

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

*Estandarización de un Modelo
de Nitrosación Endógena*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

JAVIER TRONCOSO PAREDES

QUERÉTARO, QRO. 1994

No. Reg. H54067

TS

Ciaz. 547.26

T853e



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

*Estandarización de un
modelo de
Nitrosación Endógena.*

TESIS:

**QUE PARA OBTENER EL
TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO.**

PRESENTA:

JAVIER TRONCOSO PAREDES.

QUERETARO, QRO. 1994.

INDICE GENERAL

	Pág.
I.- INDICE GENERAL.....	1
II.- INDICE DE FIGURAS.....	2
III.- INDICE DE TABLAS.....	3
IV.- RESUMEN.....	4
V.- INTRODUCCION.....	6
VI.- GENERALIDADES.....	19
VII.- OBJETIVOS.....	43
VIII.- MATERIAL Y METODOS.....	44
IX.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
X.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No.	NOMBRE	PAG.
1	Sistemas de prueba para identificar mutágenos....	13
2	Riesgos clínicos de las mutaciones.....	15
3	Modelo de reacción de nitrosación endógena..... en orina utilizando metilurea y nitrito de sodio.	47
4	Modelo de reacción de nitrosación endógena..... en orina utilizando adipato de piperazina y nitrito de sodio.	48
5	Ensayo vía el hospedero utilizando metilu-..... rea y nitrito de sodio.	51
6	Ensayo vía el hospedero utilizando adipato..... de piperazina y nitrito de sodio.	52
7	Ensayo vía el hospedero utilizando clorhi-..... drato de piperazina y nitrito de sodio.	53
8	Efectividad mutagénica de nitrito de so-..... dio + clorhidrato de piperazina; inhibi- ción de la actividad mutagénica al agregar vitamina C en el ensayo vía el hospedero.	60

INDICE DE TABLAS

TABLA	NOMBRE	PAG.
I	Concentraciones de químicos utilizados en el ensayo de orinas.....	45
II	Concentraciones de químicos utilizados en el ensayo vía el Hospedero.....	49
III	Mutagenicidad de orina de ratones tratados con diferentes precursores de nitrosación: En el ensayo de Salmonella typhimurium TA1535.....	55
IV	Efectividad mutagénica de Nitrito de sodio y Metilurea; en el ensayo vía el Hospedero con Salmonella typhimurium TA1535 como indicador genético.....	56
V	Efectividad mutagénica de Nitrito de sodio y Adipato de pipérazina; en el ensayo vía el Hospedero con Salmonella typhimurium TA1535 como indicador genético.....	57
VI	Efectividad mutagénica de Nitrito de sodio y Clorhidrato de piperazina; en el ensayo vía el Hospedero con Salmonella typhimurium TA1535 como indicador genético.....	58

RESUMEN

La formación de compuestos mutagénicos N-nitroso por la interacción entre aminas o amidas y nitritos ha sido ampliamente estudiada. En este proyecto se describe la posibilidad de detección de compuestos N-nitroso, formados por la interacción de las especies antes mencionadas, mediante la estimación de sus propiedades mutagénicas.

En el presente trabajo se buscó un modelo de nitrosación in vivo que proporcionara resultados satisfactorios al utilizar Salmonella typhimurium cepa TA1535 como indicador de mutaciones. La mutagenicidad fué estimada como el número de revertantes His⁺ de Salmonella typhimurium TA1535 resultantes al ser expuestas a los productos obtenidos de los modelos estudiados. Se probaron dos modelos diferentes de nitrosación endógena:

En el primero de ellos la actividad mutagénica fué estudiada en la orina de ratónes obtenida después de la administración oral de a).-nitrito de sodio más metilurea y b).-nitrito de sodio más adipato de piperazina. Los resultados obtenidos fueron negativos.

En el segundo modelo, la actividad mutagénica se probó en Salmonella typhimurium TA1535 recuperada de la cavidad peritoneal de ratones a los cuales se había administrado por vía oral c).-nitrito de sodio más adipato de piperazina y d).-nitrito de sodio más clorhidrato de piperazina. Esta metodología se conoce como ensayo vía el hospedero.

Al analizar los resultados se observó que la administración simultánea de nitrito de sodio y clorhidrato de piperazina provocó un aumento en el número de revertantes His⁺ de Salmonella typhimurium TA1535. No así cuando se administraron por separado.

Finalmente se probó ácido ascórbico como inhibidor de la formación de compuestos N-nitroso en este modelo de nitrosación, presentándose en los resultados una disminución en el número de revertantes His⁺ de Salmonella typhimurium TA1535.

INTRODUCCION

La producción masiva de diversas sustancias ocasionada en gran medida por los avances tecnológicos, propicia que las poblaciones humanas se encuentren cada vez más expuestas a ellas. Es evidente que los productos químicos han participado en el mejoramiento de las condiciones de vida, aunque, también se ha puesto de manifiesto que algunos de ellos tienen efectos indeseables.

El daño producido al material genético por diversos factores a través de la mutagénesis, es uno de los riesgos toxicológicos que no se han valorado lo suficiente a pesar de su repercusión en la salud de los individuos afectados y sus descendientes. Algunos estudios sugieren una relación causal entre la mutagénesis y la transformación maligna de las células (carcinogénesis) y ciertas alteraciones del desarrollo (teratogénesis) (Cortinas de Nava et al., 1980).

En los últimos años, numerosas investigaciones han aportado nuevos elementos para entender los mecanismos que intervienen en la carcinogénesis, proceso que comprende la transformación de las células y el desarrollo del cáncer.

Los avances logrados en el campo de la carcinogénesis adquieren singular importancia para quienes están interesados en el estudio epidemiológico y el control del cáncer, ya que permiten entender porqué este padecimiento tarda tantos años en manifestarse, porqué no todos los individuos de una población enfrentan un riesgo similar de desarrollarlo y cómo múltiples factores ejercen un efecto modulador de la enfermedad.

Otro aspecto que deriva del conocimiento de la carcinogénesis es la oportunidad de identificar y controlar la exposición a los factores de riesgo, establecer estrategias para interferir en las distintas etapas del proceso y plantear conductas para vigilar y prevenir que los individuos en alto riesgo desarrollen cáncer.

Por su parte, los estudios epidemiológicos, los bioensayos animales de carcinogénesis y las pruebas de corta duración de mutagénesis y transformación celular, han contribuido de manera importante a detectar agentes ambientales capaces de inducir cáncer, constituyéndose en un recurso valioso para los programas de prevención (Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

Los epidemiólogos calculan que por lo menos el 70% de los cánceres en el humano podrían, en principio, ser prevenidos si se identificaran los principales factores de riesgo y anti-riesgo.

Esto en virtud de que la incidencia de tipos específicos de cáncer difieren marcadamente en distintas partes del mundo donde las personas tienen diferentes estilos de vida. Por ejemplo, los cánceres de colon y mama, que constituyen unos de los principales tipos de cáncer en los Estados Unidos, son bastante raros en Japón, pero no entre japoneses-americanos. Los epidemiólogos están aportando importantes pistas acerca de las causas específicas del cáncer humano, a pesar de las dificultades metodológicas inherentes. Se ha identificado que el tabaco es una causa evitable de alrededor del 30% de las muertes por cáncer en E.U. y de un número mayor de muertes por otras causas. Menos específicamente, factores presentes en los alimentos, o la carencia de ellos, han sido considerados por diversos estudios como responsables de una proporción sustancial de muertes por cáncer, aunque los factores de riesgo y de anti-riesgo están siendo identificados muy lentamente.

Una alta ingesta de grasas parece relacionarse con el cáncer del colon, pero la evidencia no es definitiva como lo son las que involucran a las grasas saturadas en las enfermedades del corazón o al tabaco en el cáncer pulmonar. El consumo de bebidas alcohólicas, particularmente por los fumadores, se piensa es responsable del 3% de las muertes por cáncer en E.U. y de un número mayor por otras causas (Ames et al., 1987).

Se han efectuado progresos en la prevención de algunos factores ocupacionales, como el asbesto, al cual los trabajadores solían estar altamente expuestos, con efectos diferidos que aún contribuyen a cerca del 2% de las muertes por cáncer en E.U.. La prevención también parece ser posible en el caso de los cánceres relacionados con hormonas como el de mama, los asociados con virus como el cáncer hepático (virus de la hepatitis B) y el cáncer de cuello uterino (papiloma virus HPV 16) (Ames et al., 1987).

Esto no sucede en el caso del cáncer gástrico, ya que la proporción de mortalidad por este tipo de cáncer que puede ser atribuible a factores de la dieta, cuando menos en los Estados Unidos, se ha estimado en un 35% (Doll y Peto, 1981). Se estima que la influencia de la dieta sobre el riesgo de padecer cáncer, es tan importante como la exposición al humo del tabaco, aunque el papel de la dieta en la etiología de esta enfermedad es difícil de estudiar en parte porque el concepto de "dieta" abarca una gran variedad de alimentos y hábitos personales difíciles de medir objetivamente.

Uno de los posibles factores de la dieta involucrado en la etiología del cáncer en humanos, es la formación endógena de nitrosaminas y nitrosamidas.

Los humanos nos encontramos expuestos a una amplia variedad de sustancias nitrogenadas provenientes de los alimentos, que pueden reaccionar *in vivo* con agentes nitrosantes para formar compuestos N-nitroso (CONN), los cuales representan una clase muy versátil de carcinógenos (Shephard et al., 1987).

Los precursores de CONN se encuentran principalmente en los componentes normales de la dieta, aunque también en el agua, aire, humo de cigarro y fármacos de uso común, entre otros.

Los agentes nitrosantes se pueden formar también endógenamente, en reacciones mediadas por bacterias y macrófagos activados (Calmels et al., 1987; Miwa et al., 1987; Marletta, 1988). De esta manera la formación endógena de CONN puede ocurrir en diferentes partes del organismo incluyendo cavidad oral, estómago e intestino, pulmón y órganos infectados o con procesos inflamatorios.

La exposición a CONN ha sido asociada con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de estómago, de esófago y de vejiga, aunque la asociación carece aún de evidencia epidemiológica convincente, principalmente por la falta de métodos confiables para estimar la formación endógena de CONN.

La hipótesis más aceptada para la carcinogénesis gástrica fué propuesta por Correa (1988) en la cual, los compuestos N-Nitroso formados endógenamente a partir de nitratos ingeridos en la dieta (reducción a nitrito vía bacteriana) son propuestos como origen de acción carcinógena en el estómago.

La exposición a nitratos exógenos ha sido, por eso, considerada un factor de riesgo importante para el padecimiento de cáncer gástrico vía la formación endógena de compuestos N-Nitroso. La evidencia epidemiológica para una asociación etiológica entre la exposición nitrato/nitrito y el cáncer gástrico es, sin embargo, confusa y permanece como materia de debate (Forman, 1989; Knight et al., 1992).

Sin embargo, existe una creciente evidencia, de que nuestra alimentación diaria contiene factores identificados como carcinógenos en animales (como los resultantes de la cocción de los alimentos) todos ellos perfectamente naturales o tradicionales, y prácticamente no es posible encontrar una dieta enteramente libre de mutágenos que pueden ser carcinógenos para roedores.

Por ello es necesario identificar las causas importantes del cáncer para el humano entre el inmenso número de riesgos mínimos.

Lo cual requiere del conocimiento tanto de las cantidades de una sustancia a la que el humano puede estar expuesto, como de su potencia carcinogénica (Ames et al., 1987).

El empleo de los sistemas animales para identificar carcinógenos cuenta con grandes ventajas, sin embargo, una regla importante para que el bioensayo se considere válido es que debe realizarse en ambos sexos de dos especies expuestas en forma crónica, lo que hace las pruebas en animales relativamente laboriosas, costosas y de larga duración. Y aún más, la utilidad de estas pruebas para la estimación del riesgo en el humano es limitada ya que existen compuestos que sólo inducen cáncer en el hombre (Vogel et al., 1976).

Es por eso que considerando las observaciones que sugieren una asociación entre la carcinogénesis y la mutagénesis, en las cuales se dice que los carcinógenos que inducen tumores en la mayoría de los órganos de las especies de roedores son capaces de producir mutaciones. Los compuestos químicos pueden participar en las etapas de iniciación y progresión del proceso de carcinogénesis a través de ocasionar alteraciones en el material genético de las células; de ahí el interés en evaluar la capacidad mutagénica de las sustancias químicas como un indicador de riesgo de cáncer, ver Figura 1 (Viola et al., 1971)

Figura que presenta las características más relevantes de las pruebas utilizadas en la identificación de mutágenos.

PRINCIPALES PRUEBAS DE CORTA DURACION

A. MUTACIONES GENICAS.

1. Sistemas microbianos con y sin activación metabólica. *Salmonella typhimurium* (prueba de reversión, o ensayo de Ames).
2. Cultivo de células de mamífero con y sin activación metabólica. Detección de mutaciones en el locus HGPRT o TK.
3. Mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Detección de mutaciones letales ligadas al X.

B. ALTERACIONES CROMOSOMICAS.

1. Detección de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en células de médula ósea y sangre de roedores.
2. Detección de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en linfocitos humanos en cultivo o provenientes de individuos expuestos.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

A. DAÑO AL ADN.

1. Pruebas de rompimiento de cadenas o formación de aductos.
2. Síntesis de ADN no-programada.
3. Intercambio de cromatidas hermanas.

B. ALTERNATIVAS AL USO DE LA FRACCION METABOLICA S9.

1. Uso de cultivos primarios de hepatocitos.
2. Ensayo vía el hospedero.

C. ADQUISICION DE CARACTERISTICAS TUMORALES POR LAS CELULAS EN CULTIVO.

1. Pruebas de transformación celular de fibroblastos.

(Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

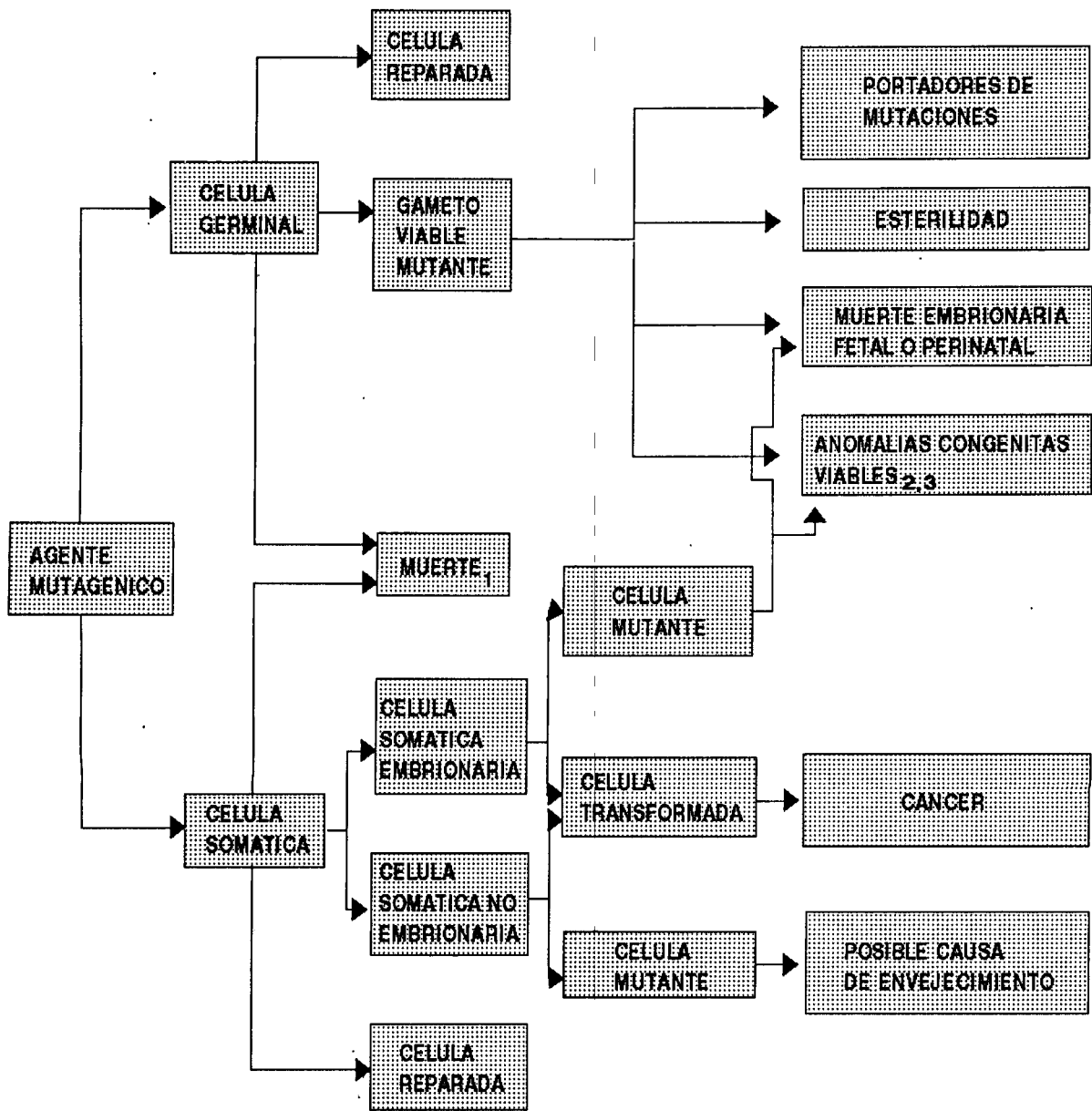
FIGURA 1. Sistemas de prueba para identificar mutágenos.

JUSTIFICACION DEL USO DEL METODO DE AMES PARA LA EVALUACION DE MUTACIONES GENICAS EN *Salmonella typhimurium*.

Una de las pruebas para la identificación de mutágenos más difundida, es la desarrollada por el grupo del Dr. Bruce N. Ames en la Universidad de California empleando como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium*.

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

Una mutación se considera como una modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN). Este cambio puede ocurrir en los genes (unidades de formación) o en los agrupamientos de genes, denominados cromosomas de cualquier tipo de célula (figura 2).



TOMADO DE: MANUAL DE METODOS PARA LA IDENTIFICACION DE MUTAGENOS Y CARCINOGENOS QUIMICOS AMBIENTALES

1 TANTO LA MUERTE DE LOS GAMETOS COMO SU INCAPACIDAD PARA REALIZAR LA FECUNDACION PUEDEN MANIFESTARSE COMO ESTERILIDAD.

2 ESTO PUEDE TRADUCIRSE EN INCAPACIDAD REPRODUCTIVA DEL INDIVIDUO

3 PUEDEN TRANSMITIRSE DE UNA GENERACION A OTRA

FIGURA 2.RIESGOS CLINICOS DE LAS MUTACIONES

Uno de los aspectos más interesantes de esta prueba, además de la fácil manipulación, economía y rapidez de ejecución, deriva del conocimiento de los cambios moleculares ocurridos en el operón de la histidina como consecuencia de las mutaciones originales, lo que permite averiguar, no tan solo si un agente químico es mutagénico, sino a través de qué mecanismo induce la mutación. Varias de estas cepas se originaron, en efecto, a través de sustituciones de bases y otras por desfasamiento de la secuencia nucleotídica (frameshift), lo que implica que su "reversión" requiere del concurso de los mismos mecanismos, es decir, sustitución de la base adecuada en el primer caso o eliminación de bases en el segundo, para "correr" la secuencia y restablecer el código genético.

La recolección de los datos generados en todos los laboratorios en los que el Dr. Ames donó las cepas, así como en su propio laboratorio, han permitido contar con información suficiente para "validar" la prueba. El estudio de más de 300 compuestos químicos, carcinogénicos y no carcinogénicos ha mostrado, además, una alta correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad. Aunque el análisis de la relación, en función de la estructura química de los compuestos, no parece ser tan alta para todos los grupos de agentes, como lo mencionara originalmente el grupo del Dr. Ames (Cortinas de Nava et al., 1980).

En el mamífero *in vivo* existen sistemas enzimáticos responsables de la transformación metabólica de los compuestos que acceden al organismo y que están ausentes en *S. typhimurium*. Por ello, la prueba ha sido complementada mediante la adición de homogenados de órganos de roedores o humanos que contienen las enzimas correspondientes (fracción S9) (Ames et al., 1973); una de las alternativas del método de Ames en la cual no se utiliza la fracción S9 es el ensayo vía el hospedero. Esta metodología fué introducida en 1969, y se han hecho varias modificaciones desde su aparición, es considerado como un método indirecto para detectar mutaciones puntuales lo que permite caracterizar agentes mutagénicos (Gabridge y Legator, 1969; Legator y Malling, 1971). En este ensayo el mamífero durante el tratamiento con un agente químico potencialmente mutágeno, es inyectado con un organismo indicador (un microorganismo) en el que la frecuencia de mutaciones puede ser medida. Después de un tiempo suficiente, el indicador es recuperado del animal y la inducción de mutantes es determinada. La comparación entre la acción mutagénica del compuesto sobre el microorganismo directamente, y la del ensayo del huésped mediador en el cual se indica si el huésped puede detoxificar el compuesto o los productos mutagénicos pueden formarse como resultado del metabolismo del huésped. Este es un procedimiento extremadamente flexible, de tal manera que permite el uso de una gran variedad de organismos indicadores y casi cualquier animal de prueba.

Aunque muchos organismos indicadores han sido utilizados en esta prueba, los auxótrofos de histidina de S. typhimurium han sido los más extensivamente usados. Los genes de histidina de S. typhimurium están entre los operones de microorganismos mejor caracterizados. Se han usado una serie de cepas mutantes por sustitución de pares de bases y por corrimiento de formato, deficientes ó competentes en reparación. La utilidad de éste método para detectar el metabolismo activo en un animal completo ha sido ampliamente demostrado, utilizando este auxótrofo con más de 100 compuestos tales como la cicacina y las nitrosaminas que han demostrado ser activos con este sistema.

GENERALIDADES

Los nitratos están presentes naturalmente en suelos, aguas, vegetales y carnes. Se les encuentra también, en pequeñas concentraciones (1-40 microgramos/m³) en el aire como resultado de la contaminación atmosférica. Los nitritos se forman en la naturaleza por la acción de bacterias nitrificadoras como etapa intermedia en la formación de nitratos; con todo, las concentraciones en plantas y agua son, por lo común, muy bajas. Sin embargo, puede haber conversión microbιolϒgica de nitrato a nitrito durante el almacenamiento de legumbres frescas, particularmente a la temperatura ambiente, en cuyo caso las concentraciones de nitritos pueden elevarse a niveles excepcionalmente altos, cerca de 3,600 mg/kg de peso en seco (Criterios de salud ambiental, 1980).

Los nitratos y nitritos se utilizan con frecuencia en la producciϒn y conservaciϒn de productos cϒrnicos curados y de algunos pescados. Estos usos, reglamentados oficialmente en muchos paϒses, se consideran vitales para prevenir el botulismo causado por el desarrollo de las cepas toxigϒnicas de Clostridium botulinum que a veces se encuentran en la carne cruda y que pueden persistir en las carnes cocidas.

La ingesta semanal de nitritos de un miembro de la población general de Inglaterra o Estados Unidos se ha estimado aproximadamente en un promedio de unos 400-500 mg, si bien estas cifras no se pueden generalizar a causa de las variaciones en los hábitos alimentarios y las concentraciones de nitratos en los alimentos y el agua.

Se han detectado concentraciones bajas de compuestos N-nitroso en aire, agua y alimentos, especialmente en productos cárnicos tratados con nitritos y ciertos productos del pescado. En la mayor parte de los casos las concentraciones observadas en alimentos son del orden de microgramos por kilogramo. En base a estos datos no es posible realizar una estimación efectiva de la exposición de la población general a los compuestos de N-nitroso (Criterios de salud ambiental 5, 1980).

El nitrito se utiliza en la curación de carnes para obtener el color rosado y el sabor característico de la carne curada. Si bien para obtener un color satisfactorio por un lapso limitado basta con un contenido de nitrito inferior a 5 mg/kg de carne, puede ser necesario utilizar hasta 20 mg/kg para producir una estabilidad comercialmente aceptable del color y hasta 50 mg/kg aproximadamente para producir el sabor característico. Sin embargo, se carece de una confirmación experimental detallada de estas cifras.

La curación de carnes da un importante grado de protección contra el botulismo y puede conferir una protección similar contra otras bacterias, como Clostridium welchii y estafilococos, aunque todavía no se ha evaluado la importancia de los nitritos en este aspecto. La cuestión relativa a saber qué cantidad de nitrito se necesita para protegerse del botulismo es muy compleja debido a varios factores que guardan relación entre sí.

La conversión de nitratos a nitritos se produce más lentamente en tocino envasado al vacío que en tocino sin envasar, a causa presumiblemente de la baja capacidad reductora de los anaerobios (Cavett, 1962). Spencer (1967) comprobó que el contenido de nitrito del tocino envasado al vacío disminuía lentamente durante el almacenamiento.

Sebranek et al. (1974) han informado que los niveles de nitrito en carne, determinados dos días después de la elaboración, son inferiores a la mitad de los originalmente añadidos a muestras congeladas y muestras elaboradas a 71°C y que tal disminución es aún más acentuada durante el almacenamiento. Se ha reportado también que el contenido de nitritos se reduce en 20-90% al freír, asar o hervir el tocino o jamón (Comité de Normas Alimentarias, 1959).

Los nitratos se pueden reducir a nitritos cuando la cocción se realiza en utensilios de aluminio. Esta observación parece significativa ya que en algunos países se utilizan utensilios de aluminio para hervir leche y agua, práctica que podría llevar a la formación de cantidades considerables de nitritos. Debiera investigarse mejor este efecto del aluminio.

Las condiciones en las cuales las distintas aminos, aminoácidos y proteínas en los alimentos podrían reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas fueron estudiadas por Ender y Ceh (1971) y Sen et al. (1970), quienes demostraron que cuando el bacalao, el arenque, la merluza, el hipogloso, la caballa o el salmón se trataban con 200 mg/kg de nitrito de sodio y se cocinaban a 110⁰C durante 60-70 minutos, solo había indicios (2.5-25 microgramos/kg) de dimetilnitrosamina (DMN) en el producto cocido. Los niveles más elevados se observaron en la caballa y la merluza, que contenían grandes cantidades de dimetilamina (DMA) y trimetilamina (TMA). Las muestras sin la adición de nitrito no contenían nitrosaminas detectables.

La formación de DMN se estudió en sistemas de modelo acuoso que contenían metilaminas y nitrito de sodio en condiciones más controladas que las empleadas en la elaboración comercial de leucisco ahumado con nitrito (un pez de agua dulce que contiene pequeñas cantidades de trimetilnitrosamina (TMN), óxido de trimetilamina (OTMA) y DMA).

Los resultados de los estudios mostraron que durante el proceso de ahumado no se formarían más de 10 microgramos de DMN por kilogramo de producto final (Malins et al., 1970).

Sen et al. (1973b), sugirieron que una fuente importante de nitrosaminas en las carnes curadas se podría derivar de una interacción de nitritos y especias, como la pimienta negra y el pimentón, que están presentes en las mezclas utilizadas para curar carnes.

Se encontró nitrosopirrolidina, nitrosopiperidina y DMN en una mezcla de curar utilizada por un fabricante de carnes en Canadá. Sen et al. (1974a) han estudiado también el efecto de la concentración de nitrito de sodio sobre la formación de nitrosopirrolidina y DMN en tocino frito. Estos autores analizaron muestras de tocino preparadas con nitrito de sodio en concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 mg/kg en busca de nitrosopirrolidina y DMN. Sin embargo, no se detectó nitrosamina en muestras preparadas sin nitrito, pero todas las muestras tratadas contenían de 2 a 20 microgramos/kg de nitrosaminas. La concentración de nitrosopirrolidina se relacionó con la concentración inicial de nitrito en el tocino. Se ha demostrado que la formación de nitrosamina en tocino aumenta con el incremento de la temperatura y el tiempo de fritura, y que, si bien la cocción, hervor o fritura producen cantidades variables de nitrosaminas, no se produce ninguna nitrosamina cuando la cocción se realiza en un horno de microondas (Pensabene et al., 1974).

Luego de la nitrosación deliberada de huevos y carnes con cantidades desusadamente elevadas (1%) de nitrito de sodio, se forman, al parecer, algunos compuestos N-nitroso, sin que pudiera determinarse claramente la naturaleza química de los compuestos detectados (Walters, 1971).

No se han realizado estudios sistemáticos acerca de la formación de compuestos N-nitroso en quesos, si bien se sabe que algunos tipos de queso se elaboran con nitratos y nitritos.

Se tienen escasos datos respecto del destino de los compuestos N-nitroso durante la cocción, elaboración o almacenamiento de alimentos, pero algunos estudios han demostrado que la nitrosamina volátil DMN y la nitrosopirrolidina se pueden perder durante la fritura de tocino (Sen et al., 1973a).

Debido a la capacidad de la espinaca para acumular grandes cantidades de nitratos y a los casos notificados de intoxicación asociada con el consumo de esta planta, se han realizado varios estudios sobre la conversión de nitratos a nitritos en la espinaca. Los datos presentados por Phillips (1968a), indicaban que el contenido inicial de nitrito de la espinaca fresca, congelada, enlatada e incorporada a alimentos para bebés era generalmente inferior a 1 mg/kg de peso en fresco.

Sin embargo, varios autores han informado de una rápida disminución de las concentraciones de nitrato y un aumento de las de nitrito en la espinaca fresca en los primeros cuatro días de almacenamiento a temperatura ambiente (Achtzehn y Hawat, 1970; Phillips, 1968a; Schuphan, 1965). Se han observado niveles muy elevados de nitrito en espinaca de tierra fertilizada (Brown y Smith, 1967), que incluso podían llegar a valores excepcionalmente elevados (3,600 mg/kg de peso seco) en casos de fertilización excesiva (Schuphan, 1965).

Bajo refrigeración, el contenido de nitrito de la espinaca fresca aumentó muy gradualmente en un período de almacenamiento de 28 días (Phillips, 1968a). No hubo aumentos significativos de los niveles de nitrito durante el almacenamiento de espinaca congelada, enlatada o en alimentos para bebés, pero se observaron concentraciones aumentadas en espinaca congelada que se había dejado descongelar a temperatura ambiente por un plazo excesivamente largo aproximadamente 39 horas (Phillips, 1968a).

En animales de experimentación y en un caso en el hombre se ha demostrado la formación *in vivo* de compuestos N-nitroso a partir de nitratos o nitritos y aminas o amidas.

Epstein (1972) observó la formación de nitrosopiperidina en el tubo gastrointestinal de ratas tratadas con nitrito y clorhidrato de piperidina.

Manteniendo la concentración de nitrito constante, la formación de nitrosopiperidina en el intestino delgado fue en aumento con las concentraciones crecientes de piperidina. También se encontró nitrosopiperidina en el estómago. Sander et al. (1974a), demostraron la formación de N-N'-dinitrosopiperacina, DMN y N-nitroso-N-metilbencilamina en el contenido gástrico de ratas a las que se administró las aminas precursoras combinadas con nitrito; sin embargo, en los animales se observó una considerable variación individual en el grado de síntesis de N-N'-dinitrosopiperacina. En otro informe reciente se formó N-nitrosopirrolidina muy rápidamente en el estómago de perros a partir de nitrito de sodio y pirrolidina en un lapso de 2-6 minutos que, sin embargo, había desaparecido casi totalmente al cabo de 30 minutos, presumiblemente a causa de su rápida absorción (Mysliwy et al., 1974).

Algunos estudios de toxicidad, han generado evidencia indirecta de la formación in vivo de compuestos N-nitroso. Por ejemplo, las lesiones hepáticas, formadas después de la administración de nitrito y algunas aminas, fueron similares a las producidas por DMN o N-nitroso-N-metilbencilamina (Asahina et al., 1971).

Efectos similares se advirtieron cuando se administró nitrito hasta tres horas después de la DMA, si bien el efecto se redujo señaladamente cuando el nitrito se administró antes de la amina.

Una parte de los nitratos ingeridos se absorbe fácilmente y otra parte puede ser metabolizada por la microflora en el conducto gastrointestinal (Ridder y Oehme, 1974). En función de los organismos presentes, el pH y los nutrientes disponibles (oligoelementos e hidratos de carbono), se pueden formar y absorber nitritos (NO_2), óxidos de nitrógeno (N_2O_5 , NO_2 , NO), hidroxilamina (NH_2OH) y amoniaco (NH_3).

Friedman et al., 1972, administraron una sola dosis oral de 150 microgramos de nitrito a ratones. La medición de la tasa de desaparición indicó que el compuesto se absorbía rápidamente y que el alimento en el estómago tenía escaso efecto sobre la absorción.

Los resultados en animales con una ligadura gastroduodenal indicaban que la absorción tenía lugar sobre todo en la mucosa gástrica. Los estudios de Mirvish et al. (1974), en ratas alimentadas con una dieta rica en nitrito sustentaron las observaciones anteriores en ratones.

Los experimentos con alimentos que contenían rojo de fenol mostraron que la disminución en las cantidades de nitrito en el contenido gástrico, especialmente en la parte glandular, se producía dentro de las cinco horas siguientes a la adición de el alimento, era significativamente mayor que la debida a la eliminación fecal directa. Esto se atribuyó a la descomposición y a otras reacciones catalizadas por ácido del nitrito, y a la absorción directa en el estómago.

Aunque de la naturaleza de los efectos tóxicos posteriores a la administración oral de las nitrosaminas se puede inferir que la absorción es considerable, existen pocos estudios con información cuantitativa sobre la absorción. Alarif y Epstein (1974), administraron nitrosometilurea y nitrosometiluretano marcados con ^3H , por sonda esofágica, a grupos de cobayas preñadas en dosis de 2 mg/kg y 5 mg/kg de peso, respectivamente. Los animales se sacrificaron una hora después de la administración de la dosis. Cuando se midió la absorción por los tejidos maternos y fetales por recuento de centelleos en líquido y determinación de DMA, se observó que los niveles maternos eran generalmente más elevados que los fetales. En estudios realizados por Juszkievicz y Kowalski (1974), la DMN, DEN y nitrosopropilamina, administradas oralmente a cabras a razón de 20-30 mg/kg, aparecieron en la sangre en un plazo de media hora y posteriormente en la leche.

La concentración en la leche, dos horas después de la administración de 30 mg/kg de DEN, fue de 14 mg/litro y al cabo de 24 horas solo se pudieron observar indicios. Phillips et al. (1975a), examinaron la desaparición de DMN del estómago e intestino delgado de ratas como índice de absorción y comprobaron que, si bien poco se absorbía en el estómago, la DMN se absorbía rápidamente del intestino delgado.

Hawksworth y Hill (1971b) realizaron un estudio de 122 muestras de orina humana y comprobaron que la concentración urinaria de nitrato guardaba relación con la cantidad de nitrato ingerido.

La excreción de nitratos y nitritos en la saliva fue estudiada por Spiegelhalder et al. (1976), en once voluntarios a los cuales se les administró zumos de leguminosas con concentraciones de nitrato de 30 a 550 mg/litro. Las cantidades de nitratos y nitritos excretadas fueron proporcionales a las de nitratos ingeridos. Luego de ingerir 100 mg de nitratos, las concentraciones de nitritos en saliva aumentaron, por término medio, en 20 mg/litro.

Magee y Barnes (1967), han examinado la información disponible sobre el metabolismo y la eliminación de compuestos N-nitroso. Magee (1956), midió la recuperación de DMN del cuerpo entero del ratón y observó que el 97% de la dosis total (0.05 mg/kg) se podía recuperar inmediatamente después de la administración oral, y que las cantidades recuperadas decrecían con el tiempo hasta que cuatro horas después no se recuperaba DMN.

Se obtuvieron resultados similares con la rata a la cual se le administrarían oralmente dosis de DMN a 50 mg/kg; la concentración declinó rápidamente con el tiempo después de la inyección, de modo que solo el 30% de la dosis se pudo recuperar a las ocho horas y nada a las 24 horas.

La transformación metabólica de DMN fue estudiada por Dutton y Heath 1956, utilizando DMN marcada con ^{14}C . Tanto en el ratón como en la rata el principal producto radiactivo fue el dióxido de carbono espirado. En el ratón se recuperó el 65% del ^{14}C inyectado como dióxido de carbono espirado, seis horas después de una inyección subcutánea de DMN a 50 mg por kg de peso. En la rata se recuperó alrededor del 40% del ^{14}C radiactivo como dióxido de carbono espirado ocho horas después de la inyección. Al terminar el experimento, el resto del ^{14}C estaba distribuido con relativa uniformidad en los tejidos, aparte del 7% aproximadamente que se había excretado en la orina.

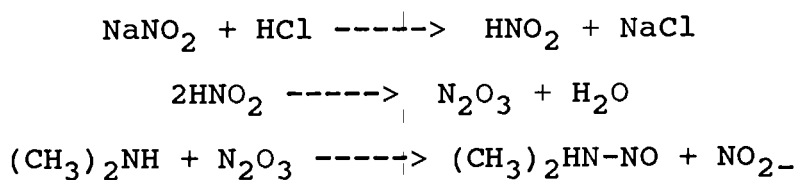
Heath (1962), comprobó que, si bien una parte de ciertas nitrosaminas estudiadas se excretaba inalterada en la orina y en el aire espirado, la mayor parte estaba en descomposición. En base a las tasas de espiración de dióxido de carbono marcado, se demostró que la descomposición de dimetil-, dietil-, y N-butilmetilnitrosamina obedecía a la cinética de Michaelis-Menten. La tasa de descomposición dependía de la dosis.

Cuando se investigó la transformación metabólica de dialquilnitrosaminas, especialmente del carcinógeno de la vejiga, di-N-butilnitrosamina, se identificaron los principales metabolitos urinarios con estructura retenida de N-nitroso (Blattmann y Preussman, 1974; Blattmann et al., 1974; Okada y Suzuki, 1972; Okada et al., 1975).

Se ha observado tanto la hidroxilación particularmente en el grupo CH₃ terminal, como el acortamiento de la cadena. La butil (3-carboxipropil) nitrosamina (BCPN), un importante metabolito de la butil (4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN), fué un carcinógeno de la vejiga igualmente potente y selectivo (Okada y Suzuki, 1972). Durante el metabolismo de la nitrosomorfolina se observó rompimiento de anillos (Stewart et al., 1974).

Si bien, el conocimiento de la síntesis endógena de compuestos N-nitroso es muy importante, no está todavía claro que porcentaje de pasos la limitan. La formación de compuestos N-nitroso (*in vitro*) a base de aminas y nitritos ha sido reseñada por Mirvish (1975), Sander (1971a), y Sander y Schweinsberg (1972).

Por ejemplo, se estima que la nitrosación de la dimetilamina (DMA) y el nitrito de sodio en soluciones diluídas de ácido clorhídrico sigue el proceso (Mirvish, 1970) que se indica a continuación:



En $\text{pH} > 1$ el principal agente nitrosante es el trióxido de dinitrógeno, que se forma reversiblemente a partir de dos moléculas de ácido nitroso. La velocidad de reacción (V_1) es proporcional a la concentración de trióxido de dinitrógeno $[\text{N}_2\text{O}_3]$ y, por ende, al cuadrado de la concentración del ácido nitroso $[\text{HNO}_2]^2$, esto es:

$$V_1 = k_1 [\text{N}_2\text{O}_3] [\text{HNO}_2]^2$$

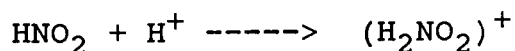
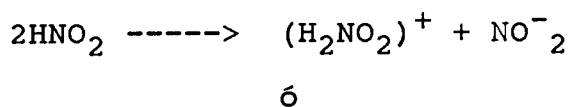
Las concentraciones de amina no ionizada y el ácido nitroso libre varían según el pH, pero k_1 es independiente del pH. A los fines prácticos, es más conveniente reformular la ecuación en función de las concentraciones totales de nitrito y DMA, esto es:

$$V_2 = k_2 [\text{amina total}] [\text{nitrito total}]^2$$

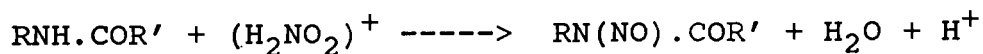
donde k_2 depende del pH; k_2 y la velocidad de reacción muestran valores máximos en $\text{pH} = 3.4$ que corresponde al $\text{p}K_a$ del ácido nitroso ($\text{p}K_a = 3.37$).

La velocidad de reacción disminuye 10 veces por cada aumento unitario de pH superior a pH=3.4. Por debajo de este nivel de pH el nitrito se convierte casi completamente en ácido nitroso. El efecto principal de una nueva reducción del pH es una caída continua de la concentración de amina no ionizada, lo que causa una disminución de la velocidad de reacción. No existe un límite preciso de pH para la nitrosación, que puede ocurrir lentamente a un pH de 5 o incluso 6, como se ha observado respecto de la DMA (Mirvish, 1970).

La nitrosación de amidas, como N-alquiureas y N-alquiluretanos, se realiza rápidamente (Challis y Challis, 1970; Mirvish, 1971; Sander y Burkle, 1969). En este caso el agente nitrosante probablemente sea el ión nitrácido $(H_2NO_2)^+$:



y la nitrosación se realiza por la siguiente reacción:



La velocidad de reacción es también proporcional a las concentraciones de alquilurea no ionizada a iones nitrácido, cuya formación puede estimarse que se realiza de acuerdo con la primera ecuación por lo tanto:

$$V_3 = k_3 [\text{RNH.COR}'] [\text{HNO}_2] [\text{H}^+]$$

$$V_4 = k_4 [\text{amida total}] [\text{nitrito total}] [\text{H}^+]$$

La velocidad de reacción, que aumenta alrededor de 10 veces por cada disminución de una unidad en el pH de 3 a 1, no muestra un nivel máximo de pH; k_4 depende de la ionización de nitrito y, por ende, del pH, pero no de la ionización de las amidas, que solamente están levemente ionizadas en un pH superior a 2.

Las tablas en las que figuran las constantes de velocidad de reacción de 15 aminas y 21 amidas de acuerdo con las ecuaciones antes dichas (Mirvish, 1975) indican que las clases de compuestos de más rápida nitrosación son las N-alquilureas, N-arilureas, N-alquilcarbamatos, aminas aromáticas secundarias, amino piperazina secundaria, derivados de morfolina y enamidas terciarias (Criterios de salud ambiental 5, 1980).

Como se menciona anteriormente la exposición a compuestos N-nitroso ha sido considerada como resultado de su formación endógena por la interacción entre aminas y nitritos (Oshima y Bartsch, 1981). Ha sido también sugerido que la ingestión de drogas aminadas junto con nitritos pueden generar nitrosaminas y nitrosamidas mutagénicas y carcinogénicas (Lijinsky, 1980).

Este es el caso del antihelmíntico piperazina, al cual se ha probado su capacidad para reaccionar endógenamente con nitrito de sodio para formar derivados nitrosados que son carcinogénicos a ratas (Von Schneider et al., 1977). Se ha observado que la administración oral de 1-4 dinitrosopiperazina a ratones preñados incrementa la frecuencia de tumores en sus descendientes cuando alcanzan la edad adulta (Borzsonyi et al., 1980). La detección de compuestos N-Nitroso en orina constituye una manera de identificar exposiciones individuales a esos agentes (Oshima y Bartsch, 1981).

Varias drogas aminadas amebicidas y antihelmínticas han sido puestas a reaccionar *in vitro* con nitrito de sodio en pH ácido y temperatura fisiológica, produciendo compuestos nitrosados que inducen mutaciones en Salmonella typhimurium TA1535 (Arriaga Alba et al., 1988). Esto ocurre con derivados de la pirimidina (pamoato de pirantel) o con drogas que contienen aminas secundarias alifáticas (cloroquina) o nitrógenos heterocíclicos (dehidroemetina, piperazina). Sin embargo, drogas antiparasitarias que contienen derivados halogenados de aminas terciarias (iodoclorohidroxiquinina) o sales cuaternarias de amonio (hidroxinaftato de befenio) no forman compuestos mutagénicos N-Nitroso bajo condiciones similares (Arriaga Alba et al., 1989).

Muchos factores han sido investigados para encontrar una asociación posible con cáncer gástrico, pero, aunque los factores dietéticos se cree que son de mayor importancia, los agentes causales no han sido claramente identificados (Howson 1986; Mettlin 1988).

Nuestro conocimiento con respecto a lo que sucede al epitelio gástrico después del establecimiento de gastritis se basa principalmente en el trabajo de Correa, (1988). No hay ninguna duda de que la gastritis cuando llega a ser atrófica, es un factor de riesgo de cáncer gástrico y resulta de la pérdida de la acidez normal, colonización bacteriana y la reducción intragástrica de nitrato a nitrito.

El nitrito puede entonces nitrosar sustratos proteicos y formar compuestos carcinogénicos N-nitroso. Esta secuencia de eventos es biológicamente plausible, y todos los pasos individualmente han sido demostrados en estudios experimentales en humanos (Mirvish, 1983; Bartsch y Montesano, 1984). Sin embargo todavía no se ha establecido si tales componentes N-nitroso sintetizados endógenamente hacen alguna contribución al cáncer humano y cual sería el papel de la exposición a nitrato dietético tiene en este proceso. La investigación epidemiológica ha sido enfocada a contestar esta pregunta (Fraser, 1985; Forman, 1987).

Mundialmente, el cáncer gástrico ocasiona la muerte de alrededor de medio millón de personas cada año y, en términos de mortalidad de cáncer, es el segundo en importancia después del cáncer de pulmón (Parkin, et al. 1988).

Como en todos los cánceres; hay mucha variación internacional en la incidencia y mortalidad de ésta enfermedad. Más notorio, sin embargo, ha sido la declinación consistente en la incidencia vista con todos los países cercanos cuyas estadísticas están disponibles (Muñoz, 1988). Investigando las causas del cáncer gástrico, se puede concluir que los agentes causales son probablemente muy extendidos.

El lugar importante que ocupa el cáncer como causa de enfermedad y de muerte en la actualidad, aunado al conocimiento del origen de una gran parte de los cánceres, ha impulsado el desarrollo de múltiples sistemas de prueba tendientes a identificar y evaluar la potencia de carcinógenos. Todo ello con el propósito de contar con información que permita el control del cáncer (Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

La forma más usual de exposición a carcinógenos para la población general está relacionada con mezclas complejas de un gran número de compuestos que se encuentran presentes en muy baja concentración en el aire, el agua y los alimentos que se consumen diariamente.

En estos casos, el patrón general de exposición y las variaciones de ésta, pueden inferirse de los hábitos de vida y la calidad del ambiente en el que se desenvuelven las poblaciones.

Lo anterior hace evidente algunas de las dificultades importantes que enfrenta el estudio de la carcinogenicidad de agentes químicos y el diseño de modelos que permitan obtener información relevante para las condiciones usuales de exposición humana a dichos compuestos (Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

En virtud de los problemas descritos, se han diseñado diversas estrategias para el desarrollo de las distintas pruebas para detectar carcinógenos, así como para la integración, interpretación y extrapolación de los datos emanados de ellas, con el objeto de evaluar el riesgo de que poblaciones humanas expuestas a tales agentes desarrollen cáncer.

Los bioensayos de carcinogénesis son tan costosos y tan largos (más de 3 años), que para garantizar su buen desarrollo se considera indispensable un diseño experimental bien documentado, basado en una metodología rigurosa, además de el control de calidad de los reactivos empleados, de los alimentos, del ambiente de los bioterios y del estado de salud de los animales (Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

Se ha reportado, a la vez, que los carcinógenos que inducen tumores en la mayoría de los órganos de las especies de roedores son capaces de producir mutaciones. Los compuestos químicos pueden participar en las etapas de iniciación y progresión del proceso de carcinogénesis a través de ocasionar alteraciones en el material genético de las células; de ahí el interés en evaluar la capacidad mutagénica de las sustancias químicas como un indicador de riesgo de cáncer (Viola et al, 1971). Además, se ha constatado que la mayoría de los carcinógenos para los roedores empleados en los bioensayos de carcinogénesis y para el humano son capaces de inducir daño genético (IARC, 1974; Waxciler et. al, 1976).

Existen numerosas pruebas para evaluar la capacidad mutagénica (inductora de mutaciones) o genotóxica (inductora de daño genético) de los agentes químicos. Estas pruebas permiten determinar distintos tipos de alteraciones genéticas, tanto en células somáticas constituyentes del cuerpo como reproductoras, *in vivo* e *in vitro*, como se señaló en las Fig. 1 y 2 (Cortinas de Nava y Espinosa, 1990).

La mutagénesis y carcinogénesis pueden ser suprimidas por una gran cantidad de compuestos químicos presentes en la naturaleza, o incluso con compuestos hechos por el hombre (Wattenberg, 1979; Wattenberg et al., 1980; Schrauzer e Ishmael, 1974; Lo y Stich, 1978 a.b., 1979, 1980; Kada et al., 1978).

Los mecanismos de acción de estos antimutágenos y anticarcinógenos son objeto de investigación de frontera en este campo y se han postulado algunos mecanismos generales. La inhibición puede deberse a la inactivación de electrófilos o radicales libres, interferencia de los mecanismos de activación metabólica medida por citocromo P-450, catálisis de la descomposición de los compuestos reactivos, alteración de las vías metabólicas, etc. Dentro de este contexto la nitrosación de numerosos compuestos puede ser bloqueada por agentes que reducen al nitrito.

Se ha observado que el ácido ascórbico (Mirvish et al., 1972), compuestos fenólicos (Groenen, 1977; Challis, 1973), ácidos fenólicos (Pignantelli et al., 1976; Walker et al., 1975, 1980), taninos (Bogovski et al., 1972) y p-nitrosfenol (Walker et al., 1979) modulan la tasa de nitrosación, sin embargo, estos estudios de cinética química no revelan si también se altera la actividad genotóxica de las mezclas resultantes (Stich et al., 1982).

La nitrosación de la metilurea conduce a la formación de mutágenos activos los cuales pueden ser detectados rápidamente por la prueba de mutagenicidad para *S.typhimurium*. Este sistema ha sido usado como un modelo para examinar el efecto de varias plantas fenólicas y taninos en presencia o ausencia de metales de transición Fe^{+3} y Mn^{+2} y mezclas complejas de sustancias, incluyendo 3 diferentes cafés. El ácido tánico y ácido clorogénico redujeron la formación de compuestos mutagénicos.

El efecto inhibitorio de esas plantas fenólicas fué similar o mayor que el del ácido ascórbico, el cual ha sido ampliamente empleado.

Es también probable que los compuestos fenólicos puedan interactuar con productos de nitrosación y así inhibir su mutagenicidad (Rosin y Stich, 1980). Sin embargo al examinar la dosis efectiva de los compuestos fenólicos, este mecanismo parece poco plausible, ya que dichas dosis no redujeron la mutagenicidad, cuando se agregaron después de la terminación de la nitrosación de la metilurea.

Los resultados de mutagenicidad en general están de acuerdo con los estudios químicos que muestran una inhibición de formación de compuestos N-nitroso por ácido tánico (Bogovski et al., 1972; Gray y Dugan, 1975), ácido gálico (Pignantelli et al., 1976) y algunos otros compuestos fenólicos (Gray y Dugan, 1975; Groenen, 1977; Kawabata et al., 1979). Sin embargo, bajo ciertas condiciones los compuestos fenólicos pueden aumentar las reacciones de nitrosación (Walker et al., 1979, 1980). En ninguna de las pruebas de mutagenicidad con el sistema de metilurea nitrosada se pudo observar una elevación significativa en la frecuencia de mutaciones cuando los compuestos fenólicos fueron agregados a la mezcla de nitrosación. Esta aparente contradicción puede ser debida a varias razones:

a) un pequeño incremento en el porcentaje de nitrosamina o formación de nitrosamina como fué observada en las pruebas químicas, puede no afectar significativamente la inducción de mutaciones, la cual dependerá principalmente de la concentración de los agentes mutagénicos y del tiempo total de exposición al mutágeno; b) el efecto catalítico de algunos compuestos fenólicos en la formación de N-nitrosaminas podría ser debido al uso de álcali para detener la reacción de nitrosación (I.A.R.C., 1980; Mirvish, 1981).

Estos dos puntos son relevantes para uno de los objetivos específicos que se plantearon para este trabajo, ya que los objetivos principales a lograr en esta investigación son los siguientes:

OBJETIVOS

A) OBJETIVO GENERAL:

- Estandarización de un modelo de reacción de nitrosación in vivo.

B) OBJETIVOS PARTICULARES:

- Probar la capacidad mutagénica de los productos formados en el ratón utilizando Salmonella typhimurium TA1535 como sensor de daño genético.
- Comprobar la capacidad inhibitoria del ácido ascórbico sobre la nitrosación de aminas.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Organismo de prueba para evaluar mutagenicidad.- La cepa bacteriana utilizada fué Salmonella typhimurium TA1535, la cual se obtuvo del laboratorio del Dr. Bruce N. Ames: Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California, 94720, BC43, U.S.A.

Ratones.- Los ratones utilizados en los experimentos fueron de la cepa CD1, los cuales se mantuvieron en bioterio con alimento para perros Purina y agua ad libitum.

REACTIVOS:

Los productos químicos que se utilizaron en los experimentos fueron: nitrito de sodio (Baker. México, D.F., México); metilurea (Baker. México, D.F., México); adipato de piperazina (Laboratorios Whintrop. México, D. F., México); clorhidrato de piperazina (Sigma Chemical, St. Louis, MO, E.U.A.); como controles positivos se utilizaron ciclofosfamida (Schering Mexicana, S.A., México D.F., México) y dimetilnitrosamina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO., E. U. A.).

DESCRIPCION DEL METODO:

En el primer modelo de nitrosación endógena se utilizó orina de ratones tratados con los compuestos que abajo se mencionan.

Cinco ratones machos de la cepa CD1 (peso promedio 35 g) por grupo, fueron expuestos oralmente durante 5 días consecutivos a los siguientes compuestos: 1) nitrito de sodio; 2) metilurea; 3) nitrito de sodio + metilurea; 4) agua.

Posteriormente se realizaron otros experimentos en los cuales los grupos formados fueron 1) adipato de piperazina; 2) nitrito de sodio; 3) adipato de piperazina + nitrito de sodio y 4) agua.

Las concentraciones utilizadas de cada uno de los químicos se encuentran en la tabla I.

Tabla I. Concentraciones de químicos utilizados en el ensayo de orinas.

Reactivo	Concentración (mg/kg)
Metilurea	12, 15 y 100
Nitrito de sodio	8, 10 y 100
Adipato de piperazina	250

Los ratones fueron colocados en jaulas metabólicas con alimento para perros Purina y agua ad Libitum. Se recolectaron muestras de orina de 24 horas; antes, después del primer día y al término del tratamiento (quinto día). Las orinas se esterilizaron por filtración a través de una membrana millipore de 0.45 micrómetros y posteriormente se utilizaron para la evaluación de la actividad mutagénica.

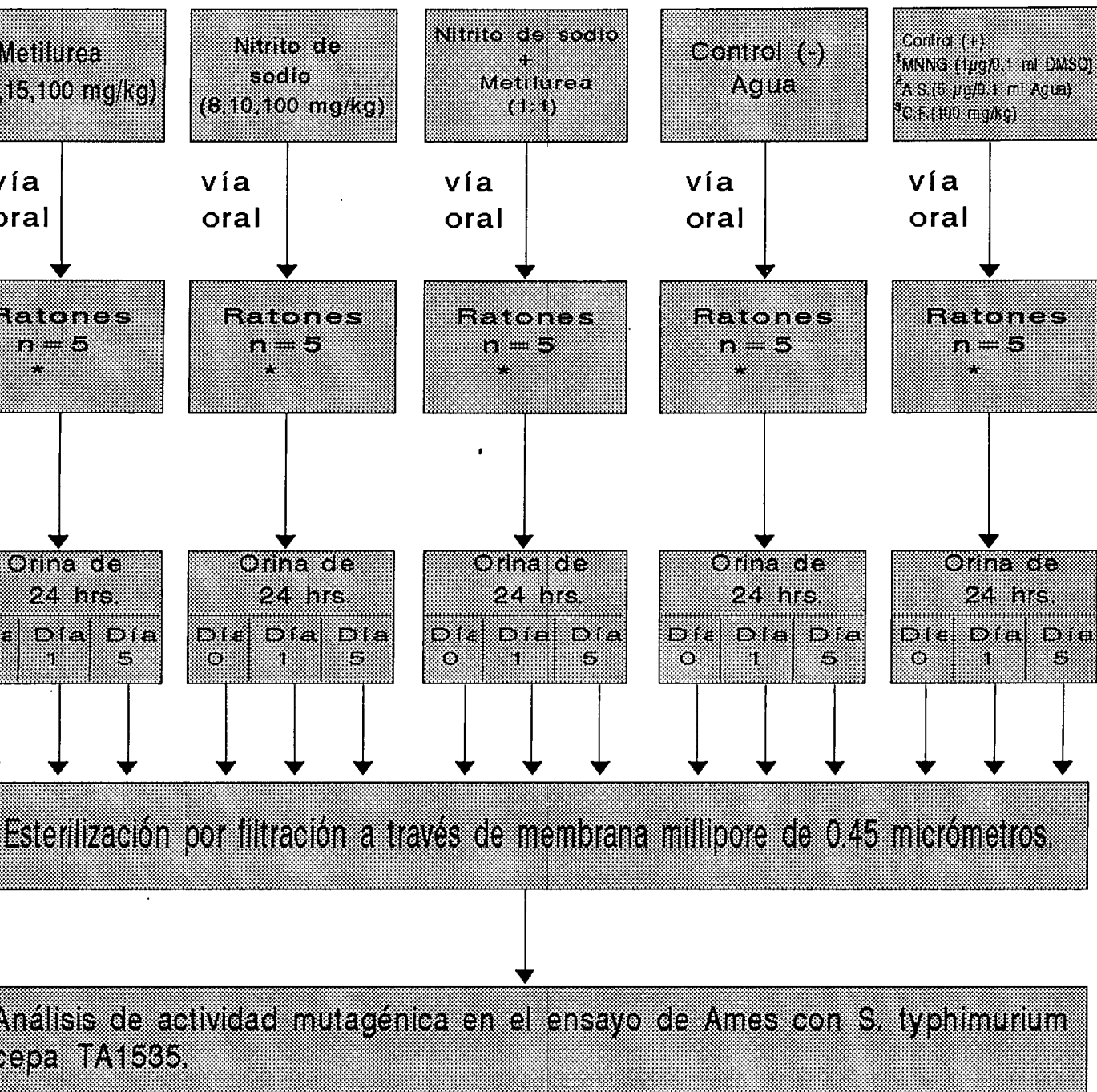
EVALUACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA.

La actividad mutagénica de la orina anteriormente recolectada fué probada en Salmonella typhimurium TA1535, de acuerdo al método reportado por Ames et al. (1975).

Descripción del método:

A un tubo conteniendo 2 ml de Agar de superficie fundido se le agregó 0.1 ml de cultivo de Salmonella typhimurium TA1535 de 16 horas y 100 o 200 microlitros de orina. Después de agitar, la mezcla se vació en cajas petri conteniendo agar Vogel-Bonner. Se incluyeron controles de bacteria no expuesta a ningún compuesto y un control positivo que fué Metil-Nitro-Nitrosoguanidina (1 microgramo en 0.1 ml de DMSO), Azida de sodio (5 microgramos en 0.1 ml de agua) y Ciclofosfamida (100 miligramos por kilogramo) (cada uno de ellos utilizado en experimentos diferentes). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

El modelo se encuentra esquematizado en las fig. 3 y 4.



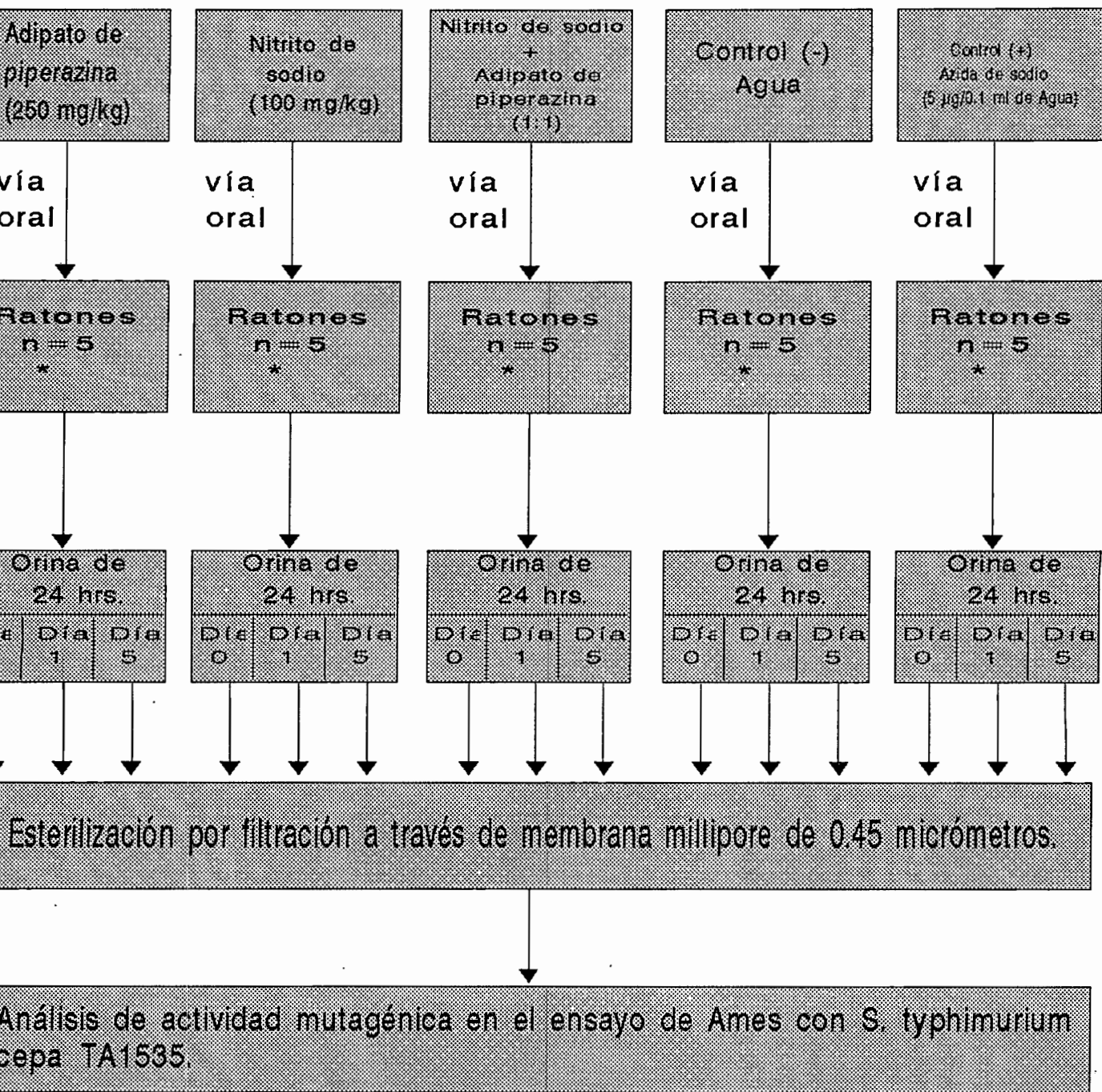
1. Metil Nitro Nitroso Guanidina

2. Azida de sodio

3. Ciclofosfamida

* Colocar los ratones en jaulas metabólicas para recolección de orina.

FIGURA 3. Modelo de reacción de Nitrosación endógena en orina utilizando metilurea y nitrito de sodio.



* Colocar los ratones en jaulas metabólicas para recolección de orina.

FIGURA 4. Modelo de reacción de Nitrosación endógena en orina utilizando adipato de piperazina y nitrito de sodio.

Recuento:

Las colonias revertantes se contaron al cabo de 48 horas de incubación a 37⁰C. Un resultado positivo se definió como un aumento en el número de revertantes que supere por más de dos veces la frecuencia de reversión espontánea y que muestre un incremento en el número de mutantes en función de la concentración del compuesto.

El segundo modelo que se utilizó fué el ensayo vía el hospedero, el cual se describe a continuación:

Los compuestos que se probaron fueron metilurea; adipato de piperazina; clorhidrato de piperazina en forma individual y combinados con nitrito de sodio; como controles positivos se utilizaron ciclofosfamida y dimetilnitrosamina. Las concentraciones utilizadas de los reactivos se encuentran reportados en la tabla II.

Tabla II. Concentraciones de químicos utilizados en el ensayo vía el hospedero.

Reactivo	Concentración (mg/kg)
Nitrito de sodio	100 y 200
Metilurea	100
Adipato de piperazina	250
Clorhidrato de piperazina	461.39
Ciclofosfamida	20
*Dimetil Nitrosamina	100

* Se administró por vía intramuscular.

En este estudio los compuestos de prueba fueron administrados oralmente. La bacteria se inoculó en la cavidad peritoneal inmediatamente después de la administración del compuesto de prueba.

Las bacterias fueron incubadas durante toda la noche para obtener una densidad aproximada de $1-2 \times 10^9$ células/ml en un baño de agua con agitación. 0.5 ml de este cultivo se transfirió a 4.5 ml de caldo nutritivo fresco e incubado por 2 horas. Una aguja de calibre 25 se utilizó para inocular 2 ml de suspensión de células dentro de la cavidad peritoneal del ratón después de que el área de inoculación fué limpiada con etanol. El peso de los animales fué de 25 a 30 gramos. Después de 3 a 4 horas de haber inoculado la suspensión de bacterias, la región abdominal del ratón muerto fué limpiada con etanol y se inyectaron 2 ml de solución salina estéril dentro de la cavidad peritoneal. La piel de la región abdominal se empujó hacia atrás de tal manera que la aguja pudo ser insertada para recuperar el fluido. La muestra obtenida de cada ratón se procesó separadamente.

El modelo se encuentra esquematizado en las Fig. 5, 6 y 7.

VIABILIDAD:

Se prepararon en el momento tubos para dilución, conteniendo 4.5 ml de solución salina estéril.

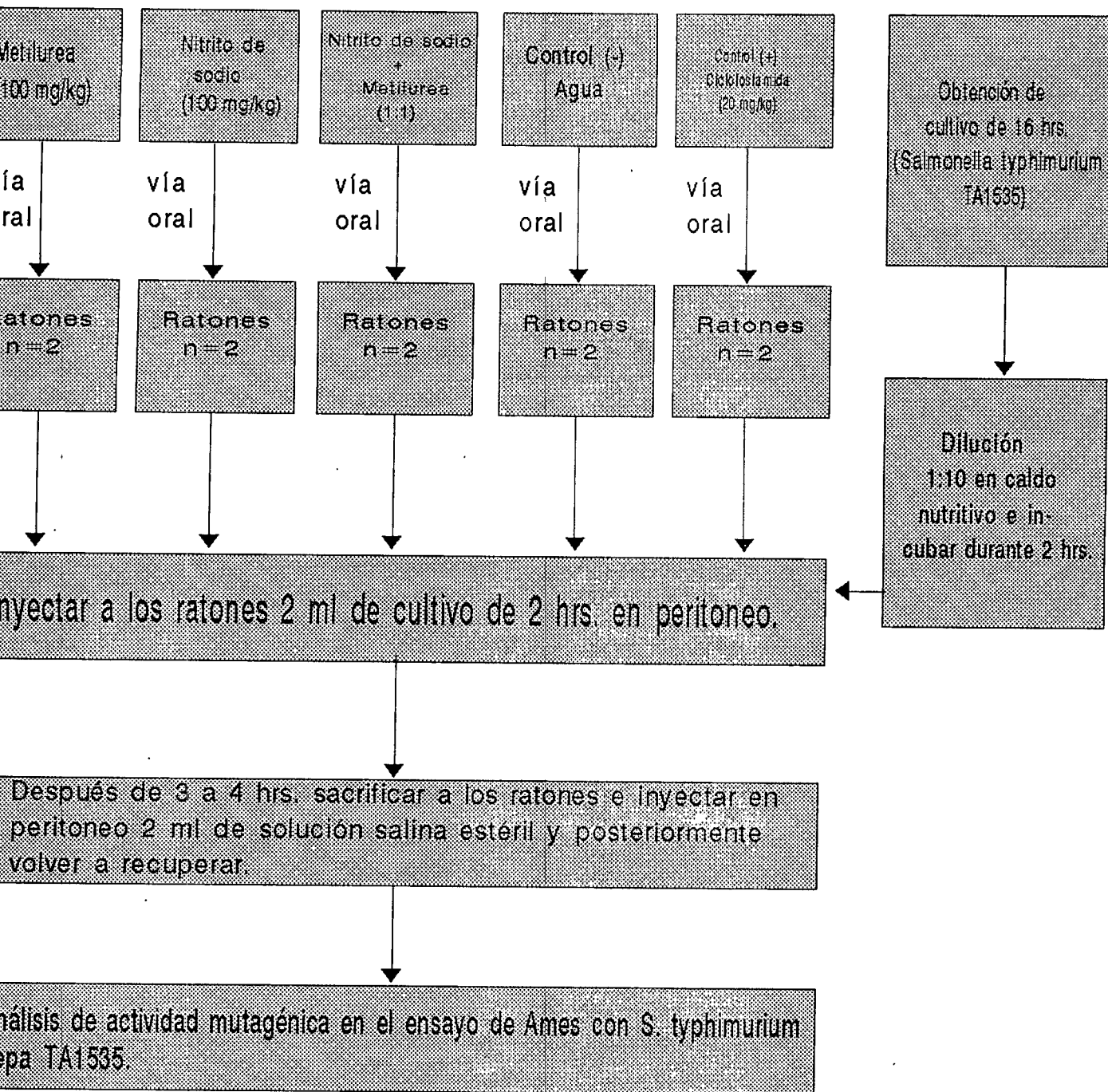


FIGURA 5. Ensayo vía el Hospedero utilizando metilurea y nitrito de sodio.

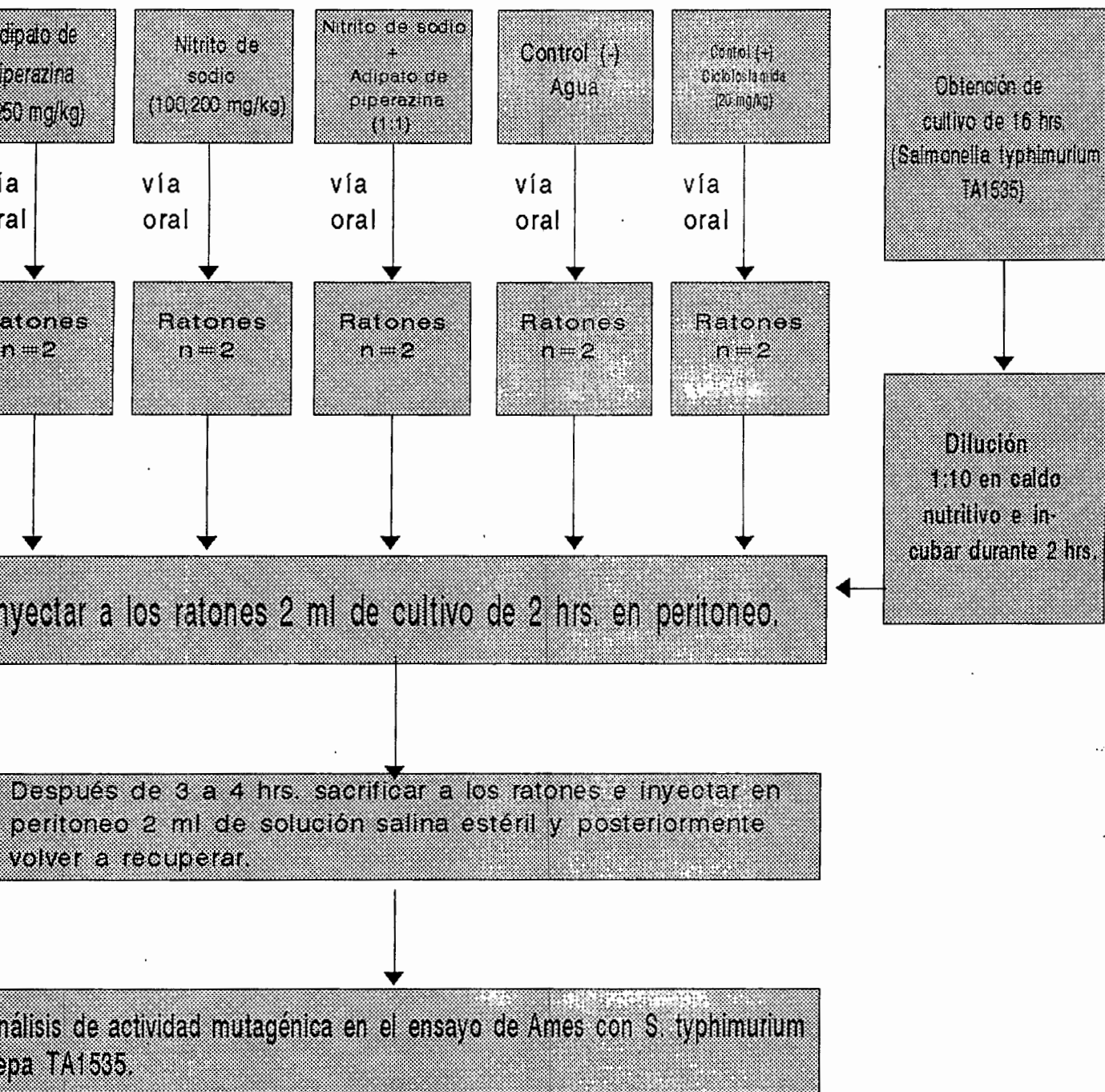


FIGURA 6. Ensayo vía el Hospedero utilizando adipato de piperazina y nitrito de sodio.

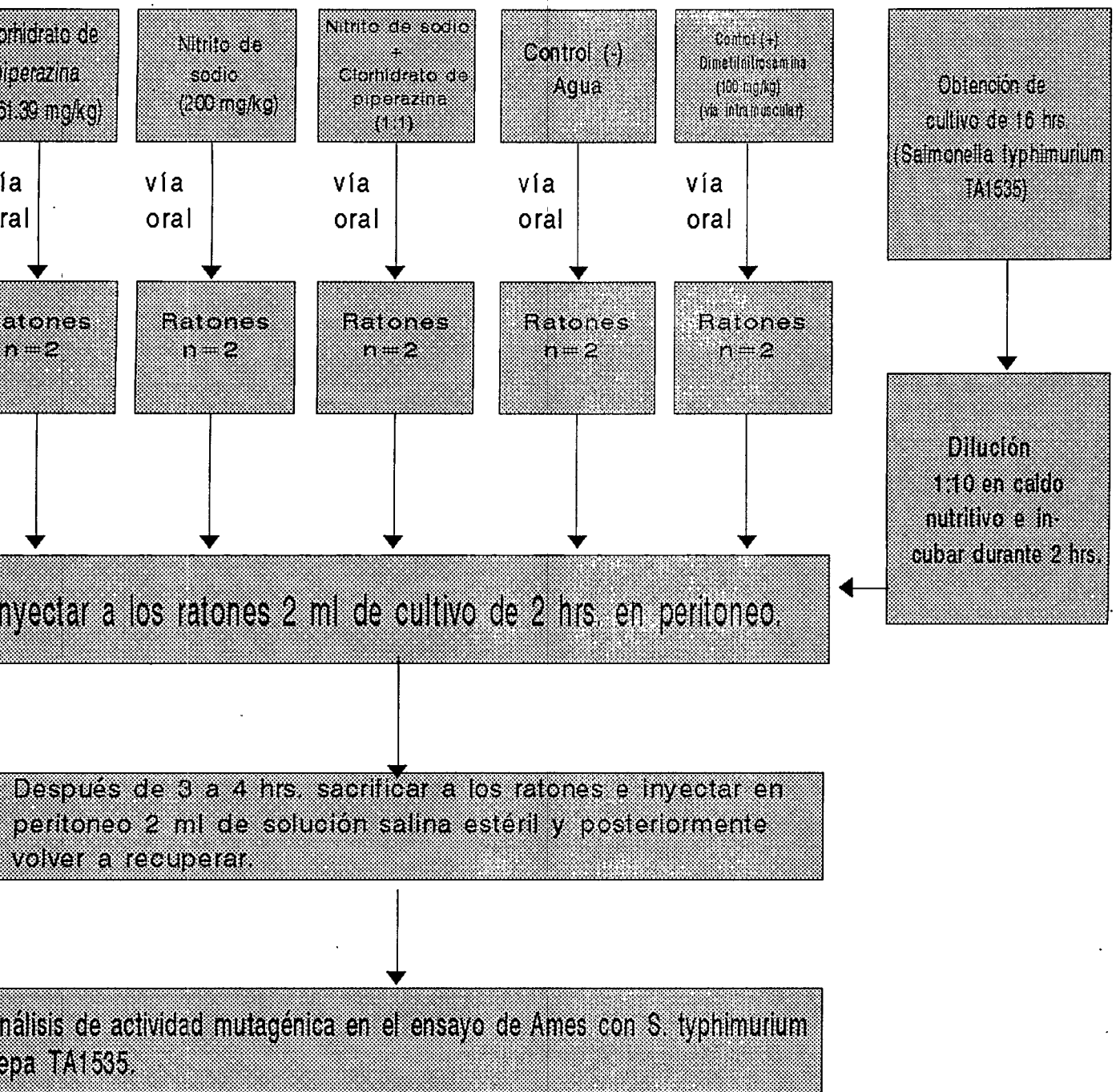


FIGURA 7. Ensayo vía el Hospedero utilizando clorhidrato de piperazina y nitrito de sodio.

Se hicieron siete diluciones seriadas de cada exudado peritoneal (0.5 + 4.5 ml) produciendo series de concentraciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .

Para el conteo total de bacterias, de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} fueron sembrados 0.2 ml en cajas de medio completo, 3 cajas por muestra.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA:

El sembrado para conteo de mutantes totales se realiza sobre medio mínimo, sembrando 0.2 ml del fluido peritoneal sin diluir en cada una de cuatro cajas. El procedimiento de sembrado fué idéntico al seguido para las cajas con medio completo. Las cajas con medio completo y mínimo se incubaron 24 y 48 horas respectivamente.

Recuento:

Las colonias revertantes se contaron al cabo de 48 horas de incubación a 37°C . Un resultado positivo se define como un aumento en el número de revertantes que supere por más de dos veces la frecuencia de reversión espontánea y que muestre un incremento en el número de mutantes en función de la concentración del compuesto.

RESULTADOS Y DISCUSION

La tabla III muestra los resultados de experimentos realizados con el primer modelo de Nitrosación Endógena.

TABLA III. Mutagenicidad de orina de ratones tratados con diferentes precursores de nitrosación: En el ensayo de Salmonella typhimurium TA1535.

TRATAMIENTO	No. de revertantes/caja		
	T=0 ^a	TA1535 T=1 ^b	T=5 ^c
MU 12 mg/kg + N 8 mg/kg			
Exp. 1	21	34	23
Exp. 2	35	48	44
agua ^d	26	37	41
MU 16 mg/kg + N 10 mg/kg			
Exp. 3	43	39	36
agua ^d	31	36	25
MU 100 mg/kg + N 100 mg/kg			
Exp. 4	30	31	33
agua ^d	38	40	32
AP 250 mg/kg + N 100 mg/kg			
Exp. 5	35	36	37
agua ^d	33	37	29

^aT=0 Antes del tratamiento; ^bT=1 después del primer día de tratamiento;

^cT=5 Después del quinto día de tratamiento.

^dControl negativo.

Los controles positivos que se utilizaron fueron:

Azida de sodio (50 µg/ml); Metil Nitro Nitroso Guanidina (1 µg/ml); Clotofosfamida (100 mg/kg).

En todos los casos se obtuvieron más de 500 col./caja.

El volumen de orina utilizado en todos los casos fué de 0.2 ml.

Todas las muestras se trabajaron por triplicado.

Todos los precursores al ser administrados individualmente presentaron resultados negativos.

MU.-metilurea; N.-nitrito de sodio; AP.-adipato de piperazina.

En ninguno de los casos se tuvieron valores de la media que fueran por lo menos dos veces el valor de la media del control negativo, aún cuando la metilurea combinada con el nitrito de sodio fueron probados a diferentes concentraciones, con las características de los ratones y las condiciones para su mantenimiento; así como la obtención y esterilización de la muestra a estudiar según la técnica descrita en material y métodos.

El ensayo vía el Hospedero fué probado como una alternativa de detección de CONN al primer método propuesto para este proyecto; debido a que no se obtuvieron resultados significativos que nos permitieran aceptar el modelo como el idóneo para lograr los objetivos propuestos. Los primeros resultados se muestran en la tabla IV.

TABLA IV. Efectividad mutagénica de nitrito de sodio y metilurea; en el ensayo vía el hospedero con Salmonella typhimurium TA1535 como indicador genético.

Grupos	rev./caja
Nitrito de sodio	5 (0.0)
Agua	10 (0.0)
Metilurea 1	20 (1.0)
Metilurea 2	11 (0.0)
Metilurea 3	8 (0.0)
Nitrito + Metilurea 1	17 (0.0)
Nitrito + Metilurea 2	11 (0.0)
Nitrito + Metilurea 3	13 (0.0)

Los compuestos fueron administrados por vía oral simultáneamente a la inyección bacteriana. El tiempo de incubación de la bacteria fué limitada a 3 horas en todos los casos. Nitrito de sodio 100 mg/kg; Metilurea 100 mg/kg; agua; Reversión espontánea S.t. TA1535 (19 rev/caja). El valor entre paréntesis es el resultado de la división de el valor obtenido sobre la reversión espontánea.

La metilurea y el nitrito de sodio fueron probados nuevamente en el ensayo vía el Hospedero.

Al realizar la comparación entre las medias de los resultados obtenidos con la de revesión espontánea de *S.typhimurium* TA1535, nos podemos dar cuenta de que en ninguno de los casos los valores llegan por lo menos al doble de la media de la reversión espontánea de *S.typhimurium* TA1535 (los valores dentro del paréntesis son los cocientes de las medias por la reversión espontánea de *S.Typhimurium* TA1535).

Al no haberse obtenido resultados positivos en los ensayos de mutagénesis con metilurea se decidió probar el adipato de piperazina. Resultados de algunos experimentos se muestran en la tabla V.

TABLA V. Efectividad mutagénica de nitrato de sodio y adipato de piperazina; en el ensayo vía el hospedero con *Salmonella typhimurium* TA1535 como indicador genético.

Grupos	Exp. 1 rev./caja		Exp. 2 rev./caja		Exp. 3 rev./caja	
N1	21	(0.0)	14	(0.0)	18	(0.0)
N2	26	(1.2)	13	(0.0)	22	(1.0)
Pz1	32	(1.4)	19	(0.0)	13	(0.0)
Pz2	36	(1.6)	17	(0.0)	13	(0.0)
N + Pz1	36	(1.6)	14	(0.0)	15	(0.0)
N + Pz2	28	(1.3)	24	(1.1)	24	(1.1)
Cf1	23	(1.0)	17	(0.0)	14	(0.0)
Cf2	27	(1.2)	19	(0.0)	10	(0.0)
A1	16	(0.0)	30	(1.4)	17	(0.0)
A2	23	(1.0)	22	(1.0)	8	(0.0)

Los compuestos fueron administrados por vía oral simultáneamente a la inyección bacteriana. El tiempo de incubación de la bacteria fué limitado a 3 horas en todos los casos.

N (nitrito de sodio 200 mg/kg); Pz (adipato de piperazina 250 mg/kg);

A (agua); Reversión espontánea S.t. TA1535 (22 rev./caja).

El valor entre paréntesis es el resultado de la división de el valor obtenido sobre la reversión espontánea.

En estos experimentos se aumentaron las dosis de nitrito de sodio y adipato de piperazina. La concentración de nitrito es la que se encuentra reportada en la bibliografía como la más alta que soportan los ratones sin llegar a ser tóxica.

En ninguno de los experimentos que se presentan en la tabla se observa efectividad mutagénica.

El adipato de piperazina presentó problemas en la solubilidad por lo que se probó el clorhidrato de este mismo compuesto, aumentando la concentración a 461.39 mg/kg.

En la tabla VI se presentan los resultados obtenidos con las nuevas concentraciones.

TABLA VI. Efectividad mutagénica de nitrito de sodio + clorhidrato de piperazina; en el ensayo vía el hospedero con Salmonella typhimurium TA1535 como indicador genético.

Grupos	Exp.1 rev./caja		Exp.2 rev./caja	
N1	35	(1.8)	13.5	(0.0)
N2	31.25	(1.6)	37.75	(1.9)
Pz1	14.75	(0.0)	14.0	(0.0)
Pz2	18.75	(0.0)	14.25	(0.0)
N + Pz1	48.25	(2.5)	50.75	(2.6)
N + Pz2	73.75	(3.8)	40.0	(2.1)
A1	17.5	(0.0)	14.5	(0.0)
A2	31.75	(1.6)	18.75	(0.0)
DMN1	42	(2.2)	36.0	(1.9)
DMN2	97	(5.1)	98.5	(5.1)

Los compuestos fueron administrados por vía oral simultáneamente a la inyección bacteriana. El tiempo de incubación de la bacteria fué limitado a 4 horas en todos los casos. N (nitrito de sodio 200 mg/kg); Pz (clorhidrato de piperazina 461.39 mg/kg); DMN (dimetilnitrosamina 100 mg/kg); Reversión espontánea S.t. TA1535 (19 rev./caja); A (agua).

Los valores entre paréntesis son el resultado de la división de el valor obtenido sobre la reversión espontánea.

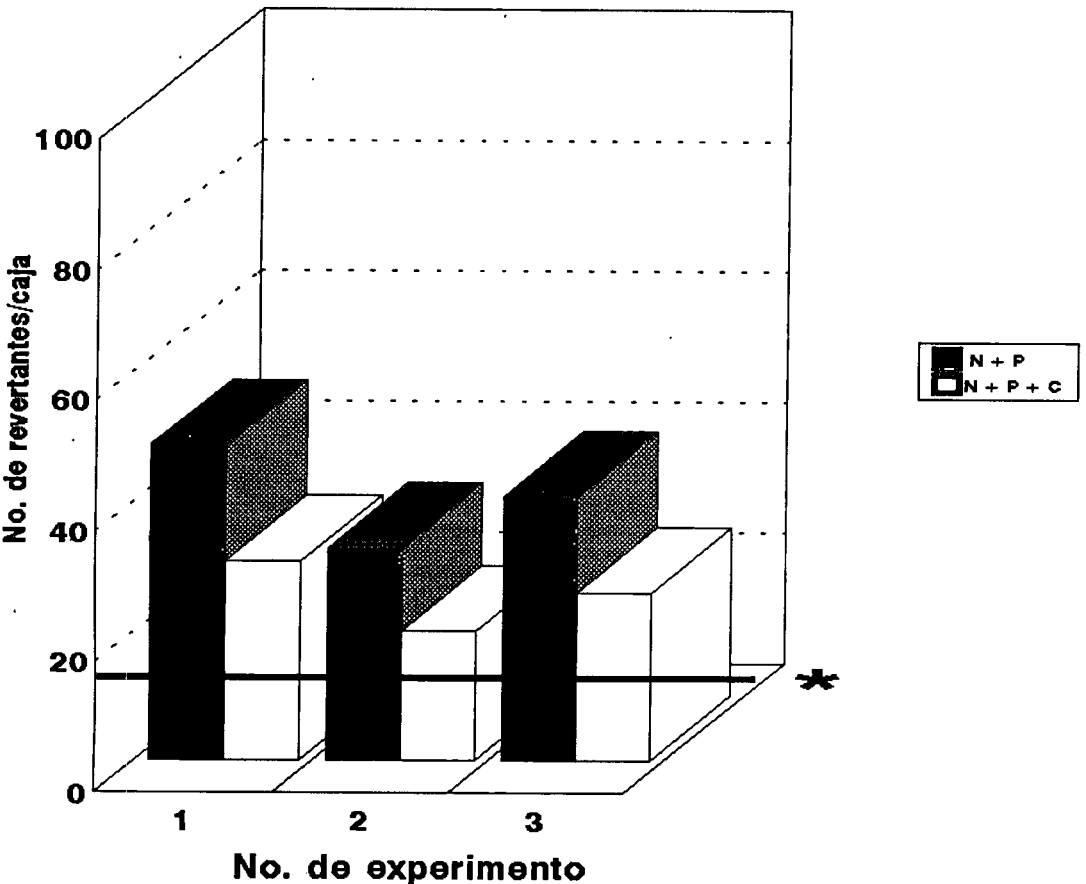
En estos experimentos, además de aumentar la dosis de piperazina, también se alargó el tiempo de incubación de la bacteria, esto es, el tiempo que dura la bacteria dentro de la cavidad peritoneal del ratón después de administrar la dosis oral de los compuestos de prueba.

En los resultados se observa un ligero aumento del número de revertantes de Salmonella que estuvieron en contacto con nitrito de sodio + clorhidrato de piperazina. Se realizaron más pruebas para comprobar que realmente eran reproducibles los resultados. Tal vez habría que aumentar las concentraciones de los precursores para obtener resultados más francos positivos; sin embargo, existe la limitante de que al hacerlo, estas resultarían tóxicas para el animal. Estos resultados nos sugieren recomendar la utilización de otros bioensayos que incluyan activadores metabólicos.

Al lograr reproducibilidad de los resultados con las condiciones de concentración y tiempo empleadas en estos últimos experimentos, este ensayo se aceptó como el modelo de nitrosación endógena a utilizar en la siguiente fase del proyecto la cual consiste en probar extractos de vegetales como posibles inhibidores de la nitrosación, sin embargo esta fase no forma parte de los objetivos del presente trabajo.

Finalmente se probó el ácido ascórbico como inhibidor de la formación de CONN en este modelo de nitrosación; los resultados se presentan en la siguiente figura.

FIGURA 8. Efectividad mutagénica de nitrito de sodio + clorhidrato de piperazina; inhibición de la actividad mutagénica al agregar vitamina C en el ensayo vía el hospedero.



Los compuestos fueron administrados por vía oral simultáneamente a la inyección bacteriana. El tiempo de incubación de la bacteria fué limitado a 4 horas en todos los casos.
 N (nitrito de sodio 200 mg/kg); Pz (clorhidrato de piperazina 461.39 mg/kg); DMN (dimetilnitrosamina 200 mg/kg); C (vit. C 200 mg/kg); Reversión espontánea S.t. TA1535 (13 rev./caja).
 *Medio de la reversión espontánea de Salmonella typhimurium TA1535.

En esta figura se observa que hay una disminución en los valores obtenidos cuando se probaron en combinación nitrito de sodio + clorhidrato de piperazina + vit. C, estos resultados apoyan lo propuesto para el ácido ascórbico como un inhibidor de la formación endógena de compuestos N-nitroso.

Podemos concluir que el ensayo vía el hospedero puede ser usado como un primer tamiz en la detección de inhibidores de nitrosación endógena. Sin embargo, debido a que en el mejor de los casos la frecuencia de mutación en Salmonella se incrementa a poco más del doble con respecto a la frecuencia espontánea, el método propuesto podría resultar poco específico generando resultados falsos negativos con frecuencia. Por ello es necesaria la búsqueda de mejores alternativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACHTZEHN, M. K. y HAWAT, H. (1970) Formación de nitratos en los vegetales y sus productos. Primera parte. Espinaca cruda. Die Nahrung 14: 383-394.

ALARIF, A. and EPSTEIN, S. S. (1974) The uptake and metabolism of ¹⁴C-labelled nitrosomethylurethane and nitrosomethylurea in guinea pigs and their in vitro metabolism in the guinea pig and human pancreas. IARC Sci. Publ. 9: 215-219.

AMES, B. N.; LEE, F. D. y DURSTON, W. E. (1973) An Improved Bacterial Test System for the Detection and Clasification of Mutagens and Carcinogens. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 70:782-786.

AMES, B. N.; McCANN Y YAMASAKI, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/mammalian-microsome Mutagenicity test. Mutat. Res. 31:347-364.

AMES, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science 221: 1256-1264.

AMES, B. N.; MAGAW, R. y SWIRSKY, G. L. (1987) Jerarquización de posibles peligros carcinogénicos. Science 236: 271.

ARRIAGA M.; ESPINOSA, J. J.; CORTINAS, C. (1988) Mutagenicity of products generated by the reaction between several antiparasitic drugs and nitrite. Environ Mutagen 12: 65-73.

ARRIAGA ALBA, M.; ESPINOSA AGUIRRE, J.; RAMIREZ, J. and CORTINAS de NAVIA, C. (1989) Mutagenicity of Urine From Mice Exposed Orally to Nitrite and Various Aminated Antiparasitic Drugs. Environmental and Molecular Mutagenesis 14:13-19.

ASAHINA, S.; FRIEDMAN, M. A.; ARNOLD, E.; MILLAR, G. N.; MISHKIN, M.; BISHOP, Y. and EPSTEIN, S. S. (1971) Acute synergistic toxicity and hepatic necrosis following oral administration of sodium nitrite and secondary amines to mice. Cancer Res. 31: 1201-1205.

BARTSCH, H. and MONTESANO, R. (1984) Relevance of nitrosamines to human cancer. Carcinogenesis 5: 1381-1396.

BLATTMAN, L. and PREUSSMAN, R. (1974a) Biotransformación de las dialquinitrosaminas carcinógenas. Nuevos metabolitos de las di-n-butyl y las di-n-pentilnitrosaminas encontrados en la orina. Z. Krebsforsch 81: 75-78.

BLATTMAN, L.; JOSWIG, N. and PREUSSMAN, T. (1974b) Estructura de los metabolitos de la metil-n-butil-nitrosamina carcinógena en la orina de ratas. Z. Krebsforsch 81: 71-73.

BOGOVSKI, P. M.; CASTEGNARO, B.; PIGNANTELLI, B. and WALKER, E. A. (1972) The inhibiting effect of tannins on the formation of nitrosamines. In: BOGOVSKI, P.; PREUSSMANN, R. and WALKER, E. A., eds, N-nitroso compounds, Analysis and Formation. IARC Scientific Publications No. 3. International Agency for Research on Cancer. Lyon. pp. 127-129.

BROWN, J. R. and SMITH, G. E. (1967) Nitrate accumulation in vegetable crops as influenced by soil fertility practises. Columbia, Universidad de Misuri. Res. Bull 920: 43.

FALMELS, S.; OHSHIMA, H.; ROSENKRANZ, H.; McCOY, E. and BARTSCH, H. (1987a) Biochemical studies on the catalysis of nitrosation by bacteria. Carcinogenesis 8: 1085-1088.

FAVETT, J. J. (1962) The microbiology of vacuum-packed sliced bacon. J. Appl. Bact. 25: 282-289.

CHALLIS, B. C. y CHALLIS, J. A. (1970) Reactions of the carboxamide group. En: Zabicky, J. (Ed.). The Chemistry of Amides. Londres: Interscience. Págs. 733-848.

CHALLIS, B. C. (1973) Rapid nitrosation of phenols and its implications for health hazards from dietary nitrites. Nature (London), 244-466.

COMITE DE NORMAS SOBRE ALIMENTOS. (1959) Preservatives in Food. Londres, Her Majesty's Stationery Office.

CORREA, P. (1988) A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res. 48: 3554-3560.

CORTINAS DE NAVA Y ESPINOSA A. (1990) Módulo de carcinogénesis en: J. Corey (Ed.) Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Mundial de la Salud. Metepec, Edo. de México, México.

FRUTTON, A. H. and HEATH, D. F. (1956) Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice. Nature 178: 644.

FRUNDER, F. and CEH, L. Z. (1971) Conditions and chemical reaction mechanisms by which nitrosamines may be formed in biological products with reference to their possible occurrence in food products. Z Lebensm Unters Forsch 145(3): 133-142.

FRUSTEIN, S. (1972) In vivo studies on interactions between secondary amines and nitrites or nitrates. IARC Sci. Publ. 3: 109-115.

- FORMAN, D. (1987) Dietary exposure to N-nitroso compounds and the risk of human cancer. *Cancer Surv.* 6: 719-738.
- FORMAN, D. (1989) Are nitrites a significant risk factor in human cancer?. *Cancer Surv.* 8: 443-458.
- FRASER, P. (1985) Nitrates-epidemiological evidence. In: WALD, N. J. and DOLL, R., eds., *Interpretation of Negative Epidemiological Evidence for Carcinogenicity (IARC Scientific Publications No. 65)*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp183-194.
- FRIEDMAN, M. A.; GREENE, F. J. y EPSTEIN, S. S. (1972) Rapid gastric absorption of sodium nitrite in mice. *J. Pharm. Sci.* 61(9): 1492-1494.
- GRAY, J. I. and DUGAN, L. R. (1975) Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40: 981-984.
- GROENEN, P. J. (1977) A new type of N-nitrosation inhibitor. In: TINBERGEN, B. J. and KROL, B., eds, *Proc. 2nd Int. Symp. Nitrite in Meat Products. Pudoc. Wageningen.* pp. 171-172.
- HAWKSWORTH, G. and HILL, M. J. (1971b) Bacteria and the N-nitrosation of secondary amines. *Br. J. Cancer* 25: 520-526.
- HEATH, D. F. (1962) The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamines in rats. *Biochem. J.* 85: 72-91.
- HOWSON, C. P.; HIRAYAMA, T. and WYNDER, E. L. (1986) The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol. Rev.* 8: 1-27.
- IARC. (1974) Diethylstilbestrol (Stilbestrol). Monograph. 6.
- IARC. (1980) Annual Report 1980. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. pp. 113-115.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS-UNAM. (1980) Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales. Vol.1.
- USKIEWICZ, T. and KOWALSKI, B. (1974) Passage of nitrosamines into milk in goats. *IARC Sci. Publ.* 9: 173-176.
- YAMADA, T.; MORITA, K. and INOUE, T. (1978) Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Res.* 53: 351-353.

- KNIGHT, T.; PIRASTU R.; PALLI, D.; COCCO, P.; LEACH, S.; PACKER, P.; IANNARILLI, R.; MANCA, P.; MOLLER, H. and FORMAN, D. (1992) Nitrate and N-nitrosoproline excretion in two Italian regions with contrasting rates of gastric cancer: the role of nitrate and other factors in endogenous nitrosation. *Int. J. Cancer*:50, 736-739.
- KORENBERG, J. R. y FREEDLENDER, E. F. (1974) *Chromosoma* 48: 355-360.
- LIJINSKY, W. (1980) Significance of in vivo formation of N-nitroso compounds. *Oncology* 37: 223-226.
- LO, L. W. and STICH, H. F. (1978) The use of short-term test to measure the preventive action of reducing agents on formation and activation of carcinogenic nitroso compounds. *Mutation Res.* 57: 57-67.
- MAGEE, P. N. (1956) Toxic liver injury. The metabolism of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 64: 676-682.
- MAGEE, P. N. and BARNES, J. M. (1967) Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.* 10: 163-246.
- MALINS, D. C.; ROUBAL, W. T. and ROBISCH, P. A. (1970) The possible nitrosation of amines in smoked chub. *J. Agric. Food Chem.* 18(4): 740-741.
- MARLETTA, M. A. (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chemical Research Toxicology* 1: 249-257.
- NETTLIN, C. (1988) Epidemiological studies in gastric adenocarcinoma. In: DOUGLAS, H. O., ed., *Gastric Cancer*, New York, Churchill Livingstone, pp 1-25.
- IRVISH, S. S. (1970) Kinetics of dimethylamine nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 44(3): 633-639.
- IRVISH, S. S. (1971) Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethanes and alkylguanidinem possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 46: 1183-1193.
- IRVISH, S. S.; WALLCAVE, L.; EAGEN, M. and SHUBIK, P. (1972) Ascorbate nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science* 177: 65-68.

MIRVISH, S. S.; ARNOLD, S.; CONRAD, E.; GHADIRIAN, P.; KOMMINENI, V. R. C. and SAMS J. (1974) The formation of N-nitroso compounds, preparation of heptafluorobutyryl derivatives of ureas, and the fate of nitrite in the rat stomach. IARC Sci. Publ. 9: 67-70.

MIRVISH, S. S. (1975) Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31: 325-351.

MIRVISH, S. S. (1981) Inhibition of the formation of carcinogenic N-nitroso compounds by ascorbic acid and other compounds. In: BURCHENAL, J. H. and OETTGEN, H. F., eds, Cancer 1980: Achievements, Challenges, and prospects for the 1980's Vol. 1, Grune and Stratton, New York, pp. 557-587.

MIRVISH, S. S. (1983) The etiology of gastric cancer-intragastric nitrosamide formation and other theories. J. Natl Cancer Inst. 71: 629-647.

MIWA, M.; STUEHR, D.J.; MARLETTA, M. A.; WISHNOK, J. S. and TANNENBAUM, S. R. (1987) Nitrosation of amines by stimulated macrophages. Carcinogenesis 8: 955-958.

MUÑOZ, N. (1988) Descriptive epidemiology of gastric cancer. In: REED, P. I. and HILL, M. J., eds, Gastric Carcinogenesis, Amsterdam, Excerpta Medica, pp 51-69.

MYSLIWI, T. S.; WICK, E. L.; ARCHER, M. C.; SHANK, R. C. and NEWBERNE, P. M. (1974) Formation of N-nitrosopyrrolidine in a dog's stomach. Br. J. Cancer 30: 279-283.

OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. (1981) Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitroso proline excreted in the urine. Cancer Res. 41: 3658-3662.

OKADA, M. and SUZUKI, E. (1972) Metabolism of butyl (4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. Gan. 63: 391-392.

OKADA, M.; SUZUKI, E.; ANJYO, T. and MOCHIUKI, M. (1975) Mutagenicity of O-acetoxy-dialkyl nitrosamines: model compounds for an ultimate carcinogen. Gan. 66(4): 457-458.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. (O.M.S., 1980) Nitratos, nitritos y compuestos de N-nitroso. Criterios de Salud Ambiental 5 .

PARKIN, D. M., LÄÄRÄ, E. and MUIR, C. S. (1988) Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. Int. J. Cancer 41: 184-197.

PENSABENE, J. W.; FIDDLER, W.; GATES, R. A.; FAGAN, J. C. and WASSERMAN, A. E. (1974) Effect of frying and other cooking conditions on nitrosopyrrolidine formation in bacon. J. Food Sci. 39: 314-316.

PHILLIPS, J. C.; LAKE, B. G.; HEADING, C. E.; GANGOLLI, S. D. and LLOYD, A. G. (1975a) Studies on the metabolism of dimethylnitrosamine in the rat. I. Effect of dose, route of administration and sex. Food Cosmet. Toxicol. 13: 203-209.

PHILLIPS, W. E. J. (1968a) Changes in the nitrate and nitrite contents of fresh and processed spinach during storage. J. Agric. Food Chem. 16(1): 88-91.

PIGNANTELLI, B.; CASTEGNARO, M. and WALKER, E. A. (1976) Effects of gallic acid and of ethanol on formation of nitrosodiethylamine, In: WALKER, E. A.; BOGOVSKI, P. and GRICIUTE, L., eds, Environmental N-nitroso Compounds, Analysis and Formation. IARC Scientific Publications No. 14, International Agency for Research on Cancer. Lyon. pp 173-178.

PREUSSMANN, R. (1983) Public health significance of environmental N-nitroso compounds. In PREUSSMANN, R., O'NEIL, I. K.; EISENBRAND, G.; SPREGELHALDER, B.; BARTSH, H., eds, IARC Scientific Publications No. 45. Lyon: International Agency for Research on Cancer, pp. 3-17.

RIDDER, W. E. and OEHME, F. W. (1974) Nitrates and environmental, animal, and human hazard. Clin. Toxicol. 7(2): 145-159.

ROSIN, M. P. and STICH, H. F. (1980) Enhancing and inhibiting effects of propyl gallate on carcinogen-induced mutagenesis. J. Environ. Pathol. Toxicol. 4: 159-167.

SANDER, J. y BÜRKLE, G. (1969) Producción de tumores malignos en ratas mediante alimentación simultánea con nitrito y aminos secundarias. Z. Krebsforsch 73: 54-66.

SANDER, J. (1971a) Investigaciones sobre la formación de compuestos carcinógenos de nitroso en el estómago de animales sometidos a experimentos, y significado para el ser humano I. Arzneim Forsch 21: 1703-1707.

SANDER, J. y SCHWEINSBERG, F. (1972) In vivo and in vitro experiments on the formation of N-nitroso compounds from amines and nitrate or nitrite. IARC Sci. Publ. 3: 97-103.

SANDER, J.; LABAR, J.; LADENSTEIN, M. and SCHWEINSBERG, F. (1974a) Quantitative measurement of in vivo nitrosamine formation. IARC Sci. Publ. 9: 123-131.

- SCHUPHAN, W. (1965) El contenido de nitrato de la espinaca (*Spinaca oleracea*, L) en relación con la metahemoglobinemia en los niños. *Z. Ernaehrungswiss* 5(3-4): 207-209.
- SEBRANEK, J. G.; CASSENS, R. G. and HOEKSTRA, W. G. (1974) Fate of added nitrite. En: *Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products*, Ziest, 10-14 September 1973. Wageningen, Centro de Publicaciones Agrícolas y Documentación. pp. 139-147.
- SCHRAUZER, G. N. and ISHMAEL, D. (1974) Effects of selenium and of arsenic on the genesis of spontaneous mammary tumors in inbred C3H mice. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 4: 441-447.
- SEN, N. P. (1970) Gas-liquid chromatographic determination of dimethylnitrosamine as dimethylnitramine at oicogram levels. *J. Chromatog.* 51: 301-304.
- SEN, N. P. (1974) Nitrosamines in toxic Constituents in Animal Foodstuffs. Nueva York: Academic Press., Inc., pp. 131.
- SEN, N. P.; MILES, W. F.; DONALDSON, B.; PANALAKS, T. and IYENGAR, J. R. (1973b) Formation of nitrosamines in meat curing mixture. *Nature* 245: 104-105.
- SEN, N. P.; IYENGAR, J. R.; DONALDSON, B. A. and PANALAKS, T. (1974b) Effect of sodium nitrite concentration on the formation of nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamine in fried bacon. *J. Agric. Food Chem.* 22(3): 540-541.
- SHEPHARD, S. E.; SCHLATTER, C. and LUTZ, W. K. (1987) Assessment of the risk of formation of carcinogenic N-nitroso compounds from dietary precursors in the stomach. *Food and Chemical Toxicology* 25: 91-108.
- SPENCER, R. (1967) A study of factors affecting the quality and shelf life of vacuum packed bacon, and of the behaviour of Wilshire cooked bacon packed and stored under controlled conditions. *BFMIRA Res. Rep.* 136.
- SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, G. and PREUSSMAN, R. (1976) The influence of dietary intake of nitrate on the nitrite content in human saliva: a factor of possible relevance for in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet. Toxicol.* 14(6): 545-548.
- STEWART, B. W., SWANN, P. F., HOLSMAN, J. W. and MAGEE, P. N. (1974) Cellular injury and carcinogenesis. Evidence for the alkylation of rat liver nucleic acids in vivo by N-nitrosomorpholine. *Z. Krebsforsch* 82(1): 1-12.

STICH, H. F. and POWRIE, W. D. (1982) Plant phenolics as genotoxic agents and as modulators for the mutagenicity of other food components. In: STICH, H. F., ed, Carcinogens and Mutagens in the Environment, Vol. 1, Food Products, CRC Press. Boca Raton, Florida.

VIOLA, P. L. et al. (1971) Oncogenic response of rat skin, lungs and bones to vinyl chloride. Cancer Res. 31: 516-522.

VOGEL, W. y BAUKNECHT, T. (1976) Nature (London) 260: 448-449.

VON SCHNEIDER, J.; WARZOK, R.; SCHWARZ, M. (1977) Endogene bildung Kanzarogener N-nitroso verbindungen Nach Gabe von Pharmake und nitrit an Ratten. Exp Phathol 13: 32-43.

WALKER, E. A.; PIGNANTELLI, B. and CASTEGNARO, M. (1975) Effects of gallic acid on nitrosamine formation. Nature (London) 258: 176.

WALKER, E. A.; PIGNANTELLI, B. and CASTEGNARO, M. (1979) Catalytic effect of p-nitrosophenol on the nitrosation of diethylamine. J. Agr. Food Chem. 27: 393-396.

WALKER, E. A.; PIGNANTELLI, B. and CASTEGNARO, M. (1980) The promoting effect of phenols on formation of NDEA. IARC Annual Report 1980. Lyon. pp. 45-47.

WALTERS, C. L. (1971) The detection and estimation of trace amounts of N-nitrosamines in a food matrix. Lab. Pract. 20: 574-578.

WATTENBERG, L. W. (1979) Naturally occurring inhibitors of chemical carcinogenesis. In: MILLER, E. C.; MILLER, J. A.; HIRONO, I.; SUGIMURA, T. and TAKAYAMA, S., eds, Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Cercinogenesis. Jpn. Sci. Soc. Press. Tokyo/Univ. Park Press. Baltimore. pp. 315-329.

WATTENBERG, L. W.; COCCIA, J. B. and LAM, L. K. T. (1980) Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. Cancer Res. 40: 2820-2823.

WAXCILER, R. J. et al. (1976) Neoplastic risk among workers exposed to vinyl chloride. Ann. New York Acad. Sci. 271: 40-48.