloqueando la metilación del DNA. En este estudio se sugirió que el mecanismo por el cual se evita la mutagenicidad de algunos CN es a través de la inhibición del proceso de activación de los compuestos<sup>40</sup>.

La literatura menciona que existen otros tipos de inhibidores de los compuestos nitroso, como las oxidasas de función mixta que suprimen el daño de CN promutagénicos a través de la activación de las enzimas de la fase I y II del metabolismo. Otros compuestos

son el 3-aminoharman, la benzamida, la 5-bromodeoxiuridina, el tetraclorito de carbón, la coenzima A, el cuferrón, el citocromo c, el 2,6-dicloro-4-nitrofenol, la EDTA, el elastatinal, el ácido  $\beta$ -indolacético, el helio, la hidroquinona, la limonena, el  $\alpha$ -naftoflavona, los análogos de NAD, el bisulfato de sodio, la estreptomina y la nicotina, entre otros<sup>41</sup>. Sin embargo, se ha observado que los resultados obtenidos con estos compuestos son limitados y poco consistentes, por lo que se necesitan más estudios para determinar su relevancia en el campo de la antimutagénesis.

## CONCLUSIONES

El estudio de la mutagenicidad de los compuestos nitroso es parte fundamental para el entendimiento del proceso carcinogénico. Sin embargo, es aún más importante el conocer los mecanismos por los cuales este proceso puede ser modulado y mejor aún inhibido. Por tal razón el campo de la antimutagénesis ha ido creciendo en las últimas décadas dando como resultado el descubrimiento de nuevos compuestos que disminuyan o anulen este efecto mutagénico.

Estos antimutágenos deben cumplir con una serie de características como son; poco o ningún efecto secundario; alta eficacia; capacidad de administrarse oralmente; tener un mecanismo de acción conocido y finalmente, ser accesible al consumo. Sin embargo, esto no garantiza su efecto protector. Los antimutágenos revisados cumplen al menos con cuatro de las cinco características mencionadas, pero su eficiencia no solo dependió de éstas sino también de algunas variables experimentales simultáneas como el tipo de mutágeno a inhibir; el tipo y condiciones de los sistemas de prueba; y el protocolo a seguir. El origen y estructura de las sustancias antimutagénicas es otro de los factores que influyen en el desempeño de su actividad.

Son varios los mecanismos por los cuales los antimutágenos inhiben el efecto de los compuestos nitroso: (a) formación de complejos mutágeno-antimutágeno; (b) competencia por aminas secundarias; (c) desactivación de enzimas metabólicas; (d) reducción del nitrito a nitrato; (e) captura de radicales libres; (f) prevención del metabolismo oxidativo del P450 y (g) uniones afines antimutágeno-DNA. Sin embargo, es muy posible que existan otros mecanismos involucrados. Debido a la complejidad en el modo de acción de los compuestos nitroso no se debería descartar el realizar ensayos antimutagénicos de combinación múltiple, además de las mezclas complejas, ya que la diversidad en los mecanismos de acción optimizaría la capacidad de antagonizar con la mutagénesis producida por los CN.

## REFERENCIAS

- Zolfigol MA, Zebarjadian MH, Chehardoli G, Keypour H, Salehzadeh S, Shamsipur M. N-nitrosation of secondary amines with [NO<sup>+</sup> Crown H (NO) (3)-2]. *J Org Chem* 2001; 66: 3619-3620.
- Mirvish SS, Haorah J, Zhou L, Clapper ML, Harrison KL, Povey AC. Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rat and mice: possible etiologic agents

for colon cancer. *J Nutr* 2002; 132: 3526S-3529S.

- Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 1995; 93:17-48.
- Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. U.K.: Oxford University Press, 1989; vol. 8: 241-250.
- Leaf CD, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv* 1989; 8:791-795.
- Mirvish SS. The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamide formation and other theories. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71:629-647.
- Ohshima H, Bartsch H. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res* 1981; 41:3658-3662.
- De Flora S. Mechanism of inhibitor of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1998; 402(1-2):151-158.
- Stavric B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem Toxicol* 1994; 32:79-90.
- Soden P, Lucas S. Inhibitory effect of vitamin C and some antioxidant in *S. typhimurium*. *Cancer Surv* 1998; 68:19-23.
- Koropatnick KJ, Stich HF. The modifying effect of sodium ascorbate on DNA damage and repair after N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 92:292-298.
- Mirvish SS, Grandjean AC, Reimers KJ, Connelly BJ, Chen SC, Gallagher J, Rosinsky S, Nie G, Tuatoo H, Payne S, Hinman C, Ruby EI. Dosing time with ascorbic acid and nitrate, gum and tobacco chewing, fasting, and other factors affecting N-nitrosoproline formation in healthy subjects taking proline with a standard meal. *Cancer Epidem Bio Prev* 1995; 4:775-782.
- Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J, Würzler FE. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1998; 402:203-209.
- Mirvish S. Effect of nitrate in drinking water and vitamin C on in vivo formation and cancer induction. Washington, DC: Georgetown University 1997; 33-44
- Kalinina LM, Agabeili RA, Svistunova GL, Iskenderova IM. Comparative evaluation of the antimutagenic effect of  $\alpha$ -tocopherol and reduced glutathione. *Ser Biol Nat* 1985; 1:76-81.
- Slamenova D, Chalupa I, Robichova S, Gabelova A, Farkasova T, Hrusovska L, Bacova G, Sebova L, Eckl P, Bresgen N, Zeithem P, Schenider P, Wsolova L, Barancokova M, Kazimirova A, Navarova J y Bezek S. Effect of dietary intake of vitamin A or E on the level of DNA damage, chromosomal aberrations, and micronuclei induced in freshly isolated rat hepatocytes by different carcinogens. *Nutr Cancer* 2002; 42(1):117-124.
- Robichova S y Slamenova D. Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Lett* 2002; 182(1):11-18.
- Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Effect of different vitamin A status on carcinogen-induced DNA damage in repair enzymes in rats. *In Vivo* 1996; 10:113-118.

## VERTIENTES

19. Alaoui-Jamali MA, Rossignol G, Castonguay A. protective effects of vitamin A against the genotoxicity of NNK, a nicotine-derived N-nitrosamine. *Carcinogenesis* 1991; 12:379-384.
20. Teplitzky SR, Kiefer TL, Cheng Q, Dwivedi PD, Moroz K, Myers L, Anderson MB, Collins A, Dai J, Yuan L, Spriggs LL, Blask DE, Hill SM. Chemoprevention of NMU-induced rat mammary carcinoma with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. *Cancer Lett* 2001; 168:155-163.
21. Brockman HE, Stack HF, Waters MD. Antimutagenicity profiles of some natural substances. *Mutat Res* 1992; 267:157-172.
22. Dixit R, Gold B. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83:8039-8043.
23. Morse MA, Eklind KI, Hecht SS, Jordan KG, Choi CI, Desai DH, Amin SG, Chung FL. Structure-activity relationship for inhibition of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. *Cancer Res* 1991; 51:1846-1850.
24. Stoner GD, Morrissey DT, Heur YH, Daniel EM, Galati AJ, Wagner SA. Inhibitory effects of phenethyl isothiocyanate on N-nitrosobenzylmethylamine carcinogenesis in the rat esophagus. *Cancer Res* 1991; 51:2063-2068.
25. Hecht SS. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Met Rev* 2000; 32:395-311.
26. Tanaka K, Hayatsu T, Negishi T, Hayatsu H. Inhibition of N-nitrosation of secondary amines in vitro by tea extracts and catechins. *Mutat Res* 1994; 12:91-98.
27. Guzman-Rincón J, Espinosa J, Graf U. Analysis of the in vivo nitrosation capacity of the larvae used in the somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1998; 412:69-81.
28. Birt DF, Lawson TA, Julius AD, Reunice CE, Salmasi S. Inhibition of dietary selenium of colon cancer induced in the rat by bis(2-oxopropyl)nitrosamine. *Cancer Res* 1982; 42:4455-4459.
29. Rosin MP. Inhibition of spontaneous mutagenesis in yeasts cultures by selenite, selenate and selenide. *Cancer Lett* 1981; 13: 7-14.
30. Balansky R. Effects of sodium selenite and caffeine on mutagenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine and aflatoxin B<sub>1</sub> in *S. typhimurium*. *Mutat Res* 1992; 269:307-317.
31. Inoue T, Ohta Y, Sadaie Y, Kada T. Effect of cobalt chloride on spontaneous mutation induction in a *Basillus subtilis* mutator strain. *Mutat Res* 1981; 91:41-45.
32. Demaut G, Seils P. Mutagenesis induced by nitrosocompounds. *Cancer Surv* 1997; 431:22-26.
33. Ramirez-Victoria P, Guzman-Rincon J, Espinosa-Aguirre JJ, Murillo-Romero S. Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum* spp.) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat Res* 2001; 496:39-45.
34. Helsler MA, Hotchkiss JS, Roe DA. Influence of fruit and vegetable juices on the endogenous formation of N-nitrosoproline and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in humans on controlled diets. *Carcinogenesis* 1992; 13:2277-2280.
35. Wu YN, Wang HZ, Li JS, Han C. The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on in vitro and in vivo N-nitrosation. *Biomed Environ Sci* 1993; 6:237-258.
36. Romert L, Curvall M y Jenssen D. Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 1992; 7(5):349-355.
37. Negishi T, Nakano H, Kitamura A, Itome C, Shiotani T y Hayatsu H. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett* 1991; 83:157-164.
38. Frosina G. Over expression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem* 2000; 267:2135-2149.
39. Rasimas JJ, Pegg AE y Fried MG. DNA binding mechanism of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Effects of protein and DNA alkylation on complex stability. *J Biol Chem* 2002; in press.
40. Negishi T, Hayatsu H. A sensitive assay of mutagenic activity of N-nitrosamines and its use for inhibition of modulators of the mutagenicity. Lyon, France, IARC, 1982; 685-664.
41. Gichner T, Veleminsky J. Inhibitors of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. *Mutat Res* 1988; 195:21-43.