

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**EFECTO PROTECTOR DE LOS
ISOTIOCIANATOS Y ORGANOSULFURADOS
SOLOS O EN COMBINACIÓN CON LA VITAMINA
C FRENTE AL DAÑO AL DNA INDUCIDO POR LA
N-NITROSOPIPERIDINA Y LA N-
NITROSOBUTILAMINA: MECANISMOS DE
ACCIÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Almudena García Pérez

Bajo la dirección de las doctoras

Paloma Morales Gómez
Ana Isabel Haza Duaso

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



**EFFECTO PROTECTOR DE LOS ISOTIOCIANATOS Y
ORGANOSULFURADOS SOLOS O EN COMBINACIÓN
CON LA VITAMINA C FRENTE AL DAÑO AL DNA
INDUCIDO POR LA N-NITROSOPIPERIDINA Y LA N-
NITROSODIBUTILAMINA: MECANISMOS DE ACCIÓN**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR:**

Almudena García Pérez

Bajo la dirección de las Doctoras:

Paloma Morales Gómez

Ana Isabel Haza Duaso

Madrid 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO PROTECTOR DE LOS ISOTIOCIANATOS Y
ORGANOSULFURADOS SOLOS O EN COMBINACIÓN
CON LA VITAMINA C FRENTE AL DAÑO AL DNA
INDUCIDO POR LA N-NITROSOPIPERIDINA Y LA N-
NITROSODIBUTILAMINA: MECANISMOS DE ACCIÓN**

Memoria que, para optar al título de Doctor, con mención honorífica de "Doctorado Europeo", presenta la licenciada Almudena García Pérez.

Madrid, octubre de 2010



Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 37 47. Fax: 91 394 37 43
E-mail: agarciap@vet.ucm.es

PALOMA MORALES GÓMEZ (Profesora titular) Y ANA ISABEL HAZA DUASO (Profesora contratada doctora), DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: “Efecto protector de los isotiocianatos y organosulfurados solos o en combinación con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la N-nitrosopiperidina y la N-nitrosodibutilamina: Mecanismos de acción” de la que es autora la Licenciada en Veterinaria Dña. Almudena García Pérez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de las que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, de de 2010.

Las Directoras de la Tesis Doctoral,

Paloma Morales Gómez

Ana Isabel Haza Duaso

Hace un tiempo atrás leí una frase del célebre actor americano, James Dean, con la que me sentí realmente identificada y, pensando en ella he seguido adelante en los buenos y no tan buenos momentos de mi vida.

“No puedo cambiar la dirección del viento, pero sí ajustar mis velas para llegar siempre a mi destino”

Y por fin ha llegado este momento tan esperado por mí. Resumir estos seis años de mi vida no es nada fácil, pero no me perdonaría quedarme corta en los agradecimientos a las muchas personas que me han acompañado a lo largo de este tiempo.

En primer lugar, quiero agradecer a Lorenzo de la Hoz, director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos por acogerme en este Departamento y a M^a Dolores Selgas, la nueva directora, por toda su ayuda en la tramitación de esta tesis.

A mis directoras, Paloma Morales y Ana Haza, porque sin vuestra dedicación y apoyo hubiese sido imposible realizar esta tesis. Paloma, siempre te agradeceré que me ofrecieses la posibilidad de adentrarme en el mundo de la ciencia y de la investigación, una vocación desconocida para mí pero que ha ido creciendo y calando poco a poco hasta convertirse en uno de mis mayores sueños. Y a Ana, también muchas gracias, por todo el apoyo y los ánimos que me has dado en estos años.

Al resto de profesores y personal no docente del Departamento, por su disponibilidad y ayuda en los momentos en que lo he precisado.

Tampoco puedo olvidarme de mis compañeros de proyecto con los que he compartido muy buenos momentos. A Nuria, porque has sido mi “hermana mayor en el laboratorio”, y como tal has ido abriendo el camino para que no me resultase tan duro, he aprendido muchas cosas de ti y por ello siempre te estaré enormemente agradecida. Y a Eugenia, porque aunque llegaste en el último momento fuiste una buena compañera, con la que fue muy fácil trabajar y me acompañaste en mis últimas andaduras por el laboratorio.

A Violeta, hace mucho tiempo que nos conocimos como compañeras de facultad y desde entonces he podido descubrir que tras tu caparazón de mujer fuerte reside un ser sensible y de gran corazón. Muchas gracias por hacernos reír con tus divertidas historias.

A Irene, deseo leer pronto mi nombre en los agradecimientos de tu tesis, estoy segura que la obtendrás con éxito porque te lo mereces, eres una gran trabajadora. Quiero agradecerte tu buen humor y tu alegre sonrisa por las mañanas.

A Pepe y a Beatriz, gracias por compartir conmigo los cursos de doctorado y por ofrecerme algo tan valioso como vuestra amistad. Espero que logréis vuestro propósito lo antes posible y que disfrutemos de los buenos recuerdos.

A María, aunque no hemos coincidido demasiado tiempo en el laboratorio, sé que he ganado una buena amiga, siempre me he sentido muy identificada en la forma de ser y pensar contigo. Gracias por tus buenos consejos y comprensión, estoy segura que a personas tenaces como tú sólo les espera un futuro brillante.

A Miguel Ángel, no puedo escribir con palabras lo que te agradezco porque me saldrían carcajadas. Trajiste la alegría y el buen humor al laboratorio, siempre nos has divertido con tus canciones, parodias... qué más se puede añadir!. Muchísimas gracias, porque hacer sonreír a la gente no tiene precio.

Y podría seguir escribiendo párrafos enteros para agradecer a todos los compañeros que he tenido el placer de conocer en este departamento. Muchos de ellos ya son doctores, con una carrera prometedora. Muchas gracias a María por enseñarme a impartir las prácticas de laboratorio y por ayudarme a seguir adelante en mi carrera profesional. Agradecer a Inés por tu capacidad para escucharme y la energía positiva que siempre me has transmitido. A Esther, por tu apoyo y por toda tu ayuda, sobre todo ahora al final. Y a los chicos del laboratorio de "al lado", Antonio y Jorge, por amenizar con bromas las comidas diarias cuando lográbamos coincidir porque siempre andábamos descoordinados con el horario. Otros eligieron caminos diferentes, pero no por ello los olvido. Gracias Belén por ser siempre tan divertida y Amanda por tener un gran corazón.

Pero las futuras generaciones de este departamento no se quedan atrás, están repletas de chicos y chicas que merecen recibir mi agradecimiento puesto que me han acompañado en esta última etapa. A Nicolette, Juan, Loreto, Juanjo, Cristina, Estefanía, Virginia, Marta y Rebeca por recibirme siempre en los pasillos con una espléndida sonrisa y un "¿qué tal estás?", tan necesarios en algunas ocasiones.

To Joseph Rafter, I want to thank you for one of the best periods of my thesis work. Thanks for for giving me the opportunity of working with you.

Simone e Francesca, vi sarò per sempre grata per la vostra amicizia, non solo per aver condiviso con me quei tre meravigliosi mesi a Stoccolma, ma per il vostro affetto e sostegno, e per esserci sempre anche se a migliaia di chilometri di distanza. Grazie di cuore.

A todos los amigos que me han escuchado y ayudado en este período... a Patricia, Marta, Laura, Luis, Susana, Juan, Jonathan, Lenis, Magnus, Antonio, Julio, Carolina, Almudena, Elena, Mónica, Álvaro, Amal, Rogelio, Nacho, José María y tantos otros. Muchas gracias.

Por último agradecer a mis padres y al resto de mi familia por enseñarme a vivir y a elegir el camino correcto. En especial a mi madre, una de las mujeres más fuertes que he conocido, gracias por cuidarme y darme todo lo que siempre he necesitado. A mis hermanas, Merce y Cati, no tengo palabras para describiros, sois las mejores que cualquiera pueda tener, la mayor herencia que han podido darnos nuestros padres. Y finalmente a Pedro padre e hijo, al primero por ofrecerme siempre apoyo y al segundo por su alegría, por favor no cambies.

INDICE	9
RESUMEN	13
SUMMARY	15
ABREVIATURAS	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABLAS	22
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	23
1. NITRATOS Y NITRITOS EN LOS ALIMENTOS.....	25
2. N-NITROSAMINAS VOLÁTILES EN LA DIETA.....	29
2.1. Reacción química de nitrosación.....	29
2.2. Formación <i>in vivo</i>	29
2.3. Formación en los alimentos.....	30
2.4. Exposición humana a la N-nitrosopiperidina y a la N-nitrosodibutilamina.....	31
2.5. Límites de N-nitrosopiperidina y de N-nitrosodibutilamina permitidos en los alimentos	32
3. RELEVANCIA DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA EN LA CARCINOGENÉISIS QUÍMICA: IMPACTO EN LA SALUD HUMANA.....	32
4. METABOLISMO DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA: PAPEL DEL CITOCROMO P450 COMO MARCADOR BIOLÓGICO.....	35
5. GENOTOXICIDAD DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA.....	39
5.1. Daño alquilativo al DNA.....	39
5.2. Daño oxidativo al DNA.....	41
6. MODELOS CELULARES HEPÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS GENOTÓXICOS.....	44
7. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	47
7.1. Antecedentes históricos.....	47
7.2. Tipos de muerte celular y métodos de determinación.....	47
7.3. Eventos celulares del proceso de apoptosis.....	51
7.4. Las caspasas.....	52
7.5. Vías de la muerte celular por apoptosis.....	53
7.5.1. Vía de los receptores de muerte celular o vía extrínseca.....	53
7.5.2. Vía mitocondrial o vía intrínseca.....	54
7.5.3. Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca.....	56
7.6. Apoptosis y daño al DNA.....	57
7.7. Apoptosis y EROs.....	58
7.8. Efecto de los componentes de la dieta en la apoptosis celular.....	60
8. ESTRATEGIAS EN LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER.....	62
8.1. Alimentación saludable: una herramienta para disminuir el riesgo de enfermedad.....	63
8.2. Efectos beneficiosos de los agentes quimiopreventivos.....	65
8.2.1. Plantas de la familia <i>Cruciferae</i> : brécol y otras crucíferas.....	67

8.2.1.1. <i>Isotiocianatos</i>	68
8.2.1.2. <i>Indoles</i>	69
8.2.2. <i>Plantas del género Allium: ajo y cebolla</i>	70
8.2.3. <i>Frutas y vegetales como fuentes de vitamina C</i>	71
8.3. <i>Interacciones entre compuestos quimiopreventivos: efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos</i>	73
CAPÍTULO II: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DESARROLLADO EN ESTA TESIS	75
1. OBJETIVOS	77
2. MATERIAL Y MÉTODOS	81
2.1. <i>Líneas celulares tumorales humanas</i>	83
2.2. <i>Compuestos químicos</i>	83
2.2.1. <i>N-nitrosaminas</i>	83
2.2.2. <i>Compuestos quimiopreventivos</i>	84
2.2.3. <i>Etopósido</i>	84
2.2.4. <i>N-acteilcisteína (NAC)</i>	84
2.3. <i>Determinación de la Viabilidad Celular</i>	84
2.3.1. <i>Método Colorimétrico MTT</i>	84
2.3.1.1. <i>Procedimiento del Método</i>	85
2.4. <i>Evaluación de la genotoxicidad in vitro: Electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa)</i>	86
2.4.1. <i>Procedimiento del Método</i>	86
2.5. <i>Detección de Apoptosis</i>	88
2.5.1. <i>Detección morfológica de apoptosis</i>	88
2.5.1.1. <i>Procedimiento del método</i>	88
2.5.1.1.1. <i>Línea celular HL-60</i>	88
2.5.1.1.2. <i>Línea celular HepG2</i>	89
2.5.2. <i>Cuantificación de apoptosis mediante el ensayo Anexina V/PI</i>	89
2.5.2.1. <i>Procedimiento del método</i>	90
2.5.3. <i>Cuantificación de apoptosis mediante el método TUNEL</i>	91
2.5.3.1. <i>Procedimiento del método</i>	91
2.5.4. <i>Medida de la actividad de las caspasas</i>	92
2.5.4.1. <i>Procedimiento del método</i>	93
2.5.5. <i>Análisis de la PARP mediante Western Blot</i>	93
2.5.5.1. <i>Procedimiento del método</i>	94
2.5.5.1.1. <i>Obtención de los extractos proteicos</i>	94
2.5.5.1.2. <i>Electroforesis y transferencia de proteínas</i>	94
2.5.5.1.3. <i>Inmunodetección</i>	95
2.6. <i>Medida de la producción intracelular de las EROs: Método del diacetato de 2',7'-</i>	

INDICE

diclorodihidrofluoresceína (H ₂ DCFDA).....	95
2.6.1. Procedimiento del método.....	96
2.7. Microsomas humanos.....	96
2.7.1. Procedimiento del método de la O-deetilación de la 7-etoxiresorufina.....	97
2.8. Análisis Estadístico.....	97
3. ARTICULOS DE INVESTIGACIÓN.....	99
4. OTROS RESULTADOS.....	103
4.1. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA y oxidación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA.....	105
4.2. Efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA.....	105
4.3. Inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 por la vitamina C.....	105
4.4. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, oxidación de las pirimidinas y alquilación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA.....	106
5. OTROS RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	107
5.1. Inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 por el AITC.....	109
5.2. Efecto de la NPIP y de la NDBA en la viabilidad de las células HepG2.....	109
5.3. Análisis de los cambios morfológicos inducidos por la NPIP y la NDBA en las células HepG2.....	110
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
6.1. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, daño oxidativo y alquilativo) inducido por la NPIP y la NDBA.....	113
6.2. Inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA.....	114
6.3. Producción de las EROs por la NPIP y la NDBA y su implicación en el proceso apoptótico.....	120
6.4. Efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA.....	123
6.5. Interacción de los OSCs o de los ITCs con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA.....	126
6.6. Mecanismos de acción.....	127
6.6.1. Inhibición de la isoforma enzimática humana CYP 1A1.....	127
6.6.2. Inhibición de la isoforma enzimática humana CYP 2A6.....	128
6.6.3. Estimulación de la isoforma enzimática humana UDP-GT 1A4.....	129
6.6.4. Efecto de la vitamina C, el DADS y el DPDS en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA.....	129
6.6.5. Capacidad de la vitamina C, el DADS y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA.....	133
7. CONCLUSIONES.....	137

INDICE

8. TRABAJO FUTURO.....	141
9. BIBLIOGRAFÍA.....	145
CAPÍTULO III: OTROS ARTÍCULOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS.....	179

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo de investigación consistió en evaluar el "Efecto protector de los compuestos isotiocianatos (ITCs) y de los organosulfurados (OSCs) solos o en combinación con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA), presentes en los alimentos. Así como, en determinar los posibles mecanismos de acción por los que estos compuestos ejercen su efecto protector". Para ello, se utilizó la línea celular de hepatoma humano (HepG2) y la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo Cometa, con una modificación, que consistió en utilizar las enzimas formamidopirimidina-DNA-glicosilasa (Fpg), endonucleasa III (Endo III) y 3-metiladenina-DNA glicosilasa (AlKa). Las dos primeras enzimas reconocen las purinas y las pirimidinas oxidadas, respectivamente, y la última enzima las purinas alquiladas.

En la fase inicial de este trabajo, evaluamos el daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. Ninguna de las N-nitrosaminas evaluadas indujeron una ruptura significativa de las cadenas del DNA, mientras que cuando las células HepG2 se incubaron conjuntamente con las enzimas Fpg, Endo III y AlKa y las N-nitrosaminas, se observó un incremento elevado del daño oxidativo y alquilativo al DNA. Como era de esperar, ambas N-nitrosaminas indujeron un daño alquilativo al DNA mayor que el daño oxidativo. Además, la NPIP requirió concentraciones más elevadas que la NDBA para ejercer su efecto genotóxico. Posteriormente, determinamos si la NPIP y la NDBA inducían apoptosis en dos líneas tumorales humanas: células de leucemia (HL-60) y de hepatoma (HepG2), utilizando diferentes técnicas como la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo (ensayo Anexina V/PI y TUNEL) y el Western Blot [ruptura de la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP)]. Las dos N-nitrosaminas redujeron la viabilidad de las células HL-60 y HepG2 mediante la inducción de apoptosis. La línea celular HL-60 mostró una mayor sensibilidad a la inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA, presentando esta última N-nitrosamina un mayor

efecto apoptótico. Además, la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA fue dependiente de la activación de las caspasas en ambas líneas celulares, actuando indistintamente las caspasas-8 y -9 como caspasas iniciadoras en las células HepG2. Por último, se utilizó el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) para detectar la producción intracelular de las especies reactivas del oxígeno (EROs) inducida por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 y HepG2, y la N-acetilcisteína (NAC) como antioxidante para determinar la participación de estas EROs en el proceso apoptótico. La producción de las EROs aumentó inmediatamente después de la exposición de las células a las N-nitrosaminas y fue dependiente de la concentración. El pretratamiento con la NAC inhibió completamente la producción de las EROs inducida por la NPIP y la NDBA, sin embargo no fue capaz de bloquear la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas.

En la segunda fase de este estudio, evaluamos el efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C frente al daño al DNA (oxidación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA, mediante el ensayo Cometa en células HepG2. De los cuatro compuestos OSCs evaluados, el sulfuro de dialilo (DAS) fue el único que no protegió frente a la oxidación de las purinas inducida por la NDBA, mientras que el disulfuro de dialilo (DADS), el sulfuro de dipropilo (DPS) y el disulfuro de dipropilo (DPDS) eliminaron de una forma más eficaz las purinas oxidadas inducidas por la NDBA que por la NPIP. De los ITCs, el fenetil isotiocianato (PEITC) y el indol-3-carbinol (I3C), exhibieron un efector protector similar frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. Sin embargo, el alil isotiocianato (AITC) no solo no protegió sino que incrementó la oxidación de las purinas inducida por ambas N-nitrosaminas. La vitamina C también protegió frente al daño oxidativo al DNA inducido por las N-nitrosaminas, aunque su efecto protector fue mayor frente a la NDBA.

Debido a que el efecto beneficioso de las frutas y las vegetales puede ser resultado de los efectos combinados de numerosos compuestos bioactivos, procedimos a investigar también el efecto protector de los OSCs y los ITCs en combinación con la vitamina C frente al daño al DNA (oxidación de las

purinas) inducido por la NPIP y la NDBA, mediante el ensayo Cometa en células HepG2. El DADS y el DPDS en combinación con la vitamina C eliminaron completamente las purinas oxidadas inducidas por las N-nitrosaminas. Por otro lado, los ITCs en combinación con la vitamina C ejercieron una protección mayor frente al daño oxidativo al DNA (oxidación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA que los ITCs solos.

Posteriormente, estudiamos los posibles mecanismos de acción por los que estos compuestos ejercen su efecto protector. Para ello, determinamos la actividad enzimática del CYP 1A1 (responsable de la activación metabólica de la NDBA), utilizando microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresaban esta isoforma enzimática humana. Todos los agentes quimiopreventivos examinados inhibieron la actividad de la etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1), excepto el I3C, en el siguiente orden: DAS > DADS > DPS > DPDS > AITC > PEITC > Vitamina C. Sin embargo, no se apreció una buena correlación entre el efecto protector de estos agentes quimiopreventivos frente

al daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA en las células HepG2 y la inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1. Por ello, procedimos a evaluar otros posibles mecanismos implicados, como el efecto de la vitamina C, el DADS y el DPDS en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las líneas celulares HL-60 y HepG2. Así, demostramos que la vitamina C, el DADS y el DPDS reducen la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en ambas líneas celulares. Por tanto, la inhibición de la apoptosis por estos agentes quimiopreventivos podría ser otro mecanismo de acción por el que ejercen su efecto protector. Finalmente, en el presente trabajo determinamos también la capacidad de la vitamina C, el DADS y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA en las células HL60 y HepG2. La vitamina C, un reconocido antioxidante hidrofílico, redujo la producción de las EROs producida por la NPIP y la NDBA en ambas líneas celulares, mientras que los antioxidantes lipofílicos, como el DADS y el DPDS, disminuyeron menos eficientemente las EROs generadas tras la exposición a las N-nitrosaminas.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate "The protective effect of isothiocyanates (ITCs) and organosulfur compounds (OSCs) alone or in combination with vitamin C towards DNA damage induced by N-nitrosopiperidine (NPIP) and N-nitrosodibutylamine (NDBA), two food N-nitrosamines. As well as possible mechanisms by which these chemopreventive compounds exert their protective effect". In this study, the human hepatoma cell line (HepG2) and the single cell-gel electrophoresis or Comet assay have been used. The Comet assay was modified using enzymes formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg), endonuclease III (Endo III) and 3-methyladenine-DNA glycosylase (AlkA). The two first enzymes uncover the oxidized purines and pyrimidines, respectively, and the last enzyme uncovers alkylated purines.

In the first part of this work, the NPIP and NDBA-induced DNA damage has been evaluated. None of the N-nitrosamines tested induced significant DNA strand breaks, while cells exposed to N-nitrosamines and incubated with Fpg, Endo III or AlkA enzymes showed a high oxidative and alkylative DNA damage. Both N-nitrosamines induced greater alkylative DNA damage than oxidative. Moreover, it was necessary to use higher doses of NPIP than NDBA to exert its genotoxic effect. Next, the induction of apoptosis by NPIP and NDBA was investigated in two human tumour cell lines: HL-60 (leukemia) and HepG2 (hepatoma), using different techniques such as fluorescence microscopy, flow cytometry (Annexin V/PI and TUNEL assays) and Western Blot [poly-ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage]. Both N-nitrosamines reduced the HL-60 and HepG2 cell viability by inducing apoptosis. HL-60 was the most sensitive cell line to the induction of apoptosis by NPIP and NDBA, and NDBA seems to have higher apoptotic effect than NPIP. The apoptosis induced by NPIP and NDBA was caspase-dependent pathway in HL-60 and HepG2 cell lines, being both caspase-8 and -9 the initiator caspases in HepG2 cells. Finally, reactive oxygen species (ROS) production induced by NPIP and NDBA was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) in HL-60 and HepG2 cells and N-acetylcysteine (NAC)

was used to explore the role of ROS in N-nitrosamines-induced apoptosis. The production of ROS occurred immediately after exposure of cells to N-nitrosamines and in a dose-dependent manner. The pretreatment with NAC completely inhibited the ROS production induced by NPIP and NDBA, but it was not able to block N-nitrosamine-induced apoptosis.

In the second part of this study, the protective effects of OSCs, ITCs and vitamin C towards DNA damage (oxidized purines) induced by NPIP and NDBA were determined, using the Comet assay in HepG2 cells. Among OSCs evaluated, diallyl sulphide (DAS) did not protect against oxidized purines induced by NDBA, whereas diallyl disulphide (DADS), dipropyl sulphide (DPS) and dipropyl disulphide (DPDS) removed the NDBA-induced oxidized purines more efficient than NPIP-induced. ITCs, in particular phenethyl isothiocyanate (PEITC) and indole-3-carbinol (I3C), exhibited similar protective effects towards oxidative DNA damage induced by NPIP and NDBA. However, allyl isothiocyanate (AITC) did not show protective effects, but in addition increased the levels of oxidized purines induced by both N-nitrosamines. The results also showed that vitamin C protected towards oxidative DNA damage induced by N-nitrosamines, although its protective effect was higher towards NDBA-induced oxidative DNA damage.

Due to the beneficial effects of fruits and vegetables may result from the combined effects of numerous bioactive compounds, the protective effects of OSCs and ITCs in combination with vitamin C towards DNA damage (oxidized purines) induced by NPIP and NDBA were evaluated, using the Comet assay in HepG2 cells. DADS and DPDS in combination with vitamin C showed an overall protective effect towards the formation of oxidized purines induced by N-nitrosamines. In the other hand, ITCs in combination with vitamin C exerted a higher protection than ITCs alone towards NPIP and NDBA-oxidative DNA damage (oxidized purines).

Subsequently, the feasible mechanisms of action by which these compounds exert their protective effects were analysed, using microsomes from baculovirus-infected cells expressing phase I

RESUMEN-SUMMARY

enzymes activities of human CYP 1A1 (responsible of metabolic activation of NDBA). All the chemopreventive compounds examined inhibited the ethoxyresorufin O-deethylation activity (CYP 1A1), except I3C, in the following order: DAS > DADS > DPS > DPDS > AITC > PEITC > Vitamina C. However, our results did not show a good correlation between the protective effect of these compounds towards oxidative DNA damage induced by NDBA in HepG2 cells and, human CYP 1A1 inhibition. For that reason, other mechanisms were determined, such as the effects of vitamin C, DADS and DPDS against NPIP and NDBA-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cell lines. We demonstrated that vitamin C, DADS and DPDS reduced the apoptosis induced by

NPIP and NDBA in both cell lines. Therefore, the inhibition of apoptosis by these chemopreventive compounds could be another mechanism of action by which exert their protective effects. Finally, in the present study, we also determined the scavenging ability of vitamin C, DADS and DPDS towards ROS production induced by NPIP and NDBA in HL-60 and HepG2 cells. Vitamin C, a well recognized hydrophilic antioxidant, reduced the production of ROS induced by NPIP and NDBA in both cell lines, whereas lipophilic antioxidants, such as DADS and DPDS decreased less efficiently the N-nitrosamine-induced ROS production.

ABREVIATURAS

*NO₂ :	Dióxido de nitrógeno	Fas-R:	Miembro de la familia del receptor TNF
*O₂ :	Anión superóxido	FLIP:	Proteína inhibidora de la caspasa-8
¹O₂ :	Oxígeno molecular "singlete"	Fpg:	Enzima Formamidopirimidina-DNA glicosilasa
8-OHdG:	8-hidroxideoxiguanosina	FS:	Fosfatidilserina
8-OHG:	8-hidroxiguanina	GSH:	Glutación
AIF:	Factor inductor de apoptosis	GST:	Enzima glutación-S-transferasa
AITC:	Alil isotiocianato	H₂DCF:	Diclorodihidrofluoresceína
AIKa:	Enzima 3-metiladenina-DNA glicosilasa	H₂DCFDA:	Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
Apaf-1:	Factor activador de apoptosis-1	H₂O₂ :	Peróxido de hidrógeno
Apo2L:	Ligando Apo2	HAPs:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Apo3L:	Ligando Apo3	HepG2:	Células derivadas de hepatoma humano
AT:	Enzima O ⁶ alquilguanina DNA alquiltransferasa	HL-60:	Células derivadas de leucemia humana
B(a)P :	Benzo (a)pireno	HO[•] :	Radical hidroxilo
Bax:	Miembro proapoptótico de la subfamilia Bax, pertenece a la familia Bcl-2	I3C:	Indol-3-carbinol
Bcl-2:	Familia de proteínas del gen 2 de células B	IAPs:	Familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis
Bcl-X_L:	Miembro antiapoptótico de la subfamilia Bcl-2, pertenece a la familia Bcl-2	IP:	Ioduro de propidio
BH:	Bcl-2 homólogos	ITCs:	Compuestos isotiocianatos
CDR:	Cantidad diaria recomendada	LMP:	Agarosa de bajo punto de fusión
CYP450:	Citocromo P450	MGMT:	Enzima O ⁶ metilguanina DNA metiltransferasa
DADS:	Disulfuro de dialilo	MMR:	Mecanismo de reparación de errores en el apareamiento de las bases del DNA
DAS:	Sulfuro de dialilo	MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
dATP:	Desoxiadenosin trifosfato	NAC:	N-acetilcisteína
DCF:	Dihidrofluoresceína	NAT:	Enzima N-acetil-transferasa
DD:	Dominio de muerte celular	NDBA:	N-nitrosodibutilamina
DED:	Dominio efector de muerte celular	NDEA:	N-nitrosodietilamina
DIM:	3,3'diindoilmetano	NDMA:	N-nitrosodimetilamina
DISC:	Complejo de señalización e inductor de muerte celular	NMOR:	N-nitrosomorfolina
DMBA:	7,12 dimetilbenzo(a)antraceno	NNK:	4-(metil-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
DPDS:	Disulfuro de dipropilo	NPIP:	N-nitrosopiperidina
DPS:	Sulfuro de dipropilo	NPYR:	N-nitrosopirrolidina
DR3:	Receptor de muerte celular 3	NQO:	Enzima NAD(P)-quinona oxidoreductasa
DR4:	Receptor de muerte celular 4	Ogg1:	Enzima 8-oxo-guanina glicosilasa
DR5:	Receptor de muerte celular 5	ON[•] :	Óxido nítrico
dUTP:	2'-deoxiuridina 5'-trifosfato	ONOO[•] :	Peroxinitrito
EGCG:	Galato de epigallocatequina	OSCs:	Compuestos organosulfurados
Endo III:	Enzima endonucleasa III	p53:	Gen supresor de tumores
EPHX1:	Enzima epóxido hidrolasa	PARP:	Enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa
ERE:	Elemento de respuesta a estrógenos	PEITC:	Fenetil isotiocianato
ERNs:	Especies reactivas del nitrógeno	PhIP:	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
EROs:	Especies reactivas del oxígeno		
FADD:	Proteína adaptadora que interactúa con los dominios de muerte celular Fas y TNFR1		
Fas-L:	Ligando de Fas		

ABREVIATURAS

PT:	Permeabilidad transitoria	TNF-α:	Factor de necrosis tumoral α
Ras:	Familia del oncogen ras	Trp-P-1:	3-amino-1,4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido (4,3- <i>b</i>) indol
RE:	Receptor de estrógenos	Trp-P-2:	3-amino-1-metil-5 <i>H</i> -pirido (4,3- <i>b</i>) indol
SDH:	Enzima succinato deshidrogenada mitocondrial	TUNEL:	Método de marcaje de los extremos 3'-OH libres del DNA, utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y nucleótidos modificados
Smac/Diablo:	Activador secundario mitocondrial de caspasas/proteína de unión a IAPs	UDP-GT 1A4:	Enzima UDP-glucuronil transferasa 1A4
SOD:	Enzima superóxido dismutasa	UDP-GT:	Enzima UDP-glucuronil-transferasa
SULT:	Enzima sulfotransferasa	Z-DEVD-FMK:	Inhibidor específico de caspasa-3
tBid:	Forma truncada de Bid	Z-IETD-FMK:	Inhibidor específico de caspasa-8
TNFR:	Familia del receptor del factor de necrosis tumoral	Z-LEHD-FMK:	Inhibidor específico de caspasa-9
TNF-R1	Receptor 1 de muerte celular y miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral.	Z-VEID-FMK:	Inhibidor específico de caspasa-6

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vías de ingestión de los nitratos y nitritos y sus posibles efectos tóxicos.
- Figura 2.** Vías de formación *in vivo* de las N-nitrosaminas.
- Figura 3.** Carcinogénesis inducida por las N-nitrosaminas.
- Figura 4.** Metabolismo de los xenobióticos (Santiago y col., 2002).
- Figura 5.** Activación metabólica de la N-nitrosopiperidina (NPIP) (Wong y col., 2003 b).
- Figura 6.** Activación metabólica de la N-nitrosodibutilamina (NDBA) (Shu y Hollenberg, 1996).
- Figura 7.** Principales posiciones de alquilación del DNA (Drabløs y col., 2004).
- Figura 8.** Mecanismo de reparación de la O⁶ alquilguanina DNA alquiltransferasa (AT) (Gerson, 2004).
- Figura 9.** Fuentes y respuesta celular a las EROs (Finkel y Holbrook, 2000).
- Figura 10.** Estructura química de la 2'-deoxiguanina (dG), de la 8-hidroxideoxiguanina (8-OHdG) y de la 8-hidroxiguanina (8-OHG).
- Figura 11.** Formación de un sitioapurínico a partir de la 8-nitroguanina (Kawanishi y col., 2006).
- Figura 12.** Patologías asociadas con alteraciones en el proceso de apoptosis.
- Figura 13.** Características morfológicas de los tipos de muerte celular más frecuentes (De Bruin y Medema, 2008).
- Figura 14.** Cambios morfológicos y bioquímicos durante el proceso de apoptosis.
- Figura 15.** Activación y estructura general de las procaspasas (Cascales, 2003).
- Figura 16.** Vías de activación y regulación de la apoptosis.
- Figura 17.** Miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Taylor y col., 2008)
- Figura 18.** Regulación de la apoptosis por las proteínas Bcl-2 y Bax.
- Figura 19.** Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca y su regulación por la familia de proteínas Bcl-2.
- Figura 20.** Mecanismo de acción del gen *p53* (Miret, 2003).
- Figura 21.** Lesiones en el DNA y vías apoptóticas inducidas por los agentes alquilantes (Kaina y col., 2007).
- Figura 22.** Relación de las EROs con las vías apoptóticas.
- Figura 23.** Mecanismos de inducción de apoptosis por los componentes de la dieta (Khan y col., 2008).
- Figura 24.** Papel de la apoptosis inducida por los compuestos carcinogénicos de la dieta en el desarrollo tumoral.
- Figura 25.** Pirámide de la Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (Nutrition, Physical Activity and Obesity Prevention Strategy, NAOS), elaborada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).
- Figura 26.** Mecanismos de acción de los agentes quimiopreventivos bloqueadores y supresores (Surh, 2003).
- Figura 27.** Mecanismos de protección de los agentes quimiopreventivos de la dieta (Dorai y Aggarwal, 2004).
- Figura 28.** Estructura química de los compuestos isotiocianatos.

Figura 29. Conversión del indol-3-carbinol a 3,3'-diindolimetano por la acción de los jugos gástricos.

Figura 30. Estructura química de los compuestos organosulfurados del género *Allium*.

Figura 31. Estructura química de la vitamina C.

Figura 32. Morfología de las líneas HL-60 (A) y HepG2 (B) al microscopio óptico.

Figura 33. Estructura química de (A) la N-nitrosopiperidina (NPIP) y de (B) la N-nitrosodibutilamina (NDBA).

Figura 34. Reacción de metabolización del MTT a formazán, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en células viables.

Figura 35. Procedimiento del método colorimétrico MTT.

Figura 36. Células HepG2 (A) control y (B) tratadas con NPIP, al microscopio de fluorescencia, utilizando el ensayo Cometa

Figura 37. Ensayo Cometa.

Figura 38. Características morfológicas de apoptosis: (A) burbujeo de la membrana o "blebbing"; (B) condensación de la cromatina; y (C) formación de cuerpos apoptóticos.

Figura 39. Detección morfológica de apoptosis en las líneas celulares HL-60 y HepG2.

Figura 40. Detección de la fosfatidilserina (FS) por el ensayo Anexina V.

Figura 41. Ensayo Anexina V/IP.

Figura 42. Diagramas de puntos de las células HL-60 control (A) y tratadas con la NPIP a 20 mM durante 18 h (B) y 24 h (C), cuantificadas mediante el ensayo AnexinaV/IP.

Figura 43. Incorporación de los nucleótidos dUTP-fluoresceína a los extremos 3'-OH libres del DNA por la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT).

Figura 44. Método TUNEL.

Figura 45. Diagramas de puntos de las células HL-60 control (A) y tratadas con NPIP a 5 mM (B) y 20 mM (C) durante 48 h, cuantificadas mediante el método TUNEL.

Figura 46. Inhibición de la actividad de las caspasas.

Figura 47. Medida de la actividad de las caspasas.

Figura 48. Diagramas de puntos de las células HepG2 control (A) y tratadas con NDBA a 2,5 mM durante 72 h en ausencia (B) o presencia (C) del inhibidor de la caspasa-3, cuantificadas mediante el método TUNEL.

Figura 49. Actividad de la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP).

Figura 50. Análisis de la PARP mediante Western Blot.

Figura 51. Hidrólisis del diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por esterasas intracelulares a diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), y su posterior oxidación a dihidrofluoresceína (DCF) en presencia de las EROs.

Figura 52. Método del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA).

Figura 53. Diagramas de puntos de las células HepG2 control (A) y tratadas con la NPIP a 25 mM durante 1 h (B), cuantificadas mediante el método del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA).

Figura 54. Método de la O-deetilación de la 7-etoxiresorufina.

Figura 55. Ruptura de las cadenas del DNA y oxidación de las purinas inducida por la NPIP (A) y la NDBA (B) en células de hepatoma humano (HepG2) incubadas en ausencia (■) o presencia (◆) de la enzima Fpg. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (C₀) *** p ≤ 0,001, ** p ≤ 0,01 y * p ≤ 0,05.

Figura 56. Efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo inducido por la NPIP (A) y la NDBA (B) en células de hepatoma humano (HepG2). C₁, ■ células HepG2 tratadas con N-nitrosaminas en presencia de la enzima Fpg. ☒ Células HepG2 tratadas con N-nitrosaminas y vitamina C en presencia de la Fpg. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ** p ≤ 0,01 y * p ≤ 0,05.

Figura 57. Efecto de la vitamina C en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ** p ≤ 0,01.

Figura 58. Ruptura de las cadenas del DNA, oxidación de las pirimidinas y alquilación de las purinas inducida por la (A) NPIP, ■ 9 mM, ☒ 44 mM y (B) NDBA, ■ 0,3 mM, ☒ 3 mM en células de hepatoma humano (HepG2). □ Células HepG2 sin tratar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *** p ≤ 0,001, ** p ≤ 0,01 y * p ≤ 0,05.

Figura 59. Efecto del AITC en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *** p ≤ 0,001 y ** p ≤ 0,01.

Figura 60. Efecto de la NPIP (A) y de la NDBA (B) en la viabilidad de las células HepG2 empleando el método MTT. Las células se cultivaron con diferentes concentraciones de las N-nitrosaminas durante 6 (□), 18 (▣) y 24 (■) h. C₀, células HepG2 sin tratar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control: * p ≤ 0,05 y *** p ≤ 0,001.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contribución de los alimentos a la ingesta de nitratos (%).

Tabla 2. Límites de concentración para los nitritos y nitratos establecidos en el Real Decreto 1118/2007.

Tabla 3. Actividad carcinogénica de la NPIP y de la NDBA (Tricker y Preussmann, 1991).

Tabla 4. Expresión de las distintas isoformas del CYP450 en hepatocitos primarios y en la línea celular de hepatoma humano HepG2 (Donato y col., 2008).

Tabla 5. Tipos de muerte celular.

Tabla 6. Métodos para la detección de los diferentes tipos de muerte celular.

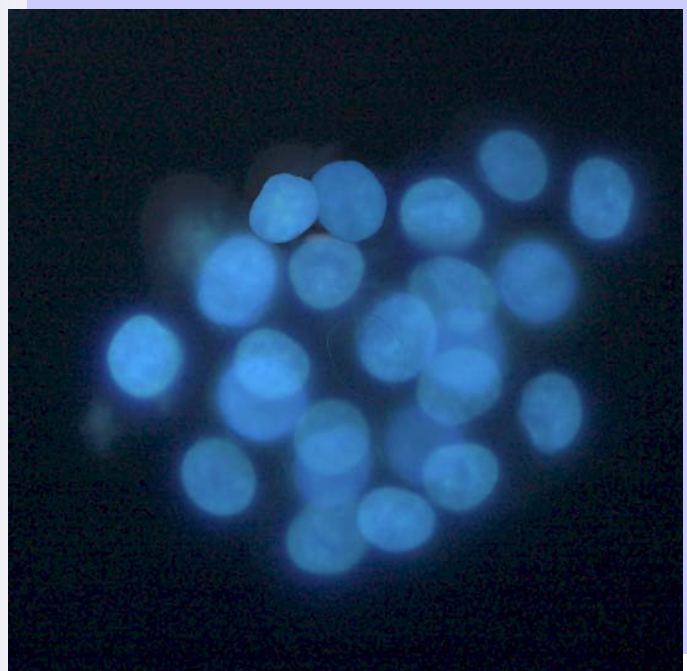
Tabla 7. Sustratos de las caspasas (Jordán, 2003).

Tabla 8. Diferencias entre alimentos funcionales y nutracéuticos (Shahidi, 2002).

Tabla 9. Clasificación de los agentes quimiopreventivos según su estructura química y sus principales fuentes en los alimentos (Russo y col., 2005).

Tabla 10. Compuestos quimiopreventivos utilizados en este trabajo frente a la genotoxicidad de la NPIP y de la NDBA.

Tabla 11. Efecto de la NPIP y de la NDBA en la apoptosis de las células HepG2 empleando el colorante vital naranja de acridina.



CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. NITRATOS Y NITRITOS EN LOS ALIMENTOS

El nitrato está presente de forma natural en el medio ambiente como consecuencia del ciclo del nitrógeno, que puede estar alterado por diversas actividades humanas. Entre éstas cabe destacar la utilización de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, los vertidos orgánicos de origen doméstico e industrial no sometidos a tratamientos adecuados de depuración y, el uso de aditivos alimentarios.

De esta forma el nitrato está ampliamente distribuido en los alimentos, siendo las principales fuentes de exposición los vegetales, el agua de bebida y los productos cármicos (Tabla 1). Se ha calculado una ingesta media de nitrato de 50-140 mg/día en Europa y de 40-100 mg/día en Estados Unidos (Mensinga y col., 2003), ambas muy por debajo de la ingesta diaria admisible (IDA) máxima establecida en 240 mg/día para una persona de 65 kg según el Comité Científico de Alimentación Humana (CCAH). Algunas especies vegetales tienen gran capacidad de acumulación de nitrato (los productos de hoja fundamentalmente), por lo que puede ser frecuente encontrar cantidades elevadas en este tipo de productos. La lechuga, las espinacas, la remolacha y el apio son algunos ejemplos donde la concentración media de nitratos es cercana a los 1000 mg/kg de peso fresco, e incluso puede alcanzar los 3000-4000 mg/kg (Walker, 1996; Van Vliet y col., 1997). El grado de acumulación no sólo depende del

tipo y de la variedad genética, sino también de la temperatura, la luz solar, el nitrógeno disponible, o el modo de cultivo entre otros factores.

Por otro lado, aunque la presencia de nitrato en los alimentos es poco significativa (Merino y col., 2000; AIIC, 2006), el nitrato puede transformarse en nitrito por reducción bacteriana tanto en los alimentos (durante el procesado y el almacenamiento), como en el propio organismo (en la saliva y en el tracto gastrointestinal). Se estima que un 5% del nitrato ingerido se transforma en nitrito endógenamente, lo que supone la fracción mayoritaria de la exposición global a este compuesto.

Para alcanzar un nivel elevado de protección de la salud pública, la Unión Europea ha establecido las concentraciones máximas de nitrato en algunos vegetales, como la lechuga y las espinacas, a través del Reglamento nº 1881/2006. Otras medidas para la reducción de los nitratos y nitritos en vegetales de hoja verde son la implantación de programas de vigilancia, orientados a la reducción progresiva de los niveles en las especies con contenidos más elevados, la elaboración de códigos de buenas prácticas agrícolas dirigidos a la utilización adecuada de los fertilizantes, así como una selección de variedades que acumulen poco nitrato. En lo referente al agua de bebida, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1984) ha establecido 50 mg/l como límite máximo permitido de

Tabla 1. Contribución de los alimentos a la ingesta de nitratos (%).

Alimentos	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Reino Unido (1997)	Instituto Federal para la Valoración del Riesgo. Alemania (2004)	Organización Mundial de la Salud. Europa (2003) *	Departamento de Sanidad del País Vasco (1997)
Verduras y hortalizas	36	60	<90	75
Patatas	33			12
Derivados cármicos	4,2			5
Pan y cereales	3,7		<5	
Fruta	3,5	14	5	
Leche y productos lácteos	6			
Resto de alimentos	5,1			
Bebidas	8,5	-		
Agua	-	26	5	8
Total	100%	100%	100%	100%

* ingesta total de nitratos y nitritos

INTRODUCCIÓN GENERAL

nitratos, pero aún así puede contribuir de forma importante a la ingesta total de nitrato en algunas zonas.

En productos como piezas curadas, embutidos fermentados y mezclas gelificadas cocidas, el empleo de nitratos y nitritos se hace indispensable para obtener productos de una calidad competitiva que abarca aspectos tales como su estabilidad microbiológica (Russell y Gould, 2003) y la obtención de unas características sensoriales deseadas (Fennema, 2000). El proceso de elaboración de productos cárnicos con un mayor empleo de nitratos y nitritos es el curado o salazón. Este procedimiento empleado desde la antigüedad para conservar la carne sigue siendo utilizado hoy en día, aunque con algunas diferencias respecto al método original. El curado consiste en la incorporación de sal junto con diversos aditivos, como los nitratos o/y nitritos, a los productos que serán sometidos a este proceso (Cameán y Repetto, 2007).

Las funciones de los nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados pueden resumirse en las siguientes:

- favorecen la formación y estabilización del color rojo característico de la carne curada (Cornforth y Jayasingh, 2004),

- inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium botulinum* y previenen la toxina botulínica (Ventanas y col., 2004),
- contribuyen al desarrollo del aroma típico de la carne curada (Pegg y Shahidi, 2000) y finalmente,
- poseen un efecto antioxidante (Sebranek y Bacus, 2007), retardando el desarrollo de la rancidez y evitando la alteración de las características sensoriales.

Aunque la adición de los nitritos y nitratos en la elaboración de productos cárnicos es necesaria por las funciones anteriormente mencionadas, desde 1945 existe una creciente preocupación por los efectos derivados de su consumo (Comly, 1945). El nitrato en sí mismo generalmente no es tóxico. La toxicidad es normalmente el resultado de la conversión de los nitratos en nitritos por bacterias reductoras. Los nitritos, sin embargo, pueden llegar a tener efectos adversos importantes (Honikel, 2004). La toxicidad de éstos puede ser directa, por su papel en la síntesis de la metahemoglobina (Phillips, 1971; Tannenbaum, 1984) o indirecta, al ser origen de agentes nitrosantes requeridos para la formación de las N-nitrosaminas (Sen y col., 1969), tal y como se representa en la **Figura 1**.

En la década de los años 60, y debido al descubrimiento de la formación de la N-nitrosodimetilamina (NDMA) y de sus efectos

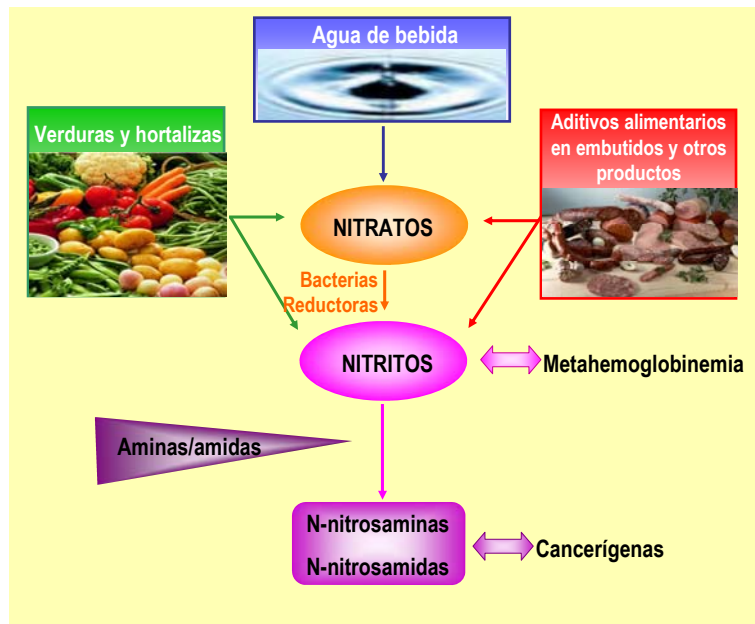


Figura 1. Vías de ingestión de los nitratos y nitritos y sus posibles efectos tóxicos.

INTRODUCCIÓN GENERAL

cancerígenos (Magee y Barnes, 1956), se abrió un nuevo campo de investigación sobre la actividad biológica de un gran número de compuestos N-nitroso (Loepky, 1994). La controversia que suscitó el tema en los productos cárnicos desencadenó en 1970 que el Instituto Americano de la Carne (AMI) planteara el problema a la Administración de Drogas y Alimentos (ADA) y, al Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos (United State Department of Agriculture, USDA). Por otra parte, la preocupación por el uso de nitratos y nitritos como aditivos alimentarios en productos cárnicos, dio lugar a que se celebrara en Europa el primer Simposio Internacional sobre Nitritos en los Productos Cárnicos (Krol y Tinbergen, 1974). Las conclusiones de este simposio fueron que los nitritos eran inhibidores de *Clostridium botulinum* y que existía una clara evidencia de que las N-nitrosaminas podían estar presentes, en cantidades trazas, en los productos cárnicos.

Así, aunque la concentración de N-nitrosaminas en los alimentos sea en cantidades extremadamente pequeñas, las consecuencias de su presencia en los mismos no deben ser ignoradas por dos razones principales. En primer lugar, porque las N-nitrosaminas poseen un gran potencial carcinogénico y en segundo lugar, porque éste podría ser mayor en los seres humanos (cuando se administran de forma continuada) que en los animales de experimentación. Esto se desprende de un estudio llevado a cabo por Hoffmann y Hecht (1985) en el cual observaron que las ratas eran más sensibles a los efectos carcinogénicos de las N-nitrosaminas que otras especies inferiores en la escala evolutiva como los ratones o los hamsters.

Al mismo tiempo, aún cuando se conoce el riesgo de la presencia de N-nitrosaminas, la prevención de un peligro mayor como el botulismo, hace que no se pueda prescindir de estos aditivos conservadores en un futuro próximo. De acuerdo con esto, se aconsejó reducir la cantidad de nitrito, adicionado y residual en los productos cárnicos, pero siempre que no fuera en detrimento de su carácter inhibidor de *Cl. botulinum* (Vargas del Río y Taborda, 2006). En este sentido, se desarrollaron investigaciones cuyos resultados permitieron disminuir los niveles de nitrito residual hasta 10-30 mg/kg, bien reduciendo la dosis adicionada o mediante la incorporación de ascorbato o de isoascorbato sódico, compuestos que bloquean la reacción de nitrosación (Pourazrang y col., 2002).

La posibilidad de formación de N-nitrosaminas cancerígenas en los productos cárnicos, así como la posible formación endógena de las mismas a partir de precursores presentes en este tipo de productos, ha llevado a las autoridades sanitarias a cuestionarse los límites establecidos. El Real Decreto 1118/2007 incorpora parcialmente a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2006/52/CE y modifica el RD 141/2002, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Esta legislación ha tenido especial incidencia en la utilización de los nitratos y nitritos, sobre todo en la elaboración de productos curados. En la **Tabla 2** se muestran los límites de concentración establecidos para los nitratos y nitritos.

La legislación establece como dosis máximas añadidas para los nitritos (E 249 y E 250) 150 mg/kg

Tabla 2. Límites de concentración para los nitritos y nitratos establecidos en el RD 1118/2007.

Productos alimenticios			Cantidad máxima durante la fabricación ¹		Dosis residual máxima ¹	
			E-249 y E-250	E-251 y E-252	E-249 y E-250	E-251 y E-252
Productos cárnicos no tratados por el calor			150	150		
	Salchichón, chorizo y similares > 30 días de curación			250		
Productos cárnicos esterilizados			100			
Productos con denominación española	Productos cárnicos tradicionales curados en seco	Jamón y paleta curada, lomo embuchado y cecina			100	250

¹ Expresado en mg/kg como NaNO₂ o NaNO₃
 E-249: Nitrito potásico E-250: Nitrito sódico
 E-251: Nitrato sódico E-252: Nitrato potásico

en los productos cárnicos no tratados por el calor, mientras que en los productos cárnicos esterilizados se limita a 100 mg/kg. Respecto a los nitratos (E 251 y E 252) pueden adicionarse en productos cárnicos no tratados por el calor a una dosis máxima de 150 mg/kg, excepto en el salchichón, chorizo y otros embutidos similares con un mínimo de 30 días de curación, que puede llegar a 250 mg/kg (si no se adicionan nitritos). Desaparece su uso en productos cocidos y conservas. Por último, en el caso de los productos tradicionales curados en seco como jamón y paleta curada, lomo embuchado y cecina, únicamente se establecen las dosis residuales máximas de estos aditivos.

No obstante, Dinamarca ha sido el único país de la Unión Europea que se ha negado a trasponer dicha directiva a su Derecho nacional en lo referente a la adición de nitritos a los productos cárnicos. Las autoridades danesas alegaron que las cantidades máximas añadidas que establece la Directiva 2006/52/CE son demasiado elevadas desde un punto de vista sanitario y que no se ha documentado la necesidad tecnológica de tales valores. Un dato importante a tener en cuenta es que en Dinamarca aproximadamente el 90% de la ingesta de productos cárnicos consiste en productos a los que se aplica una cantidad máxima de 60 mg/kg de nitritos añadidos, por lo que, la trasposición de la Directiva 2006/52/CE y la introducción del límite general de 150 mg/kg podría multiplicar por 2,3 a 2,4 la ingesta de nitritos, es decir, esto supondría un incremento equivalente en la ingesta de N-nitrosaminas. Así, en mayo de 2008 la Comisión Europea aprobó la Decisión 2008/448/CE, por la que permite mantener a Dinamarca una legislación (Orden N° 22 de 11 de enero de 2005 sobre aditivos alimentarios) más restrictiva que la indicada en la Directiva 2006/52/CE, con respecto al contenido de nitritos en productos cárnicos.

Los consumidores reclaman cada vez más alimentos naturales mínimamente procesados que sean seguros, sin emplear tecnologías agresivas como serían los tratamientos térmicos (esterilización, pasteurización) o los conservantes químicos tradicionales (nitratos o/y nitritos) (de Ancos y col., 2006). En consecuencia, existe un interés creciente en el empleo de tecnologías no-térmicas de

procesado y aditivos antimicrobianos naturales (Roller, 2003) que prolonguen la vida útil de los alimentos en condiciones óptimas de calidad, sin comprometer ni la seguridad ni las propiedades sensoriales. Actualmente, se tiende al uso simultáneo o combinado de varios factores de conservación para reforzar la eficacia de cada factor individual, siendo conocido este proceso como "tecnología de barreras" (Leistner, 2000). Se han propuesto varios métodos, entre ellos:

- el uso de gases no convencionales, como el argón (Djenane y col., 2005) y el monóxido de carbono (Luño y col., 2000; Nissen y col., 2000),
- el empleo de antioxidantes naturales, bien de origen vegetal, como la borraja, (Wettasinghe y Shahidi, 1999; 2000), el romero (Sánchez-Escalante y col., 2003 a; Djenane y col., 2002; 2003; Nissen y col., 2004), el orégano (Tsigarida y col., 2000; Farkas, 2000; Sánchez-Escalante y col., 2003 b) y el pimiento (Aguirrezábal y col., 2000; Sánchez-Escalante y col., 2003 c); o bien de origen muscular, como la carosina (O'Neill y col., 1999; Djenane y col., 2004; Sánchez Escalante y col., 2003 d), la taurina (Sánchez-Escalante y col., 2001; Djenane y col., 2002) y las poliaminas (Lovaas y Carlin, 1991),
- la utilización de compuestos con propiedades antimicrobianas como los ácidos orgánicos (Belk, 2001; Stivarius y col., 2002; Djenane y col., 2003; Gill y Landers, 2004) y las bacteriocinas (Richard, 1996) y, finalmente,
- la irradiación que ha demostrado ser un método eficaz para mejorar la calidad sanitaria y aumentar la vida útil de los alimentos (Chawla y Chander, 2004). Sin embargo, su introducción comercial está siendo muy lenta debido a la reticencia del consumidor que solo ve una técnica complicada y abstracta que hace intervenir la energía nuclear. Además influyen otros factores de tipo económico, tecnológico y político.

El empleo de estos sistemas en la industria constituye una alternativa prometedora para alargar la vida útil de las carnes y productos cárnicos, y además, le permite liberarse del etiquetado sistemático relativo a aditivos sintéticos que tanto parecen asustar, hoy en día, al consumidor.

2. N-NITROSAMINAS VOLÁTILES EN LA DIETA

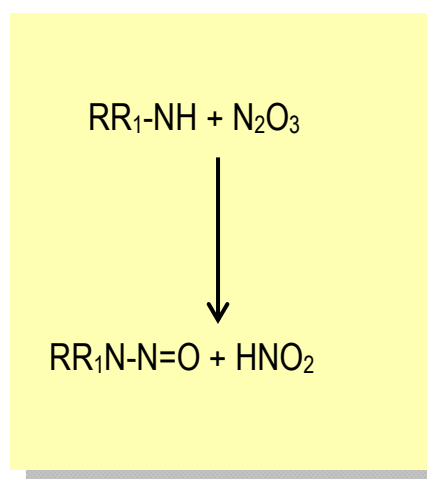
Los compuestos N-nitroso a los que está expuesta la población derivan de dos orígenes diferentes, del medio ambiente o de forma endógena (Sawamura y col., 2005). Se estima que el humo del tabaco contribuye en un 1,5-6,0 mg/día a la exposición a N-nitrosaminas, mientras que los alimentos y cosméticos aportan diariamente cerca de 0,2-0,5 mg y <0,05 mg, respectivamente (Proksch, 2001). Excluyendo ciertas ocupaciones laborales en las que la presencia de N-nitrosaminas es muy elevada (por ejemplo en la industria de la goma) (Fajen y col., 1979; Spiegelhalder y Preussmann, 1983; Nutt, 1984; Straif y col., 2000), la exposición al humo del tabaco probablemente representa la principal fuente exógena de N-nitrosaminas en humanos (Hecht y col., 1994).

En relación a la dieta, en un estudio realizado en Suecia con 764 muestras procedentes de distintos alimentos (productos cárnicos, pescado, bebidas, quesos, cacao, té, café, cereales, etc.), se detectó la presencia de N-nitrosaminas en 474 casos y se estimó una ingesta diaria por persona de 0,29 µg de N-nitrosaminas totales (Österdahl, 1988). Los compuestos N-nitroso identificados fueron la NDMA, la N-nitrosopirrolidina (NPYR), la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA). La presencia de la NDMA fue la más generalizada, mientras que la NPYR se halló sobre todo en beicon, carne, cacao y café. La NPIP y la NDBA se detectaron en un número limitado de muestras. Spiegelhalder y col. (1980) demostraron que el total de NDMA y NPYR ingeridas diariamente por varones en Alemania Occidental era de 1,1 µg y de 0,15 µg, respectivamente. Alrededor del 64% de la ingesta de NDMA era debida al consumo de cerveza. Por el contrario, en Japón (Maki y col., 1980) el consumo de N-nitrosaminas volátiles por persona era de 1,8 µg/día, siendo los productos del pescado los que mayoritariamente contribuían a esa ingesta, con un 88%. Por consiguiente, la presencia y concentración de las N-nitrosaminas en productos alimenticios asiáticos es mayor que en los consumidos por las poblaciones occidentales. De esta forma podemos afirmar que los hábitos alimentarios de los diferentes países condicionan la ingesta media diaria de N-

nitrosaminas, y el grupo mayoritario de alimentos que aporta su consumo.

2.1. Reacción química de nitrosación

La reacción química de nitrosación o de formación de las N-nitrosaminas puede producirse *in vivo* o de forma exógena (Jakszyn y col., 2006 a), en aquellos productos que contienen agentes nitrosantes. La principal vía de formación de estos compuestos es mediante la reacción de aminas secundarias y especies nitrosantes, como el ácido nitroso (Choi y col., 2007), según la ecuación general:



En esta reacción, R₁ es un grupo alquilo mientras que R puede ser un radical alquilo, arilo, u otro grupo funcional cualquiera. Además, las N-nitrosaminas también pueden formarse a partir de aminas primarias, terciarias y de los compuestos de amonio cuaternarios (Daiber y col., 2002).

2.2. Formación *in vivo*

La síntesis endógena de N-nitrosaminas se produce principalmente en el estómago, ejerciendo sus efectos cancerígenos en el epitelio gástrico, o en otros órganos diana después de distribuirse a través de la circulación sistémica. Estudios realizados por Dallinga y col. (1998) han encontrado la NPIP y la NDBA a concentraciones de 0,20 y 0,06 nmol/l, respectivamente, en el jugo gástrico de pacientes con diferentes dolencias gastrointestinales.

Se han identificado dos mecanismos de nitrosación endógena (**Figura 2**), la primera es una nitrosación química que se produce a bajo pH y la segunda es una nitrosación microbiológica, principalmente a través de bacterias denitrificadoras, a partir de productos derivados del óxido nítrico (ON^*) bajo condiciones en las que el pH es demasiado elevado para que se dé la nitrosación química (de Kok y van Maanen, 2000).

El nitrato (NO_3^-) ingerido es reducido a nitritos (NO_2^-) principalmente por las bacterias orales presentes en la saliva (Bahar y col., 2007). Bajo las condiciones ácidas del estómago, el nitrito es rápidamente protonado a ácido nitroso (HNO_2). La unión de dos moléculas de ácido nitroso desencadena la formación del trióxido de nitrógeno (N_2O_3) (Tarpey y col., 2003), el cual es un agente nitrosante que reacciona con las aminas no protonadas para formar las N-nitrosaminas (Chung y col., 2002).

La nitrosación endógena puede darse también en otras localizaciones del tracto gastrointestinal diferentes al estómago (Vermeer y col., 1999; Krul y col., 2004; Proulx y col., 2007). Esta nitrosación intestinal podría explicar la asociación entre el consumo de carnes rojas y el aumento del

riesgo de padecer cáncer colorrectal (Bingham y col., 1996). Bajo ciertas condiciones, el grupo hemo puede ser nitrosado, y actuar así como agente nitrosante (Bonnett y col., 1975). Además, el ON^* puede también reaccionar directamente con la hemoglobina y la mioglobina para producir compuestos N-nitroso (Wade y Castro, 1990).

La tercera y última vía de formación endógena de las N-nitrosaminas es mediante la activación de macrófagos y otros tipos de células, como los hepatocitos, en infecciones o inflamaciones crónicas (de Kok y col., 2005). Estas células liberan ON^* , el cual puede conducir a la nitrosación de las aminas (Vermeer y col., 2004).

2.3. Formación en los alimentos

La exposición humana a las N-nitrosaminas preformadas exógenamente puede tener diversas procedencias. Ya hemos indicado que las principales fuentes son la dieta, el tabaco, los cosméticos, los productos farmacéuticos, los compuestos químicos utilizados en la agricultura, o ciertas ocupaciones laborales, como el trabajo en la industria del cuero, del metal o de la goma (Straif y col., 2000; Filho y col., 2003).

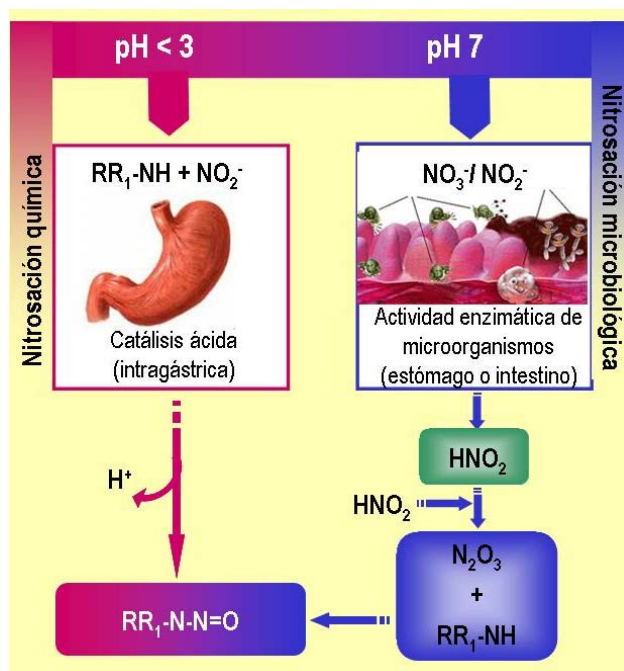


Figura 2. Vías de formación *in vivo* de las N-nitrosaminas.

La formación de las N-nitrosaminas en los alimentos puede tener lugar durante su almacenamiento y maduración, o en el transcurso de algunos procesos clave en su elaboración, como el tratamiento térmico (López y col., 2002). Su formación se debe a la presencia de los precursores en los alimentos (nitratos y nitritos), junto con la existencia de unas condiciones idóneas de pH, humedad, etc., necesarias para producirse la reacción de nitrosación (González-Alatorre y col., 2001). Así, en alimentos conservados por la adición de nitratos y nitritos, como los productos cárnicos curados (en particular el beicon) y el queso se ha observado la formación de N-nitrosaminas, aunque los niveles detectados no suelen exceder de 1 µg/kg. En el proceso de ahumado de la carne y el pescado, los óxidos de nitrógeno presentes en el humo pueden actuar como agentes nitrosantes. El uso de gases de combustión en la fase de secado de determinados productos, como las bebidas alcohólicas, la leche o las especias, también contribuyen al aporte de agentes nitrosantes (Jakszyn y col., 2006 b; Jurado-Sánchez y col., 2007). La actividad microbiana de los vegetales encurtidos, con capacidad reductora de los nitratos a nitritos, supone también un incremento potencial de la formación de las N-nitrosaminas (Grill y col., 1995). El almacenamiento de los alimentos en condiciones de exceso de humedad favorece el crecimiento del hongo *Fusarium moniliforme* que produce un aumento de compuestos nitrosantes en el alimento contaminado (Voss y col., 2001). Finalmente, las N-nitrosaminas se pueden originar a través del material de envasado del producto (metales y gomas), como consecuencia de la interacción de las aminas, empleadas como aditivos en estas industrias, y el nitrito presente en el producto cárnico (Iavicoli y Carelli, 2006).

Como previamente hemos mencionado (**Capítulo I, apartado 2.1**), la formación de N-nitrosaminas es producto de la reacción de los nitritos con las aminas. Los agentes nitrosantes, en concreto el ON^{*}, formados a partir de las sales nitrificantes reaccionan con sustratos nitrosables, constituidos esencialmente por aminas presentes en los alimentos. Estas aminas pueden ser constituyentes del alimento, como ciertos aminoácidos y aminas biógenas, mientras que otras derivan de la adición de

especias, como es el caso de la piperidina (Lijinsky, 1999) o incluso pueden proceder de los materiales empleados para el embalaje de dichos productos (Cassens, 1995). En el caso de los productos cárnicos curados la reacción tiene lugar entre los nitritos, añadidos como conservantes, y los compuestos aminados constituyentes del músculo, como la creatina, prolina o lisina (Ellis y col., 1998).

2.4. Exposición humana a la N-nitrosopiperidina y a la N-nitrosodibutilamina

La NPIP se forma a partir de las reacciones entre los agentes nitrosantes derivados de las sales de curado y de los compuestos procedentes de la pimienta y el pimentón, como la piperidina y la piperina o sus precursores (Nakamura y col., 1981; Shenoy y col., 1992). De esta forma, podríamos encontrar la NPIP en productos cárnicos crudos curados, como chorizos, salchichones, jamones y lomos, que incluyen especias en la formulación de las mezclas y en los que los tiempos de curación son prolongados. Esto favorecería el contacto entre los agentes nitrosantes de las sales de curado y los precursores presentes en las especias empleadas.

La presencia de NPIP se ha descrito en varios productos cárnicos curados cocinados (Sen y col., 1979; Spiegelhalder y col., 1980). Glória y col. (1997) estudiaron los niveles de N-nitrosaminas existentes tanto en el beicon de cerdo como en los productos derivados del beicon sometidos a un proceso de fritura, y fabricados y comercializados en Estados Unidos. La NPIP fue detectada en el 11% de las muestras de beicon de cerdo. Todas estas muestras tenían en común el contener pimienta como ingrediente. Domanska y Kowalski (2003) describen que los niveles de NPIP en productos cárnicos constituidos por piezas cárnicas enteras, tipo jamón de york, son inferiores a los existentes en productos cárnicos donde la matriz cárnica es menos uniforme, tipo salchichas. En estos últimos es más fácil la difusión de las especias que contienen los precursores de esta N-nitrosamina, y por tanto el contacto con posibles agentes presentes en la misma. Estos autores también atribuyen la formación de la NPIP a la utilización de especias. Así, trabajos realizados en Canadá con salchichón (Heyns, 1977;

Lindner, 1995) han puesto de manifiesto la presencia de NPIP (hasta 0,06 ppm). Muy recientemente, Yurchenko y Mölder (2007) comprobaron también que el contenido de NPIP en productos cárnicos especiados a la parrilla (entre 11,34 y 14,60 µg/kg) duplicaba al hallado en los correspondientes productos cárnicos sin especias (entre 6,53 y 8,38 µg/kg).

En cambio, la NDBA se origina en productos cárnicos como consecuencia de la interacción del nitrito presente en la carne con las aminas empleadas como aditivos de la industria de la goma (Sen y col., 1987). Dichos aditivos pueden nitrosarse para formar la NDBA que posteriormente migra, aunque lentamente, al producto. También se ha descrito la posibilidad de que dichos aditivos migren y reaccionen con los nitritos en el propio producto cárnico (Pensabene y col., 1995; Fiddler y col., 1998). Así, en productos cárnicos similares embalados con otros materiales, como el algodón o el plástico, no se detectó esta N-nitrosamina, por lo que se dedujo que su presencia se debía a la utilización de la goma en los envases (Spiegelhalder y Preussman, 1983).

La primera indicación sobre la presencia de N-nitrosaminas en los componentes de la goma procede de un estudio realizado por Fajen y col. (1979), en el cual se detectaron cantidades traza de N-nitrosaminas en el aire de varias industrias de la goma. Más tarde, Ireland y col. (1980) y otros autores (Spiegelhalder y Preussmann, 1983; Eisenbrand y col., 1996) detectaron N-nitrosaminas en los componentes de la goma que habitualmente entran en contacto con las personas, entre los que pueden citarse chupetes infantiles, guantes, preservativos, tetinas para biberones, juguetes y globos. La N-nitrosamina que se encuentra más frecuentemente en estos productos es la NDBA (Spiegelhalder y Preussman, 1983). De esta forma, los chupetes y las tetinas para biberones que se emplean para el cuidado y la alimentación de bebés podrían multiplicar la exposición de la población infantil a esta N-nitrosamina por 100, con respecto a un individuo adulto (Westin, 1990). Además, en un trabajo llevado a cabo por Biaudet y col. (1997) se han detectado hasta 15.600 ng/g de compuestos nitrosables en

preservativos, siendo la N-nitrosamina mayoritaria la NDBA (entre 7,3 y 31 ng/g), y en menor grado la NDMA (entre 3,8 y 4,2 ng/g) y la N-nitrosodietilamina (NDEA) (3,4 y 3,7 ng/g). Por tanto, la migración de la NDBA procedente de los preservativos a través de las secreciones genitales podría ser bastante significativa.

2.5. Límites de N-nitrosopiperidina y N-nitrosodibutilamina permitidos en los alimentos

Algunos países han establecido ciertos límites en relación a los niveles de N-nitrosaminas en alimentos y bebidas. En Estados Unidos, la Administración de Drogas y Alimentos (ADA) ha establecido el límite máximo de 10 µg/kg de NPYR para poder introducir productos alimenticios al mercado (Glória y col., 1997). Por otra parte, en Rusia y Estonia la suma de la NDMA y la NDEA en productos cárnicos y en pescado no debe superar el nivel máximo establecido de 2,0-4,0 µg/kg (Decisión del Gobierno de la República de Estonia, 2000; Domanska y Kowalski, 2003). Sin embargo, hasta el momento la concentración de las N-nitrosaminas en alimentos no ha sido regulada por la legislación de la Unión Europea. Únicamente se ha limitado la liberación de compuestos nitrosables en tetinas y chupetes a 100 ng/g (Biaudet y col., 1997). Por tanto, la tendencia actual de la Unión Europea es la de rebajar las cantidades de nitratos y nitritos añadidas a los productos cárnicos y a otros alimentos, ya que de este modo se conseguiría evitar no sólo la formación de N-nitrosaminas en los alimentos, sino también la formación de las mismas en el interior del organismo.

3. RELEVANCIA DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA EN LA CARCINOGENESIS QUÍMICA: IMPACTO EN LA SALUD HUMANA

Aunque la carcinogenicidad de las N-nitrosaminas es difícil de evaluar en humanos, son muchos los estudios epidemiológicos que relacionan la exposición a estos compuestos con la incidencia de diferentes tipos de cáncer (Pegg y Shahidi, 2000;

Eichholzer y Gutzwiller, 2003). Por tanto, el balance resultante del consumo de vegetales, frutas o compuestos inhibidores de la nitrosación, y de aditivos empleados en la elaboración de productos cárnicos curados o de pescado salado puede ser determinante en esta asociación (Eichholzer y Gutzwiller, 2003). Así, recientemente Liu y col. (2006) han observado que el consumo habitual de productos cárnicos curados o de pescado acompañado ocasionalmente de vegetales está estrechamente vinculado con el riesgo de padecer leucemia aguda.

Las N-nitrosaminas detectadas de forma más habitual en los alimentos son las dialquilnitrosaminas (NDMA, NDEA y NDBA) y las N-nitrosaminas de estructura cíclica (NPYR y NPIP) (Rom y Markowitz., 2006). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (AIIC) ha evaluado más de 900 compuestos que suponen un riesgo para la salud humana, y ha clasificado a la NPIP y a la NDBA como cancerígenos del grupo 2B (posibles carcinógenos en humanos).

Existen diferentes vías por las que las N-nitrosaminas entran en contacto con el organismo: aérea (N-nitrosaminas volátiles), digestiva y cutánea (Rigel y col., 2006). La mayoría de las N-nitrosaminas se metabolizan eficientemente en el hígado (Hodgson y Goldstein, 2001) y aproximadamente el 60% de las N-dialquilnitrosaminas se degradan a CO₂ y se exhalan, aunque una pequeña parte se excreta por orina y una porción insignificante por heces (Fournier y col., 2006).

La toxicidad sistémica de las N-nitrosaminas se descubrió de forma casual en los seres humanos. Los primeros casos de toxicidad aguda y mortalidad por N-nitrosaminas fueron descritos en 1937 (Freund, 1937), pero se pasaron por alto hasta 1954 cuando Barnes y Magee descubrieron la NDMA y estudiaron sus efectos cancerígenos en ratas (Barnes y Magee, 1954). La intoxicación aguda con la NDMA provoca hepatitis y necrosis de las células hepáticas (Fussgaenger y Ditschuneit 1980; Herron y Shank, 1980; Durand, 2002), mientras que la administración crónica produce fibrosis hepática, proliferación de los conductos biliares e hiperplasia (Cameán y Repetto, 2007). Sin embargo, los órganos afectados tras la

exposición a otras N-nitrosaminas no se ciñen exclusivamente al hígado. Así, tras el tratamiento de ratas con la NPIP se ha observado hiperplasia y formación de nódulos tumorales en el esófago, la cavidad nasal y la mandíbula inferior (Gray y col., 1991), mientras que la exposición a la NDBA provoca lesiones hiperplásicas, papilomas y carcinomas en el urotelio (Ito, 1976; Okajima y col., 1981; Nishikawa y col., 2003).

La actividad tóxica de las N-nitrosaminas está estrechamente relacionada con los efectos mutagénicos y cancerígenos que inducen (Mataix y col., 2005). Así, los procesos patológicos desencadenados por su actividad citotóxica, pueden considerarse como estadios previos de procesos carcinogénicos (Martínez y col., 2000). Estudios *in vivo* con diferentes N-nitrosaminas revelaron que estos compuestos son inhibidores de la actividad enzimática mitocondrial (Saavedra y col., 2004), lo que conduce a un aumento en la formación de compuestos mutagénicos, derivados de las mismas (Hernández y Sastre, 1999). Este hecho viene a constatar que la actividad citotóxica de las N-nitrosaminas amplifica su capacidad mutagénica y cancerígena (Hakura y col., 2005). Además, existen indicios de que algunas N-nitrosaminas inducen mutaciones en oncogenes (Li y col., 2007). En concreto, se ha observado un posible punto de mutación en el oncogén *ras* por efecto de la actividad de compuestos N-nitroso (Liu y col., 2003; Hecht, 2008). Este tipo de mutación se ha detectado en diferentes procesos cancerígenos en la especie humana (Mijal y col., 2006).

La carcinogénesis, entendiendo como tal la inducción del cáncer, es un proceso con múltiples etapas, en las que se producen alteraciones a nivel molecular y celular. Podemos diferenciar tres etapas: iniciación, promoción y progresión, aunque están estrechamente relacionadas entre sí. La iniciación es un proceso rápido e irreversible que involucra una serie de acontecimientos intra y extracelulares, como la absorción o exposición al carcinógeno, su distribución y transporte a los órganos y tejidos donde se produce la activación metabólica y la detoxificación, y la interacción covalente de las especies reactivas con el DNA, produciendo el consecuente daño genotóxico. Por el contrario, la

promoción se considera un proceso relativamente lento y reversible en el que se produce la proliferación y la acumulación de las células pre-neoplásicas. Por último, la progresión implica el crecimiento de un tumor con un alto potencial invasivo y metastásico. La **Figura 3** muestra la carcinogénesis inducida por las N-nitrosaminas.

El efecto cancerígeno desarrollado por las N-nitrosaminas se ha analizado en un elevado número de especies animales, incluyendo mamíferos, aves, peces y anfibios. Las N-nitrosaminas de estructura cíclica mayoritarias en la dieta, como la NPYR y la NPIP, han demostrado ser potentes carcinógenos en bioensayos realizados con roedores, encontrándose una alta incidencia de tumoración utilizando dosis diarias menores de 1 mg/kg de peso durante una exposición prolongada (Preussmann y col., 1977; Eisenbrand y col., 1980). Sin embargo, Takayama y col. (2008) han observado que la exposición crónica a la NPIP provoca la aparición de tumores malignos en primates pero requiere dosis más elevadas, entre 40 mg/kg (vía intraperitoneal) y 400 mg/kg (vía oral). Por el contrario, Lijinsky y Reuber (1983) estudiaron en ratas la carcinogénesis producida por la NDBA, concluyendo que es un carcinógeno mucho más débil que otros N-nitroso compuestos en esta especie animal, ya que el 80% de los animales tratados con una dosis elevada [2 mM (0,33 mg/ml)] sobrevivieron

durante 83 semanas.

Existe una gran variedad de órganos diana de la actividad carcinogénica de las N-nitrosaminas (Pelkonen y Raunio, 1997; Ferguson, 2002). Así, los efectos carcinogénicos de las N-nitrosaminas han sido observados en 29 órganos diana diferentes (NIOSH, 1983). Los tumores de hígado, esófago, pulmón, mucosa nasal, vejiga urinaria, lengua y estómago son inducidos, de forma común, por las N-nitrosaminas en ratas (Lin y col., 2002; 2003 a). Se ha observado que la dosis, la frecuencia y la ruta de administración en ciertas especies (por ejemplo en ratas) puede cambiar el órgano afectado, incluso la célula diana (Lijinsky y Kovatch, 1989). Esto hace difícil, si no imposible, predecir basándonos en experimentos realizados en ratas o ratones, cual sería el órgano diana de una N-nitrosamina particular en humanos.

Las N-nitrosaminas de estructura cíclica inducen tumores en un amplio rango de localizaciones tisulares (Andersson y col., 2003; Wong y col., 2003 a; Kanki y col., 2005). La NPIP causa tumores en esófago, y también en cavidad nasal, hígado y estómago, mientras que su homóloga, la NPYR induce principalmente tumores en hígado, pero no en esófago de ratas (Druckrey y col., 1967; Lijinsky y Reuber, 1981; Gray y col., 1991). Wong y col. (2003 a y b) atribuyeron los

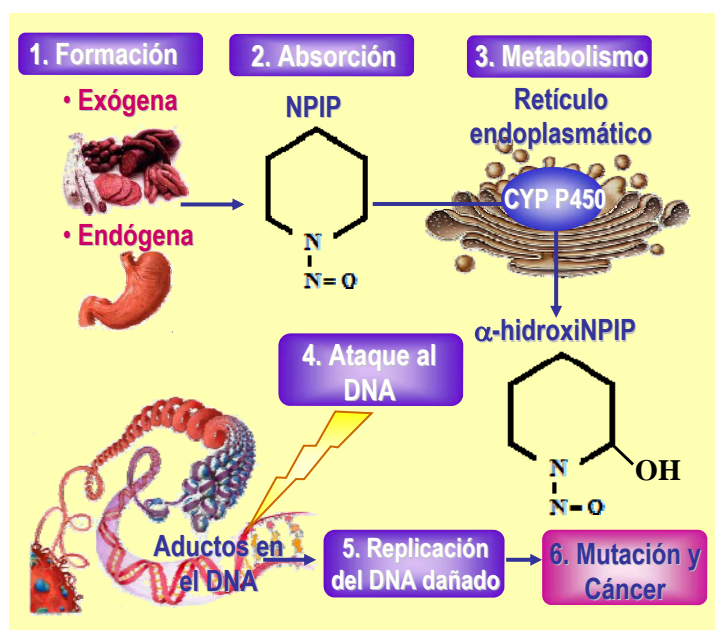


Figura 3. Carcinogénesis inducida por las N-nitrosaminas.

diferentes efectos carcinogénicos a diferencias en la activación metabólica local. Así, los microsomas del esófago y de la mucosa nasal de la rata poseen las enzimas responsables de la activación metabólica de la NPIP pero no las de la NPYR, mientras que los microsomas del hígado activan tanto las de la NPIP como las de la NPYR.

En cuanto a la NDBA, es el primer carcinógeno de vejiga urinaria identificado en ratas (Druckrey y col., 1967), pero también produce tumores en pulmón, estómago e hígado (Shibata y col., 1990; Hirose y col., 1991). Este compuesto se metaboliza en los hepatocitos (Okada y Ishidate, 1977), y el metabolito resultante se elimina en la orina, originando lesiones tumorales en la vejiga urinaria (Tsuda y col., 1987). Okajima y col. (1981) hallaron cistitis e hiperplasia en estadios iniciales, que progresaron a papilomas y carcinomas de la vejiga urinaria en estadios finales en perros a los que se les administraba la N-butyl-N-(4-hidroxi-butyl)nitrosamina, metabolito resultante de la bioactivación hepática de la NDBA.

Por lo tanto, la susceptibilidad de un tejido al proceso cancerígeno estará asociada a la competencia metabólica de dicho tejido para convertir estos procarcinógenos en metabolitos carcinogénicos y, a la unión de estos metabolitos al DNA celular (Ioannides, 1999; Kamataki y col., 2002). La **Tabla 3** muestra la actividad carcinogénica de la NPIP y de la NDBA, así como el alimento implicado.

4. METABOLISMO DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA: PAPEL DEL CITOCROMO P450 COMO MARCADOR BIOLÓGICO

Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos (Top y Springael, 2003). Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan las micotoxinas o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los fármacos, los cosméticos, los aditivos alimentarios (nitratos y nitritos), los pesticidas, los productos de uso doméstico, los derivados de la combustión de carburantes, los residuos procedentes de la industria química, etc. (Rieger y col., 2002).

Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos específicos para acelerar la eliminación de estos compuestos. Se trata de una serie de enzimas no integradas en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos sustratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. Al conjunto de reacciones a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo para su neutralización y

Tabla 3. Actividad carcinogénica de la NPIP y de la NDBA (Tricker y Preussmann, 1991).

N-nitrosamina	Carcinogenicidad		Procedencia	
	Especies	Órgano diana	Alimento	Concentración (µg/kg)
N-nitrosopiperidina (NPIP)	Rata	Hígado, esófago, tracto respiratorio y digestivo superior, cavidad nasal	Carne curada	< 20
	Ratón	Estómago, hígado, pulmón	Beicon frito	< 9,2
	Hamster	Hígado, tracto respiratorio y digestivo superior	Salami con pimienta	< 30
			Pimienta	< 300
			Mezcla de Especies	0,6-3,5
N-nitrosodibutilamina (NDBA)	Rata	Hígado, vejiga urinaria, esófago, faringe	Vegetales escabechados	< 14
	Ratón	Estómago, hígado, esófago, vejiga urinaria, pulmón	Carne curada (envasada en plástico)	1-5,6
	Hamster	Tracto respiratorio, pulmón, vejiga urinaria	Pollo ahumado	< 5,3
	Cobaya	Vejiga urinaria, hígado	Pescado seco (Japón)	< 3,1

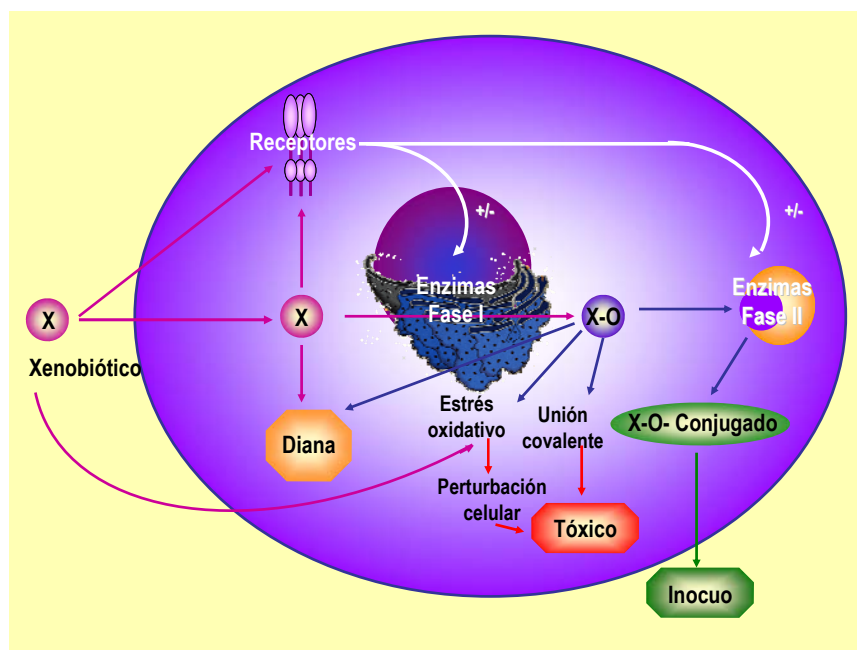


Figura 4. Metabolismo de los xenobióticos (Santiago y col., 2002).

eliminación se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización de xenobióticos (Guengerich, 2001) (Figura 4).

Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas:

- **Fase I:** los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles debido a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo) (Prior y Baker, 2003). El citocromo P450 (CYP450) es el principal responsable dentro de las enzimas de la Fase I del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. No se trata de un único enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas localizadas en el retículo endoplasmático de numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Donato, 2006). Algunos CYP450s son comunes a varias especies (p.e. el CYP 2E1 y el CYP 1A1 están presentes en la especie humana, rata, ratón, hamster y otros mamíferos) (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001; Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004) y otros son característicos de una especie en particular (p.e. el

CYP 2A6 es exclusivo de la especie humana) (Pelkonen y col., 2000).

- **Fase II:** los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la Fase I se conjugan con moléculas endógenas de carácter polar, tales como el ácido glucurónico, el glutatión (GSH), el sulfato o los aminoácidos que son rápidamente excretados a través de la orina o la bilis (González y Kimura, 2001). En este grupo se incluyen las glutatión-S-transferasas (GST), las N-acetil-transferasas (NAT), las sulfottransferasas (SULT), las NAD(P)-quinona oxidoreductasas (NQO) y las UDP-glucuronil-transferasas (UDP-GT). Estas últimas son las únicas localizadas en el retículo endoplasmático, a diferencia del resto de las enzimas de la Fase II que se localizan en el citosol (Ritter, 2000).

En los humanos, las diferentes isoformas enzimáticas de la Fase I y II están ampliamente distribuidas por todo el organismo, si bien el hígado es el órgano con mayor expresión de estas enzimas (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001; McCarver y Hines, 2002). Su expresión está regulada por factores genéticos (polimorfismos), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (efectos inductores o inhibidores provocados por

factores nutricionales o por la exposición a xenobióticos). Por esta causa, sus niveles hepáticos varían extraordinariamente entre diferentes individuos, lo que justifica las diferencias en la respuesta humana a las sustancias tóxicas (Turkey y Strassburg, 2000; Koch y col., 2002).

En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, a este proceso se le denomina bioactivación y se produce durante las reacciones de la Fase I (Cancino-Badías y col., 2003; Brown y col., 2008). La producción de radicales libres y otros metabolitos electrofilicos son una fuente de daño para la célula, y la detoxificación de estos compuestos es por tanto esencial si se quiere prevenir la toxicidad. Así, un determinado tejido puede ser susceptible a la acción tóxica de un compuesto xenobiótico debido a la exposición a metabolitos electrofilicos con capacidad para reaccionar con el DNA, junto con una pobre detoxificación a nivel tisular y una ineficaz reparación del daño al DNA (Coles y Ketterer, 1990).

Este proceso de bioactivación también permite la transformación de procarcinógenos en carcinógenos (Schwarz y col., 2005). Diversos estudios sobre los mecanismos bioquímicos de acción de las N-nitrosaminas han llegado a la conclusión de que la carcinogenicidad, la citotoxicidad y la mutagenicidad producida por estos compuestos se debe a su conversión metabólica, a través del CYP450, en reactivos fuertemente electrofilicos (Godoy y col., 2002). La activación metabólica de las N-nitrosaminas se inicia principalmente con la hidroxilación del átomo de carbono localizado en la posición α del grupo N-nitroso (Fujita y Kamataki, 2001 a). La **Figura 5** representa la bioactivación de la NPIP, dando lugar a la formación de la α -hidroxiNPIP. Esta molécula es muy inestable, descomponiéndose rápidamente en metabolitos electrofilicos, los cuales presentan una gran afinidad para unirse a las bases del DNA formando aductos.

No obstante, en la activación metabólica de la NDBA se ha podido observar también la

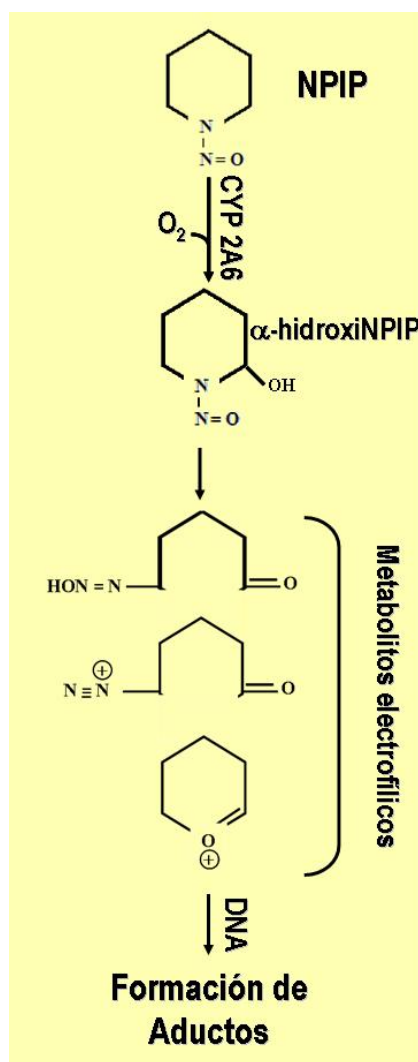


Figura 5. Activación metabólica de la N-nitrosopiperidina (NPIP) (Wong y col., 2003 b).

hidroxilación del átomo de carbono situado en la posición β -, γ - y ω -1 del grupo N-nitroso (Park y Archer, 1978; Suzuki y Okada, 1980), aunque la α y la ω -1-hidroxilación son las rutas más comúnmente implicadas en la bioactivación de esta N-nitrosamina (Suzuki y col., 1983) (**Figura 6**). Otros estudios demuestran que no solo el CYP450 participa en la activación metabólica de la NDBA. Enzimas del citosol, como la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), pueden estar involucradas en las últimas etapas del metabolismo de los derivados ω -hidroxi de la NDBA para producir los productos ω -carboxilados (Irving y Daniel, 1987; Irving, 1988; Irving y Daniel, 1988). Además, Janzowski y col. (1994) demostraron que enzimas mitocondriales dependientes del adenosín trifosfato (ATP) implicadas en la degradación de ácidos grasos

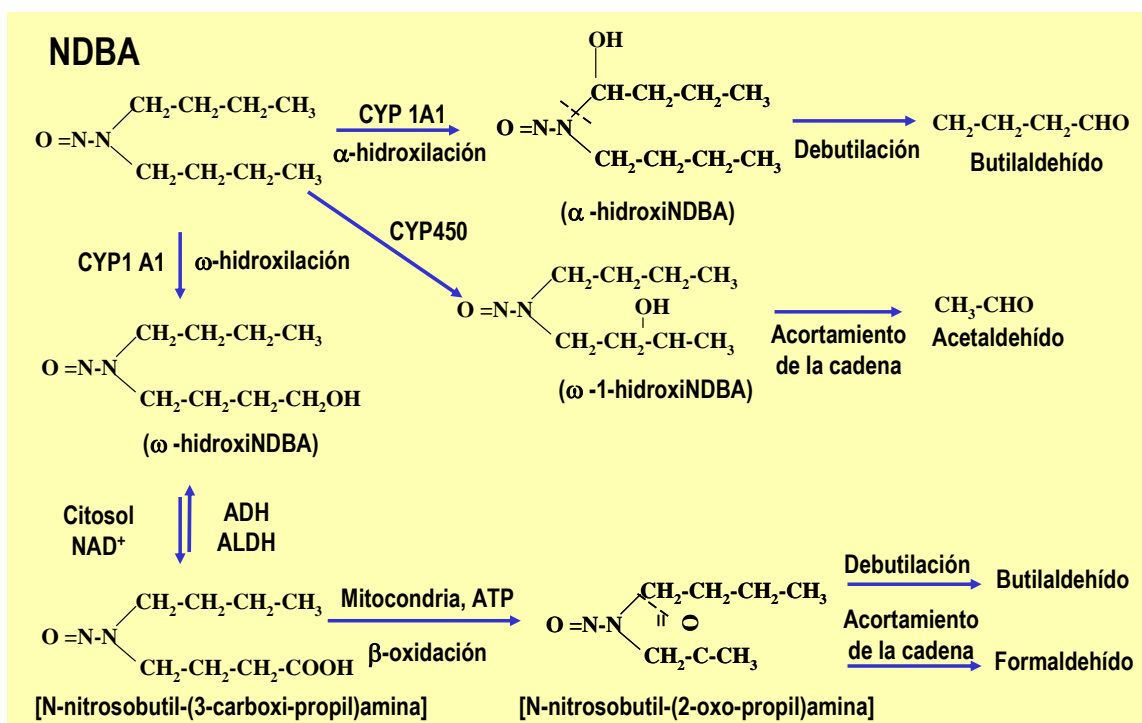


Figura 6. Activación metabólica de la N-nitrosodibutilamina (NDBA) (Shu y Hollenberg, 1996).

pueden también participar en la biotransformación de las ω -hidroxinitrosaminas en metabolitos β -oxopropil. Estos derivados β -oxopropil son a su vez buenos sustratos para las enzimas del CYP450 (Janowski y col., 1994).

El CYP450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar (Mansuy, 1998; Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001). Entre los sustratos del CYP450 se incluyen tanto moléculas de bajo peso molecular como otras mayores, aromáticas o lineales, planas o globulares, que contengan o no heteroátomos. Esta amplia especificidad de sustrato es debida a la existencia de múltiples isoformas de este enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente. Actualmente se cree que sólo tres familias de genes P450 (CYP 1, CYP 2 y CYP 3) de las 27 identificadas, son las responsables de la activación metabólica de la mayoría de los compuestos xenobióticos (Santiago y col., 2002), mientras que el resto de familias incluyen isoformas CYP450s que intervienen en la biosíntesis

y el metabolismo de compuestos endógenos (esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles).

En el caso concreto de las N-nitrosodialquilaminas, fueron Fujita y Kamataki (2001 a) quienes determinaron el papel de 11 isoformas enzimáticas del CYP450 en la activación metabólica de estos compuestos. Entre las conclusiones de este estudio, cabe destacar que el número de átomos de carbono presentes en la cadena unida al grupo N-nitroso de las N-nitrosaminas es el principal factor que determina cual será la isoforma enzimática del CYP450 que llevará a cabo la activación metabólica de dichos procarcinógenos.

La familia CYP 1 está formada por tres isoformas enzimáticas, el CYP 1A1, el CYP 1A2 y el CYP 1B1. De ellas, el CYP 1A1 constituye la mayor fracción del CYP450 extrahepático (Meyer y col., 2002). Las tres isoformas son activas en la metabolización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) a compuestos intermedios que pueden unirse al DNA (Shimada y col., 2001; Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004). Sin embargo, no existía información previa sobre el papel del CYP 1A1 en la activación mutagénica de las N-nitrosaminas, hasta que Fujita y Kamataki (2001 a)

demonstraron la participación del CYP 1A1 en la activación metabólica de N-nitrosodialquilnitrosaminas de cadena alquilo larga, como la NDBA.

La familia del CYP 2 es la que contiene un mayor número de miembros, los cuales están organizados en más de 20 subfamilias (Du y col., 2004). Dentro de la subfamilia del CYP 2A, la isoforma enzimática más interesante es el CYP 2A6. Este citocromo se expresa en el hígado, donde constituye aproximadamente el 4% del total (Pelkonen y col., 2000), aunque también se ha detectado en la mucosa nasal. Cataliza predominantemente la hidroxilación de la cumarina (Kim y col., 2005 a), aunque también es responsable de la activación metabólica de un amplio espectro de N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente, como la NPIP, NPYR, NDMA, NDBA o la 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (Kushida y col., 2000; Kamataki y col., 2002). En la subfamilia CYP 2E se encuentra una isoforma enzimática con un papel importante en el metabolismo del etanol: el CYP 2E1 (Monostory y col., 2004). Éste representa un 10% del CYP450 total en el tejido hepático (Cozza y Armstrong, 2001). Además, el CYP 2E1 es el principal citocromo que cataliza el metabolismo de las N-nitrosodialquilaminas de cadena alquilo corta, como es el caso de la NDMA (Kushida y col., 2000). No obstante, también participa, aunque en menor grado, en la bioactivación de la NPIP (Kushida y col., 2000) y de la NDBA (Fujita y Kamataki, 2001 a).

5. GENOTOXICIDAD DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos tóxicos heredables o no, dependiendo de si afectan a células germinales o a somáticas, respectivamente. Como consecuencia de dichos efectos tóxicos aparecen procesos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis, siendo estos en ocasiones de naturaleza irreversible (Hofnung y Quillardet, 1986). Sin embargo, el daño ocasionado en el DNA por la actividad de las N-nitrosaminas, se produce sólo en las células

somáticas (Cameán y Repetto, 2007). Las N-nitrosaminas necesitan de un proceso de bioactivación para generar especies que reaccionen con el DNA. Este hecho hace que sean consideradas como genotóxicos indirectos (Fujita y Kamataki, 2001 a).

Numerosos trabajos han estudiado la citotoxicidad de las N-nitrosaminas. Recientemente, Murdok y col. (2004), empleando el ensayo del Rojo Neutro, evaluaron la citotoxicidad inducida por la NPIP en dos líneas celulares pancreáticas, la BRIN BD11 y la INS-1 y en sus respectivas líneas transfectadas con la isoforma enzimática CYP 2E1, la BRIN BD11h2E1 y la INS-1h2E1. Tras la incubación con la NPIP a dosis superiores a 2,5 mM observaron un pronunciado descenso de la viabilidad en las líneas celulares transfectadas. Asimismo, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio concluyeron que la NPIP y la NDBA a concentraciones superiores a 10 y a 6 mM, respectivamente, eran citotóxicas en células Vero (células de riñón de mono verde africano), utilizando el método MTT o bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (Zabala 2002, Tesis Doctoral).

5.1. Daño alquilativo al DNA

La principal lesión al DNA inducida por las N-nitrosaminas es el daño alquilativo (Reh y col., 2000). Se sospecha que las N-nitrosaminas inducen efectos letales en las células e inician el proceso carcinogénico como resultado de la transferencia de un grupo alquilo (metilo, etilo, propilo o butilo) al DNA (Airoldi y col., 1994).

Por primera vez en 1967, Magee y Barnes demostraron que la NDMA inducía un daño alquilativo al DNA. Tras la activación metabólica de las N-nitrosaminas se generan especies reactivas, como son el ión carbonio y el ión diazonio. Estos agentes tienen la capacidad de producir alquilaciones en diferentes radicales de las bases nitrogenadas del DNA (Frei y col., 1999). Las principales posiciones de alquilación del DNA son el N-3, -7 y O-6 de la guanina, el N-1,-3 y -7 de la adenina, el N-3, O-4 y O-

2 de la timina y el N-3 y O-2 de la citosina, tal como se representa en la **Figura 7**.

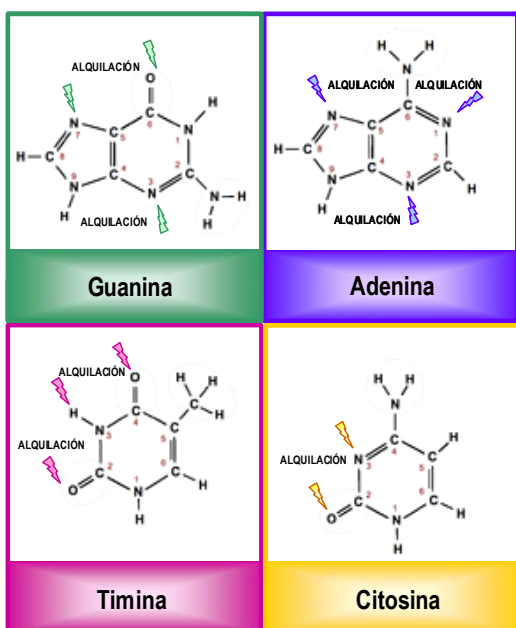


Figura 7. Principales posiciones de alquilación del DNA (Drabløs y col., 2004).

Desde entonces, la mayoría de las investigaciones realizadas se han centrado en el estudio de las dialquilnitrosaminas de cadena alquilo corta, tales como la NDMA y la NDEA, las cuales producen especies reactivas (ión metilo o etil carbonio), y la subsiguiente formación de metilaciones y etilaciones en el DNA. En cambio, los trabajos que estudian las lesiones al DNA inducidas por las dialquilnitrosaminas de cadena alquilo larga, como la NDBA, son muy escasos. La bioactivación de la NDBA conduce a la formación de especies reactivas que interaccionan con macromoléculas celulares, como el DNA o las proteínas (Shu y Hollenberg, 1997; Reh y col., 2000; Kushida y col., 2000). La principal posición de alquilación en el caso de la NDBA es el O6 de la guanina, dando lugar a la formación de la O⁶ butilguanina y la O⁶-4hidroxibutilguanina (Airoldi y col., 1994; Palli y col., 2001).

Un estudio de carcinogenicidad en ratas tratadas con la NDBA mostró que los niveles de O⁶ butilguanina y O⁶-4hidroxibutilguanina hallados en la vejiga urinaria eran 10 veces superiores a los detectados a nivel hepático (Airoldi y col., 1994). El

bajo contenido en la O⁶ butilguanina y la O⁶-4hidroxibutilguanina en el hígado podría ser resultado de una elevada actividad de la enzima O⁶ alquilguanina DNA alquiltransferasa (AT) hepática (Gerson y col., 1986). Esto explicaría por qué la NDBA en ratas ejerce sus efectos carcinogénicos principalmente en la vejiga urinaria (Druckrey y col., 1967).

Las O⁶ alquilguaninas son reparadas en el DNA por la AT (**Figura 8 A**). Las ATs principalmente catalizan la transferencia del grupo metilo de la posición O6 de la guanina de la doble cadena del DNA a un residuo cisteína de su propia secuencia, restaurando así la guanina en el DNA (Walter y col., 2001; Zhou y col., 2001). Esta proteína no es específica para grupos metilo (Drabløs y col., 2004), ya que las alquiltransferasas aisladas del hígado de rata (Pegg y col., 1984), de los tejidos humanos (Hall y col., 1985), del hígado de mono (Hall y col., 1985) y de *Escherichia coli* (Sedgwick y Lindhal, 1982; Robins y col., 1983) actúan también sobre la O⁶ etilguanina. Por ello, la O⁶ butilguanina y la O⁶-

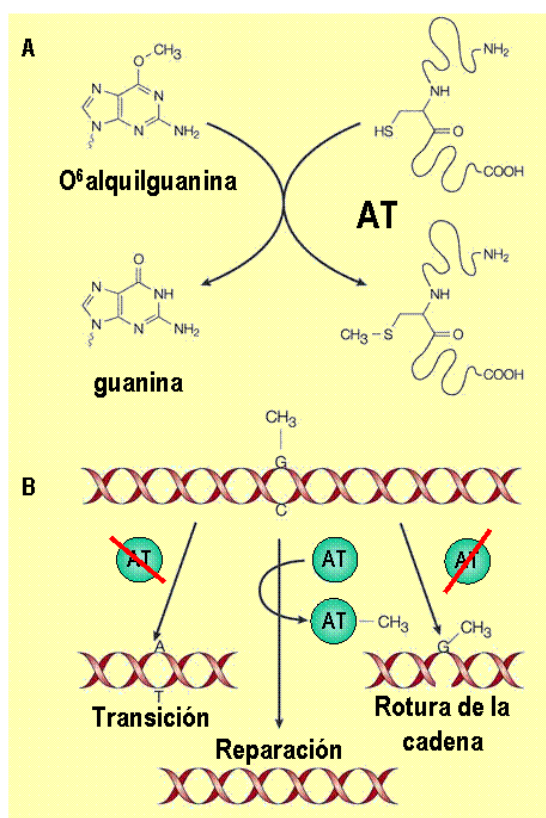


Figura 8. Mecanismo de reparación de la O⁶ alquilguanina DNA alquiltransferasa (AT) (Gerson, 2004).

4hidroxibutilguanina pueden ser también sustratos de esta enzima reparadora, aunque el índice de eliminación disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena alquilo (Morimoto y col., 1985).

Cuando la enzima reparadora se encuentra alterada, lesiones como la O⁶ butilguanina y la O⁶-4hidroxibutilguanina pueden acumularse en el DNA (**Figura 8 B**). La presencia de estas lesiones provoca bien la rotura de la cadena de DNA o bien la transición del par guanina-citosina a adenina-timina [GC:AT] (Baumgart y col., 1993) que produce mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (Bignami y col., 2000). La alteración en la expresión de estos genes conduce a un desequilibrio en el control del crecimiento celular (Steen, 2000; O'Brien y Brown, 2006).

No obstante, aunque se ha demostrado la capacidad de alquilación del DNA de la NDBA, Shu y Hollenberg (1997) observaron en hepatocitos de rata que las especies reactivas derivadas de la NDBA alquilaban preferentemente proteínas. Una posible explicación para este significativo aumento en la alquilación de las proteínas frente a la alquilación al DNA podría ser que el grupo alquilo de cadena larga (grupos butilo) no puede movilizarse tan rápidamente como el grupo alquilo de cadena corta (grupos metilo) desde un lugar de activación tan distante, como es el retículo endoplasmático (donde está el CYP450), hasta el núcleo para interactuar con el DNA. Además, estos grupos butilo son altamente reactivos, de tal forma que reaccionan rápidamente con las proteínas, ya que están más próximas que el DNA.

De forma similar, las lesiones al DNA inducidas *in vivo* a partir de las N-nitrosaminas de estructura cíclica prácticamente no han sido estudiadas y se desconoce su naturaleza en la actualidad. Lijinsky y col. (1973) no observaron ni metilación ni etilación de las guaninas en el DNA de los hepatocitos de ratas expuestas a N-nitrosaminas de estructura cíclica como la NPIP, la NPYR y la N-nitrosomorfolina (NMOR), aún cuando algunos de estos compuestos son reconocidos carcinógenos hepáticos comparables en potencia a la NDMA y la NDEA, las cuales dan lugar a alquilaciones que son detectadas fácilmente.

Más tarde, Young-Sciame y col. (1995) demostraron que la α -hidroxilación de la NPIP generaba diazohidróxidos que reaccionaban con el N2 de la guanina. Estas lesiones aunque son inestables *in vitro*, podrían ser más estables *in vivo*, como se ha observado en las lesiones del DNA formadas tras el tratamiento con las N-nitrosaminas del tabaco, como son la N-nitrososnicotina (NNN) y la NNK (Hecht, 1994). Recientemente, Wang y col. (2007) detectaron niveles cuantificables de lesiones en el N2 de la guanina en el DNA de los hepatocitos de ratas tratadas con la NPYR. Sin embargo, hasta la fecha no existen datos disponibles sobre la naturaleza de las lesiones en el DNA en animales expuestos a la NPIP. Por lo tanto, es muy importante obtener más datos a partir de estudios *in vivo* sobre la estabilidad y las propiedades biológicas de estas lesiones, aunque podemos prever que causarán errores en la codificación del DNA y mutaciones.

5.2. Daño oxidativo al DNA

Los seres humanos y la mayoría de los organismos eucariotas necesitan oxígeno para mantener una producción de energía suficiente para sobrevivir, aunque su utilización implica la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs). En el organismo debe existir un equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se rompe a favor de las EROs se produce el denominado estrés o daño oxidativo (Kohen y Nyska, 2002).

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras (Namiki, 1992; Vicario, 1997; Van Haaften y col., 2003). Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan EROs, ya que generalmente son más reactivas que la molécula de oxígeno en su estado fundamental (Chandra y col., 2000). EROs es un término global utilizado para referirse tanto a radicales libres oxigenados como a otros derivados del oxígeno no radicales con capacidad de generar radicales libres. Entre las EROs que se producen en las células

INTRODUCCIÓN GENERAL

encontramos el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), y también otras especies no radicales [(el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno molecular "singlete" ($^1\text{O}_2$)] (Rigas y Sun, 2008). Además, existen también especies reactivas del nitrógeno (ERNs) (Moncada y Higgs, 1991), como el óxido nítrico ($\text{ON}\cdot$) y el peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), entre otros, los cuales pueden inducir un daño *per se* o combinarse con las EROs para aumentar o atenuar el daño oxidativo.

Las EROs se pueden generar en todo el organismo a partir de fuentes endógenas, como son los productos de la respiración celular o de la respuesta inflamatoria, y también proceder de fuentes exógenas como consecuencia del metabolismo de los carcinógenos (el benceno, la aflatoxina, el benzo(a)pireno [B(a)P], etc.) (Figura 9). En el caso concreto de las N-nitrosaminas, el metabolismo oxidativo a través del CYP450 genera una variedad de especies radicales y no radicales, responsables de los efectos tóxicos de estos

carcinógenos (Mostafa y Sheweita, 1992; Zimmerman, 1993). El CYP450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato resultando en la formación de H_2O_2 y de $\cdot\text{O}_2^-$. Así, un aumento en la actividad del CYP450 puede favorecer el consumo acelerado del oxígeno y aumentar la producción de las EROs.

Recientes investigaciones han observado un aumento en la producción intracelular de las EROs en cultivos celulares humanos tras el tratamiento con N-nitrosaminas, como la NNK, la NDMA y la NMOR (Lin y Hollenberg, 2001; Robichová y col., 2004 a; Yeh y col., 2006). Hiramoto y col. (2002) han demostrado que se puede producir también una degradación no enzimática de las N-nitrosaminas (la NDMA y la NDEA) inducida por la reacción de Fenton, provocando la liberación del $\text{ON}\cdot$. Si el $\text{ON}\cdot$ reacciona con las EROs puede dar lugar a la formación de otras ERNs, como el dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y otros óxidos del nitrógeno (Williams y Jeffrey, 2000). Así, la reacción del $\text{ON}\cdot$

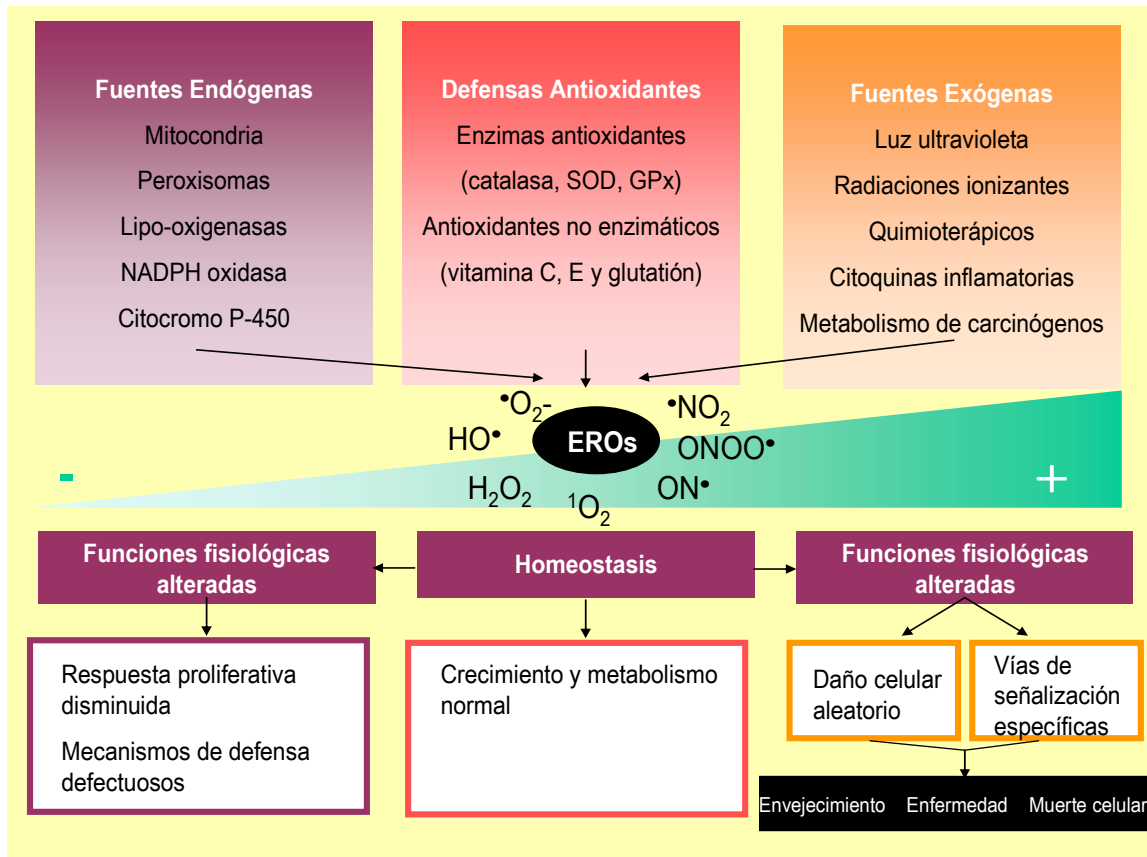


Figura 9. Fuentes y respuesta celular a las EROs (Finkel y Holbrook, 2000).

con el $^{\bullet}\text{O}_2$ da lugar a la formación del ONOO^{\bullet} , una especie altamente reactiva que causa daño oxidativo y nitrativo al DNA (de Rojas-Walker y col., 1995).

Las EROs atacan todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo sustratos lipídicos, proteínas y RNA aunque el DNA es la principal molécula diana de los procesos oxidativos (Cadet y col., 2000; Kawanishi y col., 2006). Por lo tanto, las EROs se consideran genotóxicas y están implicadas en el desarrollo de procesos carcinogénicos y enfermedades degenerativas (Evans, 2004; Loft y Møller, 2006; Green y col., 2008).

Una de las lesiones oxidativas más comunes, descubierta por Kasai y Nishimura (1984), es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), lesión oxidativa de la guanina que se forma a partir de la oxidación de la 2'-deoxiguanosina (dG) (Karlsson, 2006) (**Figura 10**). Además, su base libre, la 8-hidroxiguanina (8-OHG), se utiliza como indicador de la lesión oxidativa y su determinación en la orina puede ser un marcador útil de la lesión del DNA (Roth y col., 2004).

Cabe destacar que el tipo de lesión oxidativa generada en el DNA depende de la EROs que la produce, así el $^1\text{O}_2$ ataca preferentemente a la guanina e induce la formación de la 8-OHdG (Epe, 1991). Esta a su vez puede conducir a una transición del par GC-AT, que podría ser la desencadenante del proceso cancerígeno (Kamiya y col., 2007). De hecho, en tumores humanos se ha comprobado que las transiciones del par GC-AT son las mutaciones

que con mayor frecuencia se producen en el gen supresor de tumores *p53* (Hollstein y col., 1991; Harris y Hollstein, 1993). Por el contrario, el $^{\bullet}\text{O}_2$ y el H_2O_2 tienen muy poca reactividad para inducir este tipo de modificaciones (Fischer-Nielsen y col., 1994), mientras que el HO^{\bullet} genera una gran variedad de modificaciones en los cuatro tipos de bases nitrogenadas del DNA (Dizdaroglu, 1994).

A lo largo de la década de los 90, fueron muchos los estudios que apuntaban que el tabaco y en concreto algunos de sus componentes eran capaces de aumentar considerablemente la producción mitocondrial de las EROs y del daño oxidativo al DNA debido a la producción de la 8-OHdG en cultivos celulares (Leanderson y Tagesson, 1990; 1992). En estudios *in vivo* se detectaron también elevados niveles de la 8-OHdG en el DNA pulmonar de ratones A/J, ratas F344 y ratones Swiss (Chung y Xu, 1992; Xu y col., 1992; Bilodeau y col., 1995; Sipowicz y col., 1997) tratados con NNK. Posteriormente, se confirmó que ciertos antioxidantes presentes en el té verde inhiben la tumorigénesis pulmonar inducida por la NNK en ratones (Xu y col., 1992) y en ratas de la variedad F344 (Chung y col., 1998; Chung, 1999). Este efecto protector podría ser debido a la supresión de la formación de la 8-OHdG en el DNA pulmonar de los ratones y ratas (Dreosti, 1996; Chung, 1999).

Todos estas investigaciones preliminares han impulsado el estudio del daño oxidativo al DNA inducido por otras N-nitrosaminas presentes en los alimentos, como la NDMA. Lin y Hollenberg (2001)

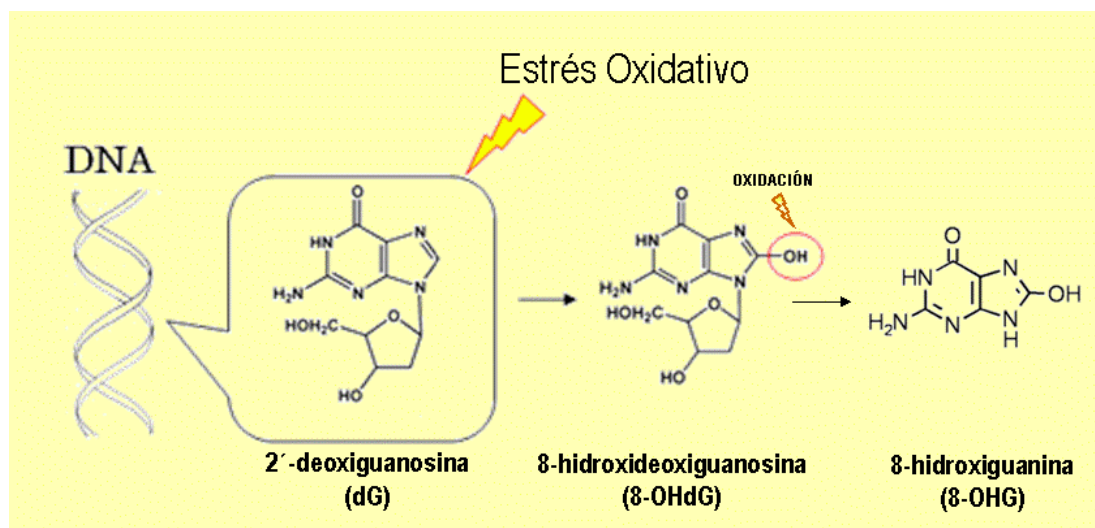


Figura 10. Estructura química de la 2'-deoxiguanina (dG), de la 8-hidrodeoxiguanina (8-OHdG) y de la 8-hidroxiguanina (8-OHG).

observaron un aumento en los niveles de la 8-OHdG en células GM2E1 (las cuales expresan la isoforma enzimática CYP 2E1) tratadas con la NDMA. Así, las EROs producidas durante la activación metabólica de la NDMA podrían contribuir a sus efectos genotóxicos.

La eliminación de estas lesiones oxidativas se produce a través de la vía de reparación por escisión de bases (REB). Esto implica la ruptura del enlace glucosídico de las bases oxidadas por las DNA glicosilasas y la subsiguiente eliminación del sitio ábasico resultante por las endonucleasas. Varias DNA glicosilasas han sido aisladas y caracterizadas (Boiteux, 1993; Demple y Harrison, 1994; Wallace, 1998). Éstas incluyen principalmente la formamidopirimidina-DNA glicosilasa (Fpg) y la 8-oxo-guanina glicosilasa (Ogg1), las cuales reparan las bases púricas oxidadas, incluyendo la 8-OHdG (Bacsi y col., 2007), mientras que la endonucleasa III (Endo III), repara las bases pirimidínicas oxidadas (Wang y col., 2002). Jaiswal y col. (2001) observaron que el ON[•], especie altamente reactiva, es capaz de inhibir la actividad de la Fpg y de la Ogg1.

En el caso de las ERNs, el ONOO[•] puede mediar la formación de la 8-OHdG (Inoue y Kawanishi, 1995) y de la 8-nitroguanina, ésta última es considerada un marcador del daño nitrativo al DNA (Yermilov y col., 1995). Akaike y col. (2003) demostraron que la 8-nitroguanina se origina a partir de la formación del ON[•] asociada a la inflamación en ratones con neumonía viral. Esta lesión es químicamente inestable y puede ser liberada

espontáneamente resultando en la formación de un sitio apurínico (Yermilov y col., 1995) (**Figura 11**). Por lo tanto, la 8-nitroguanina es una potente lesión mutagénica del DNA que conduce a la carcinogénesis, al igual que la 8-OHdG.

Por último, estas lesiones oxidativas pueden provocar cambios en la conformación del DNA que sirve de molde durante el proceso de replicación, disminuyendo la precisión de este proceso llevado a cabo por las DNA polimerasas (Feig y Loeb, 1993; Feig y col., 1994).

6. MODELOS CELULARES HEPÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE COMPUESTOS GENOTÓXICOS

Los modelos celulares hepáticos de origen humano constituyen una herramienta idónea para predecir la genotoxicidad de los carcinógenos ambientales, especialmente los carcinógenos de la dieta (Ehrlich y col., 2002 a y b; Knasmüller y col., 2004; Majer y col., 2004), así como el efecto protector de componentes de las plantas (Kassie y Knasmüller, 2000; Kassie y col., 2001; Uhl y col., 2003 a y b).

Los hepatocitos primarios de origen humano son el modelo más próximo al hígado puesto que son capaces de reproducir el perfil metabólico de un compuesto de forma muy similar al que se obtiene *in vivo* (Brambilla y Martelli, 1990). Se obtienen mediante perfusión de muestras de tejido hepático fetal o adulto (biopsias, hepatectomías) (Gómez-

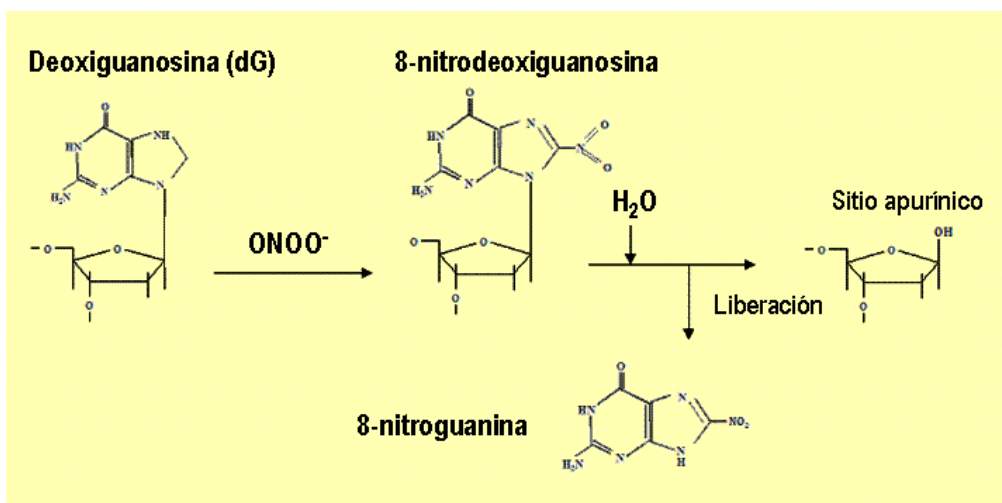


Figura 11. Formación de un sitio apurínico a partir de la 8-nitroguanina (Kawanishi y col., 2006).

Lechón y col., 1997) y permanecen viables por un corto período de tiempo. No obstante, su viabilidad se prolonga durante varios días o incluso semanas cuando se adhieren a un soporte de cultivo adecuado y se incuban con un medio enriquecido con los factores de crecimiento necesarios para su supervivencia (Bayliss y Cross, 2000). Al tratarse de células intactas, conservan la integridad de las membranas, los sistemas enzimáticos trabajan coordinadamente y se mantienen los niveles fisiológicos de los cofactores y coenzimas (Andersson y col., 2001; Hewitt y col., 2001). A pesar de esto, se observa una disminución gradual de los niveles y actividad de las enzimas del CYP450 en las primeras horas de cultivo, aunque posteriormente se estabilizan durante días o semanas (Bayliss y Cross, 2000; Runge y col., 2000; LeCluyse, 2001). Lamentablemente, el uso de los hepatocitos es muy limitado ya que no proliferan en cultivo (excepto los fetales que tienen capacidad proliferativa), lo que lleva a la necesidad constante de disponer de preparaciones celulares a partir del hígado fresco. Además, el acceso a tejido hepático humano fetal o adulto es reducido y está restringido por diversas consideraciones éticas o legales.

Las alternativas a los hepatocitos primarios humanos más estudiadas son los hepatocitos humanos inmortalizados y las líneas celulares de hepatoma humano a partir de tumores primarios del parénquima hepático. En ambos casos, el objetivo es disponer de células hepáticas humanas funcionales y al mismo tiempo con un crecimiento ilimitado. Hasta el momento se han conseguido inmortalizar hepatocitos fetales y adultos que mantienen muchas de las funciones hepáticas (Castell Ripoll, 2006). Sin embargo, la expresión de las enzimas del CYP450 sigue siendo demasiado baja en este tipo de células por lo que su utilización en estudios de metabolismo o genotoxicidad no está recomendada (Donato y col., 2003).

El uso de líneas celulares de hepatoma humano como modelo *in vitro* se sostiene por su capacidad de proliferar en cultivo y de expresar las enzimas de la Fase I y II. La línea celular HepG2 se estableció en 1979, y desde entonces es la más frecuentemente utilizada y la mejor caracterizada (Doostdar y col., 1988; Fardel y col., 1992; Walle y

col., 2000). Estas células retienen muchas de las características morfológicas de las células del parénquima hepático (Knowles y col., 1980) y, contienen las enzimas responsables de la activación metabólica de los xenobióticos (Diamond y col., 1980; Sassa y col., 1987). Sin embargo, recientes estudios demuestran (Westerink y col., 2007 a y b; Donato y col., 2008) que los niveles de expresión de algunas de las enzimas de la Fase I, como los CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 y el 3A5 son inferiores a los que presentan los cultivos primarios de hepatocitos (Tabla 4). En cambio, los niveles de expresión de las enzimas de la Fase II, como la SULT, la GST, la NAT, y la epóxido hidrolasa (EPHX1) sí se asemejan más a los que muestran los hepatocitos, siendo la única excepción, la enzima UDP-GT, que prácticamente no se expresa en estas células (Sallustio y col., 1997).

Tabla 4. Expresión de las distintas isoformas del CYP450 en hepatocitos primarios y en la línea celular de hepatoma humano HepG2 (Donato y col., 2008).

	Isoforma CYP450	Hepatocito primario	HepG2
Fase I	CYP 1A1	100	6,99 ^a
	CYP 1A2	100	0,03 ^a
Fase II	CYP 2A6	100	0,25 ^a
	CYP 2B6	100	0,50 ^a
	CYP 2C9	100	0,01 ^a
	CYP 2C19	100	0,05 ^a
	CYP 2D6	100	1,57 ^a
	CYP 2E1	100	0,04 ^a
Fase III	CYP 3A4	100	0,03 ^a
	CYP 3A5	100	1,16 ^a

^a Los resultados son valores medios expresados como porcentaje respecto a los hepatocitos.

En la última década se ha investigado en profundidad la razón por la que se produce la pérdida de expresión del CYP450 en los modelos hepatocelulares. Este fenómeno parece estar asociado a una alteración de la expresión de ciertos factores de transcripción hepato-específicos implicados en el mantenimiento del fenotipo hepático adulto (Rodríguez-Antona, 2002; 2003). Se ha observado que los niveles de expresión de algunos

de esos factores (C/EBP- α , HNF-1, HNF-3 y, HNF-4 α) en las células HepG2 son considerablemente inferiores a los valores medidos en los hepatocitos. Recientemente, se ha realizado la transfección de estos factores de transcripción en las células HepG2 y la posterior medición de los niveles de expresión de los CYP450s humanos más relevantes. Los resultados de estos ensayos muestran que el incremento de los factores de transcripción en las células HepG2 se acompaña de un sucesivo aumento en los niveles de expresión de los CYP450s. Por tanto, estas investigaciones ofrecen una nueva estrategia experimental para generar líneas celulares competentes metabólicamente para los estudios de genotoxicidad y metabolismo de xenóbioticos.

Otros factores que debemos también considerar ya que pueden provocar una menor expresión de algunas de las enzimas de la Fase I y II son la composición y la preparación del medio del cultivo, así como el tiempo de cultivo. Doostdar y col. (1988) demostraron que el medio Earle proporcionaba un aumento significativo de la actividad del CYP 1A y 2B en comparación con el medio Dulbecco y Williams E. Más tarde, Feng y col. (2002) determinaron que el medio de cultivo autoclavado provocaba un marcada disminución de la actividad del CYP 1A1 debido a un déficit de triptófano producido por las elevadas temperaturas que se emplean en el autoclavado. Además, el tiempo de cultivo puede influir también en la expresión de las enzimas de la Fase I y II, hallándose cambios importantes en los diez primeros días del cultivo (Wilkening y Bader, 2003).

Además, se han analizado ensayos intra e interlaboratorios con la línea celular HepG2, encontrando una variación de la repetibilidad bastante aceptable. Uhl y col. (1999) llevaron a cabo tres ensayos Cometa independientes, utilizando las células HepG2 para determinar la genotoxicidad del B(a)P y de la 2-amino-3-metilimidazo(4,5-f)quinolina (IQ), hallando una desviación estándar menor del 5%. Por otro lado, la reproductibilidad de experimentos llevados a cabo en dos laboratorios diferentes para determinar el efecto genotóxico de la ciclofosfamida, el B(a)P y la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP), bajo idénticas

condiciones de cultivo, fue también bastante buena con unas variaciones menores del 20%. Todas estas observaciones contribuyen a asumir que hoy en día, las células HepG2 siguen siendo la mejor herramienta *in vitro* para detectar y predecir las propiedades genotóxicas de compuestos carcinógenos ambientales y de la dieta, dada su simplicidad, disponibilidad y bajo coste, siempre y cuando los ensayos se realicen bajo condiciones estandarizadas.

No obstante, no podemos olvidar que el desarrollo de técnicas de manipulación genética ha permitido obtener células que expresan de forma permanente y estable una determinada isoenzima CYP450. Para ello, las líneas celulares se transfectan mediante vectores adecuados con el DNA complementario (cDNA) que codifica la enzima del CYP450 de interés (Masimirembwa y col., 1999; Yoshitomi y col., 2001). Así, se han construido líneas celulares HepG2 transfectadas que poseen las enzimas CYP 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 (Yoshitomi y col., 2001; Feierman y col., 2003; Kessova y Cederbaum, 2003). Recientemente, han aparecido en el mercado reactivos celulares (Isocyp-Tox, Advancell) que permiten predecir la toxicidad hepática de diversos compuestos de una forma sencilla, rápida y eficaz. Estos kits se basan en células HepG2 transfectadas que expresan las isoformas CYP 1A2, 2A6, 3A4 y 2E1 dispuestas mediante un medio semisólido en placas microtituladoras de 96 pocillos listas para su utilización. Sin embargo, ninguna de estas nuevas líneas celulares se han empleado todavía en estudios de genotoxicidad. El principal inconveniente del empleo de este tipo de células es que puede desencadenar la expresión excesiva de una enzima en particular, mientras que los niveles del resto de los CYP450s no son detectables (Venkatakrisnan y col., 2000). Puesto que el objetivo final es lograr células que reproduzcan con gran aproximación el patrón de los CYP450s propios del hígado humano, los esfuerzos futuros se encaminan hacia el desarrollo de modelos manipulados genéticamente que permitan la co-expresión controlada de varias isoenzimas. (Scheuenpflug y col., 2005; Goldring y col., 2006).

Por último, no cabe duda que la investigación con células madre constituye actualmente uno de los campos más fascinantes de la ciencia moderna y puede también ofrecer la posibilidad de obtener células de fenotipo hepático. Recientemente, Bonora-Centelles y col. (2008) han inducido la diferenciación hepatogénica de células madre adultas derivadas de tejido adiposo con resultados bastante prometedores. La principal ventaja del tejido adiposo es la facilidad con la que puede aislarse en gran cantidad. Por tanto, esta técnica podría constituir otra nueva alternativa al uso de hepatocitos primarios.

7. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

7.1. Antecedentes históricos

Los estudios sobre la muerte celular programada son relativamente recientes, y es a mediados del siglo XX cuando se despierta el interés por este proceso. Sin embargo, los primeros datos que consideran la muerte de las células como un proceso fisiológico y crítico, se obtienen a mediados del siglo XIX de las investigaciones sobre el desarrollo de los organismos. Uno de los trabajos pioneros es el realizado por Carl Vogt (1842) interesado en la metamorfosis de los anfibios. Aunque no utilizó el término de muerte celular, sí hace referencia a la “reabsorción”, “destrucción” o “desaparición” de células. Posteriormente, en 1951 Glucksmann estableció que la muerte celular es un componente normal del desarrollo animal y en 1965, Lockshin y Williams introdujeron el concepto de “muerte celular programada” o “suicidio celular”. Estos investigadores observaron que durante el desarrollo de un organismo la muerte celular se produce en lugares y momentos determinados a través de una serie de eventos programados.

El término **apoptosis** (del griego *apo* “fuera de” o “separación” y *ptosis* “caída”) se utilizó por primera vez en 1972 por los investigadores Kerr, Wyllie y Currie para describir una forma de muerte celular más prolongada, morfológica y bioquímicamente diferente a la necrosis. En este tipo de muerte celular se producen una serie de cambios secuenciales que no tienen como resultado la

pérdida de la integridad de la membrana celular y además no desencadenan una respuesta inflamatoria, tal y como ocurre en la muerte por necrosis.

En 1982 tuvo lugar un descubrimiento que abrió las puertas al estudio de las bases moleculares y genéticas del proceso de apoptosis. Robert Horvitz publicó los estudios genéticos realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* en los que se describieron los genes encargados del control y la ejecución de la apoptosis en este organismo (Horvitz y col., 1982). Gracias a la homología existente entre los genes en *C. elegans* y los organismos superiores (Schwartz y Osborne, 1994), los estudios realizados en este nematodo han permitido identificar una parte importante de la compleja red de mecanismos que controlan este proceso.

7.2. Tipos de muerte celular y métodos de determinación

En las últimas décadas, hemos sido testigos de un crecimiento exponencial de los trabajos de investigación realizados sobre los procesos que rodean a la muerte celular y se ha llegado al consenso de englobarlos en dos grandes grupos: necrosis y apoptosis. La **necrosis** (del griego *nekrós* “muerte”) se produce cuando una célula presenta un daño severo y pierde la integridad de la membrana ocasionando su muerte por lisis. Sin embargo, la **apoptosis** es una muerte fisiológica que se produce por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de la membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad al final del proceso (Evan y Littlewood, 1998). Se acompaña de otras características morfológicas y bioquímicas típicas como la condensación de la cromatina, la fragmentación internucleosomal del DNA, la activación de las caspasas y el burbujeo de la membrana plasmática. Además, la apoptosis es una muerte celular genéticamente controlada por lo que también ha recibido el nombre de muerte celular programada o suicidio celular.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El interés creciente por el estudio de este proceso no es sólo por su importancia como fenómeno biológico, sino por su relación con el desarrollo de varias enfermedades. Las enfermedades asociadas con alteraciones en el proceso de apoptosis pueden dividirse en degenerativas y proliferativas, como se muestra en la **Figura 12**. En las primeras se produce un aumento de la apoptosis, mientras que en las segundas hay una disminución de la misma provocando un aumento de la proliferación celular. De esta forma, parece evidente que las futuras investigaciones médicas vayan encaminadas tanto a documentar nuevas asociaciones entre la apoptosis y las enfermedades como a desarrollar nuevas terapias basadas en la modulación de este tipo de muerte celular.

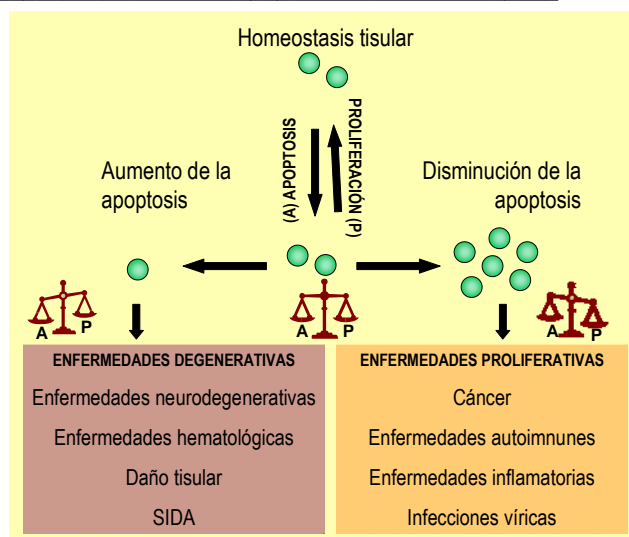


Figura 12. Patologías asociadas con alteraciones en el proceso de apoptosis.

No obstante, estudios recientes ponen de manifiesto que existen procesos difíciles de clasificar como apoptosis o como necrosis ya que comparten

características morfológicas y bioquímicas con ambas. En este sentido, la **Tabla 5** recoge los tipos de muerte celular descritos por diferentes autores. La

Tabla 5. Tipos de muerte celular.

Referencia	Tipo de muerte
<p>Bröker, Knyt y Giaccone (2005)</p> <p>Clasificación según la implicación de las caspasas</p> <p>Clasificación según la morfología nuclear</p>	<p>Vía dependiente de caspasas: APOPTOSIS</p> <p>Vía independiente de caspasas</p> <p>NECROSIS</p> <p>AUTOFAGIA</p> <p>CATÁSTROFE MITÓTICA</p> <p>PARAPTOSIS</p> <p>NECROSIS</p> <p>APOPTOSIS</p> <p>De tipo NECROSIS</p> <p>De tipo APOPTOSIS</p>
<p>Degtrev y Yuan (2008)</p> <p>Clasificación en función de la regulación del proceso, de las diferencias en la inducción de la muerte celular y de las moléculas implicadas en su ejecución</p>	<p>Muerte celular no programada: NECROSIS</p> <p>Muerte celular programada:</p> <p>APOPTOSIS</p> <p>AUTOGAFIA</p> <p>NECROPTOSIS</p>
<p>Kroemer y col. (2009)</p> <p>Clasificación según los mecanismos que producen las distintas morfologías celulares</p>	<p>NECROSIS</p> <p>APOPTOSIS</p> <p>AUTOFAGIA</p> <p>CATÁSTROFE MITÓTICA</p> <p>PARAPTOSIS</p> <p>NECROPTOSIS</p> <p>CORNIFICACIÓN</p> <p>EXCITOTOXICIDAD</p> <p>DEGENERACIÓN WALLERIANA</p> <p>PIROPTOSIS</p> <p>PIRONECROSIS</p> <p>ENTOSIS</p> <p>ANOIKIS</p>

autofagia (“comerse a uno mismo”, del griego *auto* “actuar sobre sí mismo” y *fagos* “comer”) es un proceso donde el citoplasma y las organelas son secuestrados en vesículas con la membrana celular duplicada, liberando su contenido dentro de los lisosomas para su posterior degradación (Levine y Klionsky, 2004; Levine y Kroemer, 2008). Por ejemplo, en condiciones en las cuales los peroxisomas no se necesitan, son degradados a través de un tipo específico de autofagia denominado pexofagia. La autofagia se considera una forma alternativa de muerte celular programada sin fragmentación del DNA ni condensación de la cromatina, pero acompañada de una masiva vacuolización del citosol. A diferencia de la apoptosis, es independiente de la activación de las caspasas y en su ejecución participan otras proteínas (Yue y col., 2003).

En función de los mecanismos implicados, se han descrito otros modelos de muerte celular programada de los que aún no se conoce demasiado (Kroemer y col., 2009). La **catástrofe mitótica** es una muerte celular relacionada con un fallo en la mitosis provocada por daños en los puntos de control del ciclo celular (checkpoints) que en ocasiones puede desembocar también en apoptosis (De Toro,

2006). En este tipo de muerte, se forman células con múltiples micronúcleos y la cromatina no se condensa. Actualmente se recomienda para denominar la catástrofe mitótica otras expresiones como “muerte celular precedida de multinucleación” o “muerte celular producida durante la metafase”, términos más precisos. En la **Figura 13** se muestran las características morfológicas de los tipos de muerte celular citados. Por otra parte, la **paraptosis** es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por una vacuolización del citosol asociada a un aumento del volumen mitocondrial y del retículo endoplasmático, pero sin otras características morfológicas de la apoptosis como la formación de los cuerpos apoptóticos (Sperandio y col., 2000). Esta muerte celular es independiente de la activación de las caspasas y parece estar mediada por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Sperandio y col., 2004) y por el receptor del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I) (Sperandio y col., 2000).

Degterev y Yuan (2008), además de la apoptosis y la autofagia, consideran la necroptosis como otro tipo de muerte celular programada. La **necroptosis** es una muerte celular estimulada por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) pero que cursa

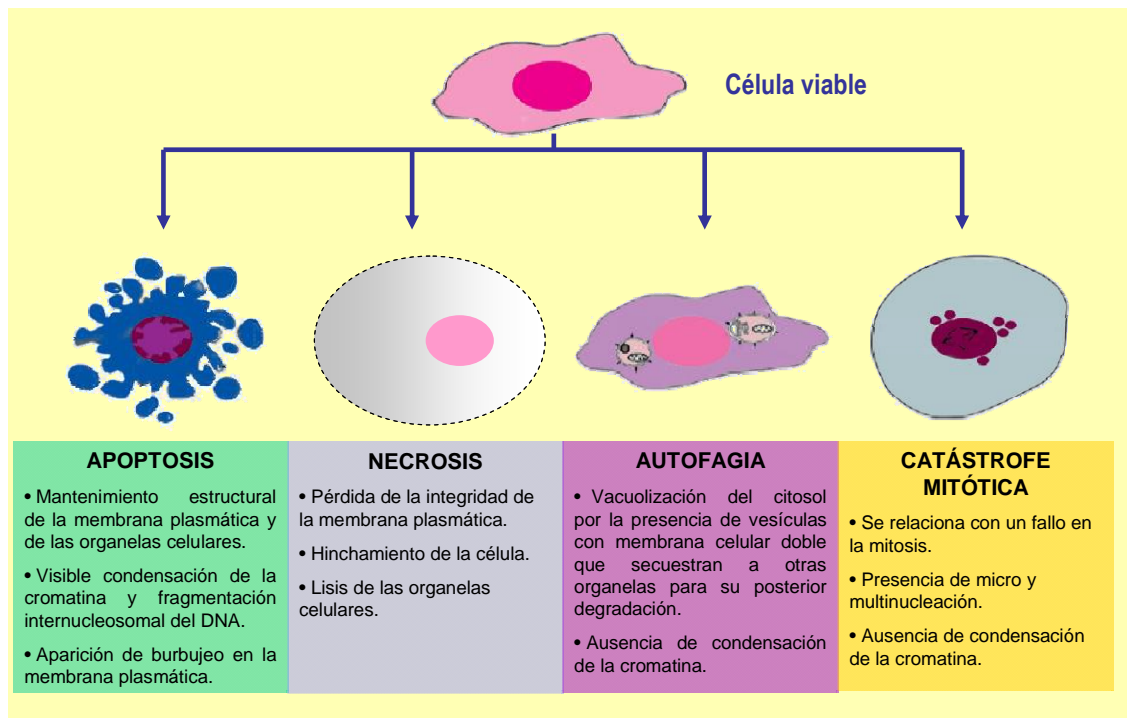


Figura 13. Características morfológicas de los tipos de muerte celular más frecuentes (De Bruin y Medema, 2008).

INTRODUCCIÓN GENERAL

con una inhibición previa de las caspasas adquiriendo una morfología necrótica.

Recientemente, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) con el fin de utilizar una terminología correcta (Kroemer y col., 2009) ha establecido los principios que definen los trece tipos de muerte celular conocidos hasta el momento, considerando las diferentes morfologías y los mecanismos que participan en cada una de ellos. Además de los tipos de muerte celular ya descritos, se incluyen otros que afectan a un linaje celular en particular como la **cornificación** en los queratinocitos de la epidermis, la **excitotoxicidad** exclusiva de las células neuronales o la **degeneración Walleriana** que afecta a los axones de las neuronas. La **piroptosis** y la **pironecrosis** se han observado en

macrófagos infectados por diferentes microorganismos tales como *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*. En la primera, la célula exhibe los cambios morfológicos típicos de apoptosis aunque también puede presentar características necróticas, mientras que en la segunda es una muerte celular de tipo necrótica. Además, se pueden diferenciar porque la piroptosis (y no la pironecrosis) es dependiente únicamente de la activación de la caspasa-1. Otras, como la **entosis** o “canibalismo celular” se describió inicialmente en linfoblastos de pacientes con la enfermedad de Huntington y se produce cuando una célula invade a otras células vivas que se encuentran a su alrededor (heterofagia). Cabe destacar que este tipo de muerte ocurre en las líneas celulares que son deficientes en la caspasa-3, como la línea de cáncer de mama MCF-7, por tanto incapaces de morir por apoptosis. Por último, se denomina **anoikis** a la

Tabla 6. Métodos para la detección de los diferentes tipos de muerte celular.

Tipo de muerte celular	Métodos de detección
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía óptica, de fluorescencia y electrónica (detección del burbujeo de la membrana, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos) - Citometría de flujo (ensayo Anexina V, método TUNEL¹, análisis del ciclo celular, actividad de las caspasas) - Western Blot (detección de la ruptura de la PARP²) - Análisis electroforético del DNA (detección de la degradación nucleosomal) - Ensayo inmunoenzimático o ELISA (detección de la degradación nucleosomal)
Necrosis	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía óptica (tinción con Azul de Tripán), de fluorescencia (tinción con yoduro de propidio [IP]) y electrónica (pérdida de la integridad de la membrana). - Citometría de flujo (IP)
Autofagia	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía óptica y de fluorescencia (exclusión de colorantes vitales hasta las etapas finales y detección de vacuolas citoplasmáticas) - Microscopía electrónica (ausencia de condensación de la cromatina)
Catástrofe mitótica	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopía óptica y electrónica (presencia de múltiples micronúcleos después de la mitosis)

¹ Método de marcaje de los extremos 3'-OH libres del DNA, utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y nucleótidos modificados (TUNEL)

² Enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa

muerte celular programada que se produce por la pérdida de contacto de la célula con los elementos de la matriz extracelular. Esto va a permitir la liberación de proteínas proapoptóticas que normalmente se encuentran secuestradas en el citoesqueleto.

En definitiva, la célula dispone de un amplio espectro de posibilidades para morir, con un complejo escenario de moléculas implicadas en los distintos tipos de muerte celular que provocan a su vez la aparición de características morfológicas y bioquímicas diferentes. Esto permite disponer de “marcadores”, entre los que caben destacar los cambios en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación del

DNA genómico, la activación de las caspasas o la degradación de los sustratos (Huerta y col., 2007). En la **Tabla 6** se recogen los métodos para la detección de los diferentes tipos de muerte celular.

7.3. Eventos celulares del proceso de apoptosis

Durante el proceso de apoptosis la célula sufre una serie de cambios no sólo morfológicos sino también bioquímicos que la diferencian de otros tipos de muerte celular (**Figura 14**). En relación a los cambios morfológicos, se observa una marcada reducción del volumen celular total acompañada de pequeñas evaginaciones esféricas a partir de la

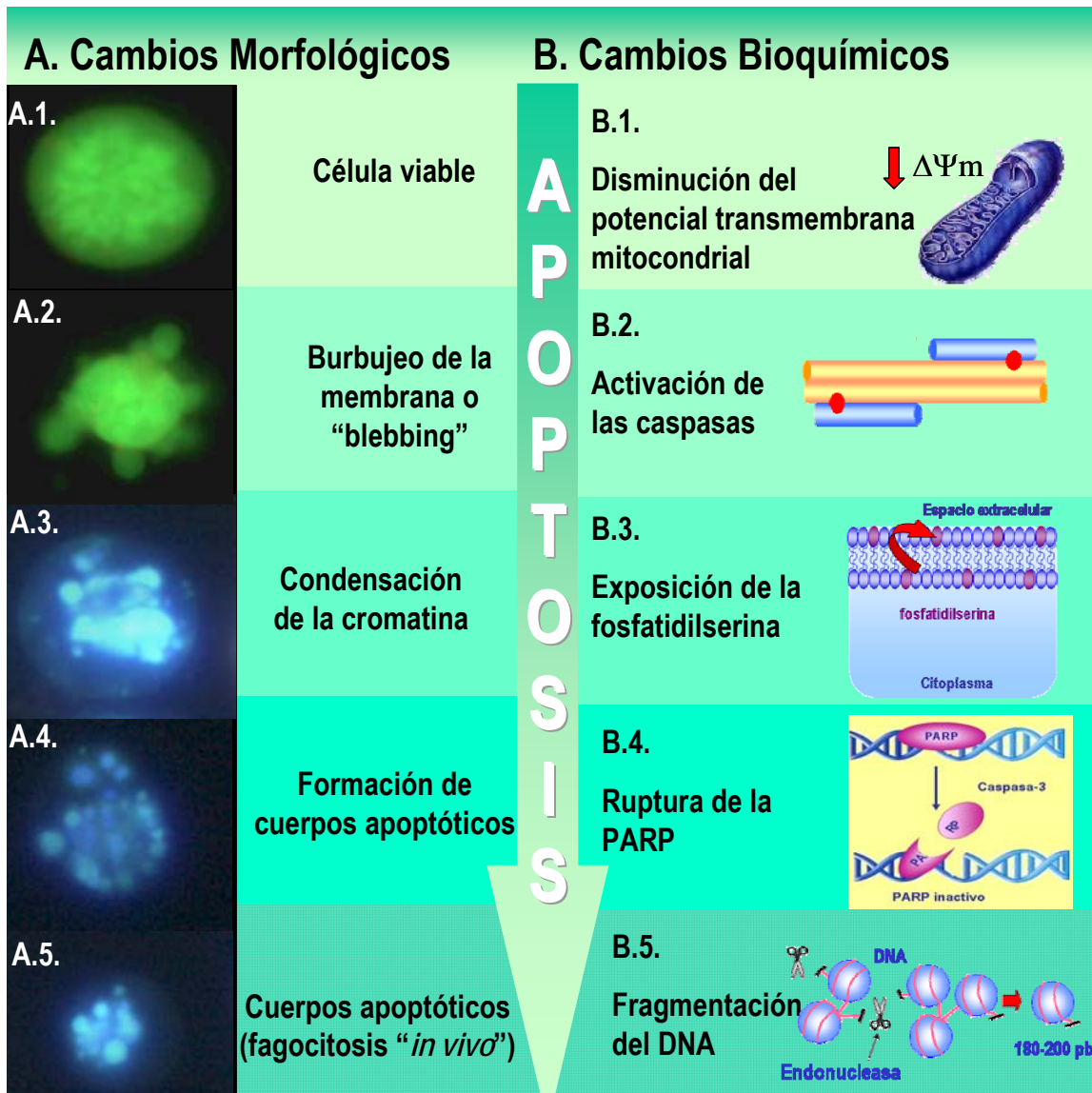


Figura 14. Cambios morfológicos y bioquímicos durante el proceso de apoptosis.

membrana plasmática en forma de burbujas (blebbing) (A.2.). Sin embargo, el cambio morfológico más característico se produce a nivel nuclear, con una marcada condensación de la cromatina (A.3.). En los estadios iniciales la cromatina migra hacia la membrana nuclear formando parches que se transforman posteriormente en esferas. A continuación, se observan fragmentos de la membrana celular que se rompen formando los denominados cuerpos apoptóticos (A.4. y A.5.) (Elmore, 2007), constituidos por restos de citoplasma rodeados de membrana celular. Finalmente, son eliminados al entorno extracelular y fagocitados por los macrófagos y las células vecinas para evitar la consiguiente respuesta inflamatoria *in vivo* (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka y col., 2003).

Al mismo tiempo, tienen lugar una serie de cambios bioquímicos: en primer lugar se produce una pérdida del potencial transmembrana de la mitocondria (esta alteración precede a los cambios en la superficie celular o a la degradación del DNA) (B.1.) (Ramírez Chamond y col., 1999). En segundo lugar, la activación de las caspasas desencadena otros cambios bioquímicos que afectarán a la membrana plasmática y al núcleo (B.2.) (Slee y col., 2001). Así, la simetría de la membrana plasmática se pierde, de tal forma que los residuos de fosfatidilserina (FS), presentes en la cara interna de la membrana plasmática, se exponen al exterior (Bratton y col., 1997) (B.3.). Seguidamente, se produce la ruptura de las enzimas implicadas en la reparación del DNA como la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) (Oliver y col., 1998) (B.4.) y finalmente, se activan una serie de endonucleasas dependientes del Ca^{2+} y Mg^{2+} que rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales de 180-200 pb (B.5.) (Leist y Jaattela, 2001). Esto produce el característico patrón de DNA en escalera cuando se analiza en una electroforesis y, se utiliza como marcador bioquímico de la apoptosis.

7.4. Las caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que actúan sobre secuencias específicas que contienen residuos de ácido aspártico. Se sintetizan en forma de zimógenos (procaspasas) con

la estructura general (de 32 a 53 kDa) que se muestra en la **Figura 15**, distinguiéndose tres dominios: el prodominio amino terminal (de 3 a 24 kDa), la subunidad grande (de 17 a 21 kDa) y la subunidad pequeña (de 10 a 13 kDa). Para ser activas las caspasas sufren dos proteólisis sucesivas dando lugar a la aparición de un heterotetrámero activo formado por el ensamblaje de dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo dos sitios activos de catálisis (Salvesen, 2002). Esta forma activa romperá sus sustratos específicos que incluyen proteínas citosólicas y nucleares.

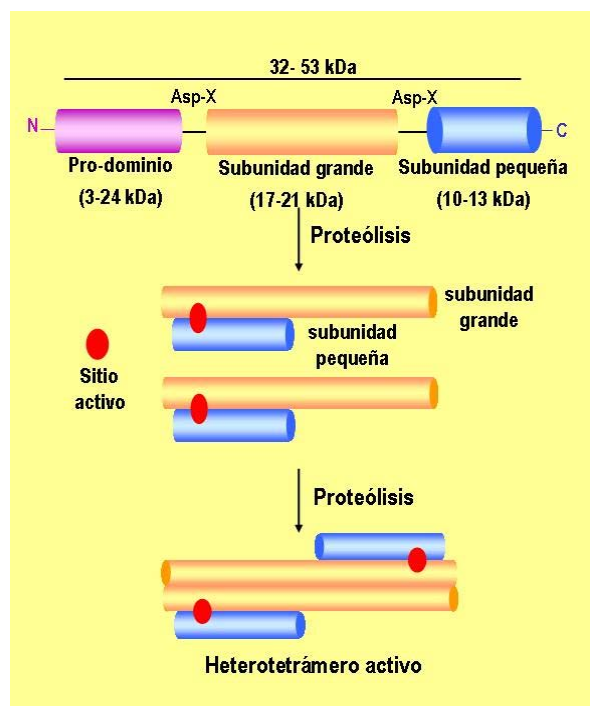


Figura 15. Activación y estructura general de las procaspasas (Cascales, 2003).

Hasta el momento, en los mamíferos se conocen 14 miembros de esta familia de proteínas aunque en la especie humana sólo se han descrito 12. De ellas, únicamente 7 participan en el proceso apoptótico, mientras que otras, como la caspasa-1, actúan como reguladores de la respuesta inflamatoria. Así, se reconocen tres categorías funcionales (Doctor y col., 2003):


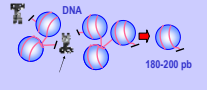
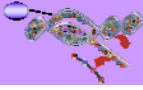

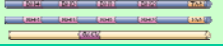
- Caspasas iniciadoras: poseen un prodominio largo y son activadas en respuesta a señales de estrés o daño celular o cuando la célula recibe una señal de muerte (caspasas -2, -8, -9 y -10).

- Caspasas efectoras o ejecutoras: son proteolizadas y activadas por las caspasas iniciadoras. Poseen un prodominio corto y son las responsables de la proteólisis directa de los sustratos que producirán los cambios morfológicos en las células. La principal caspasa efectora es la caspasa-3, aunque también ejercen funciones ejecutoras las caspasas-6 y la -7.
- Caspasas inflamatorias: participan en los procesos de activación de las citoquinas (caspasas-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14).

Las caspasas, aunque son extraordinariamente selectivas como proteasas, ejercen su actividad proteolítica sobre un amplio número de sustratos. La proteólisis de muchos de estos sustratos es la responsable de las numerosas características morfológicas y bioquímicas del proceso de apoptosis. A su vez, las caspasas inactivas pueden ser sustrato de las activas, desencadenándose una cascada de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico (Salvesen y Dixit, 1997).

El primer sustrato descrito de las caspasas fue la PARP (Oliver y col., 1998), utilizada como marcador de apoptosis en muchos tipos de líneas celulares (Helleday y col., 2005). En las células viables, la PARP se une al DNA dañado, dando lugar a la formación de polímeros de ADP-ribosa que se unirán tanto a proteínas implicadas en la replicación y transcripción del DNA como a la propia PARP. Esto provoca el bloqueo de la replicación y transcripción del material genético dañado y a su vez permite la unión de las enzimas de reparación (Chatterjee y col. 1999; Oei y col., 2005). En las fases finales del proceso apoptótico, la caspasa-3 proteoliza la PARP (116 kDa) generando un fragmento de 85 kDa, que contiene el dominio catalítico (C-terminal) y un fragmento de 24 kDa, que contiene el dominio de unión al DNA (N-terminal) (Oliver y col., 1998). El resultado final de esta ruptura es impedir la reparación del DNA dañado y por tanto, que la célula entre en apoptosis. Otros sustratos reconocidos de las caspasas se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Sustratos de las caspasas (Jordán, 2003).

Sustratos de las caspasas	
Proteínas del citoesqueleto actina, fodrina, proteína Tau y catenina	
Enzimas encargadas de degradar el DNA celular ADNasa	
Factores de transcripción retinoblastoma, HDM2	
Proteínas reguladoras proteína quinasa C, fosfatasa 2A, cinasas de adhesión local	
Miembros de la familia de proteínas Bcl-2 Bcl-2, Bcl-XL, Bid	

7.5. Vías de la muerte celular por apoptosis

Existen dos vías de activación de las caspasas (**Figura 16**) y por tanto de la apoptosis: 1) **la vía de los receptores de la muerte celular o extrínseca** en la que participan los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) localizados en la superficie celular, y 2) **la vía mitocondrial o intrínseca** que está controlada por los miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

7.5.1. Vía de los receptores de la muerte celular o vía extrínseca

La vía extrínseca tiene su origen en la membrana celular e implica la participación de los receptores de la muerte celular. Estos receptores pertenecen a la familia TNFR, y los ligandos y receptores correspondientes más conocidos son Fas-L/Fas-R, TNF- α /TNF-R1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Peter y Krammer, 1998; Suliman y col., 2001; Rubio-Moscardo y col., 2005).

La secuencia de eventos que se producen en la vía extrínseca ha sido muy bien caracterizada para los modelos Fas-L/Fas-R y TNF- α /TNF-R1. En el caso del receptor Fas, la unión del ligando Fas provoca la homotrimerización del receptor y la unión de la proteína adaptadora que interactúa con los

pérdida del potencial de membrana ya que a través de esta membrana se produce el equilibrio iónico y, ii) al hinchamiento de la matriz mitocondrial debido a la entrada de agua provocando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Esto permite la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo c, el activador secundario mitocondrial de caspasas/proteína de unión a IAPs con bajo punto isoelectrico (Smac/Diablo) y una serin proteasa conocida como Omi/HtrA2, desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol (Du y col., 2000; van Loo y col., 2002; Saelens y col., 2004; Garrido y col., 2006).

El citocromo c, una vez liberado de la mitocondria, activa a las caspasas, pero esta activación es muy compleja, ya que depende de la unión del citocromo c con el factor activador de apoptosis-1 (Apaf-1), la procaspasa-9 y el desoxiadenosin trifosfato (dATP), formando un complejo conocido como apoptosoma (Chinnaiyan, 1999; Hill y col., 2004). Esta unión provoca la activación de la caspasa-9, tras un cambio conformacional, que convierte al apoptosoma en una forma capaz de activar en ese momento a la caspasa-3 y a la caspasa-7 (Jiang y Wang, 2004).

En la etapa final de la apoptosis se liberan de la mitocondria al citosol un segundo grupo de proteínas proapoptóticas, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. El AIF es una flavoproteína que al liberarse de la mitocondria se traslada al núcleo donde provoca la condensación y ruptura del DNA en fragmentos de alto peso molecular (50 kDa) (Jozza y col., 2001). Esta forma temprana de condensación nuclear se conoce como "etapa I" de condensación (Susin y col., 2000). Además, también posee efectos a nivel de la membrana celular desencadenando la exposición de la FS hacia el exterior (Susin y col., 2000). Por último, la liberación de la endonucleasa G al citosol provoca, tras su migración al núcleo, la fragmentación del DNA junto con las exonucleasas y la DNAsa I, produciendo la condensación de la cromatina que se conoce como "Etapa II" de condensación (Susin y col., 2000) y el patrón de escalera típico de apoptosis (Li y col., 2001).

La ejecución de la vía intrínseca o mitocondrial está regulada por la familia de proteínas Bcl-2 que controlan la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma. Esta familia de proteínas incluye tanto miembros inductores como inhibidores de la apoptosis (Antonsson, 2001). Todos ellos se caracterizan por poseer dominios homólogos a la proteína Bcl-2 (nombre del primer miembro descubierto, de linfoma de células B) conocidos como dominios BH (Bcl-2 homólogos), los cuales se enumeran como BH1, BH2, BH3 y BH4. La **Figura 17** muestra los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 que a su vez se divide en tres subfamilias: una denominada subfamilia Bcl-2 que incluye a los miembros Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 y Bcl-b, todos con los cuatro dominios BH y con función antiapoptótica, y dos subfamilias de miembros proapoptóticos: la subfamilia Bax que incluye a Bax, Bak y Bok con tres dominios BH y la subfamilia BH3 que incluye a Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, PUMA, NOXA y Bmf, que como su nombre indica sólo poseen un dominio BH3.

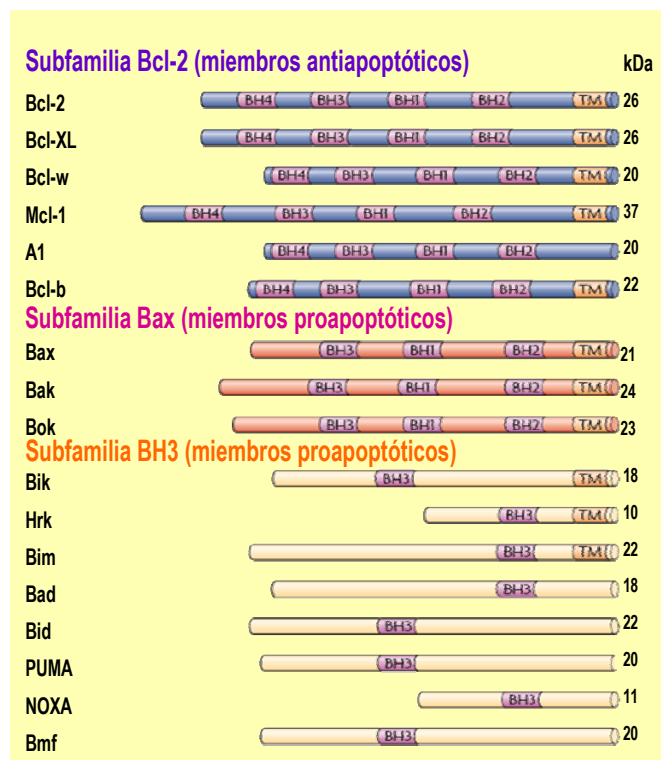


Figura 17. Miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Taylor y col., 2008).

La relación de los niveles de expresión entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determina si la célula morirá o no por apoptosis tras recibir un estímulo apoptótico (Cory y Adams, 2002). Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, sin embargo cuando Bax es mayoritario la célula muere por apoptosis (**Figura 18**). Se ha propuesto que la liberación de las proteínas propapoptóticas de la familia Bcl-2 permitiría la formación de un poro PT constituido por subunidades de la proteína Bax en la membrana mitocondrial con la consecuente liberación del citocromo c.

7.5.3. Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca

La conexión de las vías extrínseca e intrínseca del proceso apoptótico también está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, tales como Bid (Li y col., 1998; Esposti, 2002) (**Figura 19**). La activación de los receptores de la muerte celular induce la activación de la caspasa-8, que entre otros efectos, proteoliza Bid (tBid). tBid provoca un cambio en la conformación de Bax y la unión de varias subunidades de Bax permite la formación de un poro PT en la mitocondria. Esto desencadena la salida del citocromo c mitocondrial hacia el citosol, activándose así la vía intrínseca (Igney y Krammer, 2002).

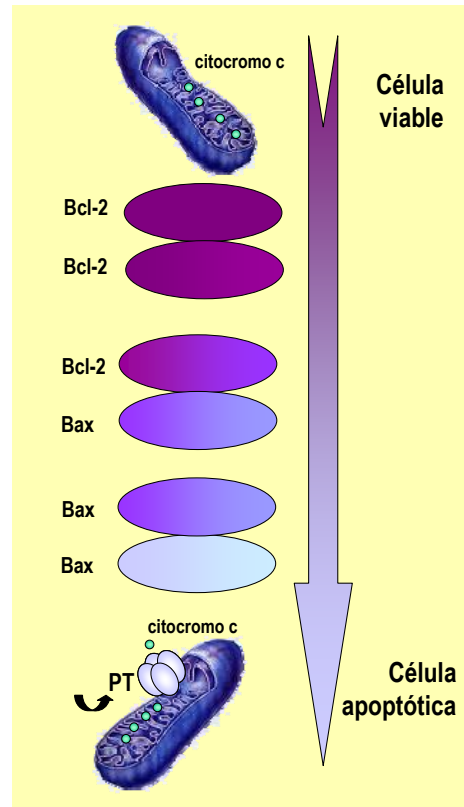


Figura 18. Regulación de la apoptosis por las proteínas Bcl-2 y Bax.

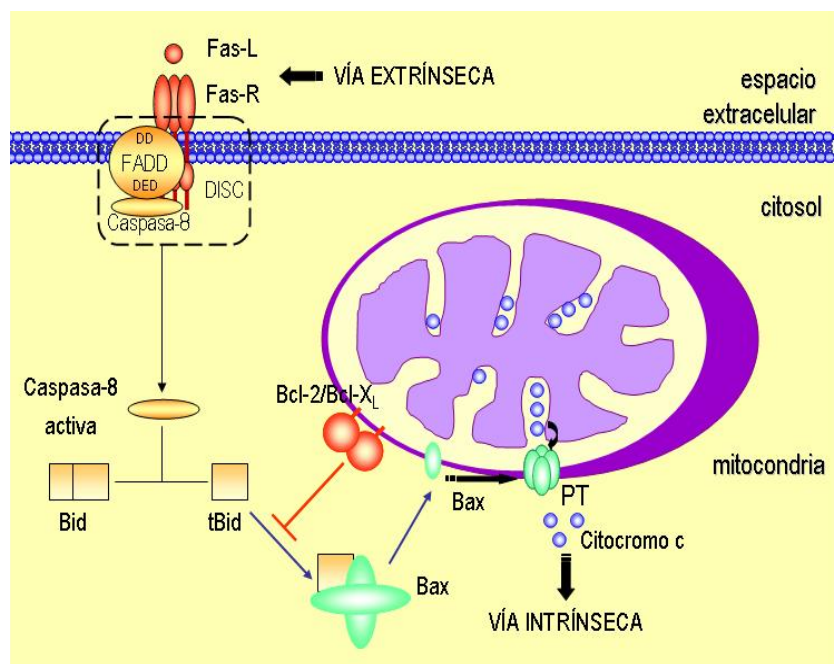


Figura 19. Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca y su regulación por la familia de proteínas Bcl-2.

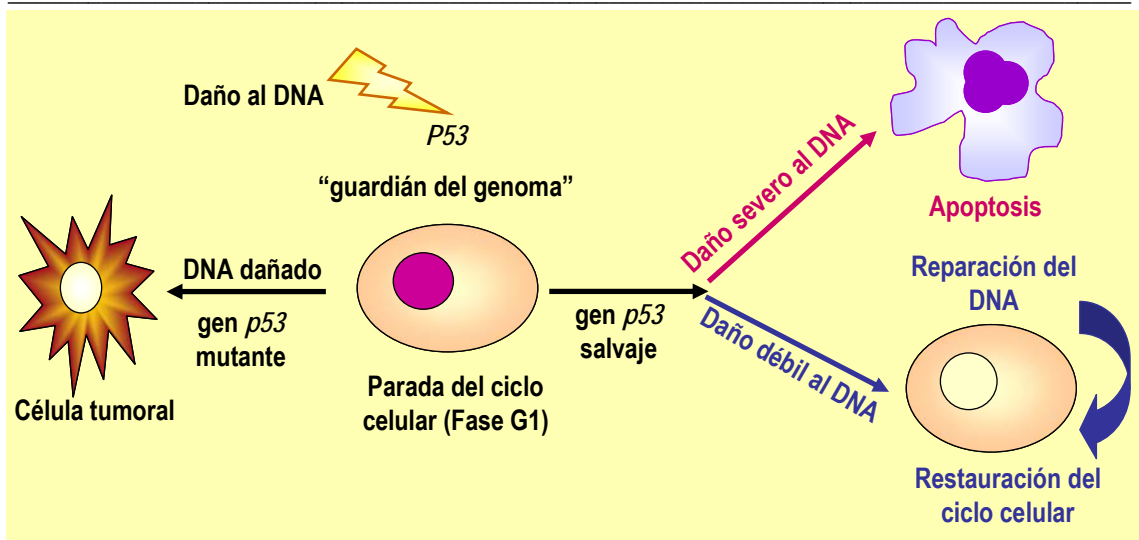


Figura 20. Mecanismo de acción del gen *p53* (Miret, 2003).

7.6. Apoptosis y daño al DNA

El proceso de apoptosis se puede iniciar también como consecuencia de un daño severo en el DNA. La activación del gen *p53*, llamado “guardián del genoma” detiene el ciclo celular en la fase G1, posibilitando la reparación del material genético en aquellas células que presentan un daño débil en el DNA, antes de la siguiente replicación (Figura 20). Sin embargo, cuando la célula presenta un daño tan severo en el DNA que no puede ser reparado, el gen *p53* induce la muerte celular por apoptosis (Somasundaran y El-Deiry, 2000). Por tanto, parece evidente que cualquier mutación que afecte al gen *p53* puede promover el desarrollo tumoral al permitir la proliferación de células con una elevada tasa de mutaciones.

Desde hace tiempo se conoce que los agentes alquilantes (como las N-nitrosaminas) pueden generar daños en diferentes estructuras celulares, entre ellas el DNA, dando lugar a las señales que inician el proceso apoptótico (Kaina y col., 1997; Tominaga y col., 1997; Meikrantz y col., 1998). La metilación en la posición O6 de la guanina da lugar a una lesión importante, la O6 metilguanina, que puede provocar la muerte celular por apoptosis tal y como se muestra en la Figura 21. La O6 metilguanina es reparada por la enzima O6 metilguanina DNA metiltransferasa (MGMT) que transfiere el grupo metilo de la posición O6 de la guanina a un residuo de cisteína de la propia enzima,

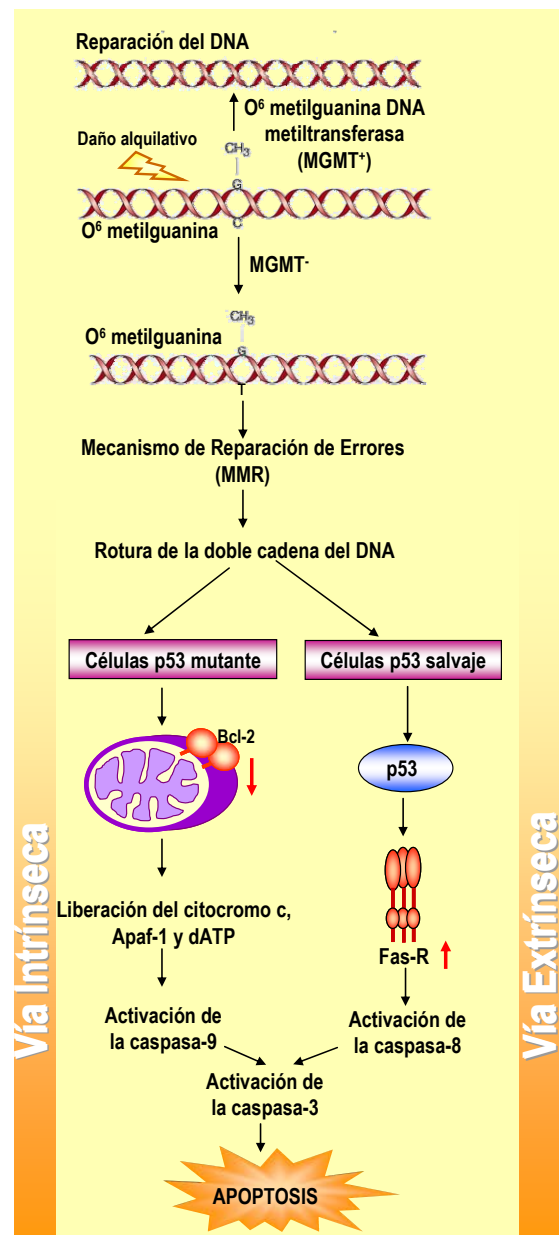


Figura 21. Lesiones en el DNA y vías apoptóticas inducidas por los agentes alquilantes (Kaina y col., 2007).

restaurando así la guanina en el DNA. Diversos estudios desarrollados en líneas celulares isogénicas que expresan la MGMT (MGMT+) o no (MGMT-) muestran que la frecuencia de apoptosis hallada tras el tratamiento con agentes alquilantes es mayor en las células que no la expresan (MGMT-) (Kaina y col., 1997; Tominaga y col., 1997; Meikrantz y col., 1998).

La O⁶ metilguanina (**Figura 21**), sin embargo no dirige la apoptosis directamente, requiere para ello de un mecanismo de reparación de errores en el apareamiento de las bases del DNA (MMR) (Hickman y Samson, 1999; Peponi y col., 2003). El mecanismo MMR detecta errores de la cadena sintetizada de *ново*, comprueba si la complementariedad de las bases es correcta, y si detecta alguna alteración, bloquea la replicación en el siguiente ciclo celular, conduciendo a la rotura de la doble cadena del DNA (Ochs y Kaina, 2000). En resumen, podemos concluir que en ausencia de la MGMT (MGMT-), las lesiones O⁶ metilguanina persistirían y la presencia del mecanismo MMR permitiría el procesamiento de la señal apoptótica.

Además, se ha comprobado que la vía apoptótica activada en las células tras la formación de la O⁶ metilguanina dependerá del estatus celular del gen *p53* (**Figura 21**). Así, las células mutadas para el gen *p53* muestran una disminución en los niveles proteicos de Bcl-2 (antiapoptótico) con la consiguiente liberación del citocromo c, Apaf-1 y dATP de la mitocondria al citosol, y por tanto la activación de la vía mitocondrial o intrínseca (Ochs y Kaina, 2000). Sin embargo, en las líneas celulares humanas que expresan el gen *p53* salvaje se activa la vía extrínseca a través de un aumento en la expresión de los receptores de la muerte celular (Fas-R) (Dunkern y col., 2003; Roos y col., 2004). Por tanto, una misma lesión del DNA, en concreto la O⁶ metilguanina, es capaz de inducir apoptosis tanto por la vía mitocondrial como por la vía de los receptores de la muerte celular, dependiendo del estatus del gen *p53*.

Aparte del daño alquilativo, las EROs pueden también dañar el DNA dando lugar a lesiones

oxidativas como la 8-OHdG, una de las más frecuentemente detectadas. Los estudios realizados hasta el momento demuestran que las células con una acumulación elevada de 8-OHdG presentan una menor capacidad proliferativa (Haracska y col., 2000; Le Page y col., 2000). Esto podría ser resultado de un bloqueo del ciclo celular o de la inducción de la apoptosis, como mecanismo de protección para evitar la proliferación de células que presentan su material genético dañado. Hyun y col. (2003) han dado un paso más determinando qué tipo de muerte celular induce la 8-OHdG en la línea de leucemia KG1. La liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, y la disminución de los niveles de la proteína Bcl-2 demuestran que la muerte celular es de tipo apoptótica, mediada por la vía mitocondrial o intrínseca. Sin embargo, no parece estar asociada a la vía extrínseca ya que no se modifica la expresión de Fas-L/Fas-R. Todos estos hallazgos prueban que la 8-OHdG aparte de su acción mutagénica puede conducir a la célula a una muerte celular por apoptosis.

7.7. Apoptosis y EROs

Numerosas publicaciones científicas apoyan la participación del estrés oxidativo en la apoptosis a través del aumento de la producción intracelular de las EROs (Martindale y Holbrook, 2002; Ibuki y Goto, 2004). Esta hipótesis se fundamenta en el aumento significativo de la apoptosis en cultivos celulares expuestos a sustancias oxidantes, como el H₂O₂, en bajas concentraciones (Hampton y col., 1998; Martindale y Holbrook, 2002). En este sentido, se ha observado también la capacidad de ciertos antioxidantes celulares, como la catalasa y la N-acetilcisteína (NAC), para bloquear la apoptosis inducida por diferentes agentes (Buttke y Sandstrom, 1994; Kannan y Jain, 2000). Asimismo, en muchos modelos celulares de apoptosis se han observado modificaciones en el equilibrio oxidoreductor intracelular previamente a la activación de las caspasas (Susin y col., 1998; Morel y Barouki, 1999). Carmody y Cotter (2001) sostienen que las EROs pueden actuar en el proceso apoptótico como

moléculas señalizadoras durante las fases de inicio y ejecución.

Así, se ha descrito que tanto la vía extrínseca como la intrínseca pueden estar mediadas por la producción de EROs (Figura 22). En la primera, las EROs actúan como estímulos apoptogénicos que activan a los receptores de la muerte celular, como el Fas-R (Gómez-Quiroz y col., 2008). Y en la segunda vía donde está implicada la mitocondria, las EROs inducen la apertura del poro PT y el colapso del potencial de la membrana mitocondrial interna. Todas las proteínas disueltas en el espacio intermembrana escapan de la mitocondria al citosol y entre ellas se encuentran el AIF (Susin y col., 1996), el citocromo c (Liu y col., 1996), el Apaf-1, la procaspasa-9 y otras procaspasas (Samali y col., 1999; Susin y col., 1999), desencadenando la sucesión de eventos apoptóticos que han sido descritos anteriormente (Capítulo I, apartado 7.5.2).

Sin embargo, otras teorías muestran un enfoque distinto al mencionado anteriormente. En ellas se indica que la apoptosis mediada por las EROs podría ser el resultado, y no el origen, de la activación de la vía extrínseca o de los receptores de la muerte celular (Higuchi y col., 1998). Cuando el ligando Fas se une a su receptor correspondiente (Fas-R) puede generarse una señal que resulta en una fuerte inhibición de la cadena respiratoria por un mecanismo aún desconocido. Como consecuencia, aumenta la producción mitocondrial de las EROs, y la apertura del poro PT.

Por último, las EROs pueden estimular la transcripción y expresión del gen *p53* (Uberti y col., 1999), pero a su vez una expresión exagerada de este gen puede conducir a una sobreproducción intracelular de las EROs desencadenando el proceso de apoptosis (Polyak y col., 1997; Minamino y col., 1999).

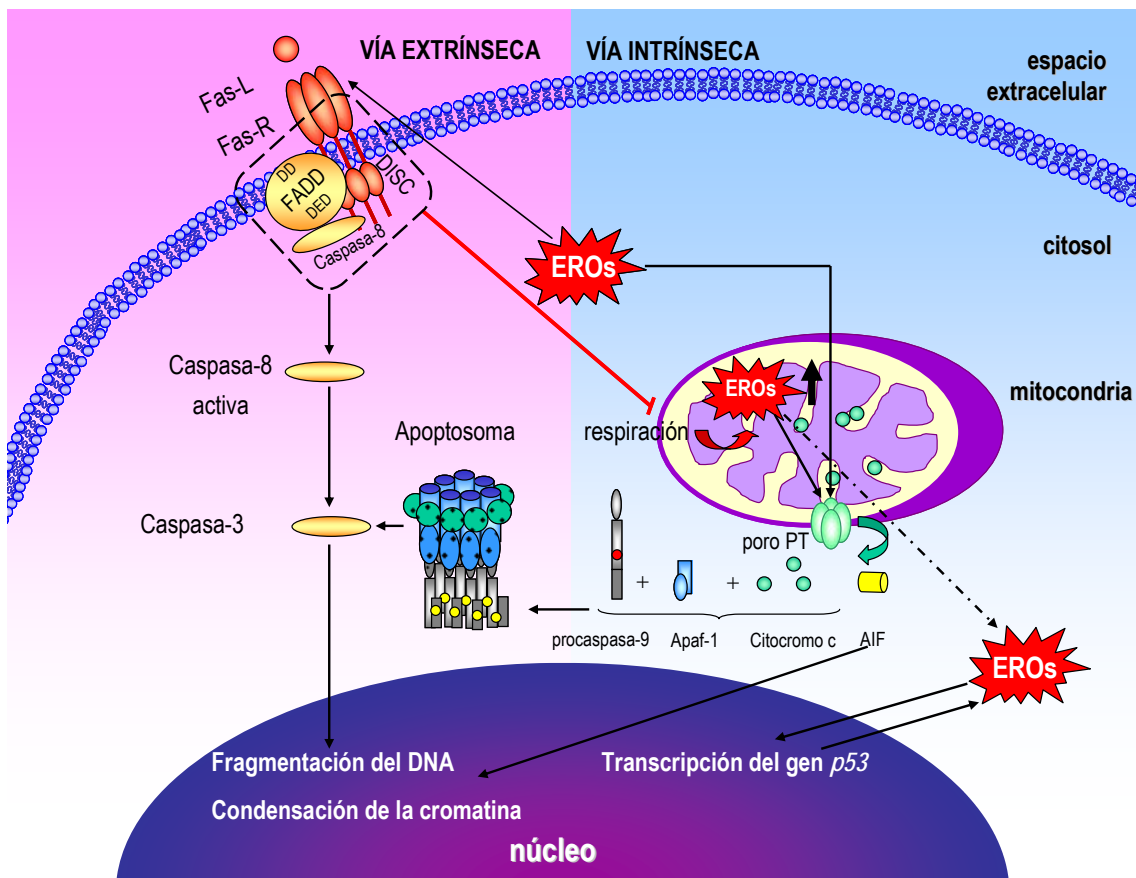


Figura 22. Relación de las EROs con las vías apoptóticas.

7.8. Efecto de los componentes de la dieta en la apoptosis celular

En las últimas décadas, son muchos los estudios científicos que relacionan la alimentación con la aparición de enfermedades tales como los trastornos cardiovasculares o el cáncer (Agarwal y col., 2006; Knoop y col., 2006). Estos estudios evidencian que una dieta variada y equilibrada como la Mediterránea junto con unos hábitos de vida saludables reduce el riesgo de padecer este tipo de enfermedades.

El cáncer es una enfermedad que se desencadena por un crecimiento celular descontrolado que lleva a la formación de un "tumor". Esto se produce porque las células cancerígenas sufren mutaciones en los genes reguladores del ciclo celular (*p53*) (Rocken y Carl-McGrath, 2001) o en los genes involucrados en la apoptosis (*Bcl-2*, *Fas*) (Muntané y col., 2007). De esta forma, las células adquieren una progresiva resistencia a la inducción de apoptosis, y esto les permite sobrevivir sin factores de crecimiento, en condiciones de hipoxia u otros tipos de estrés celular que aparecen durante el desarrollo tumoral.

Actualmente, muchos estudios demuestran que ciertos componentes de la dieta pueden tener una importante actividad anticarcinogénica puesto que son capaces de inducir apoptosis tanto en las células pre-cancerosas (eliminándolas y deteniendo el inicio de la neoplasia) como en las transformadas (afectando el desarrollo tumoral) (Watson y col., 2000; Evan y Vousden, 2001; Yen y col., 2002). La primera evidencia de la relación entre los componentes de la dieta y la apoptosis surgió a partir

de los estudios con el galato de epigallocatequina (EGCG), constituyente mayoritario del té verde, que provoca la inducción de apoptosis y la parada del ciclo celular en diferentes tipos de células tumorales sin afectar a las células normales (Ahmad y col., 1997; Khan y col., 2008).

Posteriormente, se ha puesto de manifiesto que otros componentes de los alimentos pueden inducir también apoptosis en las células tumorales, entre ellos se encuentran la mayoría de los flavonoides, los fenoles ácidos, los alcaloides, los carotenoides, los OSCs, los ITCs, los indoles y las vitaminas. En la actualidad, la inducción selectiva de la apoptosis en células tumorales es una de las estrategias más prometedoras en la lucha contra el cáncer (Sun y col., 2004). Como ya hemos descrito anteriormente, el proceso apoptótico se produce a través de dos vías intracelulares (**Capítulo I, apartado 7.5**) en las que intervienen multitud de moléculas. La **Figura 23** muestra los mecanismos de inducción de apoptosis por los componentes de la dieta. Así, el aumento de la expresión celular del receptor y ligando Fas, la reducción de los niveles de la proteína FLIP, la activación de las caspasas, el incremento de los niveles intracelulares de la proteína Bax, la disminución de los niveles de la proteína Bcl-2, la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol o el aumento de la expresión del gen *p53*, son algunos de los mecanismos más conocidos. Sin embargo, hasta el momento, sólo algunos componentes de la dieta como la vitamina C, el α -tocoferol y la NAC poseen un efecto anti-apoptótico. Estos tres agentes son reconocidas sustancias antioxidantes que podrían inhibir el proceso apoptótico sin interferir directamente con las vías intracelulares que regulan la apoptosis.

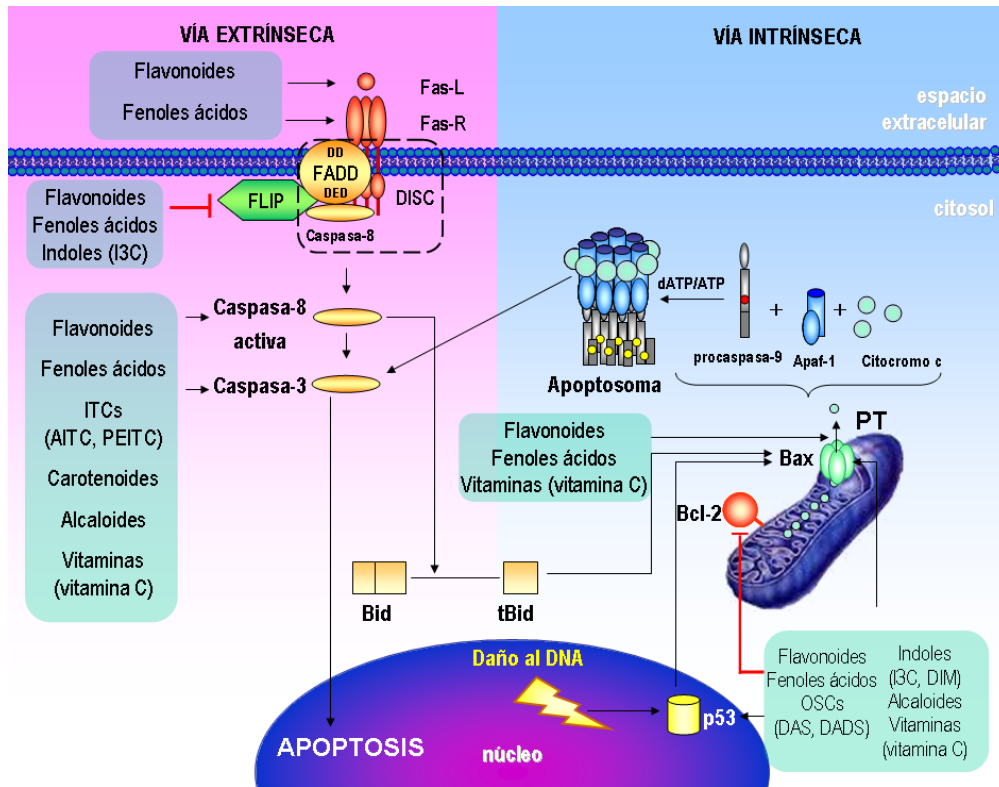


Figura 23. Mecanismos de inducción de apoptosis por los componentes de la dieta (Khan y col., 2008).

Asimismo, la dieta puede constituir una fuente exógena de compuestos carcinogénicos para la especie humana. En los últimos años ha aumentado el número de estudios científicos *in vitro* que demuestran el efecto pro-apoptótico de reconocidos carcinógenos de la dieta (Achanzar y col., 2000; Hashimoto y col., 2004; Holme y col., 2007). Estos nuevos hallazgos parecen contradecir el pensamiento simple de que el desarrollo tumoral debe acompañarse siempre de una menor apoptosis. Por tanto, parece que el papel de la apoptosis en la carcinogénesis no está aún perfectamente claro. Recientes investigaciones apoyan que la apoptosis inducida por los compuestos carcinogénicos permite la eliminación de aquellas células que tienen seriamente dañado su DNA (Croker y Hart, 2003), y a su vez promueve la supervivencia y proliferación de las células de alrededor con un daño menor (Figura 24). Esto dará lugar a la selección de células preneoplásicas con una elevada tasa de mutaciones genéticas que serán claves en las fases de promoción y progresión del cáncer (Holme y col., 2007).

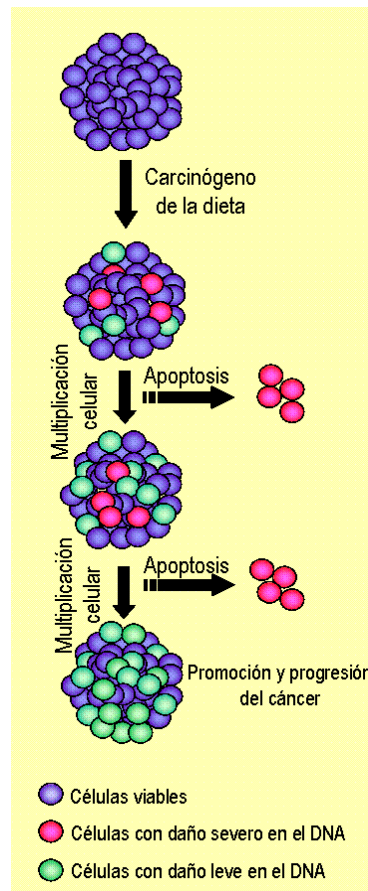


Figura 24. Papel de la apoptosis inducida por los compuestos carcinogénicos de la dieta en el desarrollo tumoral.

8. ESTRATEGIAS EN LA QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER

En las tres últimas décadas se han intentado desarrollar tratamientos eficaces frente al cáncer, y así reducir su tasa de mortalidad. Sin embargo, estudios estadísticos recientes han observado que la incidencia y la tasa de mortalidad por cáncer no han disminuido (Sporn, 1976; Editorial, 2001; Howe y col., 2001).

Actualmente existen dos estrategias para la prevención del cáncer. La primera es adoptar un estilo de vida saludable, evitando el consumo de tabaco, incorporando frutas y vegetales en la dieta, disminuyendo el contenido de grasas saturadas, de azúcares y de almidones, aumentando el ejercicio físico y previniendo infecciones y desórdenes inflamatorios. La segunda estrategia es la quimiopreención.

La quimiopreención del cáncer, definida por primera vez por Sporn en 1976, es una disciplina emergente y en expansión que emplea compuestos químicos naturales, sintéticos o biológicos para revertir, suprimir o prevenir la carcinogénesis. Estos compuestos se denominan quimiopreventivos, y muchos de ellos están de forma natural en la dieta. Uno de los grupos de quimiopreventivos más importantes es el de los fitoquímicos. Estos compuestos se definen como bioactivos no nutrientes presentes en las plantas, y por lo tanto en muchas frutas, vegetales y cereales, que poseen considerables propiedades anticarcinogénicas y antimutagénicas (Liu, 2004). Hasta la actualidad, se han identificado más de 5.000 fitoquímicos y se estima que podría haber hasta 100 fitoquímicos diferentes en una sola ración de vegetales.

En 1982 la Academia Nacional de las Ciencias de Estados Unidos incluyó unas recomendaciones en su informe sobre dieta y cáncer, haciendo hincapié en la importancia del consumo de frutas cítricas, frutas ricas en carotenos y de vegetales de la familia de las Crucíferas, para reducir el riesgo de padecer cáncer (National Research Council, 1982). A finales de 1991 en uno de estos informes sobre dieta y salud, se recomendaba el

consumo de cinco o más piezas de frutas y vegetales al día para reducir el riesgo de cáncer y de otras enfermedades crónicas. Esta fue la primera campaña para promocionar el consumo de frutas y vegetales entre la población estadounidense y recibió el nombre de "Five-a-Day for a better health". Más recientemente, en el año 2002, el Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute, NCI) lanzó una campaña llamada "Savor the Spectrum" que impulsaba a todos los americanos a comer diariamente entre 5 y 9 piezas de frutas y vegetales de una amplia gama de colores. Este programa se basa en que los fitoquímicos de diferentes colores son herramientas eficaces para la prevención del cáncer y de las enfermedades cardiovasculares.

Por último, el Estudio Prospectivo Europeo sobre Cáncer y Nutrición (The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, EPIC) es un estudio multicéntrico coordinado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (AIIC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que se inició en 1993 con la recogida de datos y muestras de sangre en 23 centros de investigación de 10 países europeos e involucró a más de medio millón de individuos. Los primeros resultados obtenidos del EPIC sobre la relación de la dieta y el cáncer mostraban un efecto protector del consumo de fibra, frutas y vegetales sobre el cáncer colorrectal; un efecto protector del consumo de frutas sobre el cáncer de pulmón, y de las frutas y vegetales sobre el tracto digestivo superior, mientras que se confirmó que un elevado consumo de frutas y vegetales no tenía efecto sobre el cáncer de próstata (Surh, 2003). Por el contrario, los últimos resultados obtenidos en el EPIC apuntan a que la asociación existente entre un elevado consumo de frutas y vegetales y la reducción en el riesgo de cáncer es mucho más débil (Boffetta y col., 2010). Se ha estimado que 200 g adicionales de frutas y vegetales previenen sólo el 3% de los casos cáncer. Sin embargo, a pesar de que el vínculo entre dieta y cáncer siga siendo poco claro, hay un factor de riesgo confirmado, la obesidad. Por tanto, las frutas y vegetales podrían aportar muchos beneficios si formarían parte de una dieta baja en calorías.

8.1. Alimentación saludable: una herramienta para disminuir el riesgo de enfermedad

El concepto de nutrición equilibrada como medicina es relativamente novedoso en los países occidentales; sin embargo, en las culturas orientales se sabe desde hace mucho tiempo que ciertos alimentos proporcionan beneficios para el mantenimiento de la salud. La medicina tradicional china junto con las prácticas de acupuntura y ejercicio, preconiza a la dieta como uno de sus pilares. Los japoneses crearon la expresión de “alimento funcional” hace dos décadas, para definir aquellos alimentos que previenen o curan enfermedades (Agarwal y col., 2006). Existen de hecho, pruebas científicas que asocian la “Dieta Mediterránea” con una mayor esperanza de vida (Trichopoulou y col., 1995; Osler y Schroll, 1997), con un riesgo más bajo de incidencia y mortalidad por cardiopatía isquémica y con un efecto protector frente a determinados tipos de cáncer (Esposito y col., 2004; Knoops y col., 2004; Kok y Kromhout, 2004; Trichopoulou y Critselis, 2004; Tripoulou y col., 2005; Agarwal y col., 2006; Knoops y col., 2006).

El modelo gráfico de la dieta mediterránea se asemeja al tradicional de la pirámide nutricional (**Figura 25**): en la base se resalta la actividad física diaria, seguida del uso de cereales y derivados (pan, pasta, patatas) que deben ser consumidos todos los días, junto con frutas, vegetales y legumbres que proveen proteínas, carbohidratos, fibra, vitaminas y sales minerales. Al ascender, se encuentran la leche y sus derivados que proporcionan calcio, y el aceite de oliva que suministra grasas de calidad óptima y sustancias antioxidantes; le siguen el pescado, el huevo y la carne de aves que aportan proteínas ricas en aminoácidos esenciales. Finalmente, en el vértice de la pirámide, se encuentran las carnes rojas, una importante fuente de proteínas y de hierro, cuyo consumo no es frecuente en este tipo de dieta.

Los esfuerzos de la comunidad científica se centran en la identificación de los **compuestos bioactivos** responsables de los efectos saludables de los alimentos. Kitts (1994) definió los compuestos bioactivos como constituyentes de los alimentos, carentes de valor nutritivo, de origen vegetal

(fitoquímicos), especialmente los de algunas frutas, vegetales, cereales, legumbres, especias y hierbas aromáticas, o de origen animal ricos en lípidos (pescado o leche) y que participan en determinadas actividades metabólicas humanas. Su presencia en los alimentos consumidos desde la antigüedad sugiere que no son peligrosos a las concentraciones a las que se encuentran en sus fuentes naturales y que carecen de efectos secundarios perjudiciales aunque, su mecanismo de acción se parezca más al de los fármacos que al de los nutrientes (Wrick, 1994).

En 1994, entró en vigor en Estados Unidos la Ley de Suplementos Dietéticos, Salud y Educación (Dietary Supplement Health and Education Act, DSHEA) que modificó la ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. De acuerdo con la DSHEA, **suplemento dietético o complemento alimenticio** es “un producto, distinto del tabaco, destinado a suplementar cualquier dieta, que contiene, al menos, uno o más de los siguientes ingredientes: una vitamina, un mineral, una hierba u



Figura 25. Pirámide de la Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad (Nutrition, Physical Activity and Obesity Prevention Strategy, NAOS), elaborada por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

otro vegetal o una sustancia dietética empleada para suplementar la dieta aumentando su ingesta dietética total; o un concentrado, metabolito, componente o extracto, o una combinación de algunos de los ingredientes mencionados”. Se venden en diferentes presentaciones, como pastillas, cápsulas, líquidos y polvos. Además, pueden ser de origen natural o químico sintético. De esta forma, la DSHEA dio lugar al nacimiento de una enorme industria, con una venta anual de suplementos dietéticos de 18 billones de dólares en Estados Unidos en el año 2002.

En los últimos años se ha creado así un auténtico caos por la cantidad de productos, tan heterogéneos, distintos y variados, que caben en la denominación de suplementos dietéticos. Antes de utilizar los suplementos en cantidades mayores a las ingeridas, sería conveniente conocer no solo su metabolismo sino también sus posibles interacciones con algunos fármacos empleados.

En la actualidad, la cultura y la sensibilidad popular frente a términos como “alimentos funcionales”, “alimento fortificado”, “nutracéuticos” o “suplementos dietéticos” es muy escasa y cuando existe, generalmente es errónea. En la **Tabla 8** se muestran las principales diferencias entre alimento funcional y nutracéutico. Así, un **alimento funcional**, según el Consejo Internacional de Información Alimentaria (International Food Information Council, IFIC) es aquel que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, es capaz de proporcionar un beneficio para la salud.

Por otro lado, un **alimento fortificado** es aquel al que se le adiciona algún componente beneficioso para la salud: leche con adición de calcio o ácidos omega-3, margarina enriquecida con componentes vegetales anticolesterol, etc. (Thompson y col., 1999). Sin embargo, un **nutracéutico** se puede definir como un suplemento dietético de un compuesto natural bioactivo presente en los alimentos, en forma de una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), y que tomado en una dosis superior a la existente en esos alimentos tiene un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal (Shahidi, 2002). Por tanto, se diferencian de los medicamentos en que éstos últimos no tienen un origen biológico natural.

Aunque los alimentos funcionales son tan antiguos como la propia humanidad, los principios bioactivos, a los que se atribuyen sus propiedades beneficiosas para la salud, sólo han interesado a las multinacionales alimentarias en las últimas décadas. Así se explica la abundancia creciente de parafarmacias, establecimientos dietéticos, herboristerías y de las autoproclamadas «tiendas de alimentos saludables». Muchas empresas alimentarias y multinacionales farmacéuticas han visto que algunos de estos compuestos bioactivos, debidamente comercializados, podrían ser una buena e importante fuente de ingresos (Sanz, 1993).

Hay una serie de factores responsables del constante crecimiento del mercado de este tipo de

Tabla 8. Diferencias entre alimentos funcionales y nutracéuticos (Shahidi, 2002).

Alimentos funcionales	Nutracéuticos
<ul style="list-style-type: none"> Alimentos naturales sin transformar Se consumen formando parte de las tres comidas principales Poseen de forma natural sustancias bioactivas en cantidades muy pequeñas Se han consumido siempre desde tiempo inmemorial 	<ul style="list-style-type: none"> Productos alimenticios de la industria La mayoría son tentempiés (snacks) o bebidas refrescantes y se consumen entre comidas Se les incorporan sustancias bioactivas en elevadas cantidades Su consumo, que aumenta día a día, se ha popularizado en las dos últimas décadas

alimentos (Sanz, 2005), entre ellos:

- El gasto, cada día mayor, que suponen las enfermedades crónicas degenerativas, para la seguridad social en hospitalizaciones y costes médico-farmacéuticos.
- Los deseos de la población de prevenir las enfermedades, siempre que sea posible, con alimentos y no con medicamentos.
- El envejecimiento de la población de los países desarrollados, manteniendo una vida física e intelectualmente más activa y confortable durante el mayor tiempo posible.
- La gran capacidad de adaptación del sector empresarial agroalimentario (especialmente el multinacional) que le permite cubrir y satisfacer cualquier demanda o tendencia del consumo que contribuya a incrementar sus ventas y a engrosar sus buenos resultados.
- La gran publicidad que se hace de cualquier ensayo científico que destaque la relación positiva entre dieta y bienestar.

En estos momentos la pregunta clave sería si los compuestos bioactivos purificados tienen los mismos efectos saludables que los presentes en los alimentos de forma natural. Los compuestos

bioactivos ingeridos en forma de suplementos dietéticos pueden producir diferentes efectos en la salud que cuando son ingeridos con el alimento, posiblemente debido a la dosis, la forma o a la presencia de otros componentes en los alimentos (McCullough y Giovannucci, 2004). Asimismo, el compuesto puro aislado puede perder su bioactividad o no comportarse de la misma forma que cuando se encuentra en el alimento. De hecho, el papel de los carotenoides y la vitamina C como suplementos anticancerígenos han sido cuestionados debido a que no han reducido la incidencia de cáncer y de las enfermedades cardiovasculares (Blot y col., 1993; Salonen y col., 2000). Por tanto, los consumidores deberían adquirir estos compuestos bioactivos a partir de una dieta variada y no a partir de suplementos dietéticos.

8.2. Efectos beneficiosos de los agentes quimiopreventivos

Wattenberg (1985) clasificó los compuestos quimiopreventivos en agentes bloqueadores o agentes supresores, según sus mecanismos de acción (Figura 26).

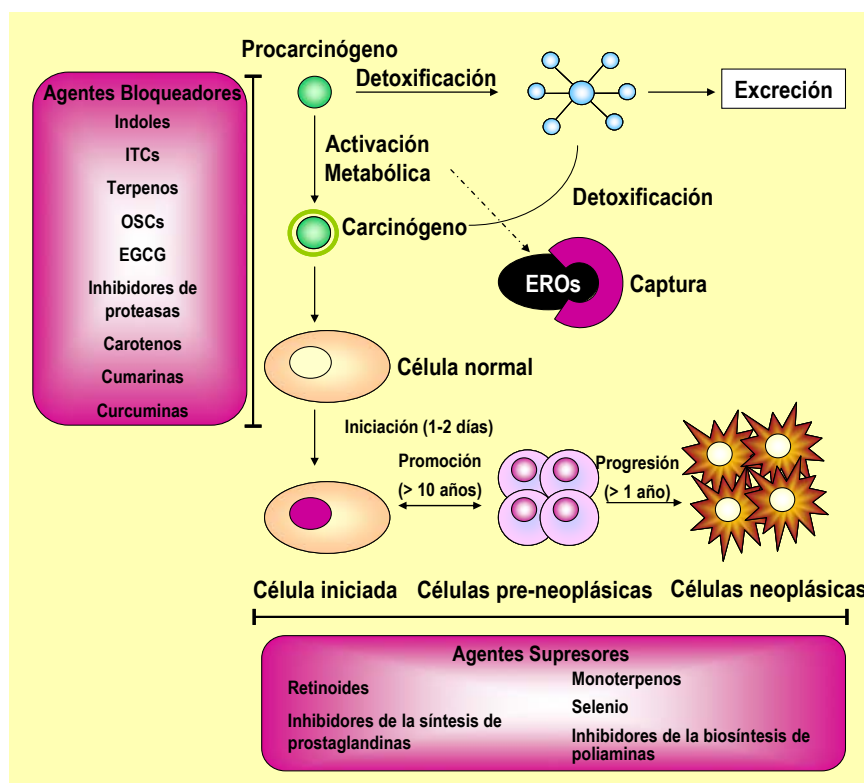


Figura 26. Mecanismos de acción de los agentes quimiopreventivos bloqueadores y supresores (Surh, 2003).

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Los **agentes bloqueadores** evitan que los carcinógenos dañen dianas celulares, como son el DNA, el RNA y las proteínas, ya que muchos de ellos tienen la capacidad de bloquear la activación metabólica de los carcinógenos a través de la inhibición de la actividad de las enzimas de la Fase I. Sin embargo, otros tienen la capacidad de estimular la actividad o la expresión de las enzimas de la Fase II, incrementando la excreción de los carcinógenos y evitando que estos ejerzan su acción cancerígena. La actividad antioxidante es otro de los mecanismos ya que pueden proteger los sistemas celulares atrapando los radicales libres generados por el estrés oxidativo, y reduciendo así el riesgo de padecer cáncer (Adom y col., 2003). Sin embargo, los compuestos quimiopreventivos antioxidantes no solo atrapan radicales libres, sino que paradójicamente pueden generar más estrés oxidativo para inhibir la proliferación de las células tumorales (Loo, 2003), que son más susceptibles al daño oxidativo que las células normales (Long y col., 2000; Loo, 2003). Dentro de los agentes bloqueadores se encuentran los indoles e isotiocianatos (ITCs) de las plantas crucíferas, los terpenos de las frutas cítricas, los organosulfurados del ajo y de la cebolla (OSCs), la EGCG del té verde, los inhibidores de proteasas de

las judías, los carotenos, las cumarinas y las curcuminas.

2. Los **agentes supresores** retardan las etapas de promoción y progresión tumoral una vez que se ha producido la transformación de las células normales a neoplásicas. En definitiva, los agentes supresores impiden el desarrollo del tumor y sus mecanismos de acción son: bloqueo del ciclo celular, modulación del proceso apoptótico (pueden presentar un efecto dual, es decir, inducir o inhibir la muerte celular por apoptosis, dependiendo de la dosis administrada) e inhibición de las vías de señalización celular que se encuentran estimuladas en las células tumorales (Greenwald, 2002; Surh, 2003). Dentro de estos agentes se encuentran los retinoides, los inhibidores de la síntesis de las prostaglandinas, los monoterpenos, el selenio y los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas.

Además, muchos quimiopreventivos pueden actuar como agentes bloqueadores y supresores. Es una regla común, más que una excepción, que un compuesto quimiopreventivo afecte a más de un proceso celular como se muestra en la **Figura 27**. Los efectos pueden ser sinérgicos,

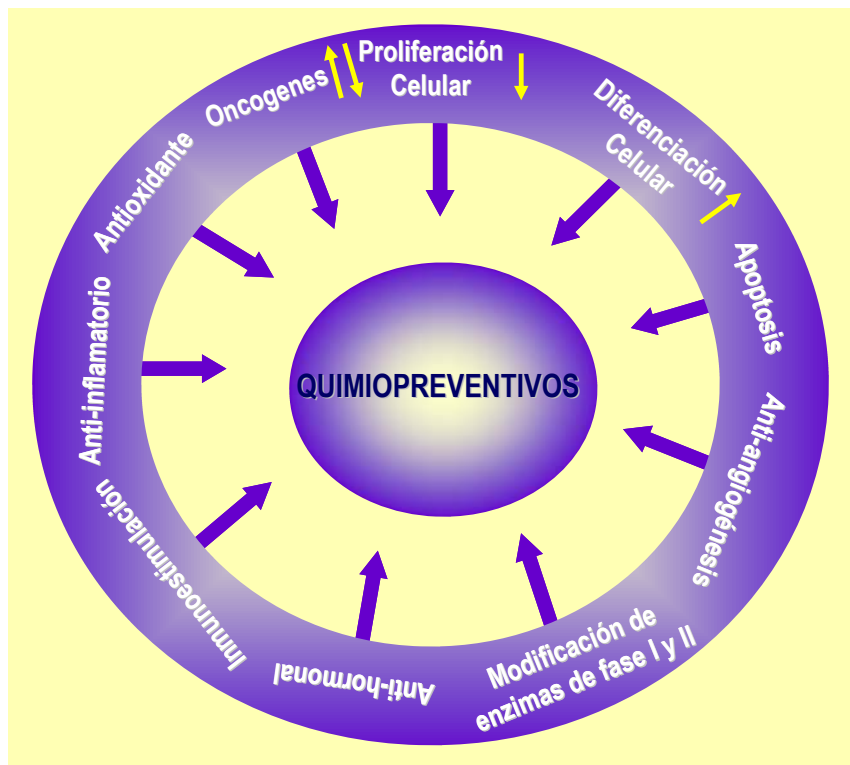


Figura 27. Mecanismos de protección de los agentes quimiopreventivos de la dieta (Dorai y Aggarwal, 2004).

Tabla 9. Clasificación de los agentes quimiopreventivos según su estructura química y sus principales fuentes en los alimentos (Russo y col., 2005).

Clasificación según estructura química	Quimiopreventivo	Fuentes
Vitaminas	Vitamina D Ácido Fólico Vitamina A Vitamina E Vitamina C	Productos lácteos Verduras y hortalizas Verduras y hortalizas Aceites vegetales Frutas y hortalizas
Minerales	Calcio Selenio Hierro Zinc	Productos lácteos y verduras Frutas, verduras, cereales, carne, pescado Carnes rojas Verduras
Carotenoides	Licopeno Luteína β-caroteno	Tomates Verduras y hortalizas de hoja verde oscuro Verduras naranjas y amarillas
Flavonoides	Genisteína Quercetina Rutina Silimarina Catequina Antocianinas	Soja y productos derivados Frutas y verduras Frutas y verduras Cardo mariano Uvas Frutas, verduras y té negro
Fenoles ácidos	Resveratrol Curcumina Ácido cafeico Ácido Ferúlico (-)-Epigallocatequina-3-galato Ácido clorogénico	Uvas, vino tinto Cúrcuma, curry, mostaza Frutas, café, soja Frutas, soja, arroz Té verde Frutas, café, soja
Isotiocianatos ITCs	Alil isotiocianato 2-fenetil isotiocianato Bencil isotiocianato 3-Metil sulfinil propil isotiocianato Sulfurofano	Coles de Bruselas Repollo Berros Brécol Brécol
Organosulfurados OSCs	Sulfuro de Dialilo Alil Mercaptano Trisulfuro de metil alil S-Alil Cisteína	Ajo, cebolla Plantas del Género <i>Allium</i> Plantas del Género <i>Allium</i> Ajo
Indoles	Indol-3-carbinol Brasinina	Crucíferas Crucíferas

aditivos o incluso antagónicos, y éstos pueden depender del tiempo, de la concentración o del tipo celular.

Por otra parte, los agentes quimiopreventivos también se pueden clasificar atendiendo a su estructura química en vitaminas, minerales y fitoquímicos (Tabla 9). Estos últimos a su vez, se dividen en seis grandes grupos: carotenoides, flavonoides, fenoles ácidos, ITCs, OSCs e indoles. De todos ellos, los más extensamente estudiados son los carotenoides (Gallicchio y col., 2008), los OSCs (Nagini, 2008), los flavonoides y los fenoles ácidos (Linseisen y Rohmann, 2008).

8.2.1. Plantas de la familia Cruciferae: brécol y otras crucíferas

Las plantas de la familia *Cruciferae*, a la que pertenecen el brécol (*Brassica oleracea* var. *italica*), la col (*B. oleracea* var. *capitata*), las coles de Bruselas (*B. oleracea* var. *gemnifera*), la coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis*), los nabos (*B. campestris* var. *rapifera*), los rábanos (*Raphanus sativus*) y los berros (*Nasturtium officinale*) son ricas en glucosinolatos (Drewnowski y Gómez-Carneros, 2000).

La hidrólisis de los glucosinolatos por la enzima mirosinasa, presente en la planta o en la flora intestinal (Keum y col., 2004), da lugar a la formación de los ITCs e indoles (Holst y Williamson, 2004). La mirosinasa está físicamente separada de los glucosinolatos en las células vegetales. No obstante,

cuando los vegetales crudos son masticados o troceados, esta enzima entra en contacto con los glucosinolatos y cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico. Las prácticas culinarias como hervir, cocer al vapor y el calentamiento en el microondas a alta potencia (850-900 W) (Verkerk y col., 1997; Rouzaud y col., 2004) pueden inactivar a la mirosinasa, disminuyendo la biodisponibilidad de los ITCs e indoles (Shapiro y col., 1998; Verkerk y col., 1997; Rouzaud y col., 2004).

8.2.1.1. Isotiocianatos

Los principales ITCs que poseen actividad quimiopreventiva son el fenil isotiocianato (PEITC) y el alil isotiocianato (AITC) (Figura 28).

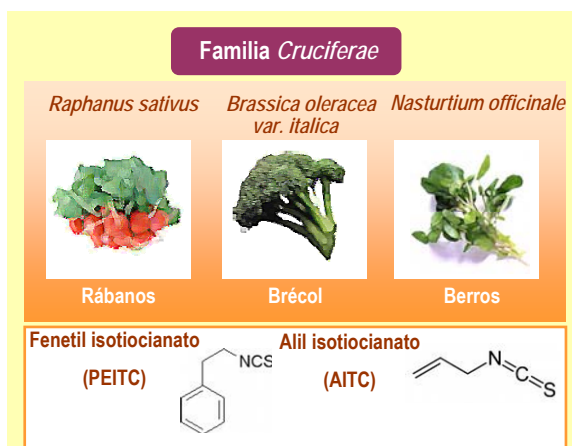


Figura 28. Estructura química de los compuestos isotiocianatos.

Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que los ITCs naturales, y un buen número de análogos sintéticos, son protectores frente a tumores inducidos por carcinógenos en vejiga, colon, esófago, mama, páncreas y estómago (Zhang y Talalay, 1994; Hecht, 1995; Talalay y Zhang, 1996; Hecht, 2000; Conaway y col., 2002).

Los ITCs pueden actuar como potentes inhibidores de las enzimas de la Fase I, como el CYP 2E1 (Hecht, 2000; Conaway y col., 2002). Además, este efecto inhibitor puede ser específico hacia un determinado carcinógeno. Por ejemplo, el PEITC es un potente inhibidor del cáncer de pulmón inducido por la NNK en ratones, sin embargo no muestra este efecto protector frente al daño al DNA y la inducción

de tumores en el pulmón tras el tratamiento con B(a)P (Adam-Rodwell y col., 1993).

Otros ITCs, como el AITC pueden actuar también como fuertes inductores de las enzimas de la Fase II, entre ellas la UDP-GT (Bacon y col., 2003; Petri y col., 2003) y la GST (Brooks y col., 2001; Bacon y col., 2003), en cultivos celulares humanos. Ésta última también interviene en el metabolismo *in vivo* de los ITCs. Así, polimorfismos en el gen que codifica para la enzima GST podrían influir en los efectos de la ingesta de las crucíferas y el riesgo de padecer cáncer (Lampe y Peterson, 2002). Se conocen dos variantes humanas de este gen, *GSTM1* y *GSTT1*, las cuales poseen grandes deleciones, y por lo tanto no codifican la correspondiente enzima GST (Coles y Kadlubar, 2003). Además, se sabe que un 50% de la población pertenece a los polimorfismos *GSTM1* y *GSTT1* (Garte y col., 2001). En consecuencia, individuos con una baja actividad GST presentan una menor eliminación de los ITCs, y por lo tanto una mayor exposición a éstos después de la ingestión de plantas crucíferas (Seow y col., 1998). Varios estudios epidemiológicos han hallado que la relación inversa entre el consumo de ITCs procedentes de plantas crucíferas y el riesgo de padecer cáncer de pulmón (Spitz y col., 2000; London y col., 2000; Lewis y col., 2001; Zhao y col., 2001) o de colon (Slattery y col., 2000; Seow y col., 2002; Turner y col., 2004) es más pronunciada en individuos que poseen las variantes *GSTM1* y *GSTT1*.

Por otro lado, aunque pueda parecer contradictorio, los ITCs pueden inducir estrés oxidativo en la célula, puesto que disminuyen las reservas de GSH (Zhang, 2000; Xu y Thornalley, 2001), conduciendo a la muerte celular por apoptosis. Además, se ha observado que el PEITC y el AITC inducen la producción de EROs (Murata y col., 2000; Rose y col., 2003).

El bloqueo del ciclo celular (Xiao y col., 2003; Zhang y col., 2003) y la inducción de apoptosis (Yu y col., 1998; Zhang y col., 2003) por el PEITC y el AITC en células cancerosas pueden ser otro de sus posibles mecanismos protectores. Yu y col. (1998) demostraron que el PEITC (10 μ M) induce muerte celular por apoptosis en células de cáncer

cervical (HeLa), a través de la activación de la caspasa-3 y la consecuente ruptura de la PARP. Por otro lado, la apoptosis inducida por el AITC en células HL-60 se produce a través de la activación de la caspasa-3 (Zhang y col., 2003). Además, los ITCs pueden regular la muerte celular por apoptosis incrementando la expresión de la proteína Bax (Gamet-Payraastre y col., 2000; Fimognari y col., 2002; Singh y col., 2004 a) y del gen supresor de tumores *p53* (Huang y col., 1998), induciendo la ruptura de Bid (Xu y Thornalley, 2000) o bien disminuyendo los niveles de Bcl-X_L (Singh y col., 2004 a).

8.2.1.2. Indoles

Los indoles tienen como principal representante al indol-3-carbinol (I3C). El precursor de este compuesto es un glucosinolato llamado glucobrasicina, la cual es muy abundante en plantas crucíferas, como el brécol. En el ambiente ácido del estómago, el I3C, en contacto con el ácido ascórbico de los jugos gástricos, se convierte en el dímero llamado 3,3'-diindoilmetano (DIM) (Tilton y col., 2006) (Figura 29).

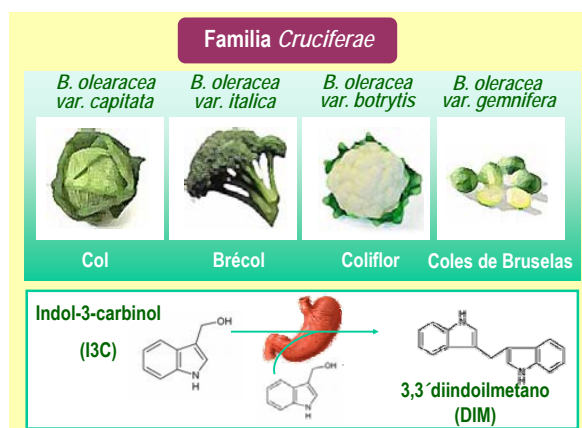


Figura 29. Conversión del indol-3-carbinol a 3,3'-diindoilmetano por la acción de los jugos gástricos.

Numerosas investigaciones indican que el I3C reduce la carcinogénesis inducida por los HAPs, las N-nitrosaminas, los compuestos nitrogenados y las aflatoxinas (Hecht, 2000). Estos efectos protectores del I3C frente a la carcinogénesis pueden ser resultado del aumento en la expresión y en la actividad catalítica de algunas enzimas de la Fase I y II (Nho y Jeffery, 2001; Safe, 2001). También se ha

comprobado que el I3C puede prevenir el desarrollo de tumores de mama inducidos tanto por agentes carcinógenos indirectos [como el 7,12 dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA)] como por carcinógenos directos [N-metilnitrosourea (MNU)] (Grubbs y col., 1995). Esto hace pensar que otros mecanismos protectores pueden estar involucrados en los efectos del I3C.

Uno de los mecanismos de acción mejor estudiados del I3C es su efecto protector en tumores dependientes de estrógenos, como es el tumor de mama. Los estrógenos, como el 17 β -estradiol, ejercen sus efectos estrogénicos al unirse al receptor de estrógenos (RE). Dentro del núcleo, el complejo estrógeno-RE puede unirse a secuencias de DNA llamadas elemento de respuesta a estrógenos (ERE), aumentando la transcripción de los genes que contienen el ERE (Jordan y col., 2001). Algunos de los efectos mediados por los RE, como la promoción de la proliferación celular en mama y útero, pueden aumentar el riesgo de padecer tumores estrógeno-dependientes (Liehr, 2000). Así, el I3C puede inhibir la transcripción de genes de respuesta a los estrógenos estimulados por el 17 β -estradiol en células tumorales de mama (Meng y col., 2000; Ashok y col., 2001). Por otro lado, el I3C puede también afectar al metabolismo del estradiol, desviando la producción del metabolito estrogénico 16 α -hidroxiestronea hacia otro menos potente como es la 2-hidroxiestronea. A diferencia de la 16 α -hidroxiestronea, la 2-hidroxiestronea tiene poca afinidad por los RE y es rápidamente metilada (Schneider y col., 1984), siendo menos disponible a los RE y por lo tanto, menos tumorigénica. Este cambio en la producción de metabolitos estrogénicos puede jugar un papel protector, puesto que la 16 α -hidroxiestronea aumenta la proliferación celular (Nebert, 1993; Bradlow y col., 1996) e induce tumores de mama (Bradlow y col., 1996).

Otro mecanismo protector del I3C consiste en el bloqueo del ciclo celular e inducción de apoptosis en células de cáncer de mama, próstata y útero (Chinni y col., 2001; Hong y col., 2002; Firestone y Bjeldanes, 2003; Chen y col., 2004). El I3C tiene la capacidad de disminuir los niveles de la proteína Bcl-2 (Chinni y col., 2001), mientras que el

DIM aumenta los niveles de Bax libre (Hong y col., 2002), formando este último, homodímeros que aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Zhang y Malejka-Giganti (2003) también han demostrado que el I3C puede aumentar la actividad de la caspasa-3 en ratas con tumores de mama inducidos por DMBA.

8.2.2. Plantas del género *Allium*: ajo y cebolla

Las plantas del género *Allium*, especialmente el ajo (*A. sativum*) y la cebolla (*A. cepa*) presentan gran cantidad de sulfuros de alilo y propilo que son los responsables de sus olores característicos (Belloir y col., 2006). Cuando estas plantas se dañan, cortan o maceran, unas enzimas denominadas alinasas actúan sobre la aliina produciéndose la alicina y una gran variedad de OSCs (Amagase, 2006). Entre estos compuestos destacan el sulfuro de dialilo (DAS) y el disulfuro de dialilo (DADS) en el ajo y, el sulfuro de dipropilo (DPS) y el disulfuro de dipropilo (DPDS) en la cebolla (Guyonnet y col., 2001), tal como se muestra en la **Figura 30**.

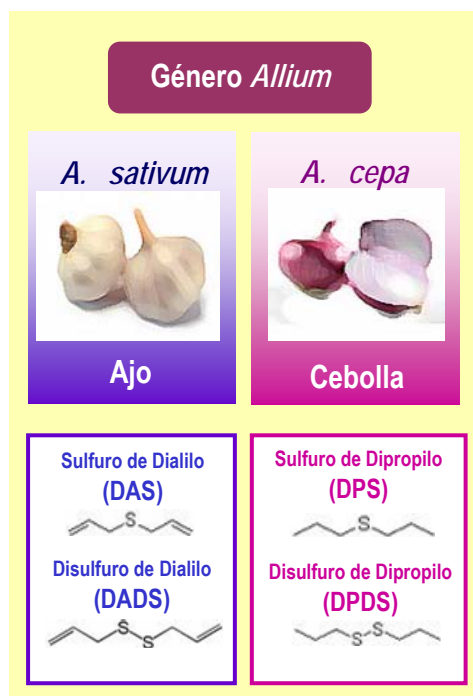


Figura 30. Estructura química de los compuestos organosulfurados del género *Allium*.

La asociación entre el consumo de ajo y el riesgo de padecer cáncer se ha evaluado en múltiples estudios epidemiológicos en los últimos 30 años. Se ha establecido que los individuos que consumen cantidades diarias elevadas de ajo (20 g al día) son menos susceptibles al cáncer que otros con un bajo consumo, particularmente en el caso del cáncer de estómago e intestino (Fleischauer y Arab, 2001; Park y Pezzuto, 2002; Galeone y col., 2006). El efecto anticancerígeno en el estómago puede estar relacionado con sus propiedades antibacterianas. La inhibición del crecimiento bacteriano en la cavidad gástrica resultaría en una menor conversión de los nitratos a nitritos en el estómago (Mei y col., 1982), y consecuentemente disminuiría la formación de las N-nitrosaminas. Shenoy y Choughuley (1992) observaron que los zumos de ajo y de cebolla inhibían las reacciones de nitrosación *in vitro* a medida que aumentaba la concentración de zumo.

Asimismo, cada vez son más los estudios científicos que indican la actividad antitumoral de los OSCs frente a distintos tipos de carcinógenos de la dieta como el B(a)P (Sparnins y col., 1988; Hu y Singh, 1997; Singh y Shukla, 1998), las aminas heterocíclicas (Tsuda y col., 1994; Mori y col., 1999), la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) (Wargovich y Goldberg, 1985; Sumiyoshi y Wargovich, 1990), la aflatoxina B1 (Haber-Mignard y col., 1996) y los compuestos N-nitroso, como la N-nitrosometilbenzilamina (NMBA) (De Boer y col., 2004) y la NDEA (Haber-Mignard y col., 1996; Singh y col., 2004 b), en diferentes órganos y especies animales.

La modificación del metabolismo de los carcinógenos es el principal mecanismo por el que los sulfuros de alilo protegen frente al desarrollo de tumores, afectando a la actividad de las enzimas de la Fase I y II (Milner, 1996; Schaffer y col., 1996; Munday y Munday, 1999). El DAS actúa como un inhibidor competitivo de la isoforma enzimática CYP 2E1, que activa un gran número de sustancias genotóxicas. De esta forma evita la unión covalente del carcinógeno con el DNA, que constituye el primer paso en el proceso carcinogénico (Milner, 1996; Schaffer y col., 1996). Además, Guyonnet y col. (1999) demostraron que el DADS aumentaba significativamente la actividad catalítica de todas las enzimas de la Fase II en tejidos de rata, excepto la

EPHX1 pulmonar, mientras que el DAS, DPS y DPDS estimulaban la actividad enzimática de la EPHX1, GST y la UDP-GT en el hígado.

Además, numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los OSCs poseen una elevada actividad antioxidante y capacidad para atrapar radicales libres y otros radicales (Imai y col., 1994; Ide y Lau, 1997). Pueden también mejorar las defensas antioxidantes, bien aumentando las reservas de GSH o aumentando la expresión de enzimas que atrapan radicales libres como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (Wei y Lau, 1998). Además, los niveles de GSH bajos están asociados con daño celular, depresión de la inmunidad y envejecimiento, aumentando por tanto el riesgo de cáncer. Los extractos de ajo aumentan los niveles de GSH en una gran variedad de células, incluidas células de hígado y mama (Liu y col., 1992).

Uno de los factores determinantes en el nivel de protección ejercido por los OSCs es el número de átomos de azufre en su estructura molecular, siendo el DADS más potente que el DAS (Sundaram y Milner, 1996 a; Yu y col., 2003). Imai y col. (1994) observaron que la capacidad de atrapar radicales libres ejercida por diversos OSCs aumentaba con el número de átomos de azufre. De la misma forma, la presencia del grupo alilo genera mayor protección que la aportada por compuestos que contienen el grupo propilo (Sundaram y Milner, 1996 a; Yu y col., 2003).

Por último, los efectos de los OSCs sobre las fases posteriores a la iniciación de la carcinogénesis son menos conocidos (Knowles y Milner, 1998; Knowles y Milner, 2000; Seki y col., 2000). Dichos efectos no están limitados a un tejido específico o a un tipo particular de célula. Varios estudios muestran que los OSCs son eficaces inhibidores de la proliferación de células tumorales en colon, piel y pulmón (Sundaram y Milner, 1996 b). El DAS y el DADS pueden aumentar la expresión del gen *p53* en diferentes células tumorales (Hong y col., 2000; Arora y col., 2004) o modificar los niveles celulares de diferentes proteínas pro o anti-apoptóticas. Así, el DAS y el DADS incrementan la expresión de la proteína Bax y disminuyen la

expresión de las proteínas Bcl-2/Bcl-X_L en células de cáncer de pulmón (Hong y col., 2000) y de mama (Nakagawa y col., 2001), respectivamente.

Sin embargo, aún existen contradicciones con respecto al papel de los OSCs en la modulación de la apoptosis en las células neoplásicas. Kim y col. (2005 b) y Koh y col. (2005) observaron que concentraciones altas de DADS inducen la expresión de genes y proteínas pro-apoptóticas, mientras que concentraciones bajas de DADS estimulan la expresión de genes y proteínas anti-apoptóticas en células neuronales. El DADS puede inducir o inhibir la apoptosis en una misma línea celular dependiendo de la concentración empleada. Por ello, se sospecha que en muchos estudios *in vitro* la inducción de apoptosis podría depender de la toxicidad de estos compuestos evaluados a altas dosis (D'Agostini y col., 2005).

8.2.3. Frutas y vegetales como fuentes de vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que se encuentra de forma habitual en frutas y vegetales (Blasiak y col., 2004) (Figura 31). Los tomates, el brécol, la coliflor, las

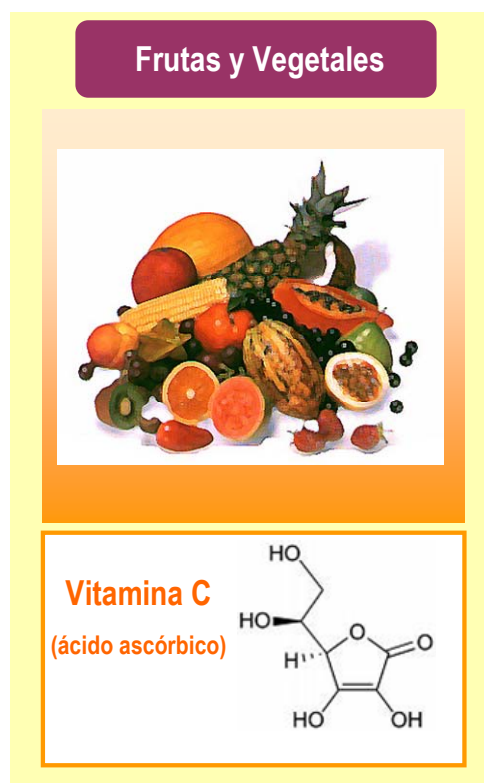


Figura 31. Estructura química de la vitamina C.

espinacas, las patatas, los kiwis, las fresas, y los cítricos como las limas, naranjas y limones (Haytowitz, 1995), son los que aportan una mayor cantidad de esta vitamina en la dieta. La especie humana es incapaz de sintetizarla al carecer de una enzima denominada gulonolactona oxidasa, por ello las necesidades diarias de vitamina C son cubiertas a través de la dieta (Valdés, 2006). La recomendación actual de ingesta diaria de vitamina C es de 90 mg/día para los hombres y de 75 mg/día para las mujeres. Sin embargo, pacientes con enfermedades crónicas, como el cáncer o la diabetes, o fumadores necesitan dosis mayores en su dieta habitual.

El empleo de la vitamina C para el tratamiento y la prevención del cáncer fue por primera vez propuesto en 1949 y después apoyado por Cameron y col. quienes en un controvertido estudio, mostraron que la administración de elevadas dosis de vitamina C mejoraba la supervivencia de los pacientes con cáncer terminal (Cameron y Campbell 1974; Cameron y Pauling, 1976; 1978). Numerosas evidencias epidemiológicas demuestran que el consumo elevado de frutas y vegetales disminuye el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer que afectan al tracto gastrointestinal y respiratorio (Block, 1991; Steinmetz y Potter, 1996). Puesto que la vitamina C está presente en grandes cantidades en estos alimentos, es posible que la reducción del riesgo de cáncer asociado al consumo de frutas y vegetales pueda ser, al menos en parte, atribuible a la vitamina C.

La vitamina C actúa atrapando radicales libres, protegiendo a las células frente al daño oxidativo causado por las EROs (Carr y Frei, 1999). Este mecanismo es el responsable de la prevención del daño oxidativo al DNA (Lutsenko y col., 2002; Padayatty y col., 2003; Li y Schellhorn, 2007), de la protección de los lípidos frente al daño peroxidativo (Chen y col., 2000; Valko y col., 2006) y de la reparación de residuos de aminoácidos para mantener la integridad de las proteínas (Baynes, 2001; Padayatty y col., 2003), actuando como un protector en las etapas de iniciación y promoción de la carcinogénesis. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias (como la presencia de metales y adecuadas condiciones de pH), la vitamina C tiene efectos pro-oxidantes e incluso mutagénicos

(Halliwell, 2001; Robichová y col., 2004 b; Duarte y Lunec, 2005). En condiciones fisiológicas *in vivo* la mayoría de los metales presentes son inactivos ya que se encuentran unidos a proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1986). No obstante, a concentraciones farmacológicas (0,3-20 mM/L), la vitamina C manifiesta una actividad pro-oxidante independientemente de la presencia de metales, que es más intensa en células cancerígenas causando muerte celular (Chen y col., 2005). Esta toxicidad selectiva puede ser atribuida a varias propiedades intrínsecas de las células tumorales, como una baja concentración de enzimas antioxidantes, por ejemplo la catalasa y la SOD (Li y Schellhorn, 2007) o por una mayor acumulación de ácido dehidroascórbico (DHA) a través de la sobre-expresión de transportadores de glucosa (GLUT) (Kawamura y col., 2001), y todo ello contribuye a su vez al aumento de la concentración intracelular de las EROs.

La vitamina C puede prevenir el cáncer de estómago no solo a través de la neutralización de las EROs (Menaker y col., 2004), sino también por la inhibición de la formación de N-nitrosaminas carcinogénicas (Lee y col., 2003; Ozdil y col., 2004; Dietrich y col., 2005; Jakszyn y col., 2006 b). La vitamina C reduce el nitrito a ON* impidiendo así que se una a las aminas para formar las N-nitrosaminas (Robichová y Slaménová, 2002). Otros estudios han demostrado que los niveles de vitamina C son bajos en pacientes adultos infectados por *Helicobacter pylori*, un reconocido factor de riesgo en el cáncer de estómago (Park y col., 2003). Por lo tanto, la erradicación de *H. pylori* y la restauración de los niveles de vitamina C deberían mejorar las defensas antioxidantes y prevenir la progresión del cáncer gástrico.

Por otra parte, la modulación de la expresión de los genes que codifican para las enzimas responsables de la activación metabólica de carcinógenos (Fase I) (Ahn y col., 2006) así como la de las enzimas responsables de la detoxificación y transformación de los mismos (Fase II) (Elbekai y col., 2007), son otros de los mecanismos a través de los cuales la vitamina C ejerce su efecto protector.

Además, las propiedades beneficiosas de la vitamina C son también consecuencia de sus

efectos sobre el ciclo celular. En células humanas de carcinoma de vejiga urinaria (T24) (Jamison y col., 2004) y en células de ovario de hamster chino (AS52) (Bijur y col., 1999), la vitamina C inhibe la proliferación bloqueando el ciclo celular en la fase G2/M (Clopton y Saltman, 1995; Bijur y col., 1999). Además, la inhibición del crecimiento celular puede ser también resultado de la inducción de apoptosis. Numerosos estudios *in vitro* han observado el efecto pro-apoptótico de la vitamina C en diferentes líneas celulares tumorales (Malicev y col., 2000; Park y col., 2004; Li y col., 2006; Hong y col., 2007) cuando se administra a dosis elevadas (0,25-1 mM). En células de leucemia mieloide aguda tratadas con vitamina C se observó un aumento en los niveles de la proteína Bax, liberación del citocromo c, activación de la caspasa -9 y de la caspasa-3 y ruptura de la PARP (Park y col., 2004).

Sin embargo, la vitamina C no solo induce apoptosis, sino que paradójicamente bloquea la apoptosis inducida por distintos agentes biológicos, físicos o químicos en diferentes tipos de células cancerígenas (Huang y col., 2002; Pérez Cruz y col., 2003; Karasavvas y col., 2005; Pérez Cruz y col., 2007). En estos estudios se ha visto que tras el tratamiento con vitamina C aumenta la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Wenzel y col., 2004; Zhou y col., 2006).

8.3. Interacciones entre compuestos quimiopreventivos: efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos

Las interacciones entre los compuestos quimiopreventivos pueden modificar los efectos que proporcionan los suplementos dietéticos y los alimentos funcionales. Estas interacciones pueden potenciar tanto el efecto de los quimiopreventivos como interferir en su actividad, afectando a un amplio rango de procesos biológicos que abarcan el metabolismo, la biodisponibilidad, la solubilidad, la absorción y la eliminación. El conocimiento de estas interacciones debería llevarnos a un enfoque más completo e integral sobre la prevención y el tratamiento de las enfermedades. De esta forma, las interacciones entre los compuestos quimiopreventivos nos pueden ayudar a explicar los

efectos saludables relacionados con los diferentes tipos de dietas, así como los efectos contradictorios encontrados con algunos suplementos dietéticos.

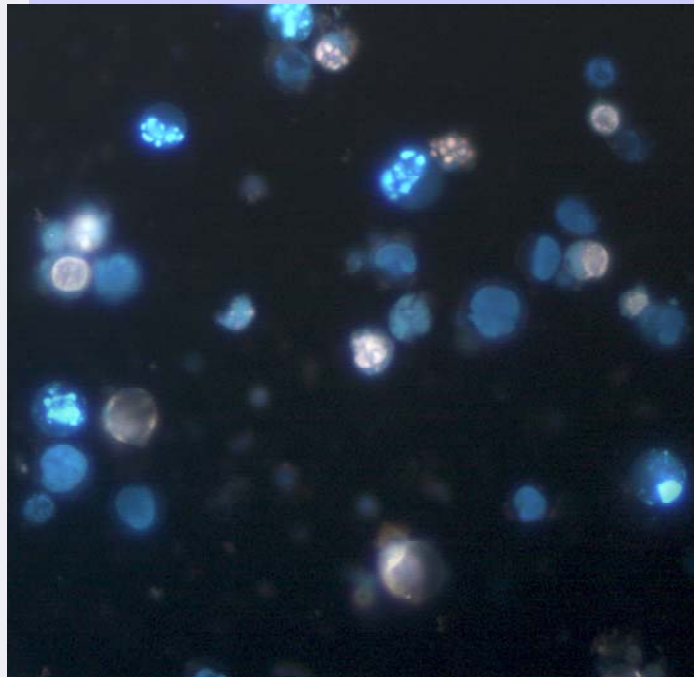
Las interacciones entre los diferentes compuestos presentes en una mezcla pueden ser positivas o negativas. Las interacciones positivas que intensifican la potencia de un compuesto bioactivo se conocen como potenciación. Las interacciones aditivas y sinérgicas son un subgrupo dentro de la potenciación y se habla de este tipo de interacciones cuando es experimentalmente caracterizada y cuantificada. Así, la bioactividad combinada de una mezcla se potencia cuando la interacción resulta en una mejora de la solubilidad, la absorción, la estabilidad o la biodisponibilidad del principio activo. En cambio, las interacciones negativas (antagónicas) se producen cuando ciertos componentes de la mezcla inhiben totalmente la actividad biológica de los compuestos bioactivos, bien disminuyendo su estabilidad o biodisponibilidad o aumentando su metabolismo.

Aunque la combinación de compuestos quimiopreventivos podría proporcionar mayores efectos protectores frente a diversos tipos de enfermedades que cuando se administran solos, existe un reducido número de estudios que examinen los efectos de la combinación de estos compuestos, así como los mecanismos implicados. La vitamina C es uno de los compuestos bioactivos más investigados por sus conocidas propiedades antioxidantes. Las combinaciones de la vitamina C con otros compuestos bioactivos como el licopeno (Riso y col., 2004) y las vitaminas A y E (Boehm y col., 1998; Kim y col., 2006 a) resultan en un efecto protector sinérgico. Antioxidantes como la vitamina A, C y E pueden interaccionar de tal forma que se protegen unos a otros de la degradación o/y promocionan su regeneración (Liu y col., 2004). Por ejemplo, la vitamina C induce la regeneración de la vitamina E y convierte el radical β caroteno en su forma reducida (Liu y col., 2004). También la vitamina A inhibe la formación de malondialdehído (Samokyszyn y Marnett, 1990) y, su actividad antioxidante está fortalecida por la inhibición de la producción de EROs por el sistema hierro-ascorbato a través de la reacción de Fenton (Sultana y col.,

2004). Recientemente Limpens y col. (2006) observaron que el tratamiento combinado de licopeno y vitamina E suprimía la proliferación celular en cáncer de próstata humano, mientras que ninguno de estos compuestos por separado reducía significativamente el volumen del tumor. Esta sinergia entre la vitamina E y el licopeno se demostró previamente *in vitro* con respecto a su actividad antioxidante (Fuhrman y col., 2000) y a su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en carcinoma de próstata (Pastori y col., 1998).

Aparte de las vitaminas, se ha observado que otros compuestos quimiopreventivos pueden presentar efectos sinérgicos. A partir de estudios en ratas alimentadas con brécol rico en glucosinolatos se observó que la actividad de la NQO aumentó significativamente, tanto en el hígado como en el colon, con respecto al grupo control o al grupo con una dieta rica en sulfurofano (SFN). El SFN purificado fue menos activo que los compuestos presentes en la matriz del brécol, lo que sugiere que otros componentes de este vegetal (como la quercetina o el S-metilcisteína sulfóxido) potenciaron su bioactividad (Keck y col., 2003). De igual manera, los glucosinolatos derivados de otras crucíferas, como las coles de bruselas, se analizaron para determinar su efecto en la actividad de las enzimas de la Fase II como la GST, la NQO y la Glutatión reductasa (GR). La mezcla de estos derivados aumentó de forma más potente la actividad de estas enzimas que los componentes individualmente (Staack y col., 1998; Nho y Jeffery, 2001).

Diferentes estudios (Hudges y col., 1998; Donnelly y col., 1999) han encontrado también interacciones negativas (antagónicas) entre las vitaminas C y E. Así, se observó que las vitaminas C y E ejercían un efecto protector frente al daño oxidativo al DNA en espermatozoides humanos cuando se administraban por separado, mientras que en tratamientos combinados a las mismas concentraciones aumentaron dicho daño oxidativo.



CAPÍTULO II:

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DESARROLLADO EN ESTA TESIS

1. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los alimentos constituyen una de las principales fuentes exógenas de N-nitrosaminas para la especie humana, existiendo una gran preocupación por su presencia en nuestra vida diaria ya que constituyen uno de los grupos de agentes carcinogénicos más estudiados. La mayor parte de los trabajos de investigación realizados hasta el momento se centran en dos N-nitrosaminas volátiles, la N-nitrosodimetilamina (NDMA) y la N-nitrosopirrolidina (NPYR). Sin embargo, son muy escasos los trabajos realizados con otras N-nitrosaminas, como la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA).

La NPIP se forma a partir de las reacciones entre los agentes nitrosantes derivados de las sales de curado y los compuestos procedentes de la pimienta y el pimentón, como la piperidina y la piperina o sus precursores. De esta forma podemos encontrar la NPIP en chorizos, salchichones, jamones y lomos que incluyan especias en la formulación de sus mezclas. Por otra parte, la NDBA se origina en productos cárnicos como consecuencia de la interacción del nitrito presente en la carne con las aminas empleadas como aditivos en la industria de la goma. Dichos aditivos pueden nitrosarse para formar la NDBA que posteriormente migra al producto. Asimismo, la NDBA es una de las N-nitrosaminas que se encuentra más frecuentemente en chupetes y tetinas para biberones empleados en el cuidado y la alimentación de los bebés. Esto podría multiplicar la exposición de la población infantil por 100 con respecto a un individuo adulto. En 1978, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (AIIC) clasificó a la NPIP y a la NDBA como carcinógenos del grupo 2B (posibles carcinógenos en humanos). Por ello, existe una creciente preocupación frente a la posibilidad de que las N-nitrosaminas puedan causar diversos tipos de cáncer en humanos, incluso con una exposición a bajas dosis a lo largo de toda la vida.

Demostrado el efecto potencialmente cancerígeno de las N-nitrosaminas, se impone la necesidad de controlar su formación en el medio ambiente y sobre todo en los alimentos. Para ello existen dos tipos de estrategias: la inhibición de su

formación y la quimiopreención. Esta última posibilidad es la que se contempla en el trabajo presentado en esta memoria.

La estrategia quimiopreventiva frente a la inducción del cáncer de muchos compuestos mutagénicos se basa en la alteración de su metabolismo. Por ello, cualquier compuesto capaz de bloquear algún paso de la activación metabólica, de capturar metabolitos intermediarios formados tras dicha activación o de estimular la actividad detoxificadora puede considerarse como un quimiopreventivo potencial. Muchos de estos agentes quimiopreventivos se encuentran en frutas y vegetales, siendo una de las relaciones más sólidas entre dieta y cáncer la establecida por el efecto protector que tiene el consumo elevado de frutas y vegetales. Este hábito alimentario se encuentra asociado a una baja incidencia de cáncer la especie humana. En trabajos preliminares desarrollados por nuestro equipo de investigación se demostró el efecto protector de los extractos acuosos y etanólicos de frutas y vegetales frente a la citotoxicidad y mutagenicidad de las N-nitrosaminas. Por tanto, como las frutas y vegetales forman parte de nuestra dieta diaria, consideramos de interés evaluar el efecto protector individual de los agentes quimiopreventivos presentes en este tipo de alimentos, frente a compuestos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos como las N-nitrosaminas que van a ser consumidas simultáneamente con frutas y vegetales. Esto permitiría también establecer la existencia de una estrecha relación entre la estructura química de estos compuestos y su actividad biológica, y profundizar en los mecanismos de acción por los que estos compuestos desarrollan su actividad protectora frente a las N-nitrosaminas. En este sentido, los compuestos organosulfurados (OSCs), los compuestos isotiocianatos (ITCs) y la vitamina C podrían actuar como quimiopreventivos frente a la carcinogenicidad de la NPIP y de la NDBA, siendo ésta la hipótesis de partida del presente trabajo de investigación.

No obstante, hoy en día, sigue siendo muy complicado determinar el comportamiento de estos agentes quimiopreventivos cuando son ingeridos a través de la dieta, debido a que una sola ración de

frutas o vegetales puede contener cientos de estos compuestos. De hecho, se han descrito interacciones entre ciertos quimiopreventivos que podrían tanto potenciar como interferir el efecto protector individual de cada uno de ellos, ya que pueden afectar a un amplio rango de procesos biológicos como el metabolismo, la biodisponibilidad, la solubilidad, la absorción y la eliminación. La complejidad de estas interacciones hace que aún estemos lejos de conocer y comprender el verdadero papel de los quimiopreventivos presentes en los alimentos frente a la prevención del cáncer. Sin duda, este desconocimiento hace necesario que las futuras investigaciones presten una mayor atención al estudio de los efectos combinados de los compuestos quimiopreventivos y, debido a que muchas frutas y vegetales, además de contener OSCs ó ITCs, son muy ricas en vitamina C, consideramos de interés evaluar la interacción entre estos quimiopreventivos. Por ello, el objetivo principal del presente trabajo de investigación consistió en evaluar el **“Efecto protector de los organosulfurados (OSCs) y de los isotiocianatos (ITCs) solos o en combinación con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA) presentes en los alimentos. Así como, en determinar los posibles mecanismos de acción por los que estos compuestos ejercen su efecto protector”**.

Para ello, se ha utilizado la línea celular de hepatoma humano (HepG2) y la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo Cometa, así como microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresan la isoforma enzimática humana CYP 1A1 implicada en el metabolismo de la NDBA. En este trabajo, además de la línea celular HepG2, también se ha empleado la línea de leucemia humana (HL-60) para la realización de los estudios de apoptosis. Para alcanzar el objetivo propuesto fue necesario realizar los siguientes objetivos parciales:

1. Analizar el daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, daño oxidativo y alquilativo) inducido por la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA), utilizando la línea celular HepG2 y el ensayo Cometa.

2. Evaluar la inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA en dos líneas celulares, HL-60 y HepG2, utilizando diferentes técnicas como la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo (ensayo Anexina V/PI y método TUNEL), el Western blot de la poli (ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) y la actividad de las caspasas.
3. Determinar la producción de las especies reactivas del oxígeno (EROs) por la NPIP y la NDBA en dos líneas celulares, HL-60 y HepG2, utilizando el diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), y su implicación en el proceso apoptótico.
4. Evaluar el efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA: Análisis del daño al DNA de un tratamiento simultáneo de N-nitrosaminas y OSCs ó ITCs ó vitamina C, utilizando la línea celular HepG2 y el ensayo Cometa.
5. Evaluar la interacción de los OSCs ó de los ITCs con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA: Análisis del daño al DNA de un tratamiento simultáneo de N-nitrosaminas y OSCs ó ITCs en combinación con la vitamina C, utilizando la línea celular HepG2 y el ensayo Cometa.
6. Estudiar los posibles mecanismos de acción por los que los compuestos quimiopreventivos ejercen su efecto protector:
 - 6.1. Inhibición de la isoforma enzimática humana CYP 1A1 (implicada en el metabolismo de la NDBA), utilizando microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresan dicha isoforma humana.
 - 6.2. Efecto de la vitamina C, el disulfuro de dialilo (DADS) y el disulfuro de dipropilo (DPDS) en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA, utilizando dos líneas celulares, HL-60 y HepG2 y el método TUNEL.
 - 6.3. Capacidad de la vitamina C, el DADS y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA, utilizando dos líneas celulares, HL-60 y HepG2, y el H₂DCFDA.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los estudios incluidos en esta tesis se han realizado *in vitro* utilizando líneas celulares tumorales humanas y microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresan la isoforma enzimática humana CYP 1A1.

2.1. Líneas celulares tumorales humanas

Hoy en día disponemos de varias líneas hepáticas tumorales humanas para predecir el potencial genotóxico de agentes carcinogénicos como las N-nitrosaminas, aunque la línea celular HepG2 es una de las mejor caracterizadas. Esta línea celular deriva originalmente de un carcinoma hepatocelular humano, conservando así muchas de las características morfológicas y la actividad de las enzimas de la Fase I y de la Fase II de las células del parénquima hepático. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente (**Capítulo I, apartado 6**) los niveles de expresión de las enzimas de la Fase I y de ciertas enzimas de la Fase II, en concreto la UDP-GT, son algo inferiores a los que se presentan en los cultivos primarios de hepatocitos. A pesar de esta limitación, la línea celular HepG2 es la mejor candidata para cumplir los objetivos de este proyecto, dada su simplicidad, disponibilidad y bajo coste.

En este trabajo de investigación, utilizamos también la línea derivada de leucemia humana, HL-

60, que expresa las enzimas del metabolismo celular (Nagai y col., 2002) y se utiliza como modelo para el estudio de la apoptosis inducida por carcinógenos (Holme y col., 1997).

Estas dos líneas se obtuvieron de la colección de cultivos celulares del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid). En la **Figura 32** se observa la morfología de las líneas HL-60 y HepG2 al microscopio óptico. En cuanto a las condiciones de cultivo, las células HL-60 y HepG2 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memory Institute) y en medio de cultivo definido de Eagle modificado por Dulbecco respectivamente, suplementados con un 10% de suero fetal bovino, 50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomycin y un 1% v/v L-Glutamina. El crecimiento de las células se realizó a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. En la realización de todos los experimentos incluidos en esta memoria se han utilizado subcultivos con un número de pases de 10 a 17.

2.2. Compuestos químicos

2.2.1. N-nitrosaminas

En este trabajo se han utilizado dos de las N-nitrosaminas volátiles que se pueden detectar en los alimentos (Ventanas y col., 2004). La N-nitrosopiperidina (NPIP), con una estructura cíclica, y la N-nitrosodibutilamina (NDBA), con una estructura lineal. En la **Figura 33** se muestra la estructura química de la NPIP y de la NDBA.

Debido a que las N-nitrosaminas son agentes carcinogénicos muy potentes, en todos los experimentos se tomaron las medidas adecuadas de seguridad para su manipulación.

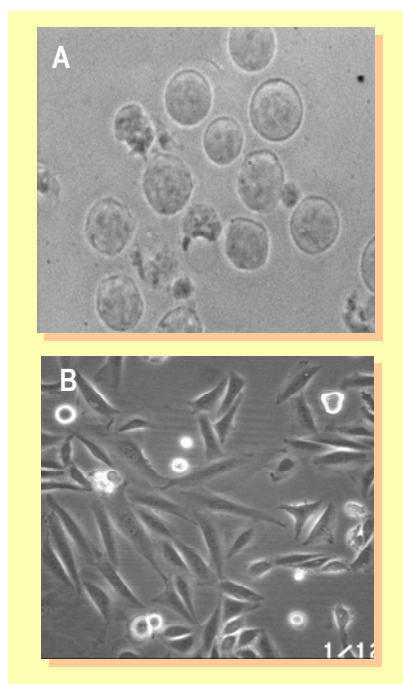


Figura 32. Morfología de las líneas HL-60 (A) y HepG2 (B) al microscopio óptico.

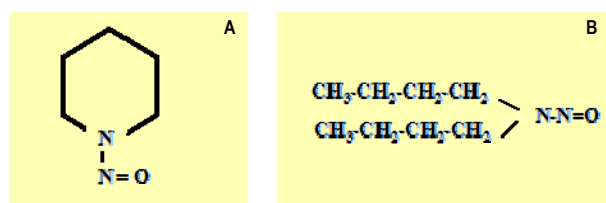


Figura 33. Estructura química de (A) la N-nitrosopiperidina (NPIP) y de (B) la N-nitrosodibutilamina (NDBA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 10. Compuestos quimiopreventivos utilizados en este trabajo frente a la genotoxicidad de la NPIP y de la NDBA.

	Frutas y vegetales	Nombre vulgar	Nombre científico	Compuestos químicos	Artículos
		Ajo	<i>Allium sativum</i>	Sulfuro de Dialilo (DAS) Disulfuro de Dialilo (DADS)	3 y 5
		Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Sulfuro de Dipropilo (DPS) Disulfuro de Dipropilo (DPDS)	3 y 5
		Brócoli Rábanos Berros Col Coliflor Coles de Bruselas	<i>Brassica oleracea var. italica</i> <i>Raphanus sativus</i> <i>Nasturtium officinale</i> <i>Brassica oleracea var. capitata</i> <i>Brassica oleracea var. botrytis</i> <i>Brassica oleracea var. gemnifera</i>	Fenil isotiocianato (PEITC) Alil isotiocianato (AITC) Indol-3-Carbinol (I3C)	4
		Frutas y vegetales		Vitamina C	3, 4 y 5

2.2.2. Compuestos quimiopreventivos

En el presente estudio de investigación los compuestos quimiopreventivos utilizados frente a la genotoxicidad de la NPIP y de la NDBA fueron los que aparecen en la **Tabla 10**.

2.2.3. Etopósido

El etopósido es un derivado semisintético de la podofilotoxina extraída del *Podophyllum peltatum* o mandrágora americana, que se utiliza como un agente quimioterapéutico frente al cáncer (Guevara y col., 2000). Este compuesto actúa inhibiendo la acción de la enzima topoisomerasa II, esencial para la replicación y transcripción del DNA. Se ha demostrado que el etopósido es capaz de inducir apoptosis en una gran variedad de líneas celulares tumorales (Nakaya y col., 1991). En los **artículos 1** y **2**, utilizamos el etopósido como un control positivo de apoptosis (Ho y col., 1999; Kumala y col., 2003), a la concentración de 5 μM en la línea celular HL-60 y de 100 μM en la línea celular HepG2.

2.2.4. N-acetilcisteína (NAC)

La NAC es un compuesto organosulfurado de naturaleza hidrofílica presente en las plantas del

género *Allium* como el ajo o la cebolla (Hsu y col., 2004). En los últimos años, numerosas investigaciones han demostrado los efectos beneficiosos que posee este compuesto frente al daño al DNA, y a la carcinogénesis inducida por numerosos compuestos químicos (De Flora y col., 2001). Entre los múltiples mecanismos que se le atribuyen destaca su actividad antioxidante, y por tanto su capacidad para atrapar o reaccionar con las EROs (Plantin-Carrenard y col., 2000; Zafarullah y col., 2003). En los **artículos 1** y **2**, la NAC (20 mM, 1h) se empleó para reducir la producción intracelular de las EROs inducida por las N-nitrosaminas, así como para determinar el papel de las mismas en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 y HepG2.

2.3. Determinación de la Viabilidad Celular

2.3.1. Método Colorimétrico MTT

Este método se basa en la metabolización de la sal de tetrazolio (MTT), de color amarillo, a cristales de formazán, de color púrpura, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales. La enzima succinato deshidrogenada mitocondrial (SDH) es la principal implicada en esta reacción reductora, así como los cofactores de nucleótidos de la pirimidina

NADH y NADPH (Figura 34). Esta conversión, por tanto, sólo puede ocurrir en células viables (Martínez y col., 1998). Los cristales de formazán formados son solubilizados y la solución coloreada resultante se cuantifica espectrofotométricamente (A_{620nm} – A_{690nm}) (Mosmann, 1983). Un incremento en el número de células viables está directamente relacionado con la cantidad de cristales de formazán formados, reflejado en la absorbancia obtenida.

En el presente trabajo de investigación utilizamos el kit de proliferación celular I MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), para evaluar la citotoxicidad de las N-nitrosaminas y de los compuestos quimiopreventivos utilizados en este trabajo (Artículo 1 y Capítulo II, apartado 5.2).

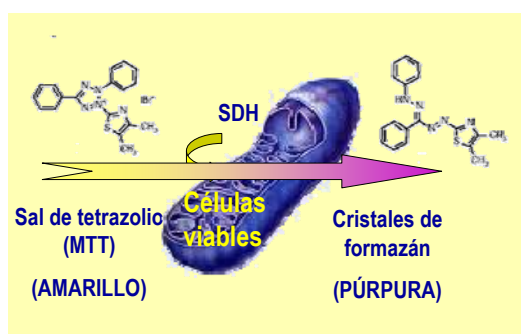


Figura 34. Reacción de metabolización del MTT a formazán, mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en células viables.

2.3.1.1. Procedimiento del método

La viabilidad celular se determinó siguiendo las indicaciones del kit de proliferación celular I MTT. Las células (1×10^6 células/ml) se cultivaron en placas microtituladoras de 96 pocillos, en medio de cultivo completo, a 37°C y con un 5% de CO₂ durante 24 h, tal y como se muestra en la Figura 35. Pasadas las 24 h, se retiró el medio de cultivo utilizado y se añadieron a los pocillos diferentes concentraciones de NPIP o NDBA (0,5-20 mM en HL-60; 1-45 mM en HepG2), incubando las placas durante 6, 18 y 24 h. Después de la incubación, se añadieron 10 µl de la solución MTT a cada pocillo, incubando la placa durante 4 h. Para disolver los cristales de formazán, se añadió a cada pocillo 100 µl de una solución solubilizante y a continuación se incubó la placa durante 24 h. Transcurrido este periodo de incubación y una vez solubilizados todos los cristales de formazán, se procedió a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia de cada pocillo (A_{620 nm} – A_{690 nm}). Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia celular (%SDH) de acuerdo a la siguiente fórmula: porcentaje de supervivencia celular (%SDH)= 100 (A₁/A₀), donde A₁ es la absorbancia de las células expuestas a las N-nitrosaminas, y A₀ es la absorbancia del control negativo (células no tratadas).

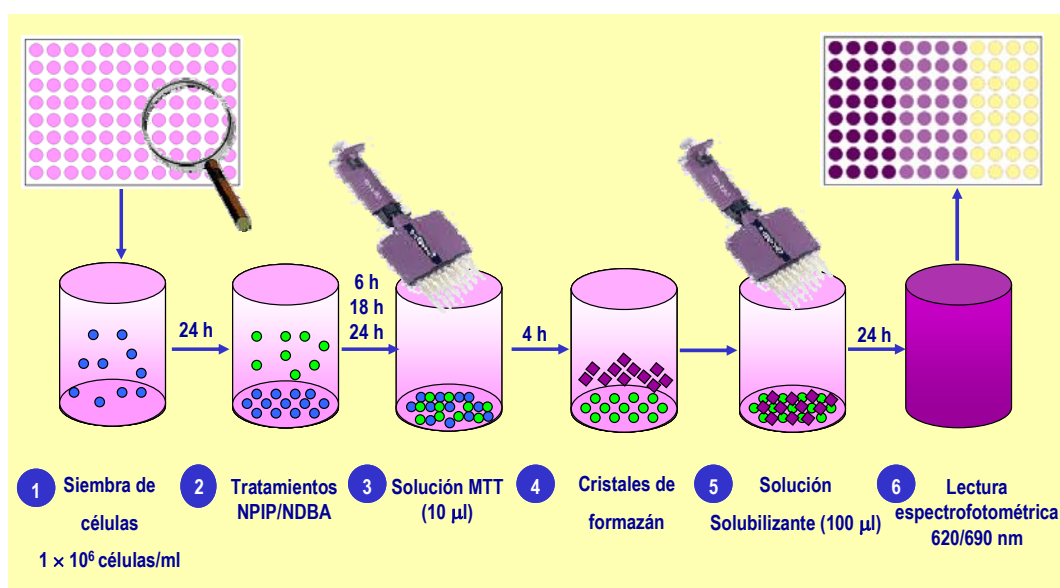


Figura 35. Procedimiento del método colorimétrico MTT.

2.4. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro*: Electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa)

La técnica de electroforesis alcalina en células individuales conocida también como ensayo Cometa es un método sensible, fiable y rápido que permite visualizar al microscopio de fluorescencia los daños en el DNA (Lee y col., 2004). Este método se desarrolló por primera vez en 1984 para detectar rupturas en la cadena doble de DNA (Östling y Johanson, 1984). Sin embargo, años más tarde, Singh y col. (1988) modificaron la técnica usando condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$) para desnaturalizar el DNA, y detectar así rupturas en las cadenas simples y dobles del DNA, sitios ácidos y álcali lábiles. La técnica consiste en el análisis de células individuales que son lisadas y sometidas a electroforesis, para lograr que el DNA migre hacia el ánodo, semejando la cola de un cometa. Las células con el DNA dañado muestran colas de cometa mayores que las no dañadas (Figura 36).

El ensayo Cometa se emplea, en general, para evaluar *in vitro* e *in vivo* la genotoxicidad de numerosos agentes químicos o físicos (Vindas y col.,

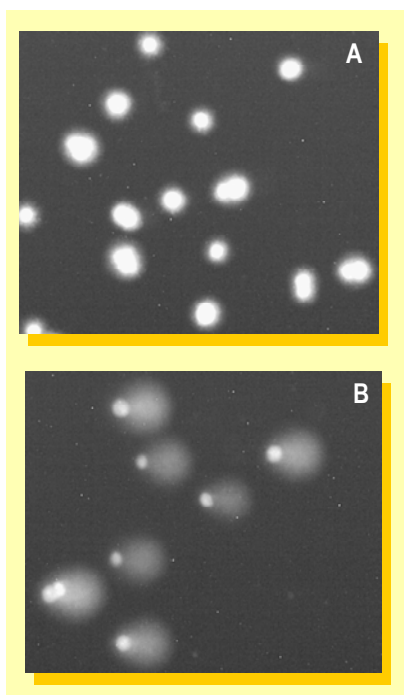


Figura 36. Células HepG2 (A) control y (B) tratadas con NPIP, al microscopio de fluorescencia, utilizando el ensayo Cometa.

2004). En el presente trabajo de investigación, utilizamos este ensayo para evaluar el daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, daño oxidativo y alquilativo) inducido por la NPIP y la NDBA (**Capítulo II, apartado 4.1 y 4.4**), así como para evaluar el efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C solos o bien de los OSCs o los ITCs en combinación con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP o la NDBA (**Artículos 3 y 4, y Capítulo II, apartado 4.2**).

2.4.1. Procedimiento del Método

El ensayo Cometa se realizó de acuerdo con el protocolo de Olive y col. (1992), aunque para una mejor caracterización del origen de la ruptura de las cadenas del DNA se utilizaron las enzimas formamido-pirimidina-DNA glicosilasa (Fpg), endonucleasa III (Endo III) y la 3-metiladenina-DNA glicosilasa (AIKa). Las dos primeras enzimas reconocen las purinas y las pirimidinas oxidadas (Møller y Loft, 2002) respectivamente, y la última, las purinas alquiladas (Collins y col., 2001).

Las células HepG2 se cultivaron en placas microtituladoras de 24 pocillos a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ml de medio de cultivo; tras 24 h de incubación, las células se trataron con la NPIP (0,9, 9 y 44 mM) o la NDBA (0,3, 0,6 y 3 mM) durante otras 24 h a 37°C y 5% de CO_2 (Figura 37). En el caso de los tratamientos simultáneos de las N-nitrosaminas con los compuestos quimiopreventivos, tras las 24 h de incubación se añadieron a las células HepG2 distintas concentraciones de los compuestos quimiopreventivos a analizar (1, 10 y 50 μM de DAS/DPS; 0,1, 1 y 2,5 μM de DADS/DPDS; 0,1, 0,5 y 1 μM de ITCs; 1, 5 y 10 μM de vitamina C), incubándose las placas durante 24 h. Después de la incubación, se trataron simultáneamente con la NPIP (44 mM) o la NDBA (3 mM) y las correspondientes concentraciones de quimiopreventivos durante otras 24 h. Por último, en los tratamientos simultáneos de OSCs o ITCs en combinación con la vitamina C y las N-nitrosaminas, al igual que hemos mencionado anteriormente, tras 24 h de incubación las células se trataron con distintas concentraciones de OSCs o ITCs en combinación con la vitamina C (10 μM) y las placas se incubaron durante 24 h. Transcurridas las

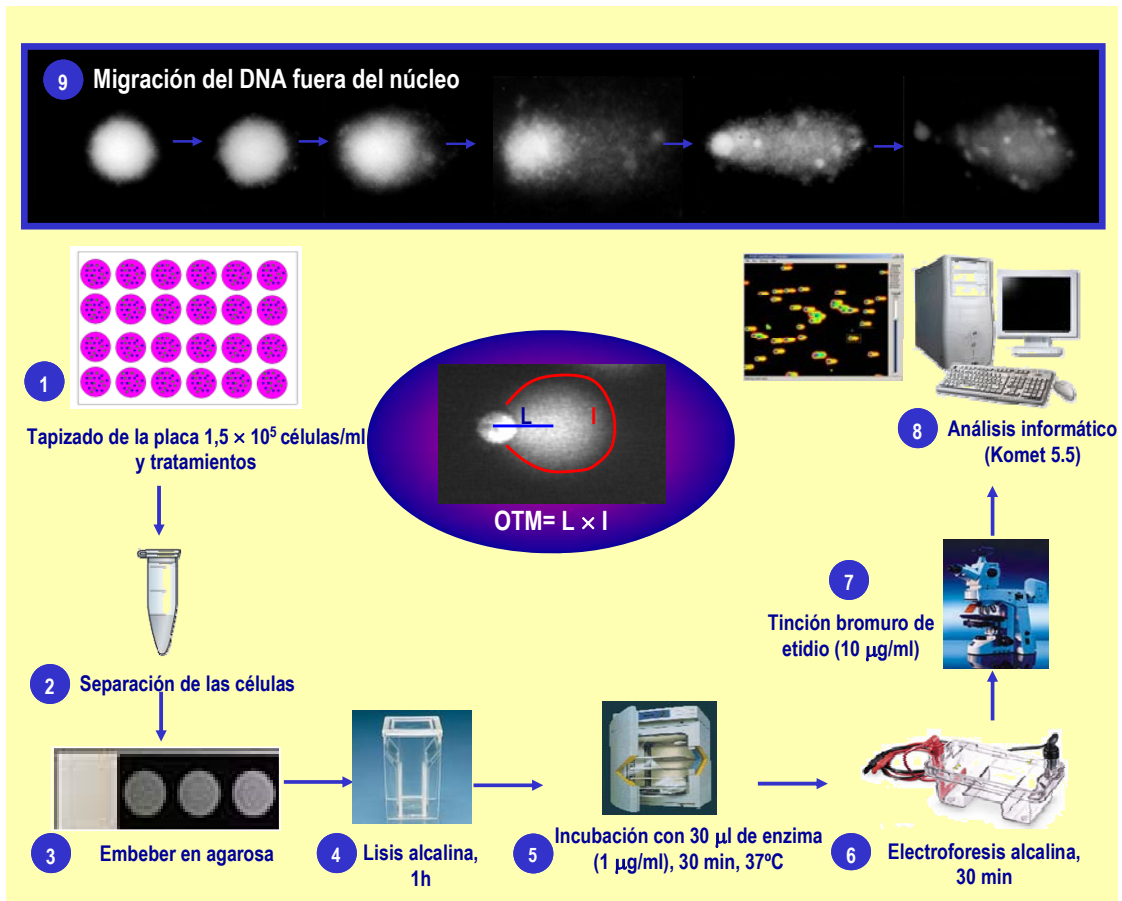


Figura 37. Ensayo Cometa.

24 h, las células se trataron simultáneamente con la NPIP y la NDBA, y los correspondientes tratamientos de OSCs o ITCs en combinación con la vitamina C durante 24 h.

Transcurrido el tratamiento de las células, se mezclaron 10 μ l de una suspensión de $1,5 \times 10^5$ células con 70 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0,75% y se extendió la mezcla en unos portaobjetos previamente pretratados con agarosa LMP al 0,30%, dejándolos secar sobre una bandeja de hielo. Tras la solidificación, las células fueron lisadas en la oscuridad durante 1 h en un tampón salino alcalino (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% Triton X-100, pH 10). A continuación, los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos en un tampón enzima para la Fpg y la Endo III (0,04 M HEPES, 0,1 M KCl, 0,05 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH 8) o para la AikA (0,07 M HEPES KOH, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol, 5% glicerol, pH 7,6) y se incubaron con 30 μ l de enzima Fpg, Endo III o AikA (1 μ g/ml) durante 30 min a 37°C en un compartimento oscuro y húmedo. Los portaobjetos

control se incubaron solo con 30 μ l de tampón enzima. Tras el tratamiento enzimático, los portaobjetos se sumergieron en tampón de electroforesis (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) durante 40 minutos en la oscuridad y a 4°C. La electroforesis se realizó a esta temperatura en una cámara de electroforesis horizontal SUB-CELL-GT (Bio-Rad) con el mismo tampón durante 30 minutos a 25 V en la oscuridad. Después de la electroforesis, los portaobjetos se neutralizaron con Tris 0,4 M (pH 7,5) y se fijaron en metanol. A continuación, el DNA se tiñó con bromuro de etidio (10 μ g/ml) en tampón tris acetato EDTA (TAE 1 \times) durante 5 minutos y se observaron en un microscopio de fluorescencia (microscopio Axiostar plus, Zeiss) conectado a un sistema de análisis de imágenes computerizado (Komet 5.5). Los resultados se expresaron como Olive Tail Moment (OTM) que se define como el producto de la cantidad de DNA de la cola (I) por la distancia que hay desde el centro de la cabeza al centro de la cola (L) (Figura 37). Se evaluaron las imágenes obtenidas de 50 células por cada tratamiento.

2.5. Detección de Apoptosis

Los métodos utilizados en este trabajo de investigación para la detección de apoptosis se basan en las características morfológicas y bioquímicas de este proceso.

2.5.1. Detección morfológica de apoptosis

Las características morfológicas de apoptosis pueden visualizarse al microscopio de fluorescencia utilizando colorantes vitales que se unen al DNA (**Figura 38**). La emisión de una mayor intensidad de fluorescencia indica una condensación de la cromatina, característica del proceso de apoptosis (Roger y col., 1996). Esta técnica, por tanto, permite distinguir las células apoptóticas de las células viables o de las necróticas, de una forma

rápida y simple, e incluso diferenciar las diferentes fases del proceso apoptótico (Darzynkiewicz, 1994). En el presente trabajo de investigación hemos utilizado dos colorantes vitales diferentes dependiendo de la línea celular objeto de estudio: Hoechts 33342 (HL-60) y naranja de acridina (HepG2).

2.5.1.1. Procedimiento del método

2.5.1.1.1. Línea celular HL-60

La detección de las células HL-60 apoptóticas tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA (**Artículo 1**) se realizó empleando el colorante vital Hoechts 33342 combinado con bromuro de etidio (**Figura 39**). Para ello, las células se dispersaron en placas microtituladoras de 6 pocillos (1×10^6

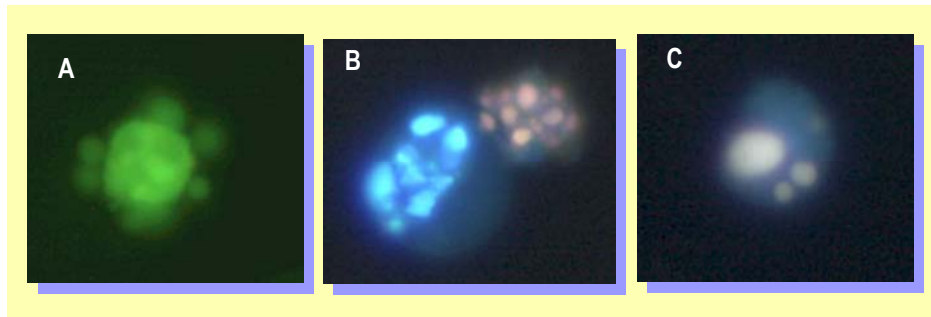


Figura 38. Características morfológicas de apoptosis: (A) burbujeo de la membrana o “blebbing”; (B) condensación de la cromatina; y (C) formación de cuerpos apoptóticos.

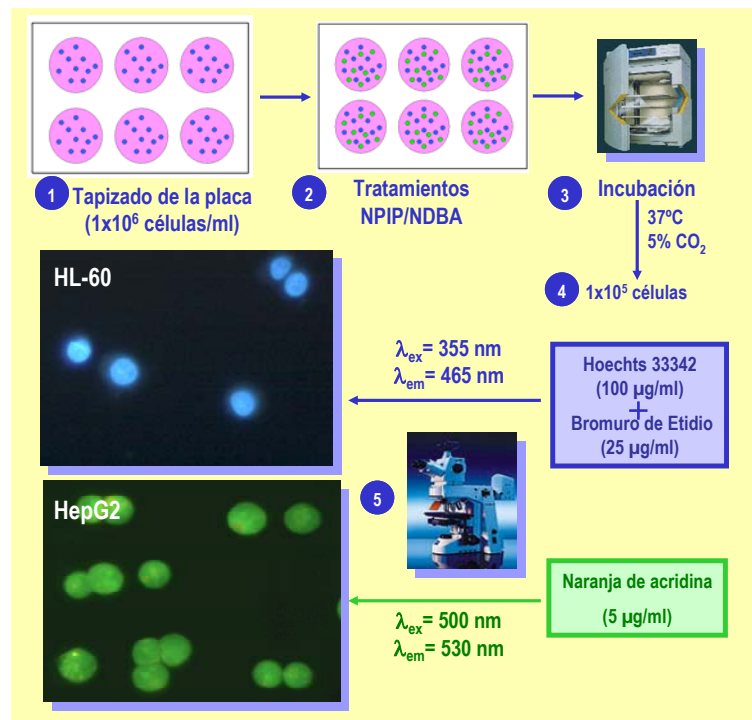


Figura 39. Detección morfológica de apoptosis en las líneas celulares HL-60 y HepG2.

células/ml) y se incubaron con la NPIP (5-20 mM) o la NDBA (0,5-10 mM) durante diferentes tiempos (3-24 h) a 37°C y un 5% de CO₂. Posteriormente, se recogieron 1×10⁵ células de cada tratamiento que se tiñeron con Hoechts 33342 (100 µg/ml) + bromuro de etidio (25 µg/ml). El bromuro de etidio sólo difunde al interior de la célula cuando la membrana plasmática pierde su integridad, indicando que la célula está necrótica o se encuentra en las etapas tardías de la apoptosis. Por tanto, las células necróticas van a adquirir un color rosa debido a la unión del bromuro de etidio con el DNA, mientras que las células viables o apoptóticas emiten una fluorescencia azul por la unión del Hoechst 33342 al material nuclear. Las células apoptóticas se diferencian de las células viables por la morfología del núcleo, que aparecerá condensado, fragmentado y con una mayor intensidad de la fluorescencia azul (Jerome y Chen, 2000). Se estudiaron 200 células por cada tratamiento diferenciando entre células viables, necróticas y apoptóticas.

2.5.1.1.2. Línea celular HepG2

La visualización de las células HepG2 apoptóticas tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA (**Artículo 2**) se observó empleando el colorante vital naranja de acridina (**Figura 39**). Para ello, las células se dispersaron en placas microtituladoras de 6 pocillos (1×10⁶ células/ml) y se incubaron con la NPIP (10-45 mM) o la NDBA (1-3,5 mM) durante diferentes tiempos (3-72 h) a 37°C y un 5% de CO₂. Posteriormente, se recogieron 1×10⁵ células de cada tratamiento que se tiñeron con naranja de acridina (5 µg/ml). Este colorante vital se une tanto al DNA (fluorescencia verde) como al RNA (fluorescencia naranja), pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud de onda según el tipo de ácido nucleico al que se ha unido (Dobrucki y Darzynkiewicz, 2001). Con esta tinción podemos identificar fácilmente cambios morfológicos asociados a la apoptosis como son: la condensación de la cromatina, el burbujeo de la membrana y la formación de los cuerpos apoptóticos. Se estudiaron 200 células por cada tratamiento diferenciando entre células viables, necróticas y apoptóticas.

2.5.2. Cuantificación de apoptosis mediante el ensayo Anexina V/PI

Este ensayo se basa en la afinidad de la Anexina V por la fosfatidilserina (FS), considerándose uno de los métodos más sensibles para la detección de células apoptóticas (Champagne y col., 1999). Durante las fases iniciales de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular, uno de éstos es la exposición de la FS. La FS cambia su localización de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática, y este proceso se puede cuantificar mediante citometría de flujo utilizando la Anexina V conjugada con fluorocromos (**Figura 40**).

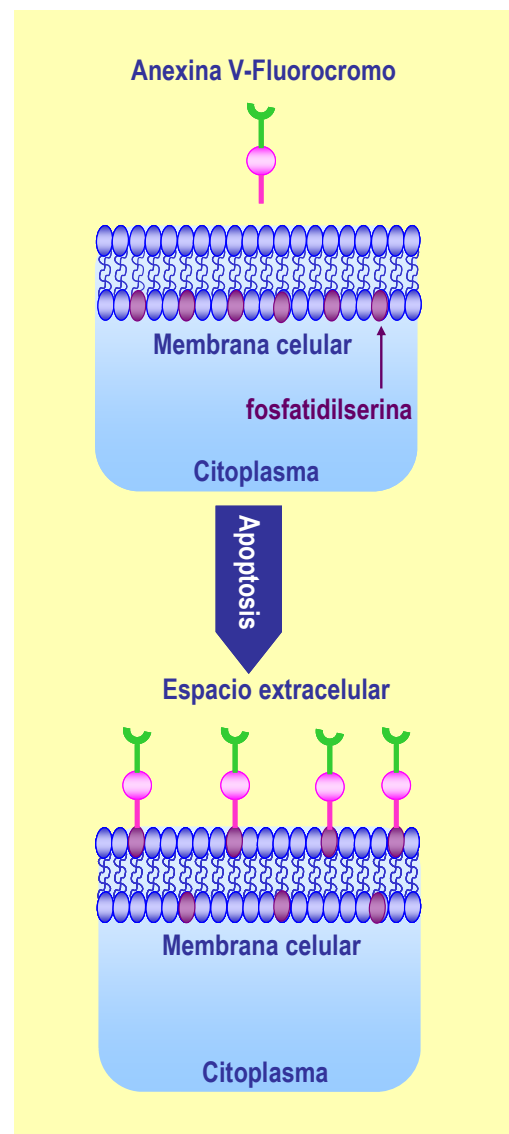


Figura 40. Detección de la fosfatidilserina (FS) por el ensayo Anexina V.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sin embargo, como en las células necróticas la FS se encuentra también en la cara externa (Krysko y col., 2004), este método se puede utilizar para diferenciar únicamente las células apoptóticas y las necróticas de las células viables, donde la FS se encuentra en la cara interna. Por otra parte, la integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al tñirlas con yoduro de propidio (IP), éste puede acceder al núcleo y unirse al DNA. Por tanto, si la Anexina V conjugada con un fluorocromo se utiliza de forma conjunta con el IP, se pueden distinguir las células apoptóticas de las necróticas y de las viables (Vermes y col., 1995). Así, las células viables son negativas para ambas tinciones, las células apoptóticas son positivas a la Anexina V y negativas al IP, y por último, las células necróticas son positivas a ambas tinciones.

En este trabajo de investigación utilizamos el ensayo Anexina V/IP para determinar el porcentaje

de células HL-60 apoptóticas tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA (**Artículo 1**).

2.5.2.1. Procedimiento del método

Para la detección y cuantificación de las células apoptóticas se utilizó el kit Vibrant Apoptosis Assay Kit # 2. Tras el tratamiento de las células HL-60 (5×10^5 células/pocillo) con la NPIP (5-20 mM) o la NDBA (0,5-2,5 mM) durante 18 y 24 h en placas microtituladoras de 6 pocillos, se resuspendieron $1,5 \times 10^5$ células en 100 μ l de tampón de unión a anexina ($1 \times$ (10 mM HEPES, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,50 mM CaCl_2) y se incubaron con 5 μ l de Alexa Fluor 488 annexin V y 10 μ l de IP (10 μ g/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente (**Figura 41**). Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con 400 μ l de tampón de unión a anexina $1 \times$ y se conservaron en hielo. Se analizaron 10.000 células por muestra, utilizando el citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton & Dickinson) y el programa Cell-Quest del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. En la **Figura 42** se muestran algunos de los diagramas de puntos de los resultados obtenidos.



Figura 41. Ensayo Anexina V/IP.

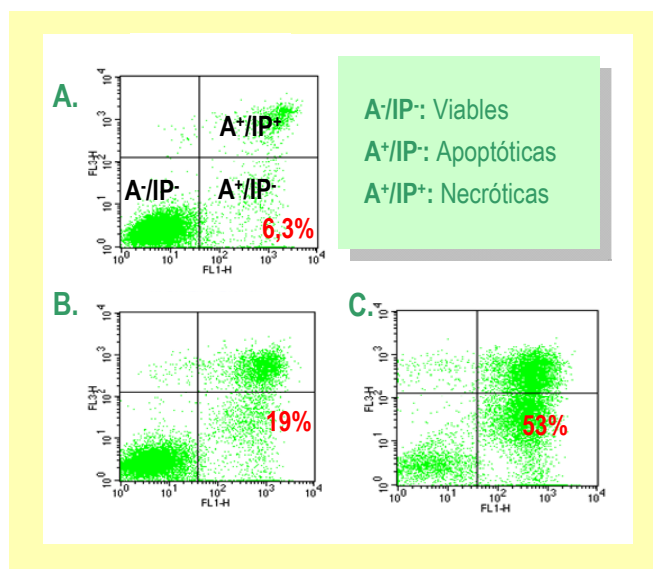


Figura 42. Diagramas de puntos de las células HL-60 control (A) y tratadas con la NPIP a 20 mM durante 18 h (B) y 24 h (C), cuantificadas mediante el ensayo Anexina V/IP.

2.5.3. Cuantificación de apoptosis mediante el método TUNEL

El método de marcaje de los extremos 3'-OH libres del DNA (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling, TUNEL) está considerado como el más sensible y específico para la cuantificación de las células apoptóticas, y su diferenciación con las necróticas. Este método se basa en la detección de la degradación del DNA, biomarcador del proceso de apoptosis (Gorczyca y col., 1993). Una vez fijadas y permeabilizadas las células, se incuban con la mezcla TUNEL que contiene la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) y los nucleótidos modificados (dUTP-fluoresceína). Durante este período de tiempo, la enzima TdT cataliza la incorporación de los dUTP modificados a los extremos 3'-OH libres del DNA celular (**Figura 43**). La fluorescencia incorporada en los lugares dañados del DNA se cuantifica utilizando un citómetro de flujo.

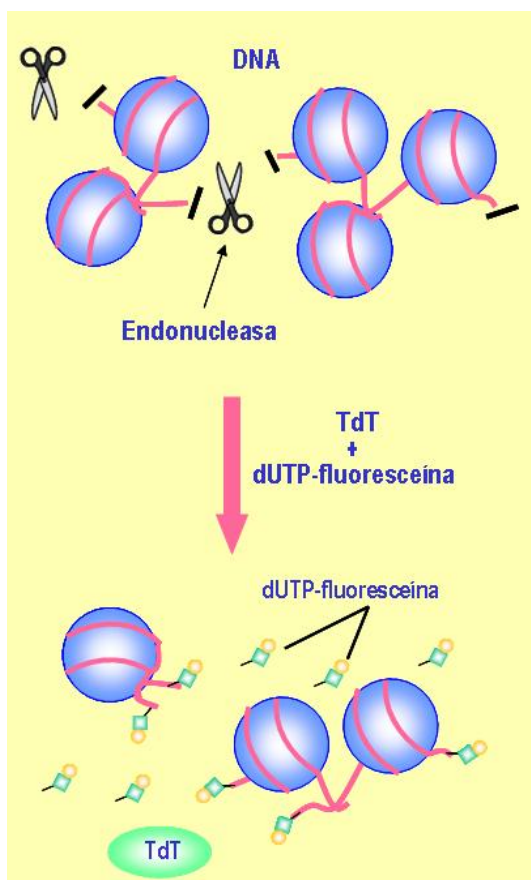


Figura 43. Incorporación de los nucleótidos dUTP-fluoresceína a los extremos 3'-OH libres del DNA por la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT).

En este trabajo de investigación utilizamos el método TUNEL para determinar el porcentaje de células HL-60 y HepG2 apoptóticas tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA, así como para evaluar la actividad de las caspasas (**Artículos 1 y 2**). También, se utilizó para determinar el papel de las EROs en el proceso apoptótico (**Artículos 1 y 2**) y finalmente, para evaluar si la vitamina C, el DADS y el DPDS inhibían la apoptosis inducida por ambas N-nitrosaminas (**Artículo 5**).

2.5.3.1. Procedimiento del método

La muerte celular por apoptosis se cuantificó empleando el Kit In Situ Cell Death Detection, Fluorescein. Las células (3×10^6 /pocillo) se trataron con la NPIP (5-20 mM en HL-60; 10-45 mM en HepG2) o la NDBA (0,5-2,5 mM en HL-60; 1-3,5 mM en HepG2) durante 24, 48 y 72 h en placas microtituladoras de 6 pocillos (**Figura 44**). Tras la incubación, las células se lavaron con tampón fosfato



Figura 44. Método TUNEL.

salino (PBS) y se fijaron en un 2% de paraformaldehído durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron con una solución de permeabilización (0,1% Triton X-100 en 0,1% de citrato de sodio) durante dos minutos en hielo. Posteriormente, las células se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL [50 µl de la solución de la enzima (TdT) y 450 µl de la solución de marcaje (dUTP-fluoresceína)] durante una hora a 37°C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, y se mantuvieron en refrigeración. Se analizaron 10.000 células por muestra y para ello se utilizó el citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton & Dickinson) y el programa Cell-Quest del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. En la **Figura 45** se muestran algunos de los diagramas de puntos de los resultados obtenidos.

Para determinar el papel de las EROs en el proceso apoptótico, las células se preincubaron con 20 mM del antioxidante NAC durante 1 h y, posteriormente se añadieron las N-nitrosaminas. En los tratamientos combinados con los compuestos quimiopreventivos, las células se preincubaron con vitamina C (5-50 µM) o DADS (1-5 µM) o DPDS (1-5 µM) durante 24 h. Transcurrido este periodo de incubación, las células se trataron simultáneamente con 20 mM (HL-60) y 25 mM (HepG2) de NPIP o con 2 mM (HL-60) y 2,5 mM (HepG2) de NDBA y las concentraciones correspondientes de vitamina C, DADS y DPDS durante 72 h.

2.5.4. Medida de la actividad de las caspasas

Las caspasas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una gran diversidad de estímulos (Thornberry y Lazebnik, 1998). Para estudiar su papel en la apoptosis, se han desarrollado inhibidores peptídicos sintéticos de diversa especificidad (**Figura 46**), obtenidos a partir de la secuencia de corte presente en los sustratos de las diferentes caspasas (Jordán y col., 2000).

En este trabajo de investigación, utilizamos los inhibidores de caspasas irreversibles y específicos de la caspasa-3 (Z-DEVD-FMK), de la caspasa-6 (Z-VEID-FMK), de la caspasa-8 (Z-IETD-FMK) y de la caspasa-9 (Z-LEHD-FMK), para determinar si estas enzimas estaban implicadas en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las células HepG2 (**Artículo 2**).

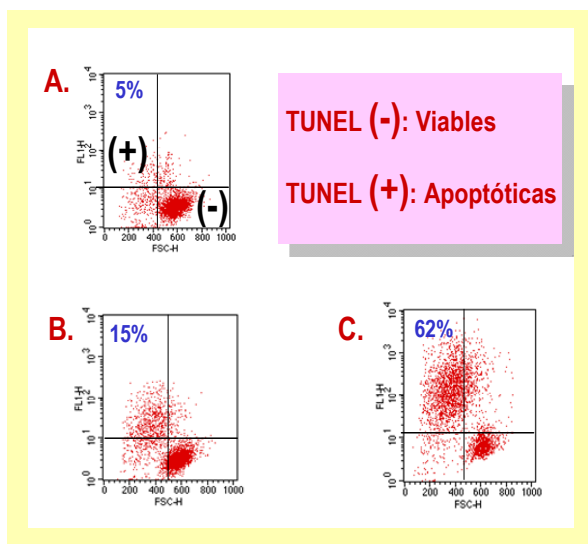


Figura 45. Diagramas de puntos de las células HL-60 control (A) y tratadas con NPIP a 5 mM (B) y 20 mM (C) durante 48 h, cuantificadas mediante el método TUNEL.

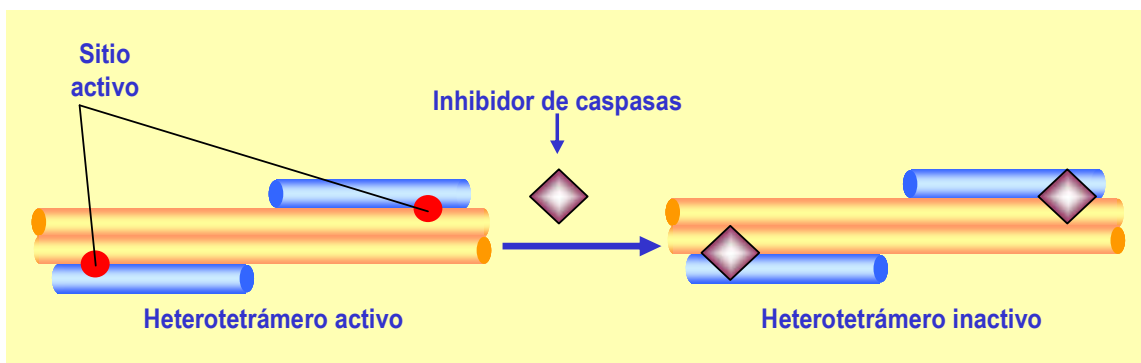


Figura 46. Inhibición de la actividad de las caspasas.

2.5.4.1. Procedimiento del método

Las células HepG2 (3×10^6 /pocillo) se incubaron con el inhibidor de caspasas correspondiente ($100 \mu\text{M}$) y las N-nitrosaminas (10 mM de la NPIP ó $2,5 \text{ mM}$ de la NDBA durante 72 horas) en placas microtituladoras de 6 pocillos (Figura 47). Posteriormente se recogieron las células y se procedió a la determinación del número de células apoptóticas mediante el método TUNEL (Capítulo II, apartado 2.5.3.1). Se analizaron 10.000 células por muestra, utilizando el citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton & Dickinson) y el programa Cell-Quest del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. En la Figura 48 se muestran algunos de los diagramas de puntos de los resultados obtenidos.

2.5.5. Análisis de la PARP mediante Western Blot

La enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) es una proteína nuclear de 116 kDa que se activa en respuesta a daños en el DNA generados por diferentes agentes genotóxicos. Esta enzima tiene como función el bloqueo de la replicación y transcripción del material genético dañado y a su vez permite la unión de las enzimas de reparación (Chatterjee y col. 1999; Oei y col., 2005). Sin embargo, durante el proceso apoptótico, la caspasa-3 corta específicamente la PARP en dos fragmentos de 85 y 24 kDa, inactivándola (Figura 49). Esta ruptura proteolítica se considera actualmente un



Figura 47. Medida de la actividad de las caspasas.

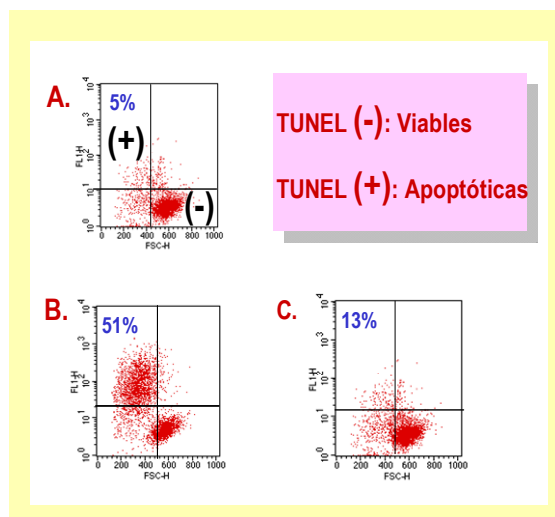


Figura 48. Diagramas de puntos de las células HepG2 control (A) y tratadas con NDBA a 2,5 mM durante 72 h en ausencia (B) o presencia (C) del inhibidor de la caspasa-3, cuantificadas mediante el método TUNEL.

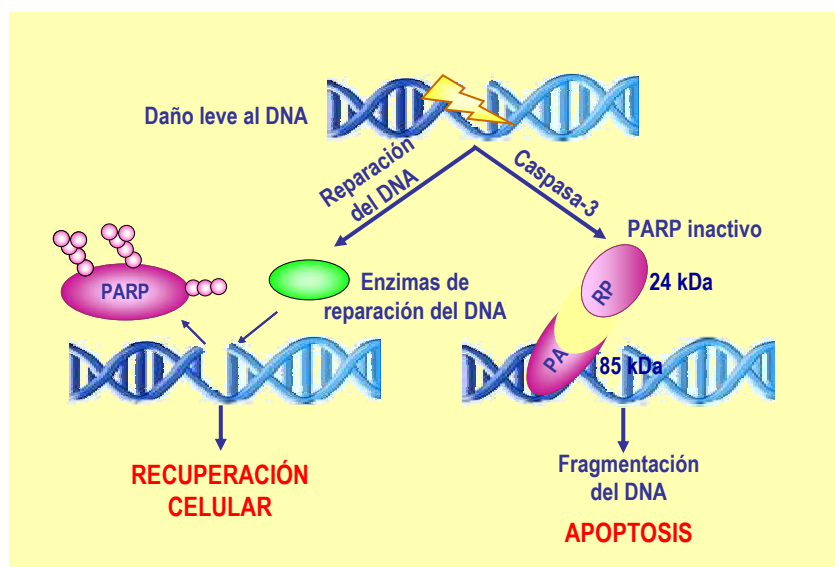


Figura 49. Actividad de la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP).

MATERIAL Y MÉTODOS

marcador de apoptosis dependiente de caspasas (Chiarugi, 2002).

En este trabajo de investigación empleamos la técnica del Western blot para detectar la ruptura de la PARP en las células HL-60 y HepG2 tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA (**Artículos 1 y 2**).

2.5.5.1. Procedimiento del método

2.5.5.1.1. Obtención de los extractos proteicos

Tras el tratamiento de las células (20×10^6) con la NPIP (5-20 mM en HL-60; 10-45 mM en HepG2) o con la NDBA (0,5-2,5 mM en HL-60; 1-3,5 mM en HepG2) se obtuvieron los extractos proteicos correspondientes (Kit de extracción proteica NucleoBuster) y se determinó la concentración de proteína utilizando el Kit Non Interfering Protein Assay. Posteriormente, empleamos 30 μ g de proteína de cada muestra para su análisis por Western Blot (**Figura 50 A**).

2.5.5.1.2. Electroforesis y transferencia de proteínas

Las muestras proteicas obtenidas se resuspendieron en un tampón que contenía Tris-HCl (63 mM), pH 6,8, glicerol (10%), 2-mercaptoetanol (1%), dodecil sulfato sódico (SDS) (2%) y azul de bromofenol (0,025%) y se llevaron a ebullición durante 15 minutos. A continuación, las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en un sistema discontinuo. La primera fase de la electroforesis se realizó a 69 V durante 1 h y la segunda fase a 100 V durante 30 min a temperatura ambiente. Terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 119 V durante 1 hora y 15 minutos en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,3). Por último, para comprobar que la cantidad de proteína era igual en todas las muestras, así como la integridad de la transferencia, utilizamos el Kit Blot-Fast Stain (**Figura 50 B**).

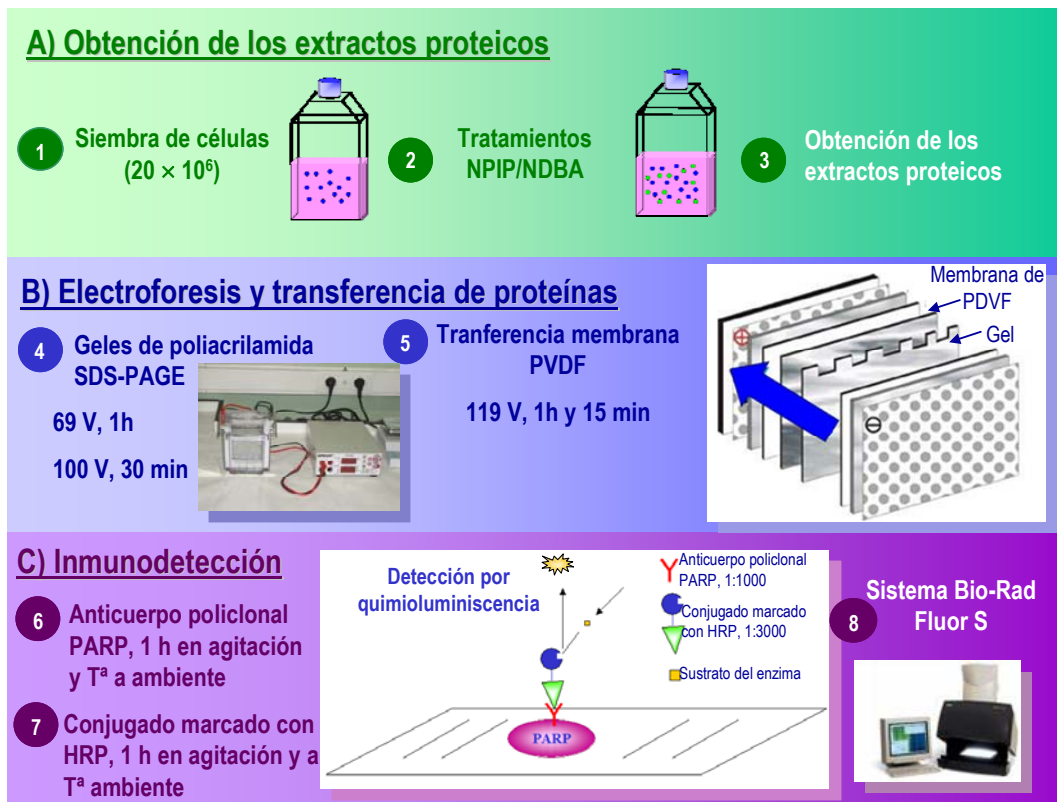


Figura 50. Análisis de la PARP mediante Western Blot.

2.5.5.1.3. *Inmunodetección*

Una vez realizada la transferencia, la membrana se mantuvo durante toda la noche en una solución de bloqueo (PBS, Tween 0,2% y leche desnatada en polvo 10%). A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal poli(ADP-ribosa)polimerasa, a la dilución 1:1000 durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Este anticuerpo reconoce tanto la banda de 116 kDa como la de 85 KDa que se genera al romper la caspasa-3 la PARP (Figura 49). Posteriormente, se lavó la membrana tres veces en la solución de bloqueo y se incubó con un conjugado anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra y marcadas con peroxidasa de rábano (HRP), a la dilución 1:3000 durante 1 h, en agitación y a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, la membrana se lavó tres veces en la solución de bloqueo y tres veces más con PBS-Tween 0,2%. Por último, la detección de las proteínas se realizó utilizando el sustrato Supersignal y el analizador de quimioluminiscencia Bio-Rad Fluor S. Las valoraciones densitométricas de cada proteína se

determinaron con el software Bio-Rad Quantity One (Figura 50 C).

2.6. Medida de la producción intracelular de las EROs: Método del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA)

El H₂DCFDA es una sonda que se utiliza para detectar la actividad oxidativa intracelular. Inicialmente, el H₂DCFDA se hidroliza por esterasas intracelulares a diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF). La H₂DCF no puede atravesar la membrana celular quedando atrapada en el interior de la célula, siendo rápidamente oxidada a dihidrofluoresceína (DCF), compuesto de alta fluorescencia, en presencia de las EROs. La intensidad resultante es proporcional a la concentración intracelular de las EROs (LeBel y col., 1992; Zhu y col., 1994) (Figura 51).

El H₂DCFDA se utilizó para detectar la producción de las EROs inducida por la NPI y la NDBA en las células HL-60 y HepG2 (Artículos 1 y 2). Asimismo, también se utilizó para evaluar si la NAC, la vitamina C, el DADS y el DPDS tenían

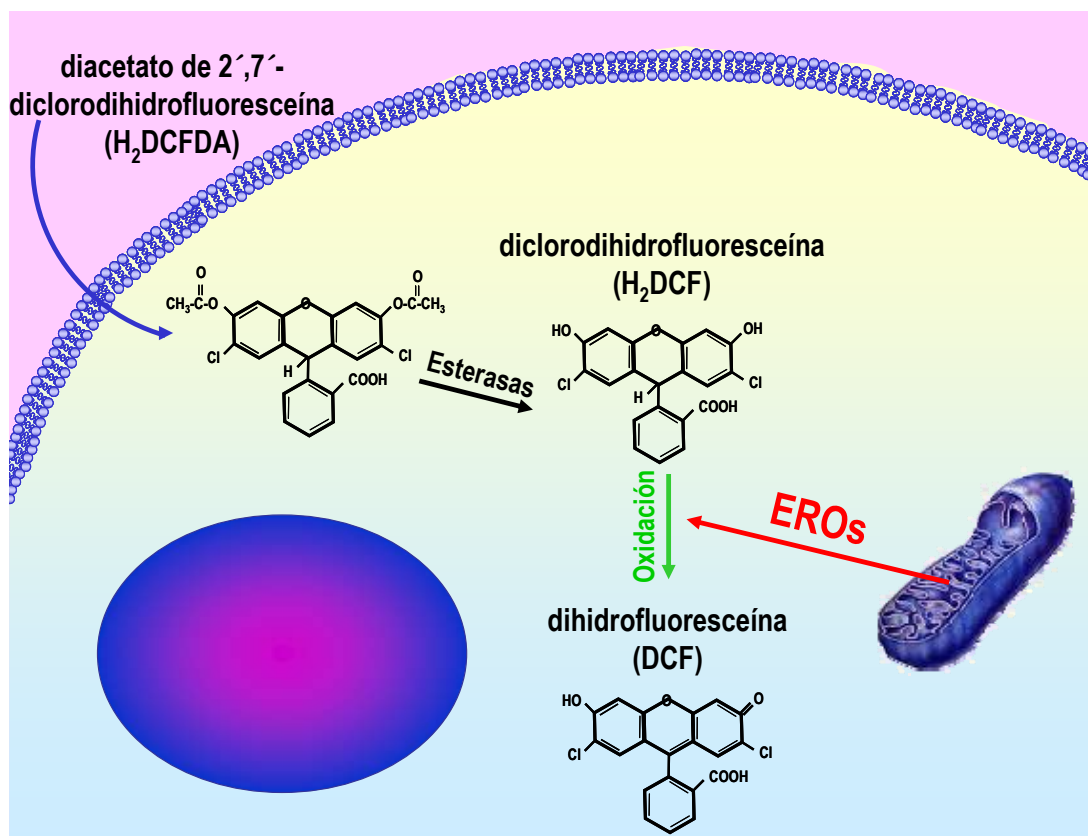


Figura 51. Hidrólisis del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por esterasas intracelulares a diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), y su posterior oxidación a dihidrofluoresceína (DCF) en presencia de las EROs.

capacidad de atrapar las EROs producidas tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA (**Artículos 1, 2 y 5**).

2.6.1. Procedimiento del método

En estos ensayos, las células HL-60 y HepG2 ($2,5 \times 10^5$ células/pocillo) se cultivaron en placas microtituladoras de 24 pocillos con medio de cultivo sin fenol rojo ni suero fetal bovino. A continuación, las células se trataron con la NPIP (5-20 mM en HL-60; 10-45 mM en HepG2) o la NDBA (0,5-2,5 mM en HL-60; 1-3,5 mM en HepG2) a diferentes tiempos de incubación (15 min-24 h) (**Figura 52**). Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 30 min con el H₂DCFDA (10 mM) a 37°C y se mantuvieron en hielo y en la oscuridad hasta su análisis. Se analizaron 10.000 células por muestra y para ello se utilizó el citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton & Dickinson) y el programa Cell-Quest del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. En la **Figura 53** se muestran algunos de los diagramas de puntos de los resultados obtenidos.

Para evaluar la capacidad de la NAC (20 mM), la vitamina C (5-50 μM), el DADS (1-5 μM) y el DPDS (1-5 μM) de atrapar las EROs inducidas por las N-nitrosaminas, las células se preincubaron durante 1 h con estos compuestos y posteriormente se trataron con las N-nitrosaminas.

2.7. Microsomas humanos

Debido a que las células HepG2 presentan niveles de expresión muy bajos de la isoforma enzimática humana CYP 1A1, en este trabajo de investigación utilizamos microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresan esta isoforma implicada en el metabolismo de la NDBA (**Artículos 3, 4, y Capítulo II, apartado 4.3 y 5.1**). Además, en un trabajo previo realizado por nuestro equipo de investigación (Arranz 2009, Tesis Doctoral) se evaluó la actividad de las isoformas enzimáticas humanas CYP 2E1 y CYP 2A6 que participan en el metabolismo de la NPIP.



Figura 52. Método del diacetato de 2',7'-dclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA).

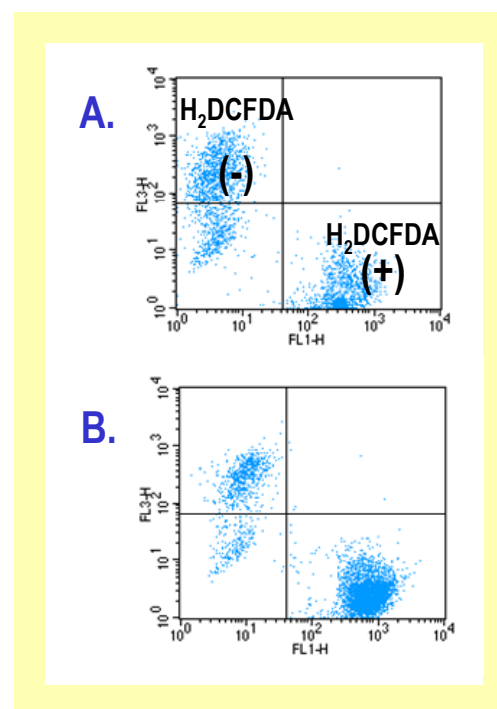


Figura 53. Diagramas de puntos de las células HepG2 control (A) y tratadas con la NPIP a 25 mM durante 1 h (B), cuantificadas mediante el método del diacetato de 2',7'-dclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA).

2.7.1. Procedimiento del método de la O-deetilación de la 7-etoxiresorufina

La medida de la actividad del CYP 1A1 se realizó por el método de la O-deetilación de la 7-etoxiresorufina a resorufina (Burke y col., 1985) (Figura 54). La mezcla de reacción (2ml) que contenía: 2,5 pmol de CYP 1A1, 1,3 mM NADP+, 3,3 mM glucosa-6-fosfato, 0,4 U/ml glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 3,3 mM cloruro magnésico, y 1 mg/ml de la 7-etoxiresorufina en 100 mM de fosfato potásico (pH 7,4), y diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos quimiopreventivos a evaluar, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, la actividad del CYP 1A1 se determinó por fluorescencia ($\lambda = 550$ nm de excitación y $\lambda = 586$ nm de emisión). La cantidad de resorufina formada se calculó a partir de una curva patrón que contenía cantidades conocidas de este compuesto. La α -naftoflavona (Burke y col., 1985) se

utilizó como un inhibidor específico de la actividad enzimática del CYP 1A1. Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad enzimática (% actividad residual) = $A_1/A_0 \times 100$, donde A_1 es la fluorescencia de las muestras que contienen los compuestos quimiopreventivos y A_0 es la fluorescencia del control negativo (mezcla de reacción).

2.8. Análisis estadístico

Los resultados de esta Tesis Doctoral representan la media y el correspondiente error estándar de tres ensayos independientes (cada uno de ellos por triplicado). La comparación estadística se realizó con la t- de Student y se consideraron diferencias significativas cuando sus medias mostraron una $p \leq 0,05$. Para el análisis de los datos se empleó el software Statgraphics Plus 5.0.

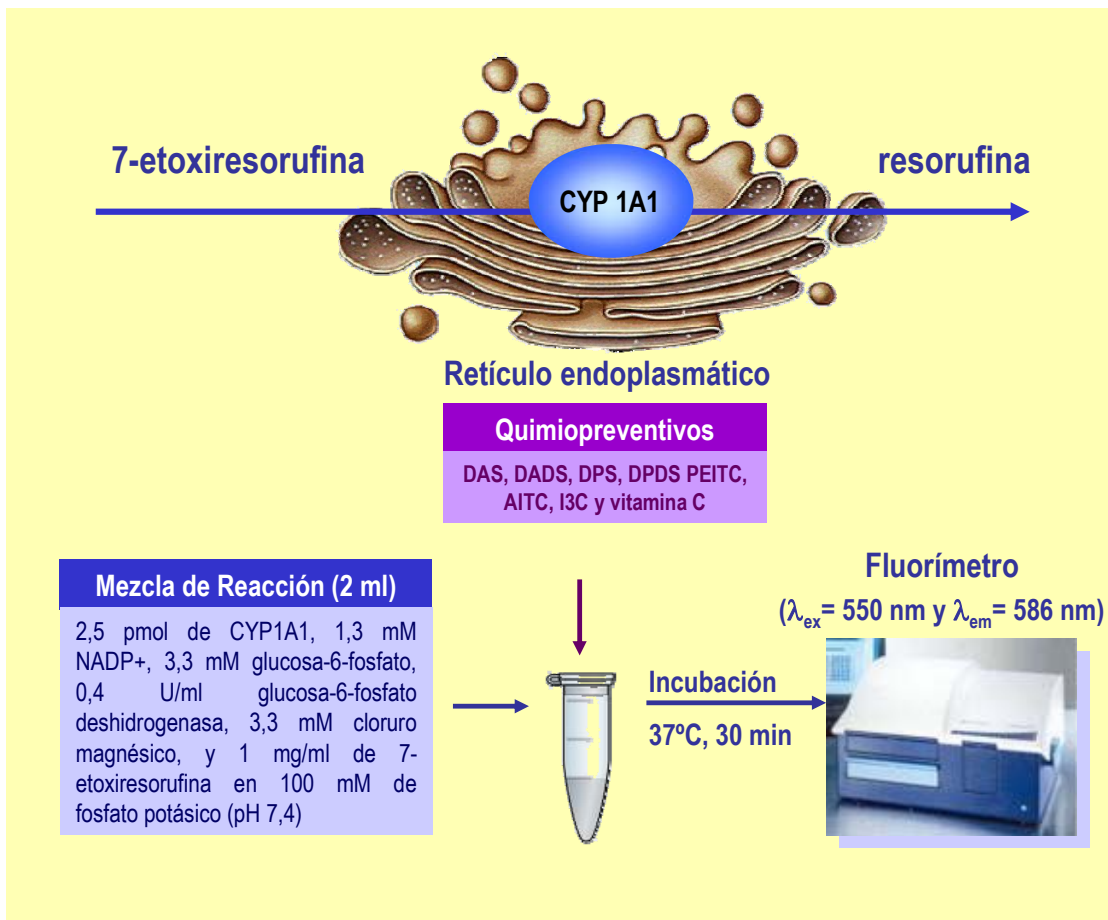


Figura 54. Método de la O-deetilación de la 7-etoxiresorufina.

3. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Esta tesis está basada en los siguientes artículos originales:

1. **García A**, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J y Haza AI. 2008. Induction of apoptosis and reactive oxygen species production by *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosodibutylamine in human leukemia cells. *J Appl Toxicol* 28, 455-465.
2. **García A**, Morales P, Rafter J y Haza AI. 2009. *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosodibutylamine induce apoptosis in HepG2 cells via the caspase dependent pathway. *Cell Biol Int* 33, 1280-1286.
3. **García A**, Haza AI, Arranz N, Delgado ME, Rafter J y Morales P. 2008. Organosulfur compounds alone or in combination with vitamin C protect towards *N*-nitrosopiperidine- and *N*-nitrosodibutylamine-induced oxidative DNA damage in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 173, 9-18.
4. **García A**, Haza AI, Arranz N, Rafter J y Morales P. 2008. Protective effects of isothiocyanates alone or in combination with vitamin C towards *N*-nitrosodibutylamine or *N*-nitrosopiperidine-induced oxidative DNA damage in single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *J Appl Toxicol* 28, 196-204.
5. **García A**, Morales P, Arranz N, Delgado ME, Rafter J y Haza AI. 2009. Antiapoptotic effects of dietary antioxidants towards *N*-nitrosopiperidine and *N*-nitrosodibutylamine-induced apoptosis in HL-60 and HepG2 cells. *J App Toxicol* 29, 403-413.

4. OTROS RESULTADOS

4.1. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA y oxidación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA

La **Figura 55** muestra la ruptura de las cadenas del DNA y la oxidación de las bases púricas inducida por la NPIP y la NDBA en las células HepG2, utilizando el ensayo Cometa. Nuestros resultados indican que la oxidación de las purinas en las células HepG2 aumentó al incrementarse la concentración de ambas N-nitrosaminas en presencia de la enzima Fpg. Además, el OTM hallado en las células expuestas a la NPIP o a la NDBA e incubadas con la enzima Fpg fue superior al de las células no expuestas a la Fpg. El OTM de las células HepG2 tratadas con NPIP (0,9-44 mM) en presencia de la enzima Fpg fue de $1,45 \pm 0,4$ y de $4 \pm 0,46$ UA, respectivamente. La oxidación de las purinas en las células expuestas a la NDBA e incubadas con la enzima Fpg se observó a concentraciones de 0,3 a 3 mM (OTM $1,34 \pm 0,8$ y $1,84 \pm 0,64$ UA, respectivamente).

4.2. Efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA

En los tratamientos simultáneos de N-nitrosaminas y vitamina C, las células HepG2 se incubaron siempre en presencia de la enzima Fpg. La **Figura 56** muestra el efecto protector de la vitamina C frente a la oxidación de las purinas inducida por la NPIP (44 mM) o por la NDBA (3 mM). A las concentraciones de 1 y 5 μ M, la vitamina C mostró un débil efecto protector frente a la formación de las bases púricas oxidadas inducidas por la NPIP (3-55%) y por la NDBA (12-14%). Sin embargo, la concentración más alta de vitamina C (10 μ M) redujo drásticamente la oxidación de las purinas inducidas por la NPIP y por la NDBA (80 y 94%, respectivamente).

4.3. Inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 por la vitamina C

La **Figura 57** muestra el efecto de la vitamina C en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-

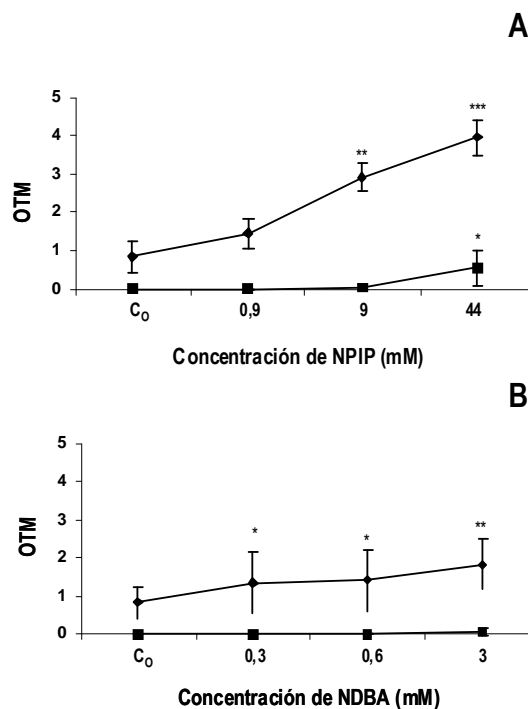


Figura 55. Ruptura de las cadenas del DNA y oxidación de las purinas inducida por la NPIP (A) y la NDBA (B) en células de hepatoma humano (HepG2) incubadas en ausencia (■) o presencia (◆) de la enzima Fpg. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (C₀) *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$.

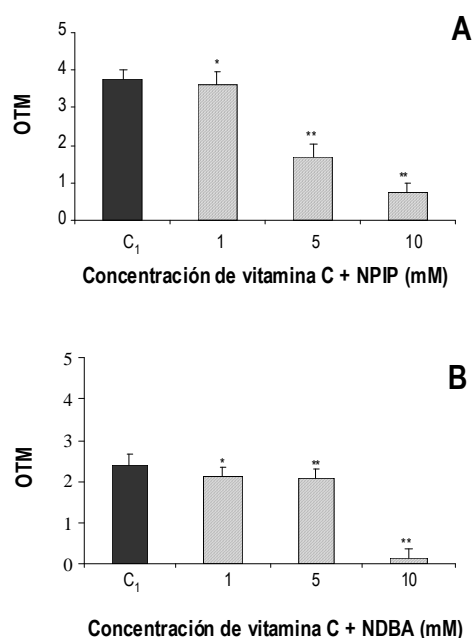


Figura 56. Efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo inducido por la NPIP (A) y la NDBA (B) en células de hepatoma humano (HepG2). C₁, ■ células HepG2 tratadas con N-nitrosaminas en presencia de la enzima Fpg. ▨ Células HepG2 tratadas con N-nitrosaminas y vitamina C en presencia de la Fpg. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$.

deetilasa (CYP 1A1). Nuestros resultados mostraron que la actividad del CYP 1A1 se redujo débilmente por la vitamina C a todas las concentraciones analizadas (1, 5 y 10 μM , 15, 17 y 19%; respectivamente).

Los resultados descritos en los apartados 4.1., 4.2. y 4.3. se encuentran publicados en Arranz N, Haza AI, García A, Rafter J y Morales P. 2007. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. Toxicol In Vitro 21, 1311-1317.

4.4. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, oxidación de las pirimidinas y alquilación de las purinas) inducido por la NPIP y la NDBA

La ruptura de las cadenas del DNA, así como la oxidación de las bases pirimidínicas y la alquilación de las bases púricas inducida por la NPIP y la NDBA en las células HepG2, y utilizando el ensayo Cometa, se muestra en la Figura 58. En ausencia de las enzimas Endo III o AlKa no se observó una ruptura de las cadenas del DNA significativa tras el tratamiento con ambas N-nitrosaminas. Sin embargo, la oxidación de las pirimidinas y la alquilación de las purinas en las células HepG2 aumentó al incrementarse la concentración de la NPIP o de la NDBA en presencia de las enzimas Endo III y AlKa, respectivamente. Además, tanto la NPIP (44 mM) como la NDBA (3 mM) resultaron más alquilativas (OTM $20,48 \pm 3,24$ y $15,75 \pm 1,37$ UA, respectivamente) que oxidativas (OTM $7,68 \pm 2,23$ y $2,30 \pm 0,65$ UA, respectivamente).

Estos resultados se encuentran publicados en García A, Haza AI, Arranz N, Delgado E y Morales P. 2008. Efecto protector de compuestos organosulfurados, isotiocianatos y vitamina C frente al daño oxidativo y alquilativo al DNA inducido por N-nitrosaminas. Alimentaria 391, 104-105.

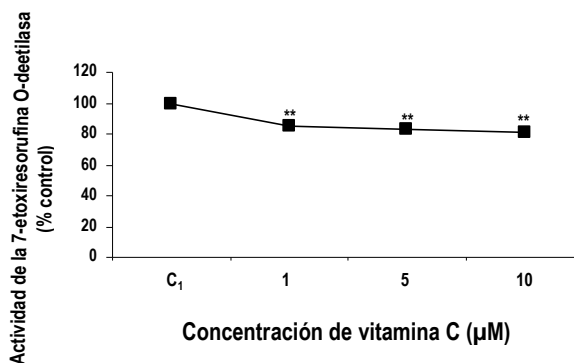


Figura 57. Efecto de la vitamina C en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ** $p \leq 0,01$.

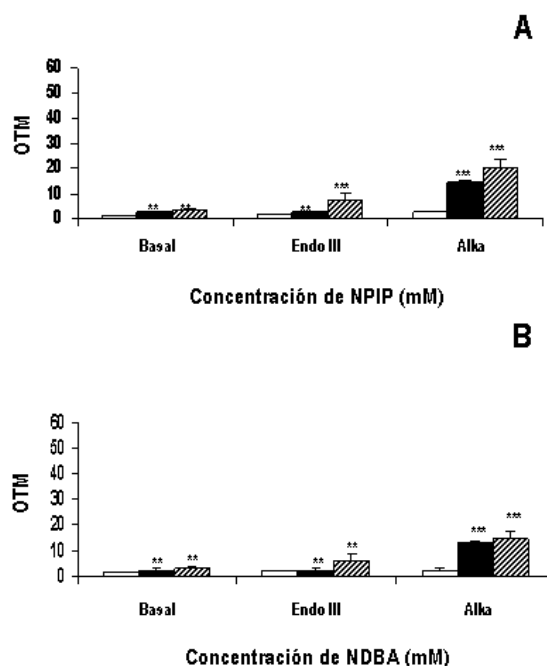


Figura 58. Ruptura de las cadenas del DNA, oxidación de las pirimidinas y alquilación de las purinas inducida por la (A) NPIP, ■ 9 mM, ▨ 44 mM y (B) NDBA, ■ 0,3 mM, ▨ 3 mM en células de hepatoma humano (HepG2). □ Células HepG2 sin tratar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$.

5. OTROS RESULTADOS NO PUBLICADOS

5. OTROS RESULTADOS NO PUBLICADOS

5.1. Inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 por el AITC

El efecto del AITC en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1) se muestra en la **Figura 59**. Los resultados obtenidos indican que la actividad del CYP 1A1 se redujo significativamente por la acción del AITC a todas las concentraciones analizadas (0,1-1 μ M), mostrando la máxima inhibición a la menor concentración (0,1 μ M, 58%).

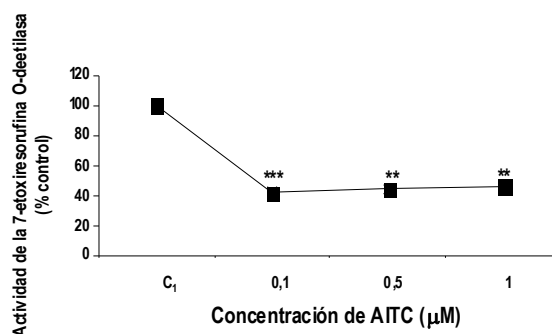


Figura 59. Efecto del AITC en la actividad de la 7-etoxiresorufina O-deetilasa (CYP 1A1). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control *** $p \leq 0,001$ y ** $p \leq 0,01$.

5.2. Efecto de la NPIP y de la NDBA en la viabilidad de las células HepG2

El efecto de la NPIP y de la NDBA en la viabilidad de las células HepG2 se determinó utilizando el método colorimétrico MTT (**Figura 60**). El rango de concentraciones empleadas fue de 1 a

45 mM durante 6, 18 y 24 h. Nuestros resultados mostraron que la incubación de las células durante 6 y 18 h con la NPIP no inhibía significativamente la viabilidad celular (1 mM, 91-90%; 45 mM, 86-82%, se

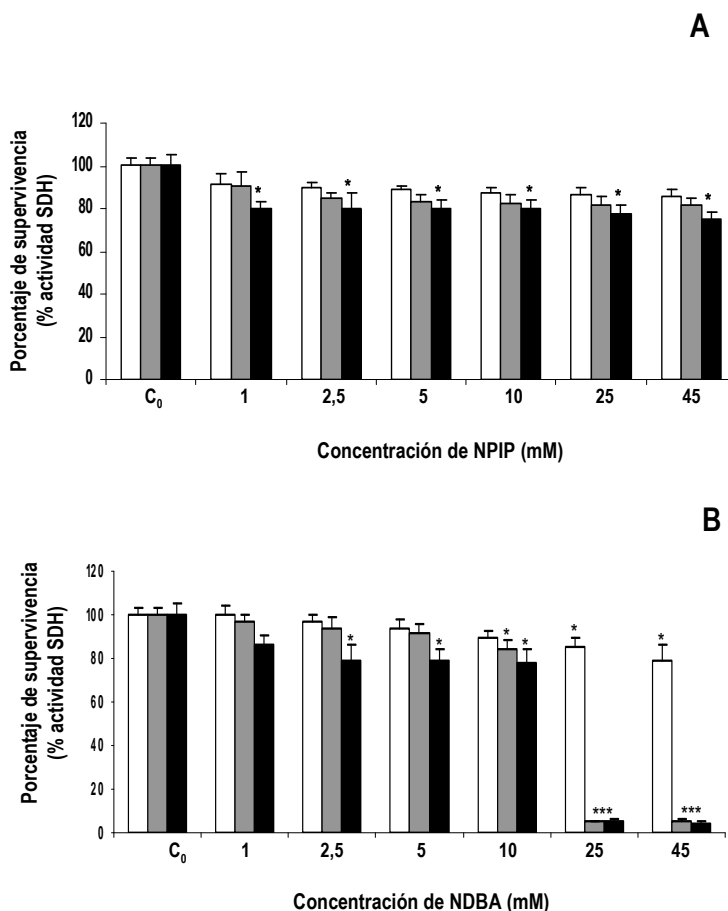


Figura 60. Efecto de la NPIP (A) y de la NDBA (B) en la viabilidad de las células HepG2 empleando el método MTT. Las células se cultivaron con diferentes concentraciones de las N-nitrosaminas durante 6 (□), 18 (■) y 24 (■) h. C₀, células HepG2 sin tratar. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control: * $p \leq 0,05$ y *** $p \leq 0,001$.

supervivencia celular, respectivamente). No obstante, al aumentar el período de incubación a 24 h, todas las concentraciones analizadas de NPIP (1-45 mM) mostraron una ligera inhibición de la viabilidad de las células HepG2 (80-75% de supervivencia celular, respectivamente) (**Figura 60 A**).

Sin embargo, el tratamiento de las células HepG2 con 25 y 45 mM de NDBA (**Figura 60 B**) durante 18 h (6 y 5% de supervivencia celular, respectivamente) y 24 h (5 y 4% de supervivencia celular, respectivamente) de incubación redujo la viabilidad drásticamente.

5.3. Análisis de los cambios morfológicos inducidos por la NPIP y la NDBA en las células HepG2

Con el objeto de determinar si la inhibición de la viabilidad celular por las N-nitrosaminas era debida a la inducción de apoptosis, estudiamos la morfología celular. Para ello, las células HepG2 se trataron con la NPIP (10-45 mM) o la NDBA (1-3,5

mM) a diferentes tiempos de incubación (3-72 h) y, a continuación, las características morfológicas de apoptosis, como la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos, se visualizaron al microscopio de fluorescencia, utilizando el colorante vital naranja de acridina.

Como se observa en la **Tabla 11** el porcentaje de células HepG2 apoptóticas alcanzó aproximadamente un 30% tras el tratamiento con 10 y 25 mM de NPIP a las 24, 48 y 72 h de incubación. La concentración más elevada de NPIP (45 mM) indujo un 48% de células apoptóticas tras 24 h de tratamiento, aumentando hasta un 91% a las 72 h. El porcentaje de células apoptóticas obtenido tras el tratamiento con la NDBA aumentó con el incremento de la concentración y el tiempo de incubación. Así, tras 3 h de incubación a la concentración de 3,5 mM de NDBA, se alcanzó un 52% de células apoptóticas y a las 18 h observamos la formación de múltiples cuerpos apoptóticos (81% de células apoptóticas).

Tabla 11. Efecto de la NPIP y de la NDBA en la apoptosis de las células HepG2 empleando el colorante vital naranja de acridina.

	% células apoptóticas				% células apoptóticas				
	Concentración de NPIP (mM)				Concentración de NDBA (mM)				
Tratamientos (h)	Control ^b	10	25	45	Tratamientos (h)	Control ^b	1	2,5	3,5
24	10 ± 2,2	27 ± 3,4 ^a	27 ± 5,2 ^a	48 ± 2,9 ^a	3	6 ± 1,7	26 ± 3,4 ^a	47 ± 2,9 ^a	52 ± 6,2 ^a
48	15 ± 2,8	28 ± 4,2 ^a	32 ± 6,2 ^a	84 ± 12,4 ^a	6	8 ± 1,9	27 ± 6,1 ^a	53 ± 3,3 ^a	72 ± 7,8 ^a
72	17 ± 2,2	30 ± 2,5 ^a	36 ± 8,5 ^a	91 ± 9,7 ^a	18	9 ± 1,8	27 ± 3,1 ^a	57 ± 2,9 ^a	81 ± 8,2 ^a

^a Indica diferencias significativas con respecto al control $p \leq 0,001$.

^b Células HepG2 sin tratar con N-nitrosaminas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Daño al DNA (ruptura de las cadenas del DNA, daño oxidativo y alquilativo) inducido por la NPIP y la NDBA

Las N-nitrosaminas constituyen un grupo de compuestos citotóxicos, mutagénicos y genotóxicos indirectos, es decir, necesitan un sistema de activación metabólica para poder desarrollar su actividad tóxica, mutagénica y cancerígena a nivel celular. Este proceso de biotransformación, llevado a cabo por las isoformas enzimáticas del CYP450, es preciso para generar metabolitos alquilantes electrofílicos que reaccionan con el DNA y con otras macromoléculas celulares. Sin embargo, la aparición de rupturas de la cadena doble y sencilla del DNA, sitios alcali lábiles así como sitios abásicos podrían ser resultado también de la acción de las EROs que aumentan durante el metabolismo celular de las N-nitrosaminas (Robichová y col., 2004 a; Beda y Nedospasov, 2007).

La mayor parte de los ensayos experimentales para identificar posibles compuestos mutagénicos y carcinogénicos en humanos estudian los efectos biológicos que resultan como consecuencia del daño al DNA (formación de micronúcleos, mutaciones, aberraciones cromosómicas, etc.). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado técnicas para la detección directa de daños al DNA, y uno de los avances más recientes es la electroforesis alcalina de células individuales o ensayo Cometa. Sasaki y col. (2000) confirman que este método de genotoxicidad es la herramienta más útil en la actualidad para prever la carcinogenicidad provocada por compuestos genotóxicos, tales como las N-nitrosaminas.

Para determinar si las N-nitrosaminas inducen daño al DNA, analizamos si la NPIP y la NDBA provocan la ruptura de las cadenas del DNA, un daño oxidativo (oxidación de purinas y pirimidinas) y un daño alquilativo (alquilación de purinas) al DNA en las células HepG2. La **Figura 55** y la **Figura 58 (Capítulo II, apartados 4.1 y 4.4)** muestran que en ausencia de las enzimas Fpg, Endo III o AIKa, la NPIP (0,9-44 mM) y la NDBA (0,3-3 mM) no

indujeron una ruptura de las cadenas del DNA significativa. Sin embargo, cuando las células HepG2 se trataron con las N-nitrosaminas y se incubaron en presencia de la enzima Fpg, Endo III o AIKa, se observó un elevado incremento en el daño oxidativo y alquilativo del DNA. Como era previsible, la NPIP (44 mM) y la NDBA (3 mM) indujeron un daño alquilativo en las bases púricas (OTM $20,48 \pm 3,24$ y $15,75 \pm 1,37$ UA, respectivamente) mayor que el daño oxidativo en las purinas ($4 \pm 0,46$ y $1,84 \pm 0,64$ UA, respectivamente) y en las pirimidinas (OTM $7,68 \pm 2,23$ y $2,30 \pm 0,65$ UA, respectivamente). Además, la NDBA resultó menos alquilativa que la NPIP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (Shu y Hollenberg, 1997), en los que se observa que los metabolitos electrofílicos resultantes de la bioactivación de la NDBA alquilan preferentemente proteínas en lugar del DNA, posiblemente debido al elevado peso molecular de estos intermediarios reactivos.

A pesar de que la NPIP y la NDBA son agentes predominantemente alquilantes, tal y como muestran nuestros resultados, en el presente trabajo de investigación hemos demostrado que la NPIP y la NDBA inducen también un daño oxidativo al DNA de las células HepG2, siendo ésta una de las aportaciones originales de esta tesis. Por tanto, la NPIP y la NDBA pueden inducir también un desequilibrio oxidativo en la célula, promoviendo la formación de las EROs, y contribuyendo al efecto genotóxico de las mismas. En cambio, otros reconocidos carcinógenos de la dieta, aunque dañan al DNA, no son capaces de inducir un daño oxidativo al mismo, como es el caso de ciertas aminas heterocíclicas. Wu y col. (2004) no detectaron ni la oxidación de las purinas ni de las pirimidinas en linfocitos humanos tratados con la PhIP o con la 3-amino-1-metil-5H-pirido(4,3-b)indol (Trp-P-2). Por tanto, el daño al DNA generado por la PhIP o la Trp-P-2 no estaría relacionado con la producción intracelular de las EROs. Además, nuestro estudio muestra que los niveles de las pirimidinas oxidadas fueron superiores a los de las purinas tras el tratamiento con la NPIP (OTM $7,68 \pm 2,23$ y $4 \pm 0,46$ UA, respectivamente) o con la NDBA (OTM $2,30 \pm 0,65$ y $1,84 \pm 0,64$ UA, respectivamente). Otros autores (Gábelová y col., 1998; Wang y col., 2006)

han observado también ligeras diferencias en la oxidación de las bases púricas y pirimidínicas del DNA tras el tratamiento con carcinógenos estructuralmente relacionados (el 4-aminobifenil y su análogo, el 2-aminobifenil; los HAPs). Esto puede ser debido a las diferencias en la activación metabólica de estos carcinógenos, dando lugar a daños en el DNA de distinta naturaleza o al menos en diferente grado.

En cuanto al rango de concentraciones evaluadas, observamos que la NDBA provocó el mayor daño oxidativo y alquilativo al DNA a la concentración de 3 mM, mientras que la NPIP necesitó dosis más elevadas (9-44 mM) (**Figura 55** y **Figura 58**). De acuerdo con nuestros resultados, Martelli y col. (1998) comprobaron que la NDBA ejercía su efecto genotóxico a concentraciones (1 mM) inferiores que la NPIP (1-3,2 mM), empleando la técnica de elución alcalina en hepatocitos humanos. Murdok y col. (2004), usando el ensayo Cometa, evaluaron el daño al DNA inducido por la NPIP en dos líneas celulares pancreáticas, la BRIN BD11 y la INS-1 y sus respectivas líneas transfectadas, la BRIN BD11h2E1 y la INS-1h2E1, las cuales expresan la isoforma enzimática CYP 2E1. Tras la incubación con la NPIP a dosis superiores a 10 mM observaron un aumento en el daño al DNA, en ambos tipos de líneas celulares.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Arranz y col., 2007 a; García y col., 2008) han demostrado que otras N-nitrosaminas presentes de forma habitual en los alimentos, como la NDMA y la NPYR, son también capaces de provocar daño oxidativo y alquilativo al DNA en las células HepG2. Así, la NDMA fue la N-nitrosamina que requirió la concentración más elevada (27 mM) para aumentar significativamente el daño oxidativo y alquilativo al DNA. Mientras que las dosis necesarias para inducir un daño oxidativo y alquilativo al DNA fueron significativamente menores en el caso de la NPYR (5 mM), de la NPIP (9 mM) y de la NDBA (3 mM). Otros autores han observado también que la NDMA necesita concentraciones muy elevadas para ser genotóxica en líneas celulares de hepatoma humano y en cultivos primarios de hepatocitos (Brambilla-Campart y col., 1989; Valentin-Severin y col., 2003). Uhl y col (2000) y Valentin Severin y col.

(2003) confirmaron que la NDMA fue el compuesto menos genotóxico de un panel de diez compuestos evaluados con el ensayo Cometa y en células HepG2. Estos resultados también corroboran estudios preliminares realizados por nuestro equipo de trabajo, en los que se evaluó la actividad mutagénica de las N-nitrosaminas (Ikken y col., 1998). La NDMA mostró una actividad mutagénica a concentraciones más elevadas que la NPYR, la NPIP y la NDBA.

6.2. Inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA

Numerosos estudios han demostrado que los compuestos carcinogénicos presentes en la dieta (compuestos N-nitroso, aminas heterocíclicas, HAPs) inducen apoptosis y, por esta razón están recibiendo mucho interés en los últimos años (Lin y col., 1999; Hashimoto y col., 2004; Landvik y col., 2007). En este sentido, la apoptosis inducida por estos carcinógenos parece tener un papel importante en la aparición y en el desarrollo del cáncer. Como ya hemos mencionado, la apoptosis en las células expuestas a compuestos carcinogénicos permite la eliminación de aquellas que tienen seriamente dañado su DNA. Sin embargo, también puede promover, en las células de alrededor con un daño menor, supervivencia y proliferación, dando lugar a una selección de células preneoplásicas con una tasa de mutaciones alta. La selección de estas células cancerosas va ser clave en las fases de promoción y progresión del cáncer (Holme y col., 2007).

Entre los compuestos N-nitroso más representativos se encuentran las N-nitrosaminas, carcinógenos presentes en los alimentos que poseen una elevada actividad genotóxica. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el efecto apoptótico de estos compuestos. La inducción de apoptosis por la NDMA y la NPYR ya ha sido demostrada en nuestro laboratorio (Arranz 2009, Tesis Doctoral). En este trabajo ampliamos los estudios a otras dos N-nitrosaminas, la NPIP y la NDBA, de las que no existe ninguna referencia al respecto. Las N-nitrosaminas inducen apoptosis a través de la producción de compuestos intermediarios reactivos durante su activación

metabólica por el CYP450 (Lin y col., 1999). En la especie humana, las diferentes isoformas enzimáticas del CYP450 están distribuidas por todo el organismo aunque el hígado es el órgano con una mayor expresión de estas enzimas. De esta forma, los reactivos intermediarios generados en el hígado se unen covalentemente al DNA de los hepatocitos, formando aductos del tipo O⁶ metilguanina (O⁶meG). Reh y col. (2000) observaron que existe una asociación significativa entre la exposición a la NPIP y a la NDBA y la presencia de O⁶meG en el DNA. Estos aductos inducen a su vez la expresión del gen *p53*, la activación de las proteasas y de las endonucleasas que catalizan la degradación del DNA en sitios internucleosomales, conduciendo a la muerte celular por apoptosis (Thompson, 1995; Roos y col., 2004). En el presente trabajo de investigación seleccionamos la línea celular HepG2 para evaluar la inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA. Las células HepG2 proceden de un carcinoma hepatocelular humano y poseen la capacidad de proliferar en cultivo adherente y de expresar las enzimas del CYP450. Por estas propiedades, han sido utilizadas en muchos estudios *in vitro* para caracterizar la apoptosis celular (Matsuda y col., 2002; Kim y col., 2006 b), y en concreto para determinar el efecto apoptótico de ciertos hepatocarcinógenos (Panaretakis y col., 2001; Chen y col., 2003).

Asimismo, los metabolitos reactivos generados durante la bioactivación de las N-nitrosaminas pueden alquilar también el DNA de otras células, como los leucocitos, cuando la sangre circula a través del hígado (Mirvish, 1995). Estudios epidemiológicos muestran que en ciertas ocupaciones laborales donde la presencia de las N-nitrosaminas es muy elevada (por ejemplo en la industria de la goma) el riesgo de padecer leucemia es alto (Spiegelhalter y Preussmann, 1983; Straif y col., 2000). Recientemente, se ha asociado la exposición a nitritos y a N-nitrosaminas procedentes de la dieta con el desarrollo de leucemia aguda en niños (Liu y col., 2006). Por tanto, en este estudio utilizamos también la línea derivada de leucemia humana HL-60. Las células HL-60 crecen en suspensión y se utilizan como modelo para estudiar la inducción de apoptosis (Holme y col., 1997) y, al

igual que las células HepG2, expresan las enzimas del metabolismo celular (Nagai y col., 2002).

Para la detección y cuantificación de la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las líneas celulares HL-60 y HepG2 hemos empleado una gran variedad de métodos analíticos. La apoptosis es un proceso dinámico en el cual la célula presenta distintas características morfológicas y bioquímicas dependiendo del momento en el que se encuentre. Esto permite disponer de diferentes “marcadores”, aunque no todos están presentes en las diferentes líneas celulares ni tampoco son exclusivos de este proceso. Por este motivo y para evitar errores en la detección de la apoptosis se recomienda la utilización de dos o más técnicas (Leite y col., 1999; Gómez-Lechón y col., 2002). Además, es necesario considerar otros aspectos como el momento en el que se producen estos cambios morfológicos o bioquímicos (tempranos o tardíos), su duración o el nivel de detección (célula individual o población celular). Así, en este trabajo hemos empleado los siguientes métodos: (i) Microscopía de fluorescencia utilizando colorantes vitales como el Hoechst 33342 más bromuro de etidio y el naranja de acridina para estudiar la condensación de la cromatina, (ii) Citometría de flujo para detectar la exposición de la fosfatidilserina (FS) (ensayo Anexina V/PI), la degradación del DNA (método TUNEL) y la actividad de las caspasas, y (iii) Western Blot para visualizar la ruptura de la enzima PARP.

Con el fin de seleccionar las concentraciones y los tiempos de incubación adecuados para estos estudios, evaluamos en primer lugar el efecto de las N-nitrosaminas en la viabilidad celular, utilizando el método MTT. Tras 72 h de incubación, la NPIP a concentraciones superiores a 2,5 mM redujo significativamente la viabilidad de las células HL-60 (5, 10 y 20 mM; 76%, 63% y 58% de supervivencia celular, respectivamente) (**Figura 1 A, artículo 1**). Todas las concentraciones analizadas de NPIP (1-45 mM) inhibieron ligeramente la viabilidad de las células HepG2 (80-75% de supervivencia celular, respectivamente) (**Figura 60, Capítulo II, apartado 5.2**). Como muestran las **Figura 1 B (Artículo 1)** y **Figura 60 B (Capítulo II, apartado 5.2)**, la NDBA disminuyó significativamente la

viabilidad de las células HL-60 (20 mM) y HepG2 (25 mM) tras 18 (10 y 6% de supervivencia celular, respectivamente) y 24 h de exposición (6% y 5% de supervivencia celular, respectivamente). Por tanto, el efecto citotóxico de la NDBA fue más pronunciado en ambas líneas celulares. Estos resultados confirman los obtenidos en un estudio previo realizado por nuestro laboratorio, en el que se evaluó también el efecto citotóxico de las N-nitrosaminas en células Vero (células de riñón de mono verde africano), utilizando el método MTT (Zabala 2002, Tesis Doctoral). La NDBA mostró una actividad citotóxica mayor a concentraciones más bajas (6 mM; 77% de supervivencia celular) que la NPIP (10 mM; 76%), la NPYR (10 mM, 78%) y la NDMA (13 mM; 81%).

A continuación y para determinar si el daño citotóxico ejercido por la NPIP y la NDBA era debido a la inducción de apoptosis, utilizamos la microscopía de fluorescencia. El examen al microscopio de fluorescencia, nos permitió observar en ambas líneas celulares las características morfológicas de apoptosis, tales como la condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos (**Figura 2, artículo 1; Figura 1, artículo 2**). El porcentaje de células apoptóticas aumentó con el incremento de la concentración y el tiempo de incubación. La línea celular HepG2 (**Tabla 11, Capítulo II, apartado 5.2**) fue más resistente que la línea celular HL-60 (**Tabla 1, artículo 1**) a la inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA. Tras 72 h de tratamiento con una concentración de 45 mM de NPIP se alcanzaron un 91% de células HepG2 apoptóticas, mientras que sólo fueron necesarias 24 h de incubación y una concentración de 20 mM para obtener un 96% de células HL-60 apoptóticas. Además, la NDBA mostró un mayor efecto apoptótico que la NPIP en ambas líneas celulares ya que se necesitaron concentraciones menores y tratamientos más cortos para obtener porcentajes elevados de células apoptóticas (2,5 mM, 18 h, 94% de células HL-60 apoptóticas; 3,5 mM, 18 h, 81% de células HepG2 apoptóticas).

La microscopía de fluorescencia es una técnica rápida y económica, ampliamente utilizada para determinar la inducción de apoptosis (Jablonski y col., 2001; Solhaug y col., 2004). Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes: es altamente

cualitativa, subjetiva a la capacidad del investigador en cuanto a la observación y detección, y el tiempo del ensayo es limitado (cuando los cambios morfológicos son máximos) (Haza y col., 2000). Una técnica más actual y fiable para la detección de la apoptosis es la citometría de flujo. La citometría de flujo determina dos tipos de propiedades celulares, las intrínsecas, que son aquellas que podemos medir sin necesidad de añadir fluorocromos, como pueden ser el tamaño o la granularidad, y las extrínsecas, como la medición de la exposición de la FS o la degradación del DNA, que precisan de la adición de un fluorocromo. Además, los principios en los que se basa esta técnica no son complicados. Una suspensión de células convenientemente procesada y teñida con fluorocromos, se inyecta en la cámara del citómetro de flujo. Las células de la muestra atraviesan de forma individual y sucesiva esta cámara e interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática. La excitación de los fluorocromos en el punto de interacción entre la célula y el haz lumínico da lugar a la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. Esta señal es procesada por un ordenador y nos permite efectuar el análisis de la muestra. Las ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos que emplean fluorocromos incluyen la objetividad y la elevada sensibilidad, ya que permite el análisis individual y cuantitativo de un gran número de células en un corto periodo de tiempo (Vermes y col., 2000). Las desventajas y limitaciones son los altos costes de instrumentalización y la incapacidad de visualizar las células que estamos analizando.

La citometría de flujo se ha utilizado en este estudio para detectar (i) la exposición de la FS mediante el ensayo Anexina V/PI en la línea celular HL-60 y (ii) la degradación del DNA mediante el método TUNEL en las líneas celulares HL-60 y HepG2, tras la incubación con la NPIP y la NDBA. El ensayo Anexina V/PI se ha empleado únicamente en la línea celular HL-60, puesto que su uso en células adherentes como las HepG2 se considera poco fiable y no está recomendado. Esto se debe a que los tratamientos empleados para el desprendimiento de las células adherentes, como la tripsinización, aumentan el porcentaje de células positivas a la Anexina V y generan, por tanto, errores en la cuantificación de la apoptosis (Zamai y col., 2001). La

exposición de la FS en la cara externa de la membrana celular se produce sólo en los estadios tempranos o intermedios del proceso apoptótico, previamente a otros eventos celulares como la degradación del DNA, por lo que se considera un marcador temprano de apoptosis (O'Brien y col., 1997; Chan y col., 1998; Akiyama y col., 1999). Sin embargo, este método presenta el inconveniente de no diferenciar las células apoptóticas tardías, en las que la integridad de la membrana celular está comprometida, de las células necróticas. Por esta razón, utilizamos también el método TUNEL, el más sensible y específico hasta el momento, para la detección de la apoptosis en ambas líneas celulares. Esta técnica detecta la degradación del DNA, biomarcador del proceso apoptótico (Gorczyca y col., 1993), y permite por tanto diferenciar las células apoptóticas tardías de las necróticas.

La **Figura 3 (Artículo 1)** muestra que la exposición de la FS en las células HL-60 comenzó a las 18 h de tratamiento con la NPIP (5-20 mM) o la NDBA (0,5-2,5 mM), y aumentó progresivamente en las 6 h posteriores de incubación. Así, el mayor aumento en el número de células HL-60 apoptóticas se produjo tras 24 h de incubación con 20 mM de NPIP (53%) (**Figura 3 A**) y 2,5 mM de NDBA (73%) (**Figura 3 B**). En cambio, fue necesario aumentar el período de incubación con las N-nitrosaminas hasta 72 h para detectar un porcentaje elevado de células HL-60 apoptóticas mediante el método TUNEL (**Figura 4, artículo 1**). El tratamiento de las células HL-60 durante 72 h con 20 mM de NPIP aumentó el porcentaje de células apoptóticas hasta un 74% (**Figura 4 A**), mientras que se necesitaron dosis inferiores con la NDBA (2,5 mM) para obtener un porcentaje de apoptosis similar (69%) (**Figura 4 B**).

En la línea celular HepG2, tras el tratamiento con 10 mM de NPIP durante 24 h se detectó un 6% de células apoptóticas, aumentando hasta alcanzar un 23% y un 86% de apoptosis a las concentraciones de 25 y de 45 mM de NPIP, respectivamente, utilizando el método TUNEL (**Figura 2 A, artículo 2**). En los tratamientos con la NDBA, el porcentaje de células apoptóticas incrementó considerablemente tras 72 h de incubación con 1 y 2,5 mM (27% y 51%, respectivamente) (**Figura 2 B, artículo 2**). Además,

cabe destacar que a las concentraciones más elevadas de NPIP (45 mM) y de NDBA (3,5 mM), el porcentaje de células apoptóticas fue máximo a las 24 h incubación (86,5% y 95%, respectivamente), permaneciendo invariable a las 48 (86,7% y 94,1%, respectivamente) y 72 h (87,1% y 93,4%, respectivamente). De acuerdo con nuestros resultados, Lin y col. (1999) observaron que el porcentaje de células GM2E1 (fibroblastos humanos) apoptóticas obtenido tras el tratamiento con la NDMA (1 mM) no variaba con el tiempo de incubación, obteniendo valores similares a las 24, 48 y 72 h.

Los resultados obtenidos con el método TUNEL indican que la degradación del DNA (cambio bioquímico asociado al proceso apoptótico) en las células HL-60 (**Figura 4, artículo 1**) y HepG2 (**Figura 2, artículo 2**) tras el tratamiento con ambas N-nitrosaminas, tiene lugar a partir de las 24 h de incubación. En general, con el microscopio de fluorescencia los cambios morfológicos se observaron en ambas líneas celulares tras períodos de incubación más cortos (**Tabla 1, artículo 1; Tabla 11, Capítulo II, apartado 5.3**). Estos resultados que inicialmente pueden parecer contradictorios, no lo son. En la bibliografía existente, otros autores han descrito que los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis celular no se producen simultáneamente. Según Collins y col. (1997) la degradación del DNA es un fenómeno que sucede sólo en las etapas tardías del proceso apoptótico, correspondiéndose con la fase lítica de la apoptosis. Por otra parte, Willingham (1999) afirma que no existe ninguna razón para asumir que los cambios morfológicos producidos en el núcleo de la célula durante el proceso apoptótico (p.e. la condensación de la cromatina) y los cambios bioquímicos (p.e. la degradación del DNA), puedan ser detectados en el mismo momento.

El etopósido, un conocido agente inductor de apoptosis en células tumorales, se ha utilizado como control positivo en los **artículos 1 y 2**. Los resultados obtenidos con el ensayo Anexina V/PI y el método TUNEL mostraron que la NPIP y la NDBA a las concentraciones más elevadas indujeron un porcentaje de células apoptóticas similar o superior al obtenido tras el tratamiento con el etopósido en ambas líneas celulares (**Figura 3 y 4, artículo 1;**

Figura 2, artículo 2). Este hallazgo indica que las N-nitrosaminas poseen un importante potencial apoptótico, el cual puede estar relacionado con sus efectos tóxicos.

En definitiva, los resultados obtenidos con la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo confirman que la NPIP y la NDBA inducen apoptosis en las células HL-60 y HepG2 dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Además, la NDBA mostró un efecto apoptótico mayor en ambas líneas celulares. Tras 72 h de incubación con la NDBA a una concentración de 2,5 mM (HL-60) y de 3,5 mM (HepG2) el porcentaje de células apoptóticas superó el 50%, mientras que fue necesario incrementar las dosis de NPIP a 20 mM (HL-60) y a 45 mM (HepG2) para obtener un porcentaje de apoptosis similar (**Figura 4, artículo 1; Figura 2, artículo 2**). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el **Capítulo II, apartado 6.1**, donde señalamos que la NDBA (3 mM) mostró un efecto genotóxico a concentraciones inferiores que la NPIP (9 mM) en las células HepG2, utilizando el ensayo Cometa. Por tanto, la inducción de apoptosis y el daño al DNA dependen de la estructura química de la N-nitrosamina y de su activación metabólica. Otros autores han observado que la activación metabólica por la isoenzima CYP 1A1 juega un papel clave en la apoptosis inducida por el B(a)P (Salas y Burchiel, 1998; Solhaug y col., 2005). Hirose y col. (1998) también comprobaron que la apoptosis inducida por la PhIP en el epitelio de colon de rata dependía de su bioactivación por el CYP 1A2. En el caso de las N-nitrosaminas, el número de átomos de carbono de la cadena del grupo nitroso es uno de los principales factores que determinan la isoforma del CYP450 responsable de la activación metabólica de cada N-nitrosamina. El CYP 2A6 participa en la activación metabólica de las N-nitrosaminas de estructura cíclica, como la NPYR y la NPIP (Kamataki y col., 2002), mientras que es el CYP 2E1 la isoforma enzimática implicada en la α -hidroxilación de la NDMA (Bellec y col., 1996), y en la bioactivación de la NDBA es el CYP 1A1 (Fujita y Kamataki, 2001 a). Además, Lin y col. (1999) han confirmado que los reactivos intermediarios de la NDMA inducen la muerte celular por apoptosis en una línea celular transfectada el CYP 2E1.

Por otra parte, la línea celular HepG2 mostró una mayor resistencia a la inducción de apoptosis por la NPIP, la NDBA y el etopósido, ya que se necesitaron concentraciones más elevadas que en la línea celular HL-60 para obtener porcentajes de apoptosis similares (**Tabla 1 y Figura 4, artículo 1; Tabla 11, Capítulo II, apartado 5.3 y Figura 2, artículo 2**). Esto puede ser debido a las diferencias que existen en la expresión de las isoformas enzimáticas implicadas en el metabolismo de las N-nitrosaminas, en ambas líneas celulares. De acuerdo con nuestros resultados, Holme y col. (2007) observaron que el B(a)P (50-100 nM) inducía un porcentaje de apoptosis mayor en las células de hepatoma Hepa1c1c7 que en las células epiteliales hepáticas F258 de rata. Estos autores comprobaron que la mayor sensibilidad de las células Hepa1c1c7 a los efectos apoptóticos del B(a)P se debía a que presentaban una mayor expresión de la isoforma CYP 1A1. Recientemente, Patil y col. (2009) han demostrado que el B(a)P a bajas concentraciones (100 y 200 μ M) induce apoptosis en células neurosensoriales de retina de rata (R28). Sin embargo, a concentraciones elevadas (400 y 1000 μ M) en las células R28 y a todas las concentraciones analizadas (100-1000 μ M) en células humanas del endotelio microvascular (HMVEC) produce la muerte celular por necrosis. La disparidad encontrada en el efecto citotóxico del B(a)P puede ser atribuida, igualmente, a la diferente expresión de las isoformas enzimáticas que metabolizan el B(a)P en cada una de estas líneas celulares.

Para determinar la implicación de las caspasas en el proceso de apoptosis se puede medir el fraccionamiento de muchos de los sustratos que intervienen en la cascada de señalización celular. Un ejemplo de ellos es la enzima PARP, fraccionada por la caspasa-3 (ejecutora) en los estadios apoptóticos tardíos en dos fragmentos, de 85 y 24 kDa cada uno, que se pueden determinar por Western Blot (Chiarugi, 2002). En las células HL-60 tratadas con 5 y 10 mM de NPIP la ruptura de la PARP comenzó a las 18 h de tratamiento (**Figura 5 A, artículo 1**). Sin embargo, no se apreció la ruptura de la PARP tras el tratamiento de las células HepG2 con la NPIP a ninguna de las concentraciones (10-45 mM) y tiempos de incubación (24-72h) examinados, aunque

sí pudimos notar la desaparición de la banda de 116 kDa a la concentración de 25 mM después de 72 h de tratamiento y a la de 45 mM después de 24 y 72 h (**Figura 3 A, artículo 2**). Igualmente, el etopósido produjo la ruptura de la PARP en la línea HL-60 a la concentración de 5 μ M durante 6 y 18 h (**Figura 5, artículo 1**) pero no en la línea HepG2 a la concentración de 100 μ M durante 24 y 72 h (**Figura 3, artículo 2**). En estas últimas, solo se observó la desaparición de la banda de 116 kDa tras el tratamiento durante 72 h con el etopósido. Al contrario de lo que sucedió con la NPIP y el etopósido, la proteólisis de la PARP se detectó en las dos líneas celulares tras el tratamiento con la NDBA (**Figura 5 B, artículo 1; Figura 3 B, artículo 2**). Así, en las células HL-60, encontramos la PARP rota a todas las concentraciones y tiempos de incubación utilizados (**Figura 5 B, artículo 1**), mientras que en las células HepG2 solamente lo observamos después de 6 h de incubación a la concentración de 2,5 mM y, de 3 h a la concentración de 3,5 mM (**Figura 3 B, artículo 2**).

Los resultados obtenidos muestran que la NDBA induce la ruptura de la PARP en ambas líneas celulares (**Figura 5 B, artículo 1; Figura 3 B, artículo 2**) y la NPIP solamente en la línea celular HL-60 (**Figura 5 A, artículo 1**). La visualización de la proteólisis de la enzima PARP tras el tratamiento con las N-nitrosaminas evidencia que la caspasa-3 (efectora) participa activamente en el proceso apoptótico inducido por estos carcinógenos. Asimismo, otros autores han descrito que la amina heterocíclica 3-amino-1,4-dimetil-5-*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1) induce apoptosis en células hepáticas (30 μ M) y mononucleares (10-15 μ M) de rata, mediante la activación de la caspasa-3 y la subsecuente ruptura de la PARP (Ashida y col., 2001; Hashimoto y col., 2001). Sin embargo, en las células HepG2 tratadas con la NPIP o el etopósido no se observa la ruptura de la PARP sino la desaparición de la banda de 116 kDa a medida que aumenta la concentración y el tiempo de incubación (**Figura 3 A, artículo 2**). Coincidiendo con nuestros resultados, DiBartolomeis y Moné (2003) señalaron en sus estudios con células Jurkat tratadas con etopósido (500 μ M) durante 6 h que la desaparición progresiva del fragmento de 116

kDa puede también corresponderse con la ruptura de la PARP.

Finalmente, empleamos los inhibidores específicos de las caspasas-3, -6, -8 y -9 y el método TUNEL con el objeto de confirmar si las dos N-nitrosaminas inducen apoptosis en las células HepG2 dependiente de caspasas. Como se observa en la **Figura 4 (Artículo 2)** cuando las células HepG2 se incubaron simultáneamente con las N-nitrosaminas y los inhibidores específicos de caspasas, el porcentaje de células apoptóticas disminuyó, confirmando la implicación de las caspasas en este proceso. Las caspasas-8 y -9 actúan indistintamente como caspasas iniciadoras, ya que la inhibición de ambas disminuye el porcentaje de células HepG2 apoptóticas de forma similar (69% y 65% de reducción para la NPIP, respectivamente; 74% y 65% de reducción para la NDBA, respectivamente) (**Figura 4, artículo 2**). Asimismo, las caspasas -3 (73% de reducción en el porcentaje de apoptosis) y -6 (74% y 80% tras el tratamiento con la NPIP y la NDBA, respectivamente) participan como caspasas efectoras. Nuestros resultados indican que tanto la vía extrínseca (caspasa-8) como la vía intrínseca (caspasa-9) dominan la cascada inicial de la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las células HepG2. Se han obtenido resultados similares para la cascada de activación de la apoptosis inducida por el B(a)P en una línea tumoral humana de pulmón (Xiao y col., 2007) y, por la amina heterocíclica Trp-P-1 en esplenocitos de rata (Hashimoto y col., 2004). Por el contrario, otros estudios describen que la caspasa-8 es la principal caspasa iniciadora en la cascada de activación de la apoptosis inducida por otros carcinógenos presentes en la dieta, aunque la caspasa-9 puede también participar (Ashida y col., 2001; Oh y Lim, 2006). Asimismo, los resultados de un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación (Arranz 2009, Tesis Doctoral) demostraron que la caspasa-8 es la principal caspasa iniciadora de la apoptosis inducida por la NPYR y la NDMA en las células HepG2, aunque con la participación de manera secundaria de la caspasa-9.

La inducción de apoptosis por otras N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente, como la NDMA y la NPYR, en las líneas celulares HL-60 y

HepG2, se ha evaluado con anterioridad en nuestro laboratorio (Arranz 2009, Tesis Doctoral). Comparando con los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos afirmar que la NDBA es la N-nitrosamina más potente en la inducción de apoptosis en ambas líneas celulares. Tras 72 h de incubación de las células HL-60 y HepG2 con la NDBA (2,5 y 3,5 mM, respectivamente), el porcentaje de células apoptóticas superó el 50%, mientras que fue necesario emplear dosis superiores de NPIP (20 y 45 mM), NPYR (50 mM) y NDMA (135 mM) para obtener un porcentaje similar, utilizando el método TUNEL. Además, en la línea celular HL-60 se detectó la ruptura de la PARP tras el tratamiento con cualquiera de las cuatro N-nitrosaminas examinadas, aunque la NDBA fue la más eficaz. Así, visualizamos claramente el fragmento de 85 kDa en las células HL-60 tratadas con 0,5 mM de NDBA durante 3 h, mientras que se necesitaron dosis y tiempos de incubación superiores para detectar la proteólisis de la PARP tras el tratamiento con la NPIP, la NPYR y la NDMA. En las células HepG2, la ruptura de la PARP se observó tras el tratamiento con 3,5 mM de NDBA durante 3 y 6 h, mientras que no se detectó la proteólisis de esta enzima a ninguna de las concentraciones y tiempos de incubación estudiados con el resto de las N-nitrosaminas. Con el método TUNEL la línea celular HepG2 mostró una mayor resistencia a la inducción de apoptosis por la NPIP y la NDBA que la línea celular HL-60. En cambio, las células HepG2 presentaron una sensibilidad mayor que las células HL-60 a la inducción de apoptosis por la NPYR (50 mM, 72 h; 68% y 51% de células apoptóticas) y por la NDMA (135 mM, 72 h; 78% y 49% de células apoptóticas). Por tanto, las diferencias encontradas en el porcentaje de células apoptóticas dependen de la estructura química de la N-nitrosamina y de la diferente expresión de las isoformas enzimáticas implicadas en el metabolismo de las mismas en ambas líneas celulares.

La presente memoria demuestra por primera vez que la NPIP y la NDBA inducen apoptosis en dos líneas tumorales humanas, HL-60 y HepG2, utilizando varias técnicas analíticas, tales como la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo y el Western Blot. Además, la apoptosis inducida por estas N-nitrosaminas es dependiente de la activación de las caspasas en ambas líneas

celulares, actuando indistintamente las caspasas-8 y -9 como caspasas iniciadoras en las células HepG2.

6.3. Producción de las EROs por la NPIP y la NDBA y su implicación en el proceso apoptótico

La activación metabólica de las N-nitrosaminas, a través del CYP450, permite generar EROs, que a su vez pueden producir estrés oxidativo y lesiones celulares (Robichová y col., 2004 a; Bansal y col., 2005; Yeh y col., 2006; Beda y Nedospasov, 2007). En concreto, las EROs dañan macromoléculas celulares, como los sustratos lipídicos, los hidratos de carbono, las proteínas, el RNA y el DNA, inhibiendo los procesos metabólicos fundamentales y desencadenando como respuesta al estrés celular, la apoptosis (McGowan y col., 1996; Ueda y col., 1998).

Estudios científicos indican que las vías de inducción de apoptosis (intrínseca y extrínseca) se pueden activar a través de un mecanismo dependiente de las EROS. Skulachev (2000) ha observado que las EROs inducen la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PT) en la mitocondria, facilitando la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo c y la procaspasa-9 (vía intrínseca). Recientemente, Gómez-Quiroz y col. (2008) han comprobado también que las EROs pueden actuar como estímulos proapoptóticos, activando los receptores de la muerte celular como el Fas-R (vía extrínseca). Sin embargo, otros estudios muestran un planteamiento totalmente diferente: las EROs se generan como consecuencia de la activación de la apoptosis, y no intervienen en el inicio de la misma, por lo que la apoptosis se produce por un mecanismo independiente de las EROS. Así, Higuchi y col. (1998) y Gottlieb y col. (2000) señalan que la activación de la vía extrínseca o de los receptores de la muerte celular produce una fuerte inhibición de la cadena respiratoria en la mitocondria, lo que conlleva un aumento en la producción de las EROS.

En el **Capítulo II, apartado 6.1** del presente trabajo de investigación evaluamos el daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA en

las células HepG2, utilizando el ensayo Cometa y la enzima Fpg para reconocer las bases púricas oxidadas. Nuestros resultados muestran que ambas N-nitrosaminas inducen un significativo daño oxidativo al DNA que puede estar relacionado, al menos en parte, con la producción intracelular de las EROs en esta línea celular. Puesto que la relación entre el estrés oxidativo y el proceso apoptótico atrae nuestro interés, analizamos si la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas produce por un mecanismo dependiente o independiente de las EROs. En primer lugar, determinamos las EROs producidas por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 (**Figura 6, artículo 1**) y HepG2 (**Figura 5, artículo 2**). La producción de las EROs en las células HL-60 comenzó inmediatamente (a los 15 min) después de la exposición a la NPIP (5-20 mM) y a la NDBA (0,5-2,5 mM) (**Figura 6, artículo 1**), alcanzando los niveles máximos a la media hora y disminuyendo hasta los niveles basales a las 24 h. De acuerdo con nuestros resultados, Robichová y col. (2004 a) observaron que las EROs originadas por la NMOR en células de carcinoma de colon (Caco-2), se producen durante la primera hora de incubación con este compuesto. Asimismo, la exposición de las células de carcinoma de pulmón (A549) a la NNK durante una hora ocasiona un incremento significativo en los niveles intracelulares de las EROs (Yeh y col., 2006).

Como se muestra en la **Figura 5 A (Artículo 2)**, la producción de las EROs en las células HepG2 tratadas con la NPIP (10-45 mM) alcanzó el máximo nivel tras 1 h de incubación y disminuyó progresivamente hasta los niveles basales a las 24 h. Un resultado similar obtuvieron Oh y Lim (2006) al tratar las células HepG2 con cadmio (16 μ M). La producción de las EROs se iniciaba a la media hora, alcanzaba los niveles máximos a las 3 h y disminuía paulatinamente hasta las 24 h. Recientemente, Erkekoglu y Baydar (2010) han confirmado también que la NDMA (10 mM), la NDEA (10 mM) y la NMOR (10 mM) incrementan las EROs producidas tras una breve incubación (de 30 a 90 minutos), en las células HepG2. Por el contrario, la NDBA no aumentó significativamente los niveles intracelulares de las EROs en la línea celular HepG2 (**Figura 5 B, artículo 2**). Holme y col. (2007) encontraron también resultados diferentes al tratar

dos líneas celulares hepáticas de rata con el B(a)P, detectando un significativo aumento en los niveles de las EROs en las células F258, mientras que ese incremento no se observó en las células Hepa1c1c7.

La producción de las EROs no sólo fue dependiente del tiempo de incubación, sino que también aumentó con el incremento de la concentración en las líneas celulares HL-60 (**Figura 6, artículo 1**) y HepG2 (**Figura 5, artículo 2**), y por tanto, la máxima señal se obtuvo a la dosis más elevada de la NPIP (20 mM/HL-60 y 45 mM/HepG2) y de la NDBA (2,5 mM/HL-60). Este efecto se ha observado previamente en células de carcinoma de colon (Caco-2) tratadas con la NMOR (1,7-3,4 mM) (Robichová y col., 2004 a) y en células neuronales de rata tratadas con cadmio (100 nm-100 μ M) (López y col., 2006).

La NAC es un agente quimiopreventivo de naturaleza hidrofílica que protege frente al daño al DNA y a la carcinogénesis a través de múltiples mecanismos de acción. En concreto, es capaz de atrapar o reaccionar con las EROs procedentes del metabolismo celular gracias a su capacidad antioxidante (Plantin-Carrenard y col. 2000; Zafarullah y col., 2003). Además, numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han observado que la NAC posee un efecto antiapoptótico que parece estar estrechamente relacionado con su habilidad para atenuar el estrés oxidativo, el daño al DNA y otras señales que conducen en último lugar a la apoptosis celular (De Flora y col., 2001). La mayor parte de los trabajos científicos que demuestran la capacidad de la NAC para atrapar las EROs producidas por un carcinógeno, confirman también que la NAC reduce la apoptosis inducida por los mismos, y por tanto el proceso apoptótico se produce por un mecanismo dependiente de las EROs. Dos metabolitos derivados del benceno, la 2,3,5-tris(glutatión-S-il)hidroquinona (TCHQ) y el β -benceno-hexacloride (BHC), aumentaron los niveles intracelulares de las EROs en las células de leucemia humana (HL-60) y en las células de sertoli de rata y a su vez, activaron las vías intrínseca (liberación de Bax y del citocromo c) y extrínseca (expresión del ligando Fas) del proceso apoptótico, respectivamente (Yang y col., 2005; Shi y col., 2009). Asimismo, el pretratamiento con la NAC

produjo una disminución de la producción de las EROs y de la apoptosis inducida por estos metabolitos, confirmando que las EROs actuaban como moléculas iniciadoras de este proceso. Oh y Lim (2006) han observado también que el cadmio inducía en las células HepG2 un incremento rápido de las EROs, la activación de la caspasa-8 y la liberación del citocromo c. Esta apoptosis se producía por un mecanismo dependiente de las EROs, ya que al pretratar las células HepG2 con la NAC disminuían las EROs intracelulares, y a su vez la apoptosis. Por ello, para determinar la implicación de las EROs en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA utilizamos la NAC.

Como la NDBA no aumentó los niveles intracelulares de las EROs en las células HepG2 (**Figura 5 B, artículo 2**), evaluamos el efecto de la NAC frente a su producción en la línea celular HL-60 tratada con ambas N-nitrosaminas (NPIP, 5-10 mM; NDBA 0,5-2,5 mM) (**Figura 6, artículo 1**) y, en la línea celular HepG2 tratada solamente con la NPIP (10-45 mM) (**Figura 5 A, artículo 2**). Para ello, seleccionamos aquellos periodos de incubación en los que las N-nitrosaminas inducían la máxima producción de las EROs, siendo de media hora en las células HL-60 y de 1 h en las HepG2. La incubación de las células con la NAC (20 mM, 1 h) no incrementó la producción intracelular de las EROs respecto a las células sin tratar (**Figura 7, artículo 1; Figura 6 A, artículo 2**). Por otra parte, el pretratamiento con la NAC (20 mM, 1 h) suprimió las EROs producidas por la NPIP en ambas líneas celulares y, por la NDBA en las células HL-60 (**Figura 7, artículo 1; Figura 6 A, artículo 2**).

A continuación, estudiamos el efecto de la NAC frente a la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA, cuantificando el porcentaje de células apoptóticas obtenidas mediante el método TUNEL. Los resultados mostraron que la NAC no inducía apoptosis en la línea celular HL-60 (**Figura 8, artículo 1**), mientras que en la línea celular HepG2 aumentaba el porcentaje de células apoptóticas hasta un 30% (**Figura 6 B, artículo 2**). En los pretratamientos con NAC, seleccionamos las concentraciones y los tiempos de incubación que inducían un porcentaje de apoptosis superior al 40%. La **Figura 8 (Artículo 1)** muestra que el

pretratamiento de las células HL-60 con la NAC (20 mM, 1 h) protegió débilmente (10%) frente a la apoptosis inducida por la NPIP (20 mM, 48 h) y no inhibió la producida por la NDBA (2,5 mM, 48 h). En la línea celular HepG2, el pretratamiento con la NAC tampoco redujo la apoptosis inducida por la NPIP (10 mM, 72 h) (**Figura 6 B, artículo 2**).

Estos resultados sugieren que la producción de las EROs por la NPIP y la NDBA en ambas líneas celulares puede ser un fenómeno derivado o secundario a la activación de las vías apoptóticas, y no el origen de la apoptosis. Por ello, consideramos que la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en ambas líneas celulares se produce por un mecanismo independiente de las EROs. Igualmente, Lin y col. (2003 b) han demostrado que la rein-antrona (100 μ M), un compuesto derivado de la raíz del ruibarbo, induce apoptosis en la línea celular HL-60 por un mecanismo independiente de las EROs, ya que el pretratamiento con antioxidantes como la NAC o la catalasa disminuye las EROs, pero no reduce la apoptosis. Asimismo, en células Jurkat expuestas a ultrasonidos se ha observado la activación de la proteína proapoptótica Bak y de las caspasas, y un aumento en las concentraciones intracelulares de las EROs (Kinoshita y col., 2007). Sin embargo, la preincubación con la NAC no protege frente a la apoptosis, por lo que se ha concluido que las EROs no participan en la regulación de dicho proceso.

La bibliografía disponible hasta el momento muestra que el conocimiento sobre el papel que desempeñan las EROs en la apoptosis no es todavía concluyente y requiere una mayor investigación. Las N-nitrosaminas poseen otros efectos aparte de la inducción del estrés oxidativo como por ejemplo el daño alquilativo a las proteínas o al DNA, que no pueden ser reparados por el tratamiento con ciertos antioxidantes (Gorman y col., 1997). La modificación del metabolismo de estos agentes alquilantes es uno de los principales mecanismos para proteger al organismo frente al desarrollo de tumores. La NAC aunque posee excelentes propiedades antioxidantes no altera la expresión o la actividad de las enzimas del CYP450 implicadas en la bioactivación de estos carcinógenos (Joshi y col., 1998; De Flora y col.,

2001), por lo que es posible que por sí sola no pueda proteger frente a los efectos proapoptóticos de los mismos.

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo demuestran que la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en la línea celular HL-60 y HepG2 se produce por un mecanismo independiente de las EROs.

6.4. Efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA

El estrés oxidativo está implicado en enfermedades como el cáncer, la diabetes y las enfermedades coronarias (Cooke y col., 2003; Valko y col., 2006). De forma paralela al daño genotóxico que ejercen los carcinógenos de la dieta en el organismo, existen barreras defensivas que permiten limitar la acción oxidante y los daños posteriores. Entre ellas, cabe destacar la acción de los sistemas antioxidantes enzimáticos (Martínez, 2005) como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, todas ellas enzimas con capacidad para atrapar los radicales libres (Wei y Lau, 1998). Sin embargo, además de las defensas internas, cada vez parece más claro el papel protector de una ingesta diaria de antioxidantes. Entre los antioxidantes directos se encuentran la vitamina C, E, carotenoides, flavonoides y los OSCs presentes en muchos alimentos (Halliwell, 1996). Por otro lado, los efectos antioxidantes indirectos pueden ser provocados por fitoquímicos que no son capaces de atrapar las EROs, como es el caso de los ITCs, pero que estimulan la expresión de las enzimas antioxidantes y de la Fase II (Zhang, 2004).

En trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se evaluó el daño al DNA inducido por los compuestos OSCs, los ITCs y la vitamina C, con el fin de seleccionar aquellas concentraciones de los mismos que no resultarán genotóxicas y, posteriormente utilizarlas en los tratamientos simultáneos con las N-nitrosaminas (Arranz y col., 2006; 2007 a y b). Los resultados mostraron que el DAS y el DPS a concentraciones de 1-50 μM y el DADS y el DPDS a concentraciones de

1-5 μM no indujeron ni la ruptura de las cadenas del DNA ni la oxidación de las bases púricas. Asimismo, el AITC, el PEITC y el I3C en un rango de concentraciones de 0,1-1 μM tampoco causaron un daño genotóxico a las células HepG2. Finalmente, la vitamina C tampoco indujo un daño al DNA a ninguna de las concentraciones analizadas (1-10 μM).

En el presente trabajo de investigación, de los cuatro OSCs estudiados, el DAS (1-50 μM) fue el que mostró un efecto protector más débil frente a la oxidación de las purinas inducida por la NPIP y la NDBA en las células HepG2, empleando el ensayo Cometa. El DAS únicamente a la concentración más baja disminuyó débilmente las purinas oxidadas inducidas por la NPIP (1 μM , 29%), pero no las inducidas por la NDBA (**Figura 1, artículo 3**). El efecto de la NDBA solo se atenuó en un 5% a la concentración más alta de DAS (50 μM). Por esta razón no consideramos relevante en estudios posteriores evaluar la interacción del DAS con la vitamina C. Hageman y col. (1997) y Kim y col. (2001) atribuyeron este menor efecto protector del DAS frente a la formación de aductos inducida por el B(a)P, a su naturaleza más volátil. La **Figura 2 A (Artículo 3)** mostró que la máxima reducción en la formación de purinas oxidadas en el DNA inducida por la NPIP se produjo a la mayor concentración de DADS (2,5 μM , 38%). Por el contrario, la oxidación de las bases púricas inducida por la NDBA se redujo drásticamente a la menor concentración de DADS (0,1 μM , 92%) (**Figura 2 A, artículo 3**). Recientemente, Belloir y col. (2006) han comprobado que el DAS y DADS inhiben la genotoxicidad de la NDMA a bajas concentraciones, sugiriendo un efecto protector inverso a la dosis. Además, nuestros resultados demuestran que la protección ejercida por el DADS fue mayor que la del DAS frente al daño oxidativo al DNA inducido por las dos N-nitrosaminas analizadas.

El efecto protector de los compuestos propilo frente a compuestos carcinogénicos presentes en los alimentos ha sido menos estudiado, aunque Guyonnet y col. (2000) observaron que el DPS y el DPDS redujeron la mutagenicidad del B(a)P y de la PhIP en el test de Ames, utilizando microsomas de rata. Nuestros resultados también

revelaron que la oxidación de las purinas inducida por la NPIP y la NDBA se redujo en un 55-24% y en un 66-15%, respectivamente, a las concentraciones de 1 y 10 μM de DPS (**Figura 3 A, artículo 3**). Por el contrario, una concentración de 50 μM de DPS abolió este efecto protector, observándose un incremento significativo de la genotoxicidad de ambas N-nitrosaminas. El DPDS a todas las concentraciones utilizadas (0,1-2,5 μM) también mostró un efecto protector frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA (**Figura 4 A, artículo 3**). La adición de 0,1 μM de DPDS redujo en un 59-80% la oxidación de las purinas inducida por la NPIP o la NDBA, respectivamente, mientras que una concentración más alta de DPDS (2,5 μM) sólo la redujo en un 51-64%. Comparando los resultados obtenidos con los compuestos propilo, DPS y DPDS, podemos concluir que el DPDS elimina más eficazmente las purinas oxidadas inducidas por la NPIP o por la NDBA que el DPS.

Los diferentes efectos protectores de los OSCs frente al daño oxidativo al DNA inducido por ambas N-nitrosaminas pueden atribuirse a la estructura química de las mismas y a su diferente activación metabólica. Wattenberg y col. (1983) sugirieron, además, que el número de átomos de azufre en la estructura de los OSCs era el mejor indicador de la capacidad fitoprotectora de estos agentes. Estudios *in vivo* muestran que la eficacia de los OSCs frente a la reducción del cáncer de estómago inducido por el B(a)P en ratones y por la NDEA en ratas, aumenta con el número de átomos de azufre en la molécula de los OSCs (Haber-Mignard y col., 1996; Singh y Shukla, 1998). Además, Siess y col. (1997) apoyan que las diferencias estructurales entre los compuestos alilo (DAS/DADS) y propilo (DPS/DPDS) tienen solo mínimas consecuencias cualitativas en la modificación de los niveles expresión de las enzimas de la Fase I y II, mientras que el número de átomos de azufre produce diferencias cuantitativas en sus efectos. Más tarde, Fujita y Kamataki (2001 b) han comparado la inhibición de la actividad del CYP 2A6 por el DADS y el DAS, y han observado que el DADS es un inhibidor mucho más eficiente que el DAS. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación también muestran que el efecto

protector de los compuestos OSCs con dos átomos de azufre en su molécula (DADS y DPDS) es mayor que el de los compuestos que sólo contienen un átomo de azufre (DAS y DPS). Por tanto, podemos concluir que el efecto protector de los OSCs frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP o por la NDBA depende fundamentalmente de la estructura química y de la activación metabólica de la N-nitrosamina, así como del número de átomos de azufre en la estructura química de los OSCs.

Al comparar los resultados de este trabajo de investigación (NPIP y NDBA) con los obtenidos en trabajos preliminares con otras dos N-nitrosaminas, la NPYR y la NDMA (Arranz y col., 2007 a), podemos observar que los OSCs ejercen un rango muy amplio de efectos protectores frente al daño oxidativo al DNA inducido por N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente. El DADS mostró un mayor efecto protector frente a la formación de las purinas oxidadas inducida por la NDBA (0,1 μM , 92%) que frente a la NPYR (1 μM , 53%), la NDMA (1 μM , 48%) y la NPIP (1 μM , 11,5%). Por el contrario, el DAS (1 μM) no disminuyó las purinas oxidadas inducidas por la NDBA y ejerció un efecto protector mayor frente a la oxidación de las purinas inducida por la NPYR (1 μM , 48%) que frente a la NDMA (1 μM , 39%) y la NPIP (1 μM , 29%). Por último, el DPS y el DPDS mostraron un efecto protector similar frente a la oxidación de las bases púricas inducida por la NPYR (60-53%), la NDMA (58-56%) y la NPIP (55%). Sin embargo, la máxima reducción de la formación de las purinas oxidadas por el DPS y el DPDS se observó frente a la NDBA (66-77%). En resumen, estos resultados indican que el DADS, el DPS y el DPDS eliminan las purinas oxidadas inducidas por la NDBA de una forma más eficaz que las inducidas por la NPYR, la NDMA y la NPIP.

En el presente trabajo de investigación también evaluamos el efecto protector de los ITCs (PEITC, I3C y AITC) frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. De los tres ITCs analizados (0,1-1 μM), sólo dos, el PEITC y el I3C, mostraron un efecto protector frente a la oxidación de las purinas inducida por la NPIP y la NDBA (**Figura 1 A y 3 A, artículo 4**). El daño oxidativo al DNA provocado por la NPIP en las células HepG2 se

redujo ligeramente (19-26%) a todas las concentraciones de PEITC (0,1-1 μM). Sin embargo, el efecto de la NDBA sólo se atenuó en un 27% a la concentración más baja de PEITC (0,1 μM) (**Figura 1 A, artículo 4**). Los resultados obtenidos con el I3C (**Figura 3 A, artículo 4**) indicaron que el daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP se reducía con el aumento de la concentración (0,1-1 μM), observándose la máxima reducción (28%) a la concentración de 1 μM . Por el contrario, el daño oxidativo al DNA provocado por la NDBA sólo se redujo a la concentración más baja (0,1 μM , 26%) (**Figura 3 A, artículo 4**). Si comparamos los resultados del presente trabajo de investigación con la NPIP y la NDBA con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Arranz y col., 2006), con otras dos N-nitrosaminas, la NDMA y la NPYR, podemos concluir que tanto el PEITC como el I3C fueron más eficaces en eliminar las purinas oxidadas inducidas por la NDMA (67%) y la NPYR (79%) que por la NPIP (26-28%) y la NDBA (26%). Por tanto, el efecto protector de los ITCs (PEITC e I3C) frente al daño oxidativo al DNA inducido por las N-nitrosaminas depende de la estructura química de las mismas y de su diferente activación metabólica. En resumen, mientras los OSCs (DADS, DPS y DPDS) eliminan más eficazmente las purinas oxidadas inducidas por la NDBA, los ITCs (PEITC e I3C) eliminan mejor las inducidas por la NDMA y la NPYR.

Existen otros trabajos (Knasmüller y col., 1992, 1996) que confirman también el papel protector del PEITC frente al efecto genotóxico inducido por la NDMA y la NPYR, sin embargo no hay datos precedentes con respecto a la NPIP y la NDBA. Knasmüller y col. (1992, 1996), empleando el PEITC, han observado una reducción en el daño al DNA inducido por la NDMA y la NPYR en *Escherichia coli* K-12 y, una drástica reducción en la inducción de micronúcleos por la NDMA en células HepG2.

Como hemos descrito anteriormente, de los tres ITCs evaluados sólo dos (PEITC e I3C) mostraron efecto protector frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. El AITC (0,1-1 μM) incrementó el efecto genotóxico provocado por la NPIP y por la NDBA en dos y 1,5 veces, respectivamente (**Figura 2 A, artículo 4**). Laky y col.

(2002) y Uhl y col. (2003 b) observaron que el AITC no causaba daño al DNA *per se*, pero en los tratamientos simultáneos con B(a)P producía un significativo efecto genotóxico sinérgico. A dosis elevadas de AITC (3-6 μM), la migración del DNA era casi dos veces superior a la producida por el B(a)P solo. Sin embargo, en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Arranz y col., 2006), tras el tratamiento simultáneo de las células HepG2 con la NDMA o la NPYR, y el AITC (1 μM) se observó un significativo efecto protector (53% y 67%). Por tanto, el efecto genotóxico sinérgico del AITC con la NPIP o la NDBA es nuevo e interesante, aunque está también apoyado por otros autores que han sugerido que algunos ITCs pueden inducir rupturas en las cadenas del DNA o tener efectos mutagénicos (Musk y col., 1995; Kassie y col., 2003).

Finalmente, otro de los quimiopreventivos estudiados en el presente trabajo fue la vitamina C. Nuestros resultados indicaron que la vitamina C a la concentración de 10 μM (**Figura 56, Capítulo II, apartado 4.2**) fue el quimiopreventivo más eficaz, de todos los evaluados, frente a la oxidación de las bases púricas inducida por la NPIP (80%) y la NDBA (94%). Lazarová y Slamenová (2004) han demostrado también que la vitamina C protege a las células HepG2 frente a la oxidación de las purinas inducida por otros carcinógenos de la dieta, como el B(a)P y el 5,9-dimetil-7H-dibenzo[c,g]carbazole. Además, un estudio realizado por nuestro laboratorio (Arranz y col., 2007 b) con anterioridad evaluó el efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NDMA y la NPYR. Al comparar nuestros resultados con la NPIP y la NDBA y los obtenidos previamente con la NDMA y la NPYR, podemos concluir que la vitamina C es igual de eficaz al eliminar las purinas oxidadas inducidas por la NPIP (80%) y la NPYR (81%), dos N-nitrosaminas de estructura cíclica. Sin embargo, el efecto protector de la vitamina C (10 μM) frente a las N-nitrosodialquilaminas es dispar, reduciendo en un 94% el daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA y en un 61% el de la NDMA. Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos preliminares de nuestro grupo de investigación (Ikken y col. 1999), en los que se determinó el efecto protector de extractos etanólicos de frutas y vegetales frente a la

mutagenicidad de las N-nitrosaminas. Se concluyó que el mayor efecto inhibitorio (51%) frente a la mutagenicidad inducida por la NDBA fue ejercido por extractos etanólicos de kiwi (que contienen alrededor de 5 $\mu\text{mol/g}$ de vitamina C).

Las similitudes y discrepancias halladas en el efecto protector de la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por las N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente pueden ser debidas a diferencias en su estructura química y en la activación metabólica de las mismas. Así, la NPIP y la NPYR son activadas principalmente por el CYP 2A6 (Kamataki y col., 2002), mientras que es el CYP 1A1 la isoforma enzimática implicada en la bioactivación de la NDBA (Fujita y Kamataki, 2001 a) y en la α -hidroxilación de la NDMA es el CYP 2E1 (Bellec y col., 1996). Recientemente, Erkekoglu y Baydar (2010) han evaluado el efecto protector de la vitamina C (10 μM) frente a la genotoxicidad de dos N-nitrosodialquilaminas, la NDMA (10 mM) y la NDEA (10 mM), y una N-nitrosamina de estructura cíclica, la NMOR (10 mM), en células HepG2, utilizando el ensayo Cometa. Los resultados muestran que la vitamina C reduce el daño al DNA inducido por la NDMA, la NDEA y la NMOR en un 30%, 22,60% y un 21,85%, respectivamente. Asimismo, estos autores han atribuido las discrepancias encontradas en el efecto protector de la vitamina C frente al daño al DNA inducido por estas N-nitrosaminas, a las diferencias en su estructura química, así como en su activación metabólica.

6.5. Interacción de los OSCs o de los ITCs con la vitamina C frente al daño al DNA inducido por la NPIP y la NDBA

Recientemente, Møller y Loft (2006) realizaron una revisión de 87 estudios científicos sobre el papel de los antioxidantes de la dieta en la reducción del daño oxidativo al DNA en la orina y en las células sanguíneas humanas. Estos autores concluyeron que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes era más efectivo, que el aporte de un antioxidante en particular, para reducir el daño oxidativo al DNA, aunque los efectos protectores que hallaron eran más bajos que los que previamente esperaban. Más recientemente, Guarnieri y col.

(2007) han demostrado que el zumo de naranja presenta un mayor efecto protector que la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en células mononucleares de individuos sanos. Además, Lamy y col. (2008) han observado que los extractos de rúcula (perteneciente a la familia *Brassicaceae*) reducen el efecto genotóxico del B(a)P en células HepG2, empleando el ensayo Cometa. El análisis posterior por cromatografía de gases ha permitido la identificación del PEITC entre sus componentes mayoritarios, aunque esta planta es rica también en compuestos polifenólicos (Martínez-Sánchez y col., 2007), vitamina C y carotenoides (Steinmetz y Potter, 1991). Así, el efecto antígenotóxico de la rúcula puede ser consecuencia de la interacción sinérgica de todos estos compuestos.

Por ello, otro de los objetivos de este trabajo consistió en determinar las posibles interacciones de los OSCs y de los ITCs con la vitamina C, ya que podrían tanto potenciar como interferir el efecto protector individual de cada uno de ellos. Para alcanzar este objetivo procedimos a evaluar el efecto protector de los OSCs y de los ITCs en combinación con la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. Inicialmente, determinamos el efecto protector del DADS, DPS y DPDS en combinación con la vitamina C. Los resultados obtenidos con el DPS mostraron que la máxima reducción del daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP se obtuvo a la concentración más elevada (50 μM , 72%), mientras que frente a la NDBA se alcanzó con la concentración más baja (1 μM , 80%) (Figura 3 B, artículo 3). Sin embargo, el DADS (Figura 2 B, artículo 3) y el DPDS (Figura 4 B, artículo 3) a todas las concentraciones empleadas (0,1-2,5 μM) en combinación con la vitamina C (10 μM) redujeron drásticamente las purinas oxidadas inducidas por la NPIP (93-97% y 98-90%, respectivamente) y por la NDBA (94-98% y 95-91%, respectivamente). Estos resultados reflejan que las posibles interacciones entre los OSCs y la vitamina C sean probablemente aditivas. Sin embargo, ya que la vitamina C por sí sola (10 μM) reduce significativamente la oxidación de las purinas inducida por la NPIP (80%) y la NDBA (94%) (Figura 55, Capítulo II, apartado 4.1), es probable que la

contribución de los OSCs a este efecto protector no sea tan relevante en los tratamientos combinados. Es decir, que dicha protección puede ser debida únicamente a la vitamina C.

Nuestro estudio demostró también que cuando las células se trataban con el PEITC, el AITC o el I3C (0,1-1 μ M) en combinación con la vitamina C (10 μ M), el efecto protector frente a la oxidación de las purinas inducida por la NPIP (1 μ M, 50, 73, 63%, respectivamente) o por la NDBA (0,1 μ M, 67, 42, 32%, respectivamente) (**Figuras 1-3 B, artículo 4**) era superior al de los ITCs solos (**Figuras 1-3 A, artículo 4**). Por otra parte, observamos además que el efecto protector de la vitamina C sola frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP (80%) y la NDBA (94%) era mayor que el del tratamiento combinado con los ITCs, poniendo de manifiesto una posible interacción antagónica. Park y Levine (2000) afirmaron que la acumulación intracelular de ácido ascórbico está inhibida por los flavonoides a través del bloqueo de la absorción del ácido dehidroascórbico y ascórbico en las células HL-60. Basándonos en estos hallazgos, sugerimos también que los ITCs puedan inhibir la absorción intracelular de la vitamina C por un mecanismo similar.

Por tanto, hoy en día la administración de suplementos dietéticos que contienen en sus formulaciones vitaminas u otros compuestos quimiopreventivos debe realizarse con cautela y fomentar el desarrollo de trabajos científicos que estudien las posibles interacciones de sus componentes. En un estudio *in vivo* realizado en varones se asoció la ingestión de suplementos multivitamínicos (vitamina C, vitamina E y β caroteno) con una reducción en el daño oxidativo al DNA (oxidación de las bases pirimidínicas), siendo este efecto más pronunciado entre los fumadores (Duthie y col., 1996). En cambio, en otra investigación no se observaron cambios en los niveles de daño oxidativo al DNA (8-OHdG) en individuos fumadores tratados con suplementos dietéticos que contenían vitamina C, vitamina E y β caroteno (Jacobson y col., 2000).

6.6. Mecanismos de acción

6.6.1. Inhibición de la isoforma enzimática humana CYP 1A1

Un posible mecanismo de acción por el que los OSCs, los ITCs y la vitamina C evitan que las N-nitrosaminas dañen macromoléculas celulares, como el DNA, es que interaccionen con las enzimas que catalizan la activación metabólica de la NPIP y de la NDBA (Hecht, 1999). Existen numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que revelan el papel de los OSCs en la inhibición de la actividad enzimática de las isoformas CYP 2E1, CYP 2A6 y CYP 1A1, bloqueando así la producción de intermediarios genotóxicos (Siess y col., 1997; Guyonnet y col., 1999; Fujita y Kamataki, 2001 b).

En este sentido, los resultados del **artículo 3 (Figura 7)** muestran el efecto inhibitor de los OSCs en la O-deetilación de la etoxiresorufina (CYP 1A1), responsable de la activación metabólica de la NDBA. Como se observa, el DAS (1-50 μ M; 73%) y el DADS (0,1-2,5 μ M; 70%) ejercieron una mayor inhibición de la actividad del CYP 1A1 que el DPS (1-50 μ M; 68%) y el DPDS (0,1-2,5 μ M; 37-62%). Además, como hemos descrito anteriormente, estos compuestos (DADS, DPS y DPDS) redujeron eficientemente el daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA (92%, 66% y 80%, respectivamente) (**Figura 2 A, 3 A y 4 A, artículo 3**). Por tanto, existe una buena correlación entre el efecto protector del DADS, DPS y DPDS frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA y la inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1. Estos resultados sugieren que el efecto protector del DADS, DPS y DPDS frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA, puede atribuirse a la inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1, isoforma responsable de su activación metabólica.

Nuestros resultados también ponen de manifiesto que el DAS fue el único OSCs de los cuatro evaluados que no mostró efecto protector frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y por la NDBA. Sin embargo, si que inhibió la actividad enzimática del CYP 1A1. Estas discrepancias pueden deberse a que en los ensayos

del efecto protector empleábamos como modelo biológico, células de hepatoma humano, mientras que en los ensayos de actividad enzimática se utilizaron microsomas de células de insecto transfectadas con baculovirus que expresaban la isoforma enzimática humana CYP 1A1. Una de las mayores y más importantes desventajas del empleo de microsomas es que la biotransformación de los xenobioticos no está influenciada por las moléculas transportadoras como sucede en el caso de los modelos celulares (Brandon y col., 2003).

Por otra parte, los trabajos de investigación que han centrado su estudio en el efecto protector de los ITCs y la inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 son escasos, y la mayor parte de ellos muestran resultados muy dispares dependiendo del ITCs evaluado. Conaway y col. (1996) han demostrado que el AITC inhibe débilmente la actividad del CYP 1A1, mientras que Gerhäuser y col. (2003) han observado que el PEITC actúa como un potente inhibidor de esta isoforma. Sin embargo, el I3C estimula la actividad catalítica de esta enzima (Horn y col., 2002). El efecto del PEITC, del I3C y del AITC en la actividad enzimática del CYP 1A1 se muestra en la **Figura 6 (Artículo 4)** y en la **Figura 59 (Capítulo II, apartado 5.1)** del presente trabajo. Nuestros resultados demostraron que el PEITC (1 μ M; **Figura 6, artículo 4**) y el AITC (0,1-1 μ M; **Capítulo II, apartado 5.1**) redujeron drásticamente la actividad del CYP 1A1 (55% y 58-54%, respectivamente), mientras que el I3C (**Figura 6, artículo 4**) no inhibió la actividad de esta enzima a ninguna de las concentraciones analizadas (0,1-1 μ M). Como también hemos descrito anteriormente, el PEITC y el I3C atenuaron aproximadamente en un 27% y en un 26%, respectivamente, el daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA. Sin embargo, el AITC incrementó el efecto genotóxico de la NDBA. Por tanto, sólo encontramos una buena correlación entre el efecto protector del PEITC y la inhibición del CYP 1A1, lo que sugiere que el efecto protector del PEITC frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA pueda atribuirse a la inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1. El efecto protector del I3C puede deberse a otros mecanismos diferentes a los de la inhibición de las enzimas de la Fase I, como la estimulación de las enzimas de la Fase II (Nho y

Jeffery, 2001; Bacon y col., 2003), la actividad antioxidante (Zhang, 2004) o la modulación del proceso apoptótico (Chen y col., 2004; Singh y col., 2004 a).

A través de diferentes estudios *in vivo*, se ha comprobado que la administración de vitamina C disminuye la expresión de la isoforma CYP 1A1 en ratas expuestas al humo del tabaco (Ueta y col., 2001). En el presente trabajo de investigación, demostramos que la vitamina C (10 μ M) protegió a las células HepG2 del daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA (94%; **Figura 56 B, Capítulo II, apartado 4.2**). Este efecto protector puede atribuirse, sólo en parte, a la reducción de la actividad del CYP 1A1 (19%) por la vitamina C. Sin embargo, estos resultados sugieren que otros mecanismos de acción, posiblemente, puedan estar también implicados en el efecto protector de la vitamina C. Entre ellos, cabe destacar la capacidad para atrapar los radicales libres (Li y Schellhorn, 2007), la estimulación de las enzimas de la Fase II (Elbekai y col., 2007) o la regulación de la apoptosis (Hong y col., 2007; Pérez-Cruz y col., 2007).

En resumen, todos los compuestos quimiopreventivos analizados en el presente estudio inhibieron la actividad de la etoxiresorufina O-deetilasa (**CYP 1A1**) (excepto el I3C), en el siguiente orden: **DAS > DADS > DPS > DPDS > AITC > PEITC > Vitamina C**. Sin embargo, sólo hallamos una buena correlación entre el efecto protector del DADS, DPS, DPDS y PEITC frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NDBA y el porcentaje de inhibición de la actividad del CYP 1A1.

6.6.2. Inhibición de la isoforma enzimática humana CYP 2A6

El efecto protector de los OSCs, los ITCs y la vitamina C frente al daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP puede atribuirse a la inhibición de la isoforma enzimática CYP 2A6 (implicada en su metabolismo). Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en un trabajo anterior (Arranz 2009, Tesis Doctoral) indicaron que los OSCs (DAS, 38%; DADS, 42%; DPS, 42% y DPDS, 51%), los ITCs (AITC, 52%, PEITC 14% e I3C, 24%) y la

vitamina C (82%) inhibieron significativamente la actividad de la cumarina hidroxilasa (CYP 2A6). En el presente estudio (Artículos 3, 4 y Capítulo II, apartado 4.2) mostramos también que los OSCs (DAS, 29%; DADS, 38%; DPS, 55% y DPDS, 51%), los ITCs (PEITC, 26% e I3C, 28%) y la vitamina C (80%) protegían eficazmente a las células HepG2 del daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP. Por tanto, comparando los resultados de la Tesis Doctoral Arranz (2009) con los obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que existe una buena correlación entre el efecto protector de los OSCs, los ITCs (excepto el AITC) y la vitamina C y la inhibición de la actividad enzimática CYP 2A6.

6.6.3. Estimulación de la isoforma enzimática humana UDP-GT 1A4

La inhibición de la actividad enzimática del CYP 1A1 y del CYP 2A6 (responsables de la activación metabólica de la NDBA y de la NPIP) por los OSCs, los ITCs y la vitamina C, no parece ser el único mecanismo de acción por el que estos compuestos ejercen su efecto protector frente al daño oxidativo al DNA inducido por las N-nitrosaminas. La estimulación de las enzimas de la Fase II, como la UDP-glucuronil transferasa 1A4 (UDP-GT 1A4), que convierten los compuestos reactivos en menos tóxicos y más fácilmente excretables (Gamet-Payrastré y col., 2000; van der Logt y col., 2004), parece ser otro de los posibles mecanismos implicados en su efecto protector.

En un trabajo previo realizado por nuestro laboratorio (Arranz 2009, Tesis Doctoral), se determinó que el DPDS (196%), el I3C (163%) y la vitamina C (178%) fueron los compuestos quimiopreventivos que aumentaron más drásticamente la actividad enzimática de la UDP-GT 1A4. Sin embargo, la actividad de la UDP-glucuronil transferasa 1A4 fue ligeramente estimulada por el DAS (140%), el DADS (144%), el DPS (147%), el PEITC (117%) y el AITC (116%). En el presente trabajo de investigación (**Artículos 3, 4 y Capítulo II, apartado 4.2**) también demostramos el efecto protector de los OSCs (DAS, 8-5%; DADS, 38-92%; DPDS, 51-64%; DPS, 55-66%), los ITCs (PEITC, 26-27%; I3C, 28-26%) y la vitamina C (80-94%) frente al

daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA en las células HepG2. Por tanto, comparando los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral Arranz (2009) con los del presente trabajo, se desprende que existe una buena correlación entre el efecto protector de los OSCs (excepto el DAS), los ITCs y la vitamina C y la estimulación de la actividad enzimática de la UDP-glucuronil transferasa (UDP-GT 1A4).

6.6.4. Efecto de la vitamina C, el DADS y el DPDS en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA

El interés en la nutrición y su relación con el cáncer tiene su origen en estudios realizados durante las últimas décadas. Se estima que el 30% de los casos de cáncer en los países desarrollados están relacionados con hábitos de alimentación no saludables (Doll y Peto, 1981). Después del tabaco, la dieta supone la segunda causa de cáncer teóricamente prevenible ya que el consumo de ciertos alimentos puede reducir el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer (Davis, 2007). Las frutas y los vegetales son ricas en vitaminas y fitoquímicos como los carotenoides, los flavonoides, los OSCs y los ITCs que explican en parte su efecto protector frente a esta enfermedad (Steinmetz y Potter, 1991). Esta protección está directamente relacionada con la prevención de los daños al DNA celular y puede producirse mediante diferentes mecanismos de acción. Entre ellos, cabe destacar la regulación de la metilación del genoma (Mathers, 2006), la prevención de la formación de aductos en el DNA (Ferguson y col., 2004), la modulación de la actividad de las enzimas de la Fase I y II (Fujita y Kamataki, 2001 b), la capacidad de atrapar radicales libres (Borek, 2001) o la regulación de la apoptosis (Corzo-Martínez y col., 2007).

En la actualidad, uno de los principales objetivos de la comunidad científica consiste en la búsqueda de compuestos naturales o sintéticos que regulen el proceso apoptótico para generar nuevas herramientas en la prevención y el tratamiento del cáncer. La mayor parte de los estudios realizados *in vitro* muestran que los compuestos quimiopreventivos presentes en los alimentos, inducen apoptosis en las

células tumorales (D'Agostini y col., 2005). Sin embargo hasta la fecha, son escasos los trabajos que estudian sus efectos antiapoptóticos (Kim y col., 2005 b; Koh y col., 2005). Revel y col. (2001, 2003) observaron el efecto protector del resveratrol frente a los efectos adversos del B(a)P en esperma y en pulmón, y lo relacionaron con una reducción del daño al DNA y de la apoptosis. La vitamina C protege frente a la toxicidad del arsénico en células de leucemia humana (HL-60) (Karasavvas y col., 2005) y, frente a la de las radiaciones gamma en leucocitos humanos (Mozdarani y Ghoraeian, 2008) debido a sus efectos antiapoptóticos.

Los resultados del **Capítulo II, apartado 6.4** mostraron que de todos los compuestos quimiopreventivos analizados, la vitamina C, el DADS y el DPDS fueron los que presentaron un mayor efecto protector frente al daño oxidativo al DNA inducido por las N-nitrosaminas en las células HepG2, utilizando el ensayo Cometa. Como hemos mencionado anteriormente, la inhibición de la apoptosis puede ser otro mecanismo de acción por el que estos quimiopreventivos ejercen su efecto protector. Por esta razón, estudiamos el efecto de la vitamina C, el DADS y el DPDS en la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 y HepG2, utilizando el método TUNEL.

En el presente trabajo de investigación, evaluamos en primer lugar, la inducción de apoptosis por estos compuestos. Ninguno de los agentes quimiopreventivos a las concentraciones utilizadas [vitamina C (5, 10 y 50 μM); DADS y DPDS (1, 2,5 y 5 μM)] indujo apoptosis en las células HL-60 y HepG2 (Arranz y col., 2008; **Figura 1; artículo 5**).

Para los tratamientos combinados, seleccionamos las dosis de N-nitrosaminas que indujeron alrededor de un 50% de células apoptóticas. Así, las células HL-60 se trataron con 20 mM de NPIP y 2 mM de NDBA (74% y 44% de células apoptóticas, respectivamente) y las células HepG2 con 25 mM de NPIP y 2,5 mM de NDBA (70% y 51%, respectivamente) durante 72 h. La vitamina C redujo eficazmente la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas en ambas líneas celulares (**Figura 2, artículo 5**). Una concentración 5 μM de vitamina C

disminuyó la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 en un 34 y un 29%, respectivamente, mientras la concentración más elevada (50 μM) la redujo en un 77 y un 80%, respectivamente (**Figura 2 A, artículo 5**). Asimismo, en la línea celular HepG2, el efecto protector de la vitamina C (5-50 μM) frente a la apoptosis inducida por la NPIP aumentó con el incremento de la concentración (60-75% de reducción, respectivamente) (**Figura 2 B, artículo 5**). Sin embargo, la vitamina C disminuyó la apoptosis inducida por la NDBA en un 60% a todas las concentraciones utilizadas (5-50 μM) (**Figura 2 B, artículo 5**).

La **Figura 4 (Artículo 5)** muestra que el efecto protector del DADS (1-5 μM) frente a la apoptosis inducida por la NPIP en las células HL-60 (**Figura 4 A**) y HepG2 (**Figura 4 B**) aumentó con el incremento de la concentración (34-73% y 57-72% de reducción, respectivamente). En cambio, la máxima reducción de la apoptosis inducida por la NDBA se observó a la menor concentración de DADS (1 μM) tanto en la línea celular HL-60 (**Figura 4 A**) como en la línea celular HepG2 (**Figura 4 B**) (82% y un 72% de reducción, respectivamente), mostrando por tanto un efecto antiapoptótico inverso a la dosis. Por último, el efecto protector del DPDS frente a la apoptosis inducida por la NPIP en las células HL-60 aumentó con el incremento de la concentración (1-5 μM , 65-74% de reducción) (**Figura 6 A, artículo 5**). La apoptosis inducida por la NDBA fue reducida solo en un 10% a las concentraciones de 1 y 2,5 μM de DPDS, mientras que la concentración de 5 μM disminuyó el porcentaje de apoptosis en un 57% (**Figura 6 A, artículo 5**). Todas las concentraciones analizadas de DPDS (1, 2,5 y 5 μM) redujeron eficientemente la apoptosis inducida por la NPIP (62, 80 y 83% de reducción) y la NDBA (60, 72 y 77% de reducción) en las células HepG2 (**Figura 6 B, artículo 5**).

El potencial antiapoptótico de la vitamina C ha sido evaluado también en otros estudios *in vivo* e *in vitro*. Guney y col. (2007) observaron que la apoptosis producida en células endometriales de rata tras la administración oral de flúor se reducía con la suplementación de vitamina C. Por otra parte,

Wenzel y col. (2004) comprobaron que la vitamina C (1 mM) bloqueaba la apoptosis inducida por dos drogas antitumorales en células humanas de carcinoma de colón (HT-29). Recientemente, el efecto antiapoptótico de la vitamina C (5-20 nmol) frente a otras drogas antitumorales ha sido también detectado en células de leucemia (K562) y de linfoma (RL) (Heaney y col., 2008). Asimismo, el efecto protector de la vitamina C frente a la apoptosis inducida por la NDMA y la NPYR ya ha sido demostrado en nuestro laboratorio (Arranz y col., 2008). En este trabajo ampliamos los estudios acerca de sus propiedades antiapoptóticas a otras N-nitrosaminas, la NPIP y la NDBA. Si comparamos los resultados obtenidos con las cuatro N-nitrosaminas, podemos concluir que la vitamina C (50 μ M) ejerce un efecto protector similar en las células HL-60 y HepG2 frente a la apoptosis inducida por la NPIP (77% y 74% de reducción, respectivamente) y la NPYR (65% y 63% de reducción, respectivamente), dos N-nitrosaminas de estructura cíclica. Sin embargo, la inhibición producida por la vitamina C (50 μ M) en la apoptosis inducida por las dialquilnitrosaminas, como la NDBA y la NDMA, es mayor en las células HL-60 (80% y 75% de reducción, respectivamente) que en las células HepG2 (66% y 57% de reducción, respectivamente).

Como ya hemos mencionado, las N-nitrosaminas necesitan ser activadas metabólicamente por las enzimas del CYP450 para ejercer su efecto apoptótico (Lin y col., 1999). Por tanto, las diferencias observadas en el efecto antiapoptótico de la vitamina C pueden deberse a la estructura química de las N-nitrosaminas y a la expresión de las isoformas enzimáticas implicadas en el metabolismo de las mismas en ambas líneas celulares.

La especie humana no puede sintetizar la vitamina C por lo que tiene que obtenerla a través de una dieta rica en frutas y vegetales, siendo la cantidad diaria recomendada (CDR) de 90 mg/día para los hombres y de 75 mg/día para las mujeres (Frei y Trabe, 2001; Padayatty y Levine, 2001). Las concentraciones plasmáticas de vitamina C varían de acuerdo a la ingesta, alcanzando en condiciones fisiológicas valores entre 20-200 μ M (Liu y col.,

1982). Estudios realizados sobre la relación entre el consumo de vitamina C y las concentraciones en plasma concluyen que una ingesta de 100 mg/día de vitamina C alcanza concentraciones plasmáticas de 60 μ M (Padayatty y col., 2003). Así, una dieta equilibrada puede proporcionar unos niveles plasmáticos (5-50 μ M) de vitamina C adecuados para inhibir la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas.

Los dos mecanismos principales por los que se regula la apoptosis son la vía extrínseca, mediada por los receptores de la muerte celular, y la vía intrínseca, mediada por la mitocondria. Las dos caspasas iniciadoras de estas vías son la caspasa-8 y la -9, respectivamente. Los resultados del **Capítulo II, apartado 6.2** muestran que en la apoptosis inducida por la NPIP y NDBA intervienen la caspasa-8 y la caspasa-9 (**Figura 4, artículo 2**) como caspasas iniciadoras en las células HepG2. Pérez Cruz y col. (2003) han determinado que la vitamina C (1-4 mM) inhibe la apoptosis en la línea celular monocítica U937 y en monocitos humanos a través de la inactivación de la caspasa-8 y como consecuencia, reduce la activación de la caspasa-3 en ambas líneas celulares. Además, la vitamina C (500 μ M) bloquea la liberación del citocromo c, y las caspasas-9 y -3, en células endoteliales humanas (Dhar-Mascareño y col., 2005). El efecto antiapoptótico de la vitamina C puede deberse por tanto a su capacidad para regular la apoptosis mediante la inactivación de estas caspasas.

Otros autores han observado que el DADS inhibe el crecimiento de células tumorales humanas de sangre, pulmón y próstata (Kwon y col., 2002; Wu y col., 2005; Arunkumar y col., 2007; Lin y col., 2007). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el DADS (1-5 μ M) no sólo no induce apoptosis (**Figura 1, artículo 5**) sino que reduce la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA (**Figura 4, artículo 5**). Además, la máxima reducción de la apoptosis inducida por la NDBA se produce a la menor concentración de DADS (1 μ M) en ambas líneas celulares (HL-60, 82%; HepG2, 72%), reflejando un efecto antiapoptótico inverso a la dosis (**Figura 4, artículo 5**). Estos resultados confirman los obtenidos en el ensayo Cometa, donde la máxima reducción de

la oxidación de las purinas inducida por la NDBA se obtiene tras el tratamiento con las concentraciones más bajas de DADS (**Figura 2 A, artículo 3**). Además, Belloir y col. (2006) han indicado que el DADS reduce la genotoxicidad de la NDMA a bajas concentraciones (5-25 μM), mientras que a elevadas dosis la incrementa (25-50 μM).

La información disponible acerca de la regulación de la apoptosis por los diferentes OSCs es aún limitada, centrándose la mayor parte de los trabajos publicados hasta el momento en el estudio del DADS. Koh y col. (2005) observaron que una concentración de 100 μM de DADS aumentaba la liberación del citocromo c, la activación de la caspasa-3 y la ruptura de la PARP en células neuronales PC12, mientras que concentraciones menores de DADS (20 μM) inhibieron la liberación del citocromo c, la activación de la caspasa-3 y la ruptura de la PARP. En la línea celular HL-60 existen otros estudios que han evaluado el efecto del DADS a elevadas concentraciones. Entre ellos cabe destacar los resultados de Kwon y col. (2002) señalando que el DADS a una concentración de 25 μM induce apoptosis a través de la activación de la caspasa-3 y de la ruptura de la PARP. Asimismo, Lin y col. (2007) han comprobado que el DADS a altas concentraciones (60 μM) induce la expresión de genes proapoptóticos en las células HL-60. Por tanto, parece que el DADS puede ejercer un efecto antiapoptótico a bajas concentraciones (< 25 μM) o proapoptótico a elevadas concentraciones (> 25 μM) en las células HL-60. En cambio, De Martino y col. (2006) no han observado el efecto apoptótico del DADS en la línea celular HepG2, incluso utilizando elevadas concentraciones (50 μM). Esto puede indicar que las células HepG2 son más resistentes que las células HL-60 frente a los estímulos proapoptóticos del DADS. Otros trabajos han probado también que el efecto de ciertos compuestos quimiopreventivos en la apoptosis es diferente según la línea celular estudiada. Pérez-Cruz y col. (2007) observaron que la reducción de la apoptosis por la vitamina C era mayor en las células de mieloma K562 (60%) y U937 (50%) que en las de cáncer de próstata PC-3 (30%) y DU-145 (20%).

Hasta la fecha, son escasos los trabajos acerca de los efectos de la cebolla y de sus OSCs en la apoptosis celular. Wu y col. (2006) describieron la inducción de apoptosis por el aceite de cebolla (12,5 mg/ml) en células de carcinoma pulmonar (A549) mediante la producción intracelular de las EROs. Sin embargo, Sundaram y Milner (1996 b) comprobaron que el efecto apoptótico del aceite de cebolla en las células A549 era producido por el DADS y no por el DPDS. En la línea celular HL-60 tan sólo existe un estudio que evidencia una marcada supresión de la viabilidad celular tras la incubación con aceite de cebolla (20 mg/ml) (Seki y col., 2000). El presente trabajo de investigación demuestra por primera vez que el DPDS, a las concentraciones analizadas, no induce apoptosis en las líneas celulares HL-60 y HepG2 y, además reduce eficazmente el porcentaje de células apoptóticas inducido por la NPIP y la NDBA (**Figura 6, artículo 5**).

Parece evidente que el efecto de los compuestos quimiopreventivos frente a la apoptosis depende también de la concentración seleccionada en cada estudio. Así, un mismo compuesto puede actuar bien como inductor de apoptosis cuando se emplea a elevadas concentraciones o bien como inhibidor cuando se reducen las dosis utilizadas. Recientemente, D'Agostini y col. (2005) realizaron una revisión de 2.000 trabajos científicos sobre la regulación de la apoptosis por los agentes quimiopreventivos de la dieta y encontraron que en la mayoría de los ensayos *in vitro* la inducción de apoptosis por estos compuestos se debe a la utilización de concentraciones demasiado elevadas que potencian su toxicidad. En nuestro estudio, la vitamina C, el DADS y el DPDS disminuyeron eficazmente la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas en las células HL-60 y HepG2. Este efecto antiapoptótico puede atribuirse a la utilización de concentraciones relativamente bajas de vitamina C (< 50 μM), DADS (< 5 μM) y DPDS (< 5 μM) que no potencian su efecto tóxico y contribuyen a la reducción de la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas. Por tanto, la inhibición de la apoptosis parece ser otro mecanismo de acción por el que estos compuestos quimiopreventivos ejercen su efecto protector.

6.6.5. Capacidad de la vitamina C, el DADS y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA

La influencia de la dieta en el desarrollo y tratamiento de la enfermedad es cada vez más evidente (Davis, 2007). Los estudios epidemiológicos han establecido la asociación existente entre el consumo de frutas y vegetales, y una menor incidencia de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Temple, 2000; Willett, 2002). Sin embargo, aún no se sabe con certeza qué constituyente presente en las frutas y los vegetales es el responsable de este efecto protector, y se asume que los diferentes antioxidantes presentes en los mismos contribuyen en su conjunto a esta defensa (Sun y col., 2002; Chu y col., 2002; Adom y col., 2003). La prevención de las enfermedades degenerativas, cuyo origen está relacionado con procesos oxidativos, ha favorecido notablemente la difusión de la hipótesis antioxidante (Ames y Gold, 1991). Los antioxidantes a los que se ha prestado mayor atención son las vitamina C y E, los carotenoides y los compuestos polifenólicos (Liu, 2004). Sin embargo, una sola ración de frutas y vegetales puede contener cientos de compuestos antioxidantes, muchos de ellos aún desconocidos. En concreto, el ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) contienen constituyentes con excelentes propiedades antioxidantes como son los OSCs y la vitamina C (Teyssier y Siess, 2000; Kodentsova y col., 2002). Los dos OSCs que se encuentran con mayor frecuencia en estos vegetales son el DADS y el DPDS.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Arranz y col., 2007 c) se ha evaluado el efecto protector de la vitamina C, el DADS y el DPDS frente al daño oxidativo al DNA (oxidación de las bases púricas y pirimidínicas) inducido por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en las células HepG2, utilizando el ensayo Cometa. Los resultados obtenidos muestran que la vitamina C, el DADS y el DPDS reducen el daño oxidativo al DNA producido por el tratamiento con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) debido a su capacidad para atrapar los radicales libres. Asimismo, en este trabajo hemos demostrado que la NPIP aumenta los niveles intracelulares de las EROs en las líneas HL-60

(Figura 6 A, artículo 1) y HepG2 (Figura 5 A, artículo 2), mientras que la NDBA lo hace solamente en las células HL-60 (Figura 6 B, artículo 1). Estos resultados son innovadores, puesto que la comunidad científica aún debate si el estrés oxidativo contribuye al efecto tóxico de las N-nitrosaminas, agentes predominantemente alquilantes (Erkekoglu y Baydar, 2010). Por ello, en este trabajo de investigación consideramos de interés evaluar la capacidad de la vitamina C, el DADS y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA en ambas líneas celulares.

El pretratamiento de las células HL-60 y HepG2 con la vitamina C (5-50 μM) (Figura 3, artículo 5) no elevó los niveles de las EROs intracelulares, mientras que el DADS (1-5 μM) (Figura 5, artículo 5) y el DPDS (1-5 μM) (Figura 7, artículo 5) aumentaron la producción de las EROs con el incremento de la concentración en ambas líneas celulares. Otros autores han obtenido resultados similares, demostrando que el DADS estimula la producción de las EROs con el aumento de la concentración. Entre ellos, Kim y col. (2005 b) observaron que el DADS en células neuronales de ratón (N18D3) aumentaba la producción intracelular de las EROs a concentraciones superiores a 25 μM. Además, Wu y col. (2005) comprobaron que el DADS a partir de 200 μM incrementaba significativamente los niveles intracelulares de las EROs en células de carcinoma de pulmón (A549).

En los tratamientos combinados, la vitamina C a todas las concentraciones examinadas (5-50 μM) disminuyó la producción de las EROs inducida por la NPIP en las células HL-60 (51-60% de reducción, respectivamente) y en las HepG2 (29-58% de reducción, respectivamente) (Figura 3, artículo 5). Sin embargo, el aumento de las EROs en las células HL-60 tratadas con la NDBA fue sólo parcialmente reducido por la vitamina C a las concentraciones de 10 y 50 μM (9-19% de reducción, respectivamente) (Figura 3, artículo 5). Por el contrario, el DADS a todas las concentraciones utilizadas (1-5 μM) incrementó las EROs producidas por la NPIP y la NDBA en las células HL-60 (16-40% y 3-20% de incremento, respectivamente) y en las HepG2 (1-18% de incremento) (Figura 5, artículo 5). En el caso del

DPDS, la producción intracelular de las EROs inducida por la NPIP en la línea HL-60 se redujo tras el pretratamiento a todas las concentraciones estudiadas (1-5 μM , 52-34% de reducción, respectivamente), mientras que las EROs producidas por la NDBA sólo disminuyeron a la concentración más baja (1 μM , 25% de reducción) (**Figura 7 A, artículo 5**). En la línea celular HepG2, la producción de las EROs inducida por la NPIP se redujo ligeramente a 1 μM de DPDS (24% de reducción) y aumentó a 2,5 y 5 μM (8 y 17% de incremento, respectivamente) (**Figura 7 B, artículo 5**). En definitiva, nuestros resultados indican que el DADS no es capaz de reducir las EROs producidas por la NPIP y la NDBA, mientras que el DPDS las disminuye pero menos eficientemente que la vitamina C. Además, la vitamina C y el DPDS reducen en mayor porcentaje las EROs producidas por la NPIP que las producidas por la NDBA, y este efecto protector es más pronunciado en la línea celular HL-60 que en la línea HepG2.

Por otra parte, en el **Capítulo II, apartado 6.3** se muestra que la NAC reduce eficazmente la producción de las EROs inducida por la NPIP en ambas líneas celulares (**Figura 7 A, artículo 1; Figura 6 A, artículo 2**) y por la NDBA únicamente en la línea celular HL-60 (**Figura 7 B, artículo 1**). De acuerdo con los resultados obtenidos, los antioxidantes de naturaleza hidrofílica como la NAC (20 mM) (**Figura 7, artículo 1; Figura 6 A, artículo 2**) y la vitamina C (5-50 μM) (**Figura 3, artículo 5**) presentan una mayor capacidad de atrapar las EROs producidas por las N-nitrosaminas que los antioxidantes lipofílicos, como el DADS (1-5 μM) (**Figura 5, artículo 5**) y el DPDS (1-5 μM) (**Figura 7, artículo 5**). Estas diferencias en la capacidad de atrapar las EROs por parte de los antioxidantes de distinta naturaleza pueden atribuirse inicialmente a diferencias en los tipos de las EROs producidas por las N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente. En este sentido, se ha demostrado que el ajo atrapa preferentemente radicales peróxido (H_2O_2) e hidroxilo (HO^*) (Yang y col., 1993; Auroma y col., 1997), mientras que la vitamina C reacciona directamente con el superóxido ($^*\text{O}_2$), el hidroxilo (HO^*) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (Machlin y Bendich, 1987). En segundo lugar, los antioxidantes hidrofílicos y

lipofílicos presentan diferencias en la capacidad de atrapar las EROs dependiendo de la localización intracelular de las mismas, siendo más o menos accesibles a estas localizaciones según sus características de solubilidad (Gorman y col., 1997).

Se acepta generalmente que los compuestos inductores de apoptosis estimulan, a su vez, el estrés oxidativo, mientras que los compuestos con propiedades antiapoptóticas muestran también actividad antioxidante (Buttke y Sandstrom, 1994). Según esta hipótesis, el efecto protector de la vitamina C y el DPDS frente a la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA (**Figura 2, artículo 5**) puede estar relacionado con su capacidad de atrapar las EROs (**Figura 3, artículo 5**). Por otra parte, otros mecanismos de acción pueden justificar el efecto antiapoptótico de los antioxidantes de naturaleza lipofílica (DADS y DPDS) frente a las N-nitrosaminas (**Figura 4 y 6, artículo 5**). La administración de aceite de ajo y de cebolla a ratas tratadas con nicotina incrementa las reservas intracelulares de glutatión (GSH) (Helen y col., 1999). Ghibelli y col. (1999) asocian los niveles bajos de GSH con la liberación del citocromo c y la activación de la procaspasa-9, que a su vez activa a la caspasa-3 y el proceso apoptótico. Por ello, los efectos antiapoptóticos del DADS y del DPDS pueden estar relacionados con un aumento en las reservas de GSH.

Numerosos autores han comprobado que la activación metabólica de los carcinógenos, como el B(a)P, las aminas heterocíclicas y la NDMA, por el CYP450 es imprescindible para que se desencadene el proceso apoptótico (Hirose y col., 1998; Lin y col., 1999; Solhaug y col., 2005). Los resultados del **Capítulo II, apartado 6.6.1 y 6.6.2** muestran que la vitamina C, el DADS y el DPDS actúan como eficaces inhibidores de las isoformas enzimáticas humanas CYP 1A1 y CYP 2A6 (implicadas en el metabolismo de la NDBA y de la NPIP). Además, el DADS ejerce un aumento moderado de la actividad enzimática de la UDP-glucuronil transferasa 1A4 (UDP-GT 1A4) (enzima de la Fase II), mientras que la vitamina C y el DPDS presentan un efecto más pronunciado (**Capítulo II, apartado 6.6.3**). El efecto antiapoptótico de la vitamina C, DADS y DPDS puede atribuirse también a la inhibición de la

actividad de las enzimas de la Fase I o/y estimulación de la actividad de las enzimas de la Fase II.

En definitiva, la capacidad de la vitamina C y el DPDS de atrapar las EROs producidas por la NPIP y la NDBA puede ser uno de los mecanismos de acción por el que inhiben la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas. Sin embargo, en el efecto protector de los antioxidantes de la dieta frente a la apoptosis inducida por las N-nitrosaminas parece ser que están también implicados otros mecanismos.

7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES-CONCLUSIONS

1. La N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA) causan daño alquilativo (alquilación de purinas) y oxidativo (oxidación de purinas y pirimidinas) al DNA en la línea celular HepG2. Además, la NDBA es menos alquilativa y oxidativa que la NPIP.
2. La NPIP y la NDBA inducen apoptosis dependiente de caspasas e independiente de las EROs, en las líneas tumorales humanas HL-60 y HepG2. En la inducción de apoptosis la NDBA es más potente que la NPIP y, la línea celular HepG2 más resistente que la HL-60.
3. Los compuestos organosulfurados (OSCs), los isotiocianatos (ITCs) y la vitamina C protegen a las células de hepatoma humano del daño oxidativo al DNA inducido por la NPIP y la NDBA. De todos los compuestos evaluados, la vitamina C es la más eficaz, seguida de los OSCs y por último, de los ITCs.
4. El disulfuro de dialilo, DADS, el sulfuro de dipropilo, DPS, el disulfuro de dipropilo, DPDS y la vitamina C, eliminan más eficazmente las purinas oxidadas inducidas por la NDBA, mientras que el fenetil isotiocianato, PEITC, y el indol-3-carbinol, I3C, reducen de forma similar la inducida por ambas N-nitrosaminas.
5. Es posible que las interacciones entre los OSCs y la vitamina C sean probablemente aditivas. Sin embargo, ya que la vitamina C por sí sola reduce significativamente la oxidación de las purinas inducida por ambas N-nitrosaminas, es probable que la contribución de los OSCs a este efecto protector no sea tan relevante en los tratamientos combinados. Por otra parte, el efecto protector de la vitamina C, sola, es mayor que el del tratamiento combinado con los ITCs, poniendo de manifiesto una posible interacción antagónica.
6. Todos los compuestos quimiopreventivos estudiados actúan utilizando diferentes mecanismos de acción para ejercer su efecto protector. Los OSCs estimulan la actividad detoxificadora e inhiben la actividad enzimática del CYP 1A1 y la del CYP 2A6, mientras que los ITCs actúan principalmente inhibiendo la actividad del CYP 1A1 y la del CYP 2A6. Finalmente, la vitamina C estimula la actividad detoxificadora e inhibe la actividad del CYP 2A6.
7. La vitamina C, el DADS y el DPDS reducen la apoptosis inducida por la NPIP y la NDBA. Además, la capacidad de la vitamina C y del DPDS de atrapar las EROs puede contribuir a este efecto. No obstante, los antioxidantes hidrofílicos, como la vitamina C, presentan una mayor capacidad de atrapar las EROs producidas por estas N-nitrosaminas que los antioxidantes lipofílicos, como el DPDS.
8. La estructura química y la activación metabólica de la N-nitrosamina juegan un papel fundamental en el daño oxidativo, el daño alquilativo, la inducción de apoptosis, la producción de las EROs y el efecto protector. En el caso de los OSCs, este último depende además del número de átomos de azufre en su estructura química.

CONCLUSIONES-CONCLUSIONS

1. N-nitrosopiperidine (NPIP) and N-nitrosodibutylamine (NDBA) cause alkylative (alkylation of purines) and oxidative (oxidation of purines and pyrimidines) DNA damage in HepG2 cell line. Moreover, NDBA is less alkylative and oxidative than NPIP.
2. NPIP and NDBA induce caspase-dependent and ROS-independent apoptosis in human tumour cell lines HL-60 and HepG2. In the apoptosis induction, NDBA is more potent than NPIP, and HepG2 cell line is more resistant than HL-60.
3. Organosulfur compounds (OSCs), isothiocyanates (ITCs) and vitamin C protect human hepatoma cells towards oxidative DNA damage induced by NPIP and NDBA. Among all evaluated compounds, vitamin C is the most effective, followed by OSCs and finally, ITCs.
4. Diallyl disulphide, DADS, dipropyl sulphide, DPS, dipropyl disulphide, DPDS, and vitamin C remove the oxidized purines induced by NDBA more efficiently than by NPIP, whereas phenethyl isothiocyanate, PEITC, and indole-3-carbinol, I3C, reduce the oxidation of purines induced by both N-nitrosamines similarly.
5. It is possible that interactions between OSCs and vitamin C may be probably additive. However, since vitamin C alone reduces the oxidation of purines induced by both N-nitrosamines significantly, it is probably that the contribution of OSCs in this protective effect may not be relevant in combined treatments. On the other hand, the protective effect of vitamin C alone is higher than combined treatment with ITCs, revealing a possible antagonistic interaction.
6. All chemopreventive compounds evaluated acted through different mechanisms of action to exert their protective effect. OSCs stimulate the detoxification activity and inhibit the CYP 1A1 and CYP 2A6 activity, whereas ITCs mainly act inhibiting CYP 1A1 and CYP 2A6 activity. Finally, vitamin C stimulates the detoxification activity and inhibits the CYP 2A6 activity.
7. Vitamin C, DADS and DPDS reduce the NPIP and NDBA-induced apoptosis. Moreover, the scavenging ability of vitamin C and DPDS can contribute to this effect. However, ROS production induced by N-nitrosamines was more efficiently diminished by hydrophilic antioxidants, such as vitamin C, than by lipophilic antioxidants, such as DPDS.
8. The chemical structure and metabolic activation of N-nitrosamine play an important role in the oxidative damage, alkylative damage, apoptosis induction, EROs production and protective effect. In the case of OSCs, this last depends as well as the number of sulphur atoms of their chemical structure.

8. TRABAJO FUTURO

La línea de investigación que nuestro grupo viene realizando durante los últimos quince años consiste en utilizar la estrategia quimiopreventiva frente a compuestos carcinogénicos de la dieta. En este sentido, ya hemos evaluado el efecto protector de los compuestos organosulfurados, OSCs (plantas del género *Allium* como el ajo y la cebolla), los isotiocianatos, ITCs (vegetales de la familia *Cruciferae*) y la vitamina C (frutas y vegetales), frente al daño al DNA inducido por las N-nitrosaminas presentes con mayor frecuencia en los alimentos (NDMA, NPYR, NPIP y NDBA). Sin embargo, se desconoce el efecto protector de estos agentes quimiopreventivos cuando son ingeridos a través de la dieta. Una sola ración de frutas y vegetales contiene cientos de estos compuestos y entre ellos pueden darse interacciones que potencien o interfieran el efecto protector individual de cada uno de ellos. Por ello, otro de los objetivos de nuestro grupo consiste en evaluar las posibles interacciones entre los compuestos quimiopreventivos.

Además, esta línea de investigación ha profundizado en los mecanismos de acción por los que los compuestos quimiopreventivos ejercen su efecto protector. Entre ellos cabe destacar, la inhibición de las enzimas de la Fase I del CYP450, la estimulación de las enzimas de la Fase II, la capacidad antioxidante y finalmente, la inhibición de la apoptosis. Sin embargo, existen recientes estudios que describen otros posibles mecanismos de acción, entre ellos, sería interesante conocer el papel que desempeñan las alteraciones epigenéticas en el desarrollo del cáncer, y cómo los componentes de la dieta pueden prevenirlas.

La epigenética abarca una serie de alteraciones heredables en la expresión génica que no están causadas directamente por la alteración en la secuencia nucleotídica del DNA, como son la metilación del DNA y la modificación post-transduccional de las histonas mediante metilación o acetilación.

La metilación del DNA es la principal modificación epigenética descrita en la especie humana. Se produce en los residuos de citosina (5-metilcitosina) situados en los islotes CpG, que se

encuentran a su vez concentrados en las regiones promotoras de los genes. La ausencia de metilación en un islote CpG es un indicador de que el sitio de transcripción está activado y que es capaz de ser transcrito de DNA a RNA. En las células tumorales, la hipometilación del genoma va acompañada de la hipermetilación en los islotes CpG de las regiones promotoras. Esta hipermetilación se relaciona con el silenciamiento transcripcional y es un mecanismo de inactivación de los genes supresores de tumores. Así, la hipermetilación y el silenciamiento de un gen reparador del DNA, como el gen que codifica la enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT), que previene la transición de una G por una A, desencadena la subsiguiente acumulación de este tipo de transiciones en otros genes reguladores importantes (*k-ras*, *p53*), favoreciendo el desarrollo tumoral. Una lesión importante producida por las N-nitrosaminas es la O⁶-metilguanina que en las células tumorales deficientes en la enzima reparadora MGMT conducirá a un aumento de las transiciones del par G-A, de las mutaciones en oncogenes y de genes supresores de tumores (*k-ras*, *p53*), y por tanto propiciará la progresión tumoral.

A diferencia de las mutaciones genéticas, el silenciamiento epigenético es potencialmente reversible. En la actualidad, existen drogas que inducen la desmetilación del DNA y conducen a la reexpresión de los genes silenciados, recuperándose así su función original. En este sentido, se ha observado también que algunos compuestos de la dieta como el folato, la colina, la vitamina B6 y la vitamina B12 pueden alterar el patrón de metilación del DNA a través de tres mecanismos diferentes: 1) disminuyendo la disponibilidad de grupos metilo; 2) alterando el uso de los grupos metilo por cambios en la actividad de la DNA metiltransferasa (implicada en la incorporación del grupo metilo en el DNA) y 3) induciendo cambios en la actividad de la DNA desmetilasa.

La modificación post-transduccional de las histonas puede ser considerada como otro mecanismo de control epigenético. Los extremos amino terminales de las histonas que conforman los nucleosomas pueden ser metilados (conduciendo a un silenciamiento de los genes) o acetilados (provocando la activación de los genes). La

acetilación es la modificación más estudiada, y está controlada por las enzimas histona acetiltransferasas (HATs) y las histona deacetilasas (HDACs). Estas enzimas nucleares regulan la estructura de la cromatina modificando la expresión de los genes. En el caso particular del cáncer, se ha observado que la acetilación de los extremos amino terminales de las histonas inducen un cambio conformacional en la cromatina cuyo resultado final es la transcripción de genes supresores de tumores. Por tanto, los compuestos inhibidores de las HDACs pueden emplearse para prevenir la progresión del cáncer. Muchos de ellos se obtienen por síntesis en los laboratorios o bien tienen un origen natural como es el caso del sulfurafano (SFN) o del disulfuro de dialilo (DADS).

En este sentido, y dada la experiencia adquirida durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral, sería interesante integrarme en la línea de investigación desarrollada por el grupo del Dr. Bertrand Joseph, del Departamento de Oncología y Patología del Instituto Karolinska, en Estocolmo. Este grupo de investigación estudia las alteraciones de la metilación del DNA y las modificaciones de las histonas, así como su contribución al cáncer en la especie humana. Todo ello nos permitiría conocer y profundizar en la regulación epigenética del cáncer aplicando los conocimientos adquiridos en la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos, que regulen estos cambios y por tanto, contribuyan a la protección frente al desarrollo tumoral.

9. BIBLIOGRAFÍA

A

- Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM y Waalkes MP. 2000. Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 164, 291-300.
- Adam-Rodwell G, Morse MA y Stoner GD. 1993. The effects of phenethyl isothiocyanate on benzo(a)pyrene-induced tumors and DNA adducts in A/J mouse lung. *Cancer Lett* 71, 35-42.
- Adom KK, Sorrells ME y Liu RH. 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J Agric Food Chem* 51, 7825-7834.
- Agarwal S, Hordvik S y Morar S 2006. Nutritional claims for functional foods and supplements. *Toxicology* 221, 44-49.
- Aguirrezábal MM, Mateo J, Domínguez MC y Zumalacárregui JM. 2000. The effect of pprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Sci* 54, 77-81.
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R y Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89, 1881-1886.
- Ahn T, Yun CH y Oh DB. 2006. Tissue specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetics rats. *Toxicol Lett* 166, 27-36.
- AiIC. International Agency for Research on Cancer. 2006. Ingested nitrates and nitrites. En: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. Vol 94, IARC, Lyon.
- Airoidi L, Magagnotti C, Bonfanti M, Chiappetta L, Lolli M, Medana C, De Gregorio G y Fanelli R. 1994. Detection of α -butyl and α -(4-hydroxybutyl)guanine in urothelial and hepatic DNA of rats given the bladder carcinogen N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine. *Carcinogenesis* 15, 2297-2301.
- Akaike T, Okamoto S, Sawa T, Yoshitake J, Tamura F, Ichimori K, Miyazaki K, Sasamoto K y Maeda H. 2003. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 685-690.
- Akiyama H, Suzuki K, Ino T, Kadsuda I y Hirano M. 1999. Evaluation of cytarabine-induced apoptosis in leukemic cell lines; utility of annexin V method. *Rinsho Biory* 47, 774-779.
- Amagase H. 2006. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr* 136, 716-725.
- Ames BN y Gold LS. 1991. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* 250, 3-16.
- Andersson M, Agurell E, Vaghef H, Bolcsfoldi G y Hellman B. 2003. Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity *in vitro*?. *Mutat Res* 540, 43-55.
- Andersson TB, Sjoberg H, Hoffmann KJ, Boobis AR, Watts P, Edwards R, Lake BG, Price RJ, Renwich AB, Gomez-Lechon MJ y col. 2001. An assessment of human liver-derived *in vitro* systems to predict the *in vivo* metabolism and clearance of alomokant. *Drug Metab Dispos* 29, 712-720.
- Antonsson B. 2001. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killerproteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306, 347-361.
- Anzenbacher P y Anzenbacherova E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58, 737-747.
- Arora A, Siddiqui IA y Shukla Y. 2004. Modulation of p53 in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin tumors by diallyl sulfide in Swiss albino mice. *Mol Cancer Ther* 3, 1459-1466.
- Arranz N, Haza AI, García A, Rafter J y Morales P. 2007 a. Protective effects of organosulfur compounds towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol* 45, 1662-1669.
- Arranz N, Haza AI, García A, Rafter J y Morales P. 2007 b. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Toxicol In Vitro* 21, 1311-1317.
- Arranz N, Haza AI, García A, Delgado ME, Rafter J y Morales P. 2007 c. Effects of organosulfurs, isothiocyanates and vitamin C towards hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in human hepatoma cells. *Chem Biological Interact* 169, 63-71.
- Arranz N, Haza AI, García A, Delgado ME, Rafter J y Morales P. 2008. Inhibition by vitamin C of apoptosis induced by N-nitrosamines in HepG2 and HL-60 cells. *J Appl Toxicol* 28, 788-796.
- Arranz N, Haza AI, García A, Moller L, Rafter J y Morales P. 2006. Protective effects of isothiocyanates compounds

BIBLIOGRAFÍA

- towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *J Appl Toxicol* 26, 466-473.
- Arranz N. 2009. Efecto protector de compuestos organosulfurados, isotiocianatos y vitamina C frente al daño al DNA inducido por N-nitrosaminas presentes en los alimentos: Mecanismos de acción. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Arunkumar A, Vijayababu MR, Gunadharini N, Krishnamoorthy G y Arunakaran J. 2007. Induction of apoptosis and histone hyperacetylation by diallyl disulfide in prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Lett* 251, 59-67.
- Ashida H, Kihara K, Nonaka Y, Fukuda I, Shiotani B y Hashimoto T. 2001. The heterocyclic amine, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole induces apoptosis in cocultures of rat parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 177, 59-67.
- Ashok BT, Chen Y, Liu X, Bradlow HL, Mittelman A y Tiwari RK. 2001. Abrogation of estrogen-mediated cellular and biochemical effects by indole-3-carbinol. *Nutr Cancer* 41, 180-187.
- Auroma OI, Spencer JPE, Warren D, Jenner P, Buttler J y Halliwell B. 1997. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparation. *Food Chem* 60, 149-156.
- Bacon JR, Williamson G, Garner RC, Lappin G, Langou S y Bao Y. 2003. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis* 24, 1903-1911.
- Bacsi A, Chodaczek G, Hazra TK, Konkol D y Boldogh I. 2007. Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblasts cells. *Mech Ageing Dev* 128, 637-649.
- Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T, Popovtzer A y Nagler RM. 2007. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer* 109, 54-59.
- Bansal AK, Bansal M, Soni G y Bhatnagar D. 2005. Protective role of vitamin E pretreatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. *Chem Biol Interact* 156, 101-111.
- Barnes JM y Magee PN. 1954. Toxic properties of dimethylnitrosamine. *Br J Ind Med* 11, 167-174.
- Baumgart PM, Kliem HC, Gottfried-Anacker J, Wiessler M y Schmeiser HH. 1993. Site-specific mutagenesis induced by single O⁶-alkylguanines (O⁶-n-propyl, O⁶-n-butyl, O⁶-n-octyl) *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 21, 3755-3760.
- Bayliss MK y Cross DM. 2000. The importance of hepatocytes in drug metabolism studies: an industrial perspective. En: *The hepatocyte review*. Berry MN y Edwards A (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 365-389.
- Baynes JW. 2001. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol* 36, 1527-1537.
- Beda NV y Nedospasov AA. 2007. NO-dependent modifications of nucleic acids. *Russ J Bioorganic Chem* 33, 195-228.
- Belk KE. 2001. Beef decontamination technologies. Beef facts. Denver: National Cattlemen's Beef Association.
- Bellec G, Dreano Y, Lozach P, Menez JF y Berthou F. 1996. Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine N-nitrosamines by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 17, 2029-2034.
- Belloir C, Singh V, Daurat C, Siess MH y Le Bon AM. 2006. Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct- and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 44, 827-834.
- Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B y col. 1997. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNRF1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1172-1176.
- Biaudet L, Mouillet L y Debry G. 1997. Migration of nitrosamines from condoms to physiological secretion. *Bull Environ Contain Toxicol* 59, 847-853.
- Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G y Karran P. 2000. Unmasking a killer: DNA O⁶-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat Res* 462, 71-82.
- Bijur GN, Briggs B, Hitchcock CL y Williams MV. 1999. Ascorbic acid dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress. *Environ Mol Mutagen* 33, 144-152.
- Bilodeau JF, Wang M, Chung FL y Castonguay A. 1995. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on oxidative pathways in A/J mice. *Free Radic Biol Med* 18, 47-54.
- Bingham SA, Pignatelli B, Pollock J, Ellul A, Mallaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH y O'Neill IK. 1996. Does increased formation of endogenous N nitroso compounds in the human colon explain the association

BIBLIOGRAFÍA

- between red meat and colon cancer?. *Carcinogenesis* 17, 515-523.
- Blasiak J, Sikora A, Wozniak K y Drzewoski J. 2004. Genotoxicity of streptozotocin in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol* 20, 83-96.
- Block G. 1991. Vitamin C and cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 53, 270S-282S.
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, Yang CS, Zheng SF, Gail M, Li GY y col. 1993. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 85, 1483-1492.
- Boehm F, Edge R, McGarvey DJ y Truscott TG. 1998. L-Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett* 436, 387-389.
- Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bas Bueno-de-Mesquita H, van Duijnhoven FJB, Büchner FL, Key T, Boeing H y col. 2010. Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into cancer and nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 102, 529-537.
- Boiteux S. 1993. Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J Photochem Photobiol B Biol* 19, 87-96.
- Bonnett R, Holleyhead R, Johnson BL y Randall EW. 1975. Reaction of acidified nitrite solutions with peptide derivatives: evidence for nitrosamine and thionitrite formation from 15N NMR studies. *J Chem Soc* 22, 2261-2241.
- Bonora-Centelles A, Jover R, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Castell JV, Mir J y Gómez-Lechón MJ. 2008. Desarrollo, análisis y optimización de modelos celulares hepáticos para los estudios de farmacotoxicología y terapia celular. *An R Acad Nac Farm* 74, 283-306.
- Borek C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131, 1010-1015.
- Bradlow HL, Telang NT, Sepkovic DW y Osborne MP. 1996. 2-Hydroxyestrone: the "good" estrogen. *J Endocrinol* 150, S259-S265.
- Brambilla G y Martelli A. 1990. Human hepatocytes in genotoxicity assays. *Pharmacol Res* 22, 381-392.
- Brambilla-Campart GB, Canonero R, Mereto E y Ferro M. 1989. Cytotoxic and genotoxic effects of 10 N-nitroso compounds in a human hepatoma cell line (HepG2): comparison with human hepatocyte primary cultures. *ATLA* 17, 22-27.
- Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH y Schellens JHM. 2003. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 189, 233-246.
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA y Henson PM. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.
- Bröker LE, Kruyt FA y Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155-3162.
- Brooks JD, Paton VG y Vidanes G. 2001. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 10, 949-954.
- Brown CM, Reisfeld B y Mayeno AN. 2008. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev* 40, 1-100.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T y Mayer RT. 1985. Ethoxy-penthoxy and benzyloxyphexazones and homologues: a series of substrates to different induced cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* 34, 3337-3345.
- Buttke TM y Sandstrom PA. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15, 7-10.

C

- Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A y Ravanat JL. 2000. Oxidative DNA base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462, 121-128.
- Cameán AM y Repetto R. 2007. *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos, Madrid.
- Cameron E y Campbell A. 1974. The orthomolecular treatment of cancer. II. Clinical trial of high-dose ascorbic acid supplements in advanced human cancer. *Chem Biol Interact* 9, 285-315.
- Cameron E y Pauling L. 1976. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3685-3689.
- Cameron E y Pauling L. 1978. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of

BIBLIOGRAFÍA

- prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 4538-4542.
- Cancino-Badías L, Reyes RE, Nosti R, Pérez I, Dorado V, Caballero S, Soria A, Camacho- Carranza R, Escobar D y Espinosa-Aguirre JJ. 2003. Modulation of rat liver cytochrome P450 by protein restriction assessed by biochemical and bacterial mutagenicity methods. *Mutagenesis* 18, 95-100.
- Carmody RJ y Cotter TG. 2001. Signaling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 6, 77-90.
- Carr A y Frei B. 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?. *FASEB J* 13, 1007-1024.
- Cascales M. 2003. Bases moleculares de la apoptosis. *An R Acad Nac Farm* 69, 36-64.
- Cassens RG. 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol* 49, 72-79.
- Castell Ripoll JV. 2006. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Citocromo P450. Desarrollo farmacéutico y metabolismo: los problemas, las necesidades, las herramientas. Artículo 15, 469-494.
- Champagne M, Dumas P, Orlov SN, Bennett MR, Hamet P y Tremblay J. 1999. Protection against necrosis but not apoptosis by heat stress proteins in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death. *Hypertension* 33, 906-913.
- Chan A, Reiter R, Wiese S, Fertig G y Gold R. 1998. Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic cell models. *Histochem Cell Biol* 110, 553-558.
- Chandra J, Samali A y Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
- Chatterjee S, Berger SJ y Berger NA. 1999. Poly(ADP-ribose) Polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. *Mol Cell Biochem* 193, 23-30.
- Chawla SP y Chander R. 2004. Microbiology safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control* 15, 559-563.
- Chen D, Carter TH y Auburn KJ. 2004. Apoptosis in cervical cancer cells: implications for adjunct anti-estrogen therapy for cervical cancer. *Anticancer Res* 24, 2649-2656.
- Chen K, Suh J, Carr AC, Morrow JD, Zeind J y Frei B. 2000. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, 1406-1412.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shacter E y Levine M. 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 13604-13609.
- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M y Tukey RH. 2003. The role of the Ah receptor and p38 in Benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278, 19526-19533.
- Chiarugi A. 2002. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator?. The "suicide hypothesis" revisited. *Trends in Pharmacol Sci* 23, 122-129.
- Chinnaiyan A M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1, 5-15.
- Chinni SR, Li Y, Upadhyay S, Koppolu PK y Sarkar FH. 2001. Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 20, 2927-2936.
- Choi SY, Chung MJ, Lee SJ, Shin JH y Sung NJ. 2007. N-nitrosamine inhibition by strawberry, garlic, kale, and the effects of nitrite-scavenging and N-nitrosamine formation by functional compounds in strawberry and garlic. *Food Control* 18, 485-491.
- Chu YF, Sun J, Wu X y Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of vegetables. *J Agric Food Chem* 50, 6910-6916.
- Chung FL y Xu Y. 1992. Increased 8 oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcinogenesis* 13, 1260-1272.
- Chung FL, Wang M, Rivenson A, Iatropoulos MJ, Reinhardt JC, Pittman B, Ho CT y Amin SG. 1998. Inhibition of lung carcinogenesis by black tea in Fischer rats treated with a tobacco-specific carcinogen: caffeine as an important constituent. *Cancer Res* 58, 4096-4101.
- Chung FL. 1999. The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen rodents by green and black tea. *Proc Soc Exp Biol Med* 220, 244-248.
- Chung MJ, Lee SH y Sung NJ. 2002. Inhibitory effect of whole strawberries, garlic juice or kale juice on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine in humans. *Cancer Lett* 182, 1-10.
- Clopton DA y Saltman P. 1995. Low-level oxidative stress causes cell-cycle specific arrest in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210, 189-196.

BIBLIOGRAFÍA

- Coles B y Ketterer B. 1990. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25, 47-70.
- Coles BF y Kadlubar FF. 2003. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs?. *Biofactors* 17, 115-130.
- Collins AR, Dusinska M y Horská A. 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 48, 611-614.
- Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J y Willingham MC. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45, 923-934.
- Comly HH. 1945. Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *JAMA* 129, 112-116.
- Conaway CC, Jiao D y Chung FL. 1996. Inhibition of rat liver cytochrome P450 isozymes by isothiocyanates and their conjugates: a structure-activity relationship study. *Carcinogenesis* 17, 2423-2427.
- Conaway CC, Yang Y y Chung FL. 2002. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab* 3, 233-255.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M y Lunec J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17, 1214-1915.
- Cornforth DP y Jayasingh P. 2004. Colour and pigment. En: *Encyclopedia of meat sciences*. Jensen WK, Devine C y Dikeman M (eds), Elsevier Ltd, Oxford, UK., pp. 249-256.
- Cory S y Adams JM. 2002. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Corzo-Martínez M, Corzo N y Villamiel M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends Food Sci Technol* 18, 609-625.
- Cozza KL y Armstrong SC. 2001. The Cytochrome P450 System. En: *Drug interaction principles for medical practice*. American Psychiatric Publishing, Washington, DC.
- Crocker B y Hart A. 2003. Cancer and programmed cell death. *Genome Biol* 4, 318.
- chemopreventive agents. *Mutat Research* 591, 173-186.
- Daiber A, Frein D, Namgaladze D y Ullrich V. 2002. Oxidation and nitrosation in the nitrogen monoxide/superoxide system. *J Biol Chem* 277, 11882-11888.
- Dallinga JW, Pachen DMFA, Lousberg AHP, van Geel JAM, Houben GMP, Stockbrügger RW, van Maanen JMS y Kleinjans JCS. 1998. Volatile N-nitrosamines in gastric juice of patines with various conditions of the gastrointestinal tract determined by gas chromatography-mass spectrometry and related to intragastric pH and nitrate and nitrite levels. *Cancer Lett* 124, 119-125.
- Darzynkiewicz Z. 1994. Acid-induced denaturation of DNA *in situ* as a probe of chromatin structure. *Methods Cell Biol* 41, 527-541.
- Davis CD. 2007. Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention. *Exp Biol Med* 232, 176-183.
- De Ancos B, Muñoz R, Gómez R, Sánchez-Moreno C y Cano MP. 2006. Nuevos sistemas emergentes de higienización en el procesado mínimo de alimentos vegetales. En: *I Simpósio Ibero-Americano de vegetais frescos cortados*. San Pedro, SP Brazil.
- De Boer JG, Yang H, Holcroft J y Skov K. 2004. Chemoprotection against N-nitrosomethylbenzylamine-induced mutation in the rat esophagus. *Nutr Cancer* 50, 168-173.
- De Bruin EC y Medema JP. 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 34, 737-749.
- De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F y Balansky RM. 2001. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis* 22, 999-1013.
- De Kok TMCM, Engels LGJB, Moonen EJ y Kleinjans JCS. 2005. Inflammatory bowel disease stimulates formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Gut* 54, 727-734.
- De Kok TMCM, van Maanen JMS. 2000. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat Res* 463, 53-101.
- De Martino A, Filomeni G, Aquilano K, Ciriolo MR y Rotilio G. 2006. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J Nutr Biochem* 17, 742-749.
- De Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H, Wishnok JS y Tannenbaum SR. 1995. Nitric oxide induces oxidative

D

D'Agostini F, Izzotti A, Balansky R, Bennicelli C y De Flora S. 2005. Modulation of apoptosis by cancer

BIBLIOGRAFÍA

- damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8, 473-477.
- De Toro G. 2006. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.
- Decisión del Gobierno de la República de Estonia. 2000. The list of allowed contaminants in food and action of allowable concentration on food groups 12 January, No. 14, Appendix 4 (in Estonian).
- Degterev A y Yuan J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 378-390.
- Demple B y Harrison L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63, 915-948.
- Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco. 1997. Nitrito y Nitrito. En: Vigilancia de la contaminación química de los alimentos en la Comunidad Autónoma del País Vasco: 1990-1995.
- Deveraux QL y Reed JC. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.
- Dhar-Masareño M, Cárcamo JM y Golde DW. 2005. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 38, 1311-1322.
- Diamond L, Kruszewski F, Aden DP, Knowles BB y Baird WM. 1980. Metabolic activation of benzo(a)pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* 1, 871-875.
- DiBartolomeis SM y Moné JP. 2003. Apoptosis: a four-week laboratory investigation for advanced molecular and cellular biology students. *Cell Biol Educ* 2, 275-295.
- Dietrich M, Block G, Pogoda JM, Buffler P, Hecht S y Preston-Martin S. 2005. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes Control* 16, 619-635.
- Dizdaroglu M. 1994. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Meth Enzymol* 234, 3-16.
- Djenane D, Martínez L, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA y Roncalés P. 2004. Antioxidant effect of carnosine in fresh beef steaks stored under modified atmosphere. *Food Chem* 85, 453-459.
- Djenane D, Montañés L y Roncalés P. 2005. Nuevas perspectivas para la conservación natural de la carne. *Eurocarne* 133, 153-180.
- Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA y Roncalés P. 2002. Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks displayed in modified atmosphere. *Food Chem* 76, 407-415.
- Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán JA y Roncalés P. 2003. The shelf-life of beef steaks treated with DL-lactic acid and antioxidants stored under modified atmospheres. *Food Microbiol* 20, 1-7.
- Dobrucki J y Darzynkiewicz Z. 2001. Chromatin condensation and sensitivity of DNA *in situ* to denaturation during cell cycle and apoptosis, a confocal microscopy study. *Micron* 32, 645-652.
- Doctor KS, Reed JC, Godzik A y Bourne PE. 2003. The apoptosis database. *Cell Death Differ* 10, 621-633.
- Doll R y Peto R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst Monogr* 66, 1191-1308.
- Domanska K y Kowalski B. 2003. Occurrence of volatile N-nitrosamines in polish processed meat products. *Bull Vet Inst Pulawy* 47, 507-514.
- Donato MT, Lahoz A, Castell JV y Gómez-Lechón MJ. 2008. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 9, 1-11.
- Donato MT. 2006. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?. Artículo 1, 29-62.
- Donato MT; Klocke R; Castell JV; Stenzel K; Paul D y Gómez-Lechón MJ. 2003. Constitutive and inducible expression of CYP enzymes in immortal hepatocytes derived from SV40 transgenic mice. *Xenobiotica* 33, 459-473.
- Donnelly ET, McClure N y Lewis SE. 1999. The effect of ascorbate and alpha tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 14, 505-512.
- Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT y Grant MH. 1988. The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett* 5, 15-18.
- Dorai T y Aggarwal BB. 2004. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett* 215, 129-140.
- Drabløs F, Feysi E, Aas PA, Vaagbø CB, Kavli B, Brattlie MS, Peña-Díaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krokan HE. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA repair (Amst)* 3, 1389-1407.
- Dreosti IE. 1996. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr Rev* 54, S51-S58.

BIBLIOGRAFÍA

- Drewnowski A y Gómez-Careros C. 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr* 72, 1424-1435.
- Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, y Schmihl D. 1967. Organotrope carcinogen wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitrooverbindungen an BD-ratten. *Krebsforsch*. 69, 103-201.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L y Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Du L, Hoffman SM y Keeney DS. 2004. Epidermal CYP2 family cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 195, 278-287.
- Duarte TL y Lunec J. 2005. Parto f the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene expression. Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res* 39, 671-686.
- Dunkern T, Roos W y Kaina B. 2003. Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related. *Mutat Res* 544, 167-172.
- Durand P. 2002. Sustancias "indeseables". Contaminantes. Nitrosaminas. En: *Tecnología de los productos de charcutería y salazones*. Acribia, SA, Zaragoza, España.
- Duthie SJ, Ma A, Ross MA y Collins AR. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 56, 1291-1295.
- E
- Earnshaw WC, Martins LM y Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Editorial. 2001. Cancer toll falling in the USA. *Lancet* 357, 1897.
- Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Gann M, Majer BJ, Eisenbauer M y Knasmüller S. 2002 a. Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem Toxicol* 40, 1085-1090.
- Ehrlich V, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Zsivkovits M y Knasmüller S. 2002 b. Fumonisin B(1) is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis* 17, 257-260.
- Eichholzer M y Gutzwiller F. 2003. Dietary nitrates, nitrites and N-nitroso compounds and cancer risk with special emphasis on the epidemiological evidence. En: *Food safety: contaminants and toxins*. D'Mello JPF (ed), Scottish Agricultural College. Edinburgh, UK, pp. 217-234.
- Eisenbrand G, Fuchs A y Koehl W. 1996. N-nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *Eur J Cancer Prev* 5, 41-46.
- Eisenbrand G, Habs M, Schmähel D y Preussmann R. 1980. Carcinogenicity of N-nitroso-3-hydroxypyrrolidine and dose-response study with N-nitrosopiperidine in rats. *IARC Sci Publ* 31, 657-666.
- Elbekai RH, Duke J y El-Kadi AOS. 2007. Ascorbid acid differentially modulates the induction of heme oxygenase-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and glutathione S-transferase Ya by As³⁺, Cd²⁺ and Cr⁶⁺. *Cancer Lett* 246, 54-62.
- Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M y Makela S. 1998. Nitrite and nitrate analysis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31, 195-220.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Epe B. 1991. Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact* 80, 239-260.
- Erkekoglu P y Baydar T. 2010. Evaluation of the protective effect of ascorbic acid on nitrite- and nitrosamine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatoma line. *Toxicol Mech Methods* 20, 42-52.
- Espósito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F y Giugliano D. 2004. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 292, 1440-1446.
- Esposito MD. 2002. The roles of Bid. *Apoptosis* 7, 433-440.
- Evan G y Littlewood T. 1998. A matter of life and cell death. *Science* 28, 1317-1322.
- Evan G y Vousden K. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Evans MD, Dizdaroglu M y Cooke MS. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567, 1-61.
- F
- Fajen JM, Carson GA, Rounbehler DP, Fan TY, Vita R, Goff UE, Wolf MH, Edwards GS, Fine DH, Reinhold V y col. 1979. N-Nitrosamines in the rubber and tire industry. *Science* 205, 1262-1264.

BIBLIOGRAFÍA

- Fardel O, Morel F, Ratanasavanh D, Fautrel A, Beaune P y Guillouzo A. 1992. Expression of drug metabolizing enzymes in human Hep G2 hepatoma cells. *Cell Mol Aspects Cirrhosis* 216, 327-330.
- Farkas J. 2000. Spices and herbs. En: *The microbiological safety and quality of food*. Baird Parker TC, Lund BM y Gould GW (eds). Aspen Publishers, pp 897-918.
- Feierman DE, Melinkov Z y Nanji AA. 2003. Induction of CYP3A by ethanol in multiple *in vitro* and *in vivo* models. *Alcohol Clin Exp Res* 27, 981-988.
- Feig DI, Reid TM y Loeb LA. 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54, 1890s-1894s.
- Feig DL y Loeb LA. 1993. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduce fidelity of mammalian DNA polymerase B. *Biochemistry* 32, 4466-4473.
- Feng Q, Kumagai T, Nakamura Y, Uchida K y Osawa T. 2002. Induction of cytochrome P4501A1 by autoclavable culture medium change in HepG2 cells. *Xenobiotica* 32, 1033-1043.
- Fennema R. 2000. Aditivos alimentarios. En: *Química de los alimentos*. Fennema R (ed), Acribia SA, Zaragoza, pp. 495-650.
- Ferguson LR, Philpott M y Karunasinghe N. 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198, 147-159.
- Ferguson LR. 2002. Natural and human-made mutagens and carcinogens in the human diet. *Toxicology* 181, 79-82.
- Fiddler W, Pensabene JW, Gates RA y Adam R. 1998. Nitrosamine formation in processed hams as related to reformulated elastic rubber netting. *J Food Sci* 63, 276-278.
- Filho PJS, Ríos A, Valcárcel M y Carabao EB. 2003. Development of a new method for the determination of nitrosamines by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Water Res* 37, 3837-3842.
- Fimognari C, Nüsse M, Cesari R, Lori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. 2002. Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis* 23, 581-586.
- Finkel T y Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 208, 239-247.
- Firestone GL y Bjeldanes LF. 2003. Indole-3-carbinol and 3-3'-diindolylmethane antiproliferative signaling pathways control cell-cycle gene transcription in human breast cancer cells by regulating promoter- Sp1 transcription factor interactions. *J Nutr* 133, 2448S-2455S.
- Fischer-Nielsen A, Jeding IB y Loft S. 1994. Radiation induced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 15, 1609-1612.
- Fleischauer AT y Arab L. 2001. Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J Nutr* 131, 1032S-1040S.
- Fournier D, Hawari J, Streger SH, McClay K y Hatzinger PB. 2006. Biotransformation of N-nitrosodimethylamine by *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl Environ Microbiol* 72, 6693-6698.
- Frei B y Trabe MG. 2001. The new US dietary reference intakes for vitamins C and E. *Redox Rep* 6, 5-9.
- Frei E, Gilberg F, Schröder M, Breuer A, Edler L y Wiessler M. 1999. Analysis of the inhibition of N-nitrosodimethylamine activation in the liver by N-nitrosodimethylamine using a new non-linear statistical method. *Carcinogenesis* 20, 459-464.
- Freund HA. 1937. Clinical manifestation and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann Int Med* 10, 1144-1155.
- Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M y Aviram M. 2000. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid Redox Signal* 2, 491-506.
- Fujita K y Kamataki T. 2001 a. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mutat Res* 483, 35-41.
- Fujita KI y Kamataki T. 2001 b. Screening of organosulfur compounds as inhibitors of human CYP2A6. *Drug Metab Dispos* 29, 983-989.
- Fussgaenger RD y Ditschuneit H. 1980. Lethal exitus of a patient with N-nitrosodimethylamine poisoning, 2.5 years following the first ingestion and signs of intoxication. *Oncology* 37, 273-277.

G

- Gábelová A, Bacová G, Slamenová D y Périn F. 1998. Use of repair endonucleases for characterization of DNA damage induced by N-heterocyclic aromatic hydrocarbons. *Acta Biochim Pol* 45, 203-208.

BIBLIOGRAFÍA

- Galeone C, Pelucchi C, Levi F, Negri E, Francheschi S, Talamini R, Giacosa A y La Vecchia C. 2006. Onion and garlic use and human cancer. *Am J Clin Nutr* 84, 1027-1032.
- Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, Shiels M, Hammond E, Robinson KA, Caulfields LE y col. 2008. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 88, 372-383.
- Gamet-Payrastra L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J y Tercé F. 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60, 1426-1433.
- García A, Haza AI, Arranz N, Delgado E y Morales P. 2008. Efecto protector de compuestos organosulfurados, isotiocianatos y vitamina C frente al daño oxidativo y alquilativo al DNA inducido por N-Nitrosaminas. *Alimentaria* 391, 104-105.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C y Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13, 1423-1433.
- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P y col. 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 10, 1239-1248.
- Gerhäuser C, Klimo K, Keiss E, Neumann I, Gamal-Eldeen A, Knauft J, Liu GY, Sitthimonchai S y Frank N. 2003. Mechanism-based *in vitro* screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 523-524, 163-172.
- Gerson SL, Trey JE, Miller K y Berger NA. 1986. Comparison of O⁶ alkylguanine DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 7, 745-749.
- Gerson SL. 2004. MGMT: its role in cancer etiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4, 296-307.
- Ghibelli L, Coppola S, Fanelli C, Rotillo G, Civitareale P, Scovassi AI y Ciriolo MR. 1999. Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *FASEB J* 13, 2031-2036.
- Gill CO y Landers C. 2004. Microbiological conditions of detained beef carcasses before and after removal of visible contamination. *Meat Sci* 66, 335-342.
- Glória MBA, Barbour JF y Scanlan RA. 1997. Volatile nitrosamines in fried bacon. *J Agric Food Chem* 45, 1816-1818.
- Glucksmann A. 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26, 59-86.
- Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PARA, Nunes RA, Saito EH, Higa C, Filho IM, Kruehl CDP, Schirmer CC y col. 2002. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis* 23, 611-616.
- Goldring CE, Kitteringham NR, Jenkins R, Lovatt CA, Randle LE, Abdullah A, Owen A, Liu X, Butler PJ, Williams DP y col. 2006. Development of a transactivator in hepatoma cells that allows expression of phase I, phase II, and chemical defense genes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, 104-115.
- Gómez-Lechón MJ, Donato T, Ponsoda X, Fabra R, Trullenque R y Castell JV. 1997. Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. En: Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research, *in vitro* methods in pharmaceutical research. Castell JV y Gómez-Lechón MJ (eds), Academic Press, London, pp. 129-153.
- Gómez-Lechón MJ, O'Connor E, Castell JC y Jover R. 2002. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Toxicol Sci* 65, 299-308.
- Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA y Thorgeirsson SS. 2008. Hepatocyte-specific c-met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283, 14581-14589.
- González FJ y Kimura S. 2001. Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat Res* 447, 79-87.
- González-Alatorre G, Jiménez J y Rodríguez FH. 2001. Estudio fisicoquímico de las reacciones de nitrosación de aminas en medio acuoso. *Av Ing Quím* 9, 33-37.
- Gorczyca W, Gong J y Darzynkiewicz Z. 1993. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53, 1945-1951.
- Gorman A, McGowan A y Cotter TG. 1997. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* 404, 27-33.
- Gottlieb E, Vander Heiden MG y Thompson GB. 2000. Bcl-xL prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 5680-5689.
- Gray R, Peto R, Brantom P y Grasso P. 1991. Chronic nitrosamine ingestion in 1040 rodents: the effect of the choice of nitrosamine, the species studied, and the age of starting exposure. *Cancer Res* 51, 6470-6491.

BIBLIOGRAFÍA

- Green RM, Hodges NJ, Chipman JK, O'Donovan MR y Graham M. 2008. Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Mutagenesis* 23, 457-463.
- Greenwald P. 2002. Cancer chemoprevention. *BMJ* 324, 714-718.
- Grill JP, Crociani J y Ballongue J. 1995. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Lett Appl Microbiol* 20, 328-330.
- Grubbs C, Steele V, Casebolt T, Juliana MM, Eto L, Whitaker LM, Dragnev KH, Kelloff GJ y Lubet RL. 1995. Chemoprevention of chemically induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res* 15, 709-716.
- Guarnieri S, Riso P y Porrini M. 2007. Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. *Br J Nutr* 97, 639-643.
- Guengerich FP. 2001. Uncommon P450-catalyzed reactions. *Curr Drug Metab* 2, 93-115.
- Guevara G, Galeano L y Flórez AL. 2000. Evaluación genotóxica del etopósido (VP16) en cultivos celulares estimulados con fitohemaglutinina. *Rev Colomb Cancerol* 6, 23-32
- Guney M, Oral B, Take G, Giray SG y Mungan T. 2007. Effect of fluoride intoxication on endometrial apoptosis and lipid peroxidation in rats: role of vitamins E and C. *Toxicology* 231, 215-223.
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH y Le Bon AM. 2000. Liver subcellular fractions from rats treated by organosulfur compounds from *Allium* modulate mutagen activation. *Mutat Res* 466, 17-26.
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH y Le Bon AM. 2001. Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutat Res* 495, 135-145.
- Guyonnet D, Siess MH, Le Bon AM y Suschetet M. 1999. Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from *allium* vegetables in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* 154, 50-58.
- Hagerman GH, van Herwijnen MHM, Schilderman PAEL, Rhijnsburger EH, Moonen EJC y Kleinjans JCS. 1997. Reducing effects of garlic constituents on DNA adduct formation in human lymphocytes in vitro. *Nutr Cancer* 27, 177-185.
- Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S y Satoh T. 2005. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* 20, 217-228.
- Hall J, Brésil H y Montesano R. 1985. O⁶ alkylguanine DNA alkyltransferase activity in monkey, human and rat liver. *Carcinogenesis* 6, 208-211.
- Halliwell B y Gutteridge JM. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501-514.
- Halliwell B. 1996. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 25, 57-74.
- Halliwell B. 2001. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 475, 29-35.
- Hampton MB, Fadeel B y Orrenius S. 1998. Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 854, 328-335.
- Haracska L, Yu SL, Johnson RE, Prakash L y Prakash S. 2000. Efficient and accurate replication in the presence of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase. *Nat Genet* 25, 458-461.
- Harris CC y Hollstein M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-1327.
- Hashimoto T, Ashida H, Sano T, Furuyashiki T, Hatanaka Y, Minato K, Mizuno M, Nomura K, Kumatori A, Kanazawa K y col. 2001. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) induces caspase-dependent apoptosis in mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 1539, 44-57.
- Hashimoto T, Sano T, Ito W, Kanazawa K, Danno GI y Ashida H. 2004. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole induces apoptosis and necrosis with activation of different caspases in rat splenocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 964-967.
- Haytowitz DB. 1995. Information from USDA's Nutrient Data Bank. *J Nutr* 125, 1952-1955.
- Haza AI, Glinghammar B, Grandien A y Rafter J. 2000. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr Cancer* 36, 79-89.
- Haber-Mignard D, Suschetet M, Berges R, Astorg P y Siess MH. 1996. Inhibition of aflatoxin B1- and N-nitrosodiethylamine induced liver preneoplastic foci in rats fed naturally occurring allyl sulfides. *Nutr Cancer* 25, 61-70.

H

BIBLIOGRAFÍA

- Heaney ML, Gardner JR, Karasavvas N, Golde DW, Scheinberg DA, Smith EA y O'Connor A. 2008. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res* 68, 8031-8038.
- Hecht SS. 1994. Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines- a model for cancer prevention strategies. *Drug Metab Rev* 26, 373-390.
- Hecht SS. 1995. Chemoprevention by isothiocyanates. *J Cell Biochem* 22, 195-209.
- Hecht SS. 1999. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *J Nutr* 129, 768-774.
- Hecht SS. 2000. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 32, 395-411.
- Hecht SS. 2008. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 21, 160-171.
- Helen A, Rajasree CR, Krishnamur K, Augusti KT y Vijayammal PL. 1999. Antioxidant role of oils isolated from garlic (*Allium sativum* Linn) and onion (*Allium cepa* Linn) on nicotine induce lipid peroxidation. *Vet Hum Toxicol* 41, 316-319.
- Helleday T, Bryant HE y Schultz N. 2005. Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP-1) in homologous recombination as a target for cancer therapy. *Cell Cycle* 4, 1176-1178.
- Hernández M y Sastre A. 1999. Carcinógenos y anticarcinógenos de la dieta. En: *Tratado de Nutrición*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 1147-1157.
- Herron DC y Shank RC. 1980. Methylated purines in human liver DNA after probable dimethylnitrosamine poisoning. *Cancer Res* 40, 3116-3117.
- Hewitt NJ, Bühring KU, Desenbrock J, Haunschild J, Ladstetter B y Utesch D. 2001. Studies comparing *in vivo/ in vitro* metabolism of three pharmaceutical compounds in rat, dog, monkey, and human using cryopreserved hepatocytes, microsomes, and collagen gel immobilized hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos* 29, 1042-1050.
- Heyns K. 1977. Lebensmittel-chemische probleme aus der Sicht des Naturstoffchemikers. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* 73, 111-113.
- Hickman M y Samson LD. 1999. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10764-10769.
- Higuchi M, Proske RJ y Yeh ETH. 1998. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17, 2515-2524.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM y Martin SJ. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23, 2134-2145.
- Hiramoto K, Ryuno Y y Kikugawa K. 2002. Decomposition of N-nitrosamines, and concomitant release of nitric oxide by Fenton reagent under physiological conditions. *Mutat Res* 520, 103-111.
- Hirose M, Uwagawa S, Ozaki K, Takaba K y Ito N. 1991. Effects of butylated hydroxyanisole pretreatment on low dose N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine- or N,N-dibutyl nitrosamine-induced rat forestomach or esophageal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 12, 1773-1776.
- Hirose Y, Sugie S, Yoshimi N, Matsunaga K, Hara A y Mori H. 1998. Induction of apoptosis in colonic epithelium treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and its modulation by a P4501A2 inducer, beta-naphthoflavone, in male F344 rats. *Cancer Lett* 123, 167-172.
- Ho YS, Lee HM, Chang CR y Lin JK. 1999. Induction of Bax protein and degradation of lamin A durin p53-dependent apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 57, 143-154.
- Hodgson E y Goldstein JA. 2001. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. En: *Introduction to biochemical toxicology*. Hodgson E y Smart RC (eds), Wiley-Interscience, New York, pp. 67-112.
- Hoffmann D y Hecht SS. 1985. Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Res*. 45, 935-944.
- Hofnung M y Quillardet P. 1986. Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis* 1, 19-30.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B y Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-52.
- Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebø S, Solhaug A, Tekpli X, Landvik NE, Huc L, Fardel O y Lagadic-Gossmann D. 2007. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells. *Chem Biol Interac*. 167, 41-55.
- Holme JA, Wiger R, Hongslo JK, Soderlund E, Brunborg G y Dybing E. 1997. Cell death via interactions of agents with DNA. *Adv Mol Cell Biol* 20, 145-182.
- Holst B y Williamson G. 2004. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* 21, 425-447.

BIBLIOGRAFÍA

- Hong C, Kim HA, Firestone GL y Bjeldanes LF. 2002. 3,3'-Diindolylmethane (DIM) induces a G1 cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21WAF1/ CIP1 expression. *Carcinogenesis* 23, 1297-1305.
- Hong SW, Jin DH, Hahm ES, Yim SH, Lim JS, Kim KI, Yang Y, Lee SS, Kang JS, Lee WJ y col. 2007. Ascorbate (vitamin C) induces cell death through the apoptosis-inducible factor in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 18, 811-815.
- Hong YS, Ham YA, Choi JH y Kim J. 2000. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp Mol Med* 32, 127-134.
- Honikel KO. 2004. Curing agents. En: *Encyclopedia of meat sciences*. Jensen WK, Devine C y Dikeman M (eds), Elsevier Ltd, Oxford, UK, pp. 195-201.
- Horn TL, Reichert MA y Bliss RL. 2002. Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland and P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatments of rats with indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol* 64, 393-404.
- Horvitz HR, Ellis HM y Sternberg PW. 1982. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment* 1, 56-65.
- Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LAG, Rosenberg HM, Feigal EG y Edwards BK. 2001. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 Through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 93, 824-842.
- Hsu CC, Huang CN, Hung YC y Yin MC. 2004. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr* 134, 149-152.
- Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R y Dixit VM. 1997. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-17257.
- Hu X y Singh SV. 1997. Glutathione S-transferases of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic. *Arch Biochem Biophys* 340, 279-286.
- Huang C, Ma W, Li J, Hecht SS y Dong Z. 1998. Essential role of p53 in phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis. *Cancer Res* 58, 4102-4106.
- Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson J y Hunter T. 2000. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275, 26661-26664.
- Huang RS, Huang SM, Lin BS, Hung CY y Lu HT. 2002. N-Acetylcysteine, vitamin C and vitamin E diminish homocysteine thiolactone-induced apoptosis in human promyeloid HL-60 cells. *J Nutr* 132, 2151-2158.
- Hudges CM, Lewis SEM, McKelvey-Martin VJ y Thompson W. 1998. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 13, 1240-1247.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S y Livingston EH. 2007. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 139, 143-156.
- Hyun JW, Jung YC, Kim HS, Choi EY, Kim JE, Yoon BH, Yoon SH, Lee YS, Choi J, You HJ y col. 2003. 8-Hydroxydeoxyguanosine causes death of human leukemia cells deficient in 8-oxoguanine glycosylase 1 activity by inducing apoptosis. *Mol Cancer Res* 1, 290-299.
- Iavicoli I y Carelli G. 2006. Evaluation of occupational exposure to N-nitrosamines in a rubber-manufacturing industry. *J Occup Environ Med* 48, 195-198.
- Ibuki Y y Goto R. 2004. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1690, 11-21.
- Ide N y Lau BHS. 1997. Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *J Pharm Pharmacol* 49, 908-911.
- Igney FH y Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-288.
- Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI y Cambero MI. 1998. Mutagenic activity of N-nitrosamines evaluated by the Ames test when using different levels of lyophilized and frozen S9 fraction. *Arch Lebensmittelhyg* 49, 25-38.
- Ikken Y, Morales P, Martínez A, Marín ML, Haza AI y Cambero MI. 1999. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J Agric Food Chem* 47, 3257-3264.
- Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H y Itakura Y. 1994. Antioxidants and free radical scavenging effects of garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60, 417-420.
- Inoue S y Kawanishi S. 1995. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 371, 86-88.

- Instituto Federal para la Valoración del Riesgo (Alemania) (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR). 2004. Nitrate in vegetables.
- Ioannides C. 1999. Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P-450. *Xenobiotica* 29, 109-154.
- Ireland CB, Hytrek FP y Lasoski BA. 1980. Aqueous extraction of N-nitrosamines from elastomers. *Am Ind Hyg Assoc J* 41, 895-900.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann B, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C y col. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Irving CC y Daniel DS. 1987. Influence of disulfiram on the metabolism of the urinary bladder carcinogen N'-butyl-N'-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the rat. *Carcinogenesis* 8, 1309-1315.
- Irving CC y Daniel DS. 1988. Inhibition of the oxidation of the urinary bladder carcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine by pyrazole and 4-substituted pyrazoles. *Biochem Pharmacol* 37, 1642-1644.
- Irving CC. 1988. Oxidation of N-butyl-N-(3-formylpropyl) nitrosamine to N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine in rat liver and inhibition by disulfiram. *Carcinogenesis* 9, 2109-12.
- Ito N. 1976. Early changes caused by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. *Cancer Res* 36, 2528-2531.
- J**
- Jablonski J, Jablonska E y Chojnowski M. 2001. The influence of very low doses of N-nitrosodimethylamine (NDMA) on the apoptosis of rat neutrophils *in vivo*. The role of reactive oxygen species. *Toxicology* 165, 65-74.
- Jacobson JS, Begg MD, Wang LW, Wang Q, Agarwal M, Norkus E, Singh VN, Young TL, Yang D y Santella RM. 2000. Effects of a 6-month vitamin intervention on DNA damage in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 1303-1311.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Nishioka N, Nakabeppu Y y Gores GJ. 2001. Human OGG1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res* 61, 6388-6393.
- Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibáñez R, Amiano P, Pera G, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlague MD, Dorransoro M y col. 2006 a. Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutr* 9, 785-791.
- Jakszyn P, Bingham S, Pera G, Agudo A, Luben R, Welch A, Boeing H, Del Giudice G, Palli D, Saieva C y col. 2006 b. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* 27, 1497-1501.
- Jamison JM, Gilloteaux J, Nassiri MR, Venugopal M, Neal DR y Summers JL. 2004. Cells cycle arrest and autschizis in a human bladder carcinoma cell line following vitamin C and vitamin K3 treatment. *Biochem Pharmacol* 67, 337-351.
- Janzowski C, Landsiedel R, Gölzer P y Eisenbrand G. 1994. Mitochondrial formation of β -oxopropyl metabolites from bladder carcinogenic ω -carboxyalkylnitrosamines. *Chem Biol. Interact* 90, 23-33.
- Jerome KR y Chen Z. 2000. Apoptosis in HL-60 cells and topoisomerase I *in vivo*. *Arch Pathol Lab Med* 124, 802.
- Jiang XJ y Wang XD. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73, 87-106.
- Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García C. 2000. Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol* 3, 333-340.
- Jordán J. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22, 100-106.
- Jordan VC, Schafer JM, Levenson AS, Liu H, Pease KM, Simons LA y Zapf JW. 2001. Molecular classification of estrogens. *Cancer Res* 61, 6619-6623.
- Joshi UM, Kodavanti PR y Mehendale HM. 1998. Glutathione metabolism and utilization of external tilos by cigarette smoke-challenged, isolated rat and rabbit lungs. *Toxicol Appl. Pharmacol* 96, 324-335.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L y col. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554.
- Jurado-Sánchez B, Ballesteros E y Gallego M. 2007. Gas chromatographic determination of N-nitrosamines in beverages following automatic solid-phase extraction. *J Agric Food Chem* 55, 9758-9763.
- K**
- Kaina B, Christmann M, Naumann S y Roos WP. 2007. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA repair (Amst)* 6, 1079-1099.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaina B, Ziouta A, Ochs K y Coquerelle T. 1997. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res* 381, 227-241.
- Kamatani T, Fujita K, Nakayama K, Yamazaki Y, Miyamoto M y Ariyoshi N. 2002. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP. *Drug Metab Rev* 34, 667-676.
- Kamiya H, Suzuki A, Kawai K, Kasai H y Harashima H. 2007. Effects of 8-hydroxy-GTP and 2-hydroxy-ATP on *in vitro* transcription. *Free Radic Biol Med* 43, 837-843.
- Kanki K, Nishikawa A, Masumura K, Umemura T, Imazawa T, Kitamura Y, Nohmi T y Hirose M. 2005. *In vivo* mutational analysis of liver DNA in gpt delta transgenic rats treated with the hepatocarcinogens N-nitrosopyrrolidine, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Mol Carcinog* 42, 9-17.
- Kannan K y Jain SK. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153-163.
- Karasavvas N, Cárcamo JM, Stratis G y Golde DW. 2005. Vitamin C protects HL60 and U266 cells from arsenic toxicity. *Blood* 105, 4004-4012.
- Karlsson H. 2006. Particularly harmful particles?: a study of airborne particles with a focus on genotoxicity and oxidative stress. Tesis doctoral. Karolinska Institutet, Stockholm.
- Kasai H y Nishimura S. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* 12, 2137-2145.
- Kassie F y Knasmüller S. 2000. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem Biol Interact* 127, 163-180.
- Kassie F, Laky B, Gminski R, Mersch-Sudermann V, Scharf G, Lhoste E y Knasmüller S. 2003. Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. *Chem Biol Interact* 142, 285-296.
- Kassie F, Laky B, Nobis E, Kundi M y Knasmüller S. 2001. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. *Mutat Res* 490, 1-9.
- Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, Watanabe K, Fukuda T, Nashimoto A, Honma K y Suzuki T. 2001. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer* 92, 634-641.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S y Ma N. 2006. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. *Biol Chem* 387, 365-372.
- Keck AS, Qiao Q y Jeffery EH. 2003. Food matrix effects on bioactivity of broccoli derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats. *J Agric Food Chem* 51, 3320-3327.
- Kerr JF, Wyllie AH y Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kessova I y Cederbaum AI. 2003. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 3, 509-518.
- Keum YS, Jeong WS y Kong AN. 2004. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* 555, 191-202.
- Khan N, Adhami VM y Mukhtar H. 2008. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* 76, 1333-1339.
- Kim BJ, Ryu SW y Song BJ. 2006 b. JNK- and p38 Kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 281, 21256-21265.
- Kim D, Wu ZL y Guengerich FP. 2005 a. Analysis of coumarin 7-hydroxylation activity of cytochrome P450 2A6 using random mutagenesis. *J Biol Chem* 280, 40319-40327.
- Kim HJ, Chun HS y Yang R. 2001. Use of a cyclodextrin for increased protective activity of volatile allyl sulfides against benzo[a]pyrene-induced toxicity in human cell model. *Biotechnol Lett* 23, 583-587.
- Kim JG, Koh SH, Lee YJ, Lee KY, Kim Y, Kim S, Lee MK y Kim SH. 2005 b. Differential effects of diallyl disulfide on neuronal cells depend on its concentration. *Toxicology* 211, 86-96.
- Kim KN, Pie JE, Park JH, Park YH, Kim YW y Kim MK. 2006 a. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem* 17, 454-462.
- Kinoshita M, Eguchi Y y Hynynen K. 2007. Activation of Bak in ultrasound-induced, JNK- and p38-independent apoptosis and its inhibition by Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 515-521.

- Kitts DD. 1994. Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Can J Physiol Pharmacol* 72, 423-424.
- Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ y Ehrlich V. 2004. Structurally related mycotoxins, ochratoxin A, ochratoxin B, citrinin differ in their genotoxic activities, and in their mode of action in human derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. *Nutr Cancer* 50, 190-197.
- Knasmüller S, Friesen MD, Holme JA, Alexander J, Sanyal R, Kassie F y Bartsch F. 1996. Effects of phenethyl isothiocyanate on metabolism and on genotoxicity of dimethylnitrosamine and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Mutat Res* 350, 93-102.
- Knasmüller S, Hubber WW, Kienzl H y Schulte-Hermann R. 1992. Inhibition of repairable DNA-damage in *Escherichia coli* K-12 cells recovered from various organs of nitrosamine-treated mice by vitamin A, phenethylisothiocyanate, oleic acid and triolein. *Carcinogenesis* 13, 1643-1650.
- Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A y van Staveren WA. 2004. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 292, 1433-1439.
- Knoops KT, Groot de LC, Fidanza F, Alberti-Fidanza A, Kromhout D y van Staveren WA 2006. Comparison of three different dietary scores in relation to 10-year mortality in elderly European subjects: the HALE project. *Eur J Clin Nutr* 60, 746-755.
- Knowles BB, Howe CC y Aden DO. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Knowles LM y Milner JA. 1998. Depressed p34cdc2 kinase activity and G2/M phase arrest induced by diallyl disulfide in HCT-15 cells. *Nutr Cancer* 30, 169-174.
- Knowles LM y Milner JA. 2000. Allyl sulfides modify cell growth. *Drug Metabol Drug Interact* 17, 81-107.
- Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmöller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U y col. 2002. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 30, 1108-1114.
- Koh SH, Kwon H, Park KH, Ko JK, Kim JH, Hwang MS, Yum YN, Kim OH, Kim J, Kim HT y col. 2005. Protective effect of diallyl disulfide on oxidative stress-injured neuronally differentiated PC12 cells. *Mol Brain Res* 133, 176-186.
- Kohen R y Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30, 620-650.
- Kok FJ y Kromhout D. 2004. Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 43, 2-5.
- Kondentsova M, Vrzhesinkaia OA, Beketova NA, Gobulev FV y Gorbunov IuN. 2002. Vitamin composition in wild onion species. *Vopr Pitan* 71, 3-6.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR y col. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
- Krol B y Tinbergen BJ. 1974. Proceedings of the International Symposium on Nitrite in Meat Products. PUDOC, Wageningen, Netherlands.
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH y Kirchhoff S. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.
- Krul CA, Zeilmaker MJ, Schothorst RC y Havenaar R. 2004. Intra-gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food Chem Toxicol* 42, 51-63.
- Krysko O, de Ridder L y Cornelissen M. 2004. Phosphatidylserine exposure during early primary necrosis (oncosis) in JB6 cells as evidenced by immunogold labeling technique. *Apoptosis* 9, 495-500.
- Kumala S, Niemiec P, Widel M, Hancock R y Rzeszowska-Wolny J. 2003. Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents. *Cell Mol Biol Lett* 8, 655-665.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N y Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171, 4672-4679.
- Kushida H, Fujita KI, Suzuki A, Yamada M, Endo T, Nohmi T y Kamataki T. 2000. Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Samonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* 21, 1227-1232.
- Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR y Park BH. 2002. Induction of

- apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 63, 41-47.
- L
- Laky B, Knasmüller S, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Verkerk R, Freywald C, Uhl M y Kassie F. 2002. Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol* 40, 1077-1083.
- Lampe JW y Peterson S. 2002. *Brassica*, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *J Nutr* 132, 2991-2994.
- Lamy E, Schröder J, Paulus S, Brenk P, Stahl T y Mersch-Sundermann V. 2008. Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucic acid in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food Chem Toxicol* 46, 2415-2421.
- Landvik NE, Gorria M, Aert VM, Asare N, Solhaug A, Lagadic-Gossmann D y Holme JA. 2007. Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signaling related to apoptosis: Possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects. *Toxicology* 231, 159-174.
- Lazarová M y Slamenová D. 2004. Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells *in vitro*; the effects of vitamins E and C. *Mutat Res* 557, 167-175.
- Le Page F, Kwok EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A y Cooper PK. 2000. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 101, 159-171.
- Leanderson P y Tagesson C. 1990. Cigarette smoke-induced DNA-damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chem Biol Interact* 75, 71-81.
- Leanderson P y Tagesson C. 1992. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact* 810, 197-208.
- LeBel CP, Ischiropoulos H y Bondy SC. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227.
- LeCluyse EL. 2001. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P-450 expression and regulation. *Eur J Pharmac Sci* 13, 343-368.
- Lee AJ, Hodges NK y Chipman JK. 2004. Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility. *Biomarkers* 9, 103-115.
- Lee KW, Lee HJ, Surh YJ y Lee CY. 2003. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *Am J Clin Nutr* 78, 1074-1078.
- Leist M y Jaattela M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Leistner L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol* 55, 181-186.
- Leite M, Quinta-Costa M, Leite PS y Guimaraes JE. 1999. Critical evaluation of techniques to detect and measure cell death-study in a model of UV radiation of the leukaemic cell line HL-60. *Anal Cell Pathol* 19, 139-151.
- Levine B y Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levine B y Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Lewis S, Brennan P, Nyberg F, Ahrens W, Constantinescu V, Mukeria A, Benhamou S, Batura-Gabryel H, Brüske-Hohfeld I, Simonato L y col. 2001. Re: Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, Pillow PC, Amos CI, Lei L, de Andrade M, Gu X, Hong WK y Wu X. 2000. Dietary intake of isothiocyanates evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Oncology* 10, 1105-1106.
- Li H, Zhu H, Xu CJ y Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-500.
- Li JJ, Tang Q, Li Y, Hu BR, Ming ZY, Fu Q, Qian JQ y Xiang JZ. 2006. Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced formation by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1078-1084.
- Li LY, Luo X. Y Wang X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li X, Shi ZM, Feng P, Wen ZY y Wang XJ. 2007. Effect of Qi-protecting powder (Hugi San) on expression of c-jun, c-fos and c-myc in diethylnitrosamine-mediated hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 13, 4192-4198.

BIBLIOGRAFÍA

- Li Y y Schellhorn HE. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr* 137, 2171-2184.
- Liehr JG. 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?. *Endocr Rev* 21, 40-54.
- Lijinsky W y Kovatch RM. 1989. Carcinogenesis by nitrosamines and azoxyalkanes by different routes of administration to rats. *Biomed Env Sci* 2, 154-159.
- Lijinsky W y Reuber MD. 1981. Carcinogenic effect of nitrosopyrrolidine, nitrosopiperidine and nitrosohexamethyleneimine in Fischer rats. *Cancer Lett* 12, 99-103.
- Lijinsky W y Reuber MD. 1983. Carcinogenesis in fischer rats by nitrosodipropylamine, nitrosodibutylamine and nitrosobis (2-oxopropyl)amine given by gavage. *Cancer Lett* 19, 207-213.
- Lijinsky W, Keefer L, Loo J y Roos AE. 1973. Studies of alkylation of nucleic acids by cyclic Nitrosamines. *Cancer Res* 33, 1634-1641.
- Lijinsky W. 1999. N-nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443, 129-138.
- Limpens J, Schröder FH, de Ridder CMA, Bolder CA, Wildhagen MF, Obermüller-Jevic UC, Krämer K y van Weerden WM. 2006. Combined Lycopene and Vitamin E treatment suppresses the growth of PC-346C human prostate cancer cells in nude mice. *J Nutr* 136, 1287-1293.
- Lin HL y Hollenberg PF. 2001. N-Nitrosodimethylamine-mediated formation of oxidized and methylated DNA bases in a cytochrome P450 2E1 expressing cell Line. *Chem Res Toxicol* 14, 562-566.
- Lin HL, Parsels LA, Maybaum J y Hollenberg PF. 1999. N-Nitrosodimethylamine-mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: Evidence for apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 157, 117-124.
- Lin K, Shen W, Shen Z, Cai S y Wu Y. 2003 a. Estimation of the potential for nitrosation and its inhibition in subjects from high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 107, 891-895.
- Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y y Lu S. 2002. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in habitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 102, 207-211.
- Lin M, Xie HL, Su Q, Zhou JG, Tan H, Yi L, Tang HL, Huang Y y Shi Y. 2007. Effects of diallyl disulfide on differential expression of apoptosis-associated genes in leukemia cell line HL-60. *Ai Zheng* 26, 351-356.
- Lin S, Fuji M y Hou DX. 2003 b. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway. *Arch Biochem Biophys* 418, 99-107.
- Lindner E. 1995. Toxicología de los alimentos. Acibria SA. Zaragoza. España.
- Linseisen J y Rohrmann S. 2008. Biomarkers of dietary intake of flavonoids and phenolic acids for studying diet-cancer relationship in humans. *Eur J Nutr* 47, 60-68.
- Liu C, Russell RM y Wang XD. 2004. α -Tocopherol and ascorbic acid decrease the production of β -apocarotenals and increase the formation of retinoids from h-carotene in the lung tissues of cigarette smoke-exposed ferrets *in vitro*. *J Nutr* 134, 426-430.
- Liu CY, Pan PC, Wu MT, Ho CK, Xu X, Yi L, Smith TJ y Christiani DC. 2006. Dietary exposure to nitrites and nitrosamines is associated with childhood acute leukemia. *AACR Meeting Abstracts* 473-c.
- Liu JZ, Lin XY y Milner JA. 1992. Dietary garlic powder increases glutathione content and glutathione-S-transferase activity in rat liver and mammary tissues. *FASEB J* 6, 3230 (abs).
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* 15-16, 3479-3485.
- Liu TZ, Chin N, Kiser M y Bigler WN. 1982. Specific spectrophotometry of ascorbic acid in serum or plasma by use of ascorbic acid oxidase. *Clin Chem* 28, 2225-2228.
- Liu X, Naekyung C, Yang J, Jemmerson R y Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell* 86, 147-157.
- Liu Z, Kullman SW, Bencic DC, Torten M y Hinton DE. 2003. Ras oncogene mutations in diethylnitrosamine-induced hepatic tumors in medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish. *Mutat Res* 539, 43-53.
- Lockshin R y Williams C. 1965. Programmed cell death. II. Endocrine presentation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 11, 803-809.
- Loeppky RN. 1994. Nitrosamine and N-nitroso compound chemistry and biochemistry. En: Nitrosamines and related N-nitroso compounds. Chemistry and Biochemistry, Loeppky RN, Michejda CJ (eds), ACS Symposium Series 553, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 1-18.

- Loft S y Møller P. 2006. Oxidative DNA damage and human cancer: need for cohort studies. *Antioxid Redox Signal* 8, 1021-1031.
- London SJ, Yuan JM, Chung FL, Gao YT, Coetzee GA, Ross RK y Yu MC. 2000. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet* 356, 724-729.
- Long LH, Clement MV y Halliwell B. 2000. Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media. *Biochem Biophys Res Comm* 273, 50-53.
- Loo G. 2003. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem* 14, 64-73.
- López A, López-Munguía A y Quintero R. 2002. Transformación y producción de alimentos. En: *Biología alimentaria*. Editorial Limusa, pp. 153-383.
- López E, Arce C, Oset-Gasque MJ, Cañadas S y González MP. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lípido peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* 40, 940-951.
- Lovaas E y Carlin G. 1991. Spermine: An antioxidant antiinflammatory agent. *Free Radic Biol Med* 11, 455-461.
- Luño M, Roncalés P, Djenane D y Beltrán J. 2000. A beef shelf life in low O₂ and high CO₂ containing different CO concentrations. *Meat Sci* 55, 413-420.
- Lutsenko EA, Carcamo JM y Golde DW. 2002. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem* 277, 16895-16899.
- hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutat Res* 551, 153-166.
- Maki T, Tamura Y, Shimamura Y y Naioi Y. 1980. Estimate of the volatile nitrosamine content of Japanese food. *Bull Environ Contam Toxicol* 25, 257-261.
- Malicev E, Woyniak G, Knezevic M, Radosavljevic D y Jeras M. 2000. Vitamin C induced apoptosis in human articular chondrocytes. *Pflugers Arch* 440, 48-48.
- Mansuy D. 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 121, 5-14.
- Martelli A, Robbiano L, Gazzaniga GM y Brambilla G. 1988. Comparative study of DNA damage and repair induced by ten N-nitroso compounds in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cancer Res* 48, 4144-4152.
- Martindale JL y Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192, 1-15.
- Martínez A, Cambero I, Ikken Y, Marín ML, Haza AI y Morales P. 1998. Protective effect of broccoli, onion, carrot, and licorice extracts against cytotoxicity of N-nitrosamines evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. *J Agric Food Chem* 46, 585-589.
- Martínez A, Haza AI y Morales P. 2000. N-nitrosaminas en los alimentos y riesgo para la salud (I). *Aliment Equip Tecnol* 7, 153-158.
- Martínez G. 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia* 39.
- Martínez-Sánchez A, Llorach R, Gil MI y Ferreres F. 2007. Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J Agric Food Chem* 55, 1356-1363.
- Masimirembwa CM, Otter C, Berg M, Jonsson M, Leidvik B, Jonsson E, Hohansson T, Backman A, Edlund A y Andersson TB. 1999. Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab Dispos* 27, 1117-1122.
- Mataix J, Mataix FJ y Carazo E. 2005. Nutrición para educadores. En: *Higiene Alimentaria*. Diaz de Santos, Madrid, pp. 623-629.
- Matsuda K, Yoshida K, Taya Y, Nakamura K, Nakamura Y y Arakawa H. 2002. p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res* 62, 2883-2889.

M

- Machlin LJ y Bendich A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1, 441-445.
- Magee PN y Barnes JM. 1956. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br J Cancer* 10, 114-122.
- Magee PN y Barnes JM. 1967. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv Cancer Res* 10, 163-246.
- Majer BJ, Darroudi F, Mersch-Sundermann V, Laky B y Knasmüller S. 2004. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived

BIBLIOGRAFÍA

- McCarver DG y Hines RN. 2002. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 361-366.
- McCullough ML y Giovannucci EL. 2004. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 23, 6349-6364.
- McGowan AJ, Ruiz-Ruiz MC, Gorman AM, Lopes-Rivas A y Cotter TG. 1996. Reactive oxygen intermediate(s) (ROI): Common mediator(s) of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage and apoptosis. *FEBS Lett* 392, 299-303.
- Mei X, Wang MC, Xu HX, Pan YX, Gao CY, Han N y Fu MY. 1982. Garlic and gastric cancer- the effect of garlic on nitrite and nitrate in gastric juice. *Acta Nutr Sinica* 4, 53-56.
- Meikrantz W, Begom MA, Memisoglu A y Samson L. 1998. O⁶ alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* 19, 369-372.
- Menaker RJ, Sharaf AA y Jones NL. 2004. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: host, bug, environment, or all three?. *Curr Gastroenterol Rep* 6, 429-435.
- Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM y Fan S. 2000. Inhibitory effects of indole-3- carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 63,147-152.
- Mensinga TT, Speijers GJA y Meulenbelt J. 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev* 22, 41-51.
- Merino L, Edberg U y Aman GFP. 2000. Liquid chromatographic determination of residual nitrite/nitrate in foods: NMKL Collaborative Study. *J AOAC Int* 83, 365-375.
- Meyer RP, Podvinec M y Meyer UA. 2002. Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme. *Mol Pharmacol* 62, 1061-1067.
- Mijal RS, Kanugula S, Vu CC, Fang Q, Pegg AE y Peterson LA. 2006. DNA sequence context affects repair of the tobacco-specific adduct O⁶-[4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Cancer Res* 66, 4968-4974.
- Milner JA. 1996. Garlic: its anticarcinogenic and antitumorigenic properties. *Nutr Rev* 54, S82-S86.
- Minamino T, Yujiri T, Papst PJ, Chan ED, Johnson GL y Terada N. 1999. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,15127-15132.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de Reino Unido (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, MAFF). 1997. Total diet study - nitrate and nitrite. Food surveillance information sheet 163/98.
- Miret C. 2003. Alteraciones de la apoptosis como mecanismo patogénico en el lupus eritematoso sistémico. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.
- Mirvish SS. 1995. 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* 93, 17- 48.
- Møller P y Loft S. 2002. Oxidative DNA damage in white blood cells of humans in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* 76, 303-310.
- Møller P y Loft S. 2006. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med* 41, 388-415.
- Moncada S y Higgs EA. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 21, 361-374.
- Monostory K, Hazai E y Vereczkey L. 2004. Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p-nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. *Chem Biol Interact* 147, 331-340.
- Morel Y y Barouki R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342, 481-496.
- Mori H, Sugie S, Rahman W y Suzui N. 1999. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 143, 195-198.
- Morimoto K, Dolan ME, Scicchitano D y Pegg AE. 1985. Repair of O⁶ propylguanine and O⁶ butylguanine in DNA by O⁶ alkylguanine-DNA alkyltransferases from rat liver and *E.coli*. *Carcinogenesis* 6, 1027-1031.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mostafa MH y Sheweita SA. 1992. Modification of the oxidative N-demethylation of dimethylnitrosamine by various antiinflammatory drugs. *Ramazzini Newslett* 2, 15-22.
- Mozdarani H y Ghoraeian P. 2008. Modulation of gamma-ray-induced apoptosis in human peripheral blood leukocytes by famotidine and vitamina C. *Mutat Res* 649, 71-78.
- Munday R y Munday CM. 1999. Low doses of diallyl disulfide, a compound derived from garlic, increase tissue activities of quinone reductase and glutathione

BIBLIOGRAFÍA

transferase in the gastrointestinal tract of the rat. *Nutr Cancer* 34, 42-48.

Muntané J, González R, Ranchal I, Collado JA, López-Sánchez LM, Herencia C, Rodríguez-Ariza A, Muñoz-Castañeda JR y de la Mata M. 2007. Mecanismos de lesión hepatocelular. *Rev Esp Enferm Dig* 99, 405-410.

Murata M, Yamashita N, Inoue S y Kawanishi S. 2000. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate, *Free Radic Biol Med* 28, 797-805.

Murdok DJL, Barnett YA y Barnett CR. 2004. DNA damage and cytotoxicity in pancreatic b-cells expressing human CYP2E1. *Biochem Pharmacol* 68, 523-530.

Musk SR, Astley SB, Edwards SM, Stephenson P, Hubert RB y Jonson IT. 1995. Cytotoxic and clastogenic effects of benzyl isothiocyanate towards cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 33, 31-37.

N

Nagai F, Hiyoshi Y, Sugimachi K y Tamura H. 2002. Cytochrome P450 (CYP) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines. *Biol Pharm Bull* 25, 383-385.

Nagini S. 2008. Cancer chemoprevention by garlic and its organosulfur compounds panacea or promise?. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 313-321.

Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K y Tsubura A. 2001. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 22, 891-897.

Nakamura M, Katoh I y Kawabata T. 1981. Precursors to nitrosopiperidine and nitrosopiperidine in black pepper treated with nitrous acid. *Agric Biol Chem* 45, 1257-1259.

Nakaya M, Chou S, Kaneko M y Nakamura Y. 1991. Topoisomerase inhibitors have potent differentiation inducing activity for human and mouse myeloid leukaemia cells. *Jpn J Cancer Res* 82, 184-191.

Namiki M. 1992. Antioxidants/antimutagens in food. *Food Sci Nutr* 29, 273-300.

National Research Council, Diet, Nutrition, and Cancer. 1982. National Academy Press, Washington DC.

Nebert DW. 1993. Elevated estrogen 16 α -hydroxylase activity: is this a genotoxic or nongenotoxic biomarker in human breast cancer risk?. *JNCI* 85, 1888-1891.

Nho CW y Jeffery E. 2001. The synergistic upregulation of phase II detoxification enzymes by glucosinolate

breakdown products in cruciferous vegetables. *Toxicol Appl Pharmacol* 174, 146-152.

NIOSH. The National Institute for Occupational Safety and Health. 1983. N-nitroso compounds in the factory environment. Publication n° 83-114, NIOSH, Cincinnati, OH.

Nishikawa T, Salim EL, Morimura K, Kaneko M, Ogawa M, Kinoshita A, Osugi H, Kinoshita H y Fukushima S. 2003. High susceptibility of p53 knockout mice to esophageal and urinary bladder carcinogenesis induced by N,N-dibutyl nitrosamine. *Cancer Lett* 194, 45-54.

Nissen H, Alvseike O, Bredholt S, Holck A y Nesbakken T. 2000. Comparison between of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *Int J Food Microbiol* 59, 211-220.

Nissen LR, Byrne DV, Bertelsen G y Skibsted LH. 2004. The antioxidant activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Sci* 68, 485-495.

Nutt AR. 1984. Toxic hazards of rubber chemicals. Elsevier Science Publishing Company, New York.

O

O'Brien IEW, Reutelingsperger CPM y Holdaway. 1997. Annexin V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29, 28-33.

O'Neill LM, Calvin K, Morrissey PA y Buckley DJ. 1999. Effect of carnosine, salt and dietary vitamin E on the oxidative stability of chicken meat. *Meat Sci* 52, 89-94.

O'Brien V y Brown R. 2006. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis* 27, 682-692.

Ochs K y Kaina B. 2000. Apoptosis induced by DNA damage O⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 60, 5815-5824.

Oei SL, Keil C y Ziegler M. 2005. Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability. *Biochem Cell Biol* 83, 263-269.

Oh SH y Lim SC. 2006. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 212-223.

Okada M y Ishidate M. 1977. Metabolic fate of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and its analogues.

- Selective induction of urinary bladder tumours in the rat. *Xenobiotica* 7, 11-24.
- Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, Ikuma S, Ohara S, Shiomi T, Hijioka T y col. 1981. Urinary Bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. *Cancer Res* 41, 1958-1966.
- Olive PL, Wlodek D, Durand RE y Banath JP. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp Cell Res* 198, 259-267.
- Oliver FJ, de la Rubia G, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G y Murcia JM. 1998. Importance of Poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273, 33533-33539.
- OMS. World Health Organization. 1984. Guidelines for drinking-water quality. En: Recommendations. Vol 1, WHO, Geneva.
- OMS. World Health Organization. 2003. Toxicological evaluation of certain additives and contaminant. Nitrate and Nitrite. En: Joint FAO/WHO expert committee on food additives Series 50.
- Osler M y Schroll M. 1997. Diet and mortality in a cohort of elderly people in a north European community. *Int J Epidemiol* 26, 155-159.
- Österdahl BG. 1988. Volatile nitrosamines in foods on the Swedish market and estimation of their daily intake. *Food Addit Contam* 5, 587-595.
- Östling O y Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.
- Ozdil S, Yanardag R, Koyuturk M, Bolkent S y Arbak S. 2004. Protective effects of ascorbic acid, D_L- α -tocopherol acetate, and sodium selenate on ethanol-induced gastric mucosal injury of rats. *Biol Trace Elem Res* 99, 173-189.
- P
- Padayatty JS, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK y col. 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22, 18-35.
- Padayatty SJ y Levine M. 2001. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ* 164, 353-355.
- Palli D, Saieva C, Coppi C, Del Giudice G, Magagnotti C, Nesi G, Orsi F y Airoldi L. 2001. O⁶-Alylguanines, dietary N-nitroso compounds, and their precursors in gastric cancer. *Nutr Cancer* 39, 42-49.
- Panaretakis T, Shabalina IG, Grandér D, Shoshan MC y DePierre JW. 2001. Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 173, 56-64.
- Park EJ y Pezzuto JM. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 21, 231-255.
- Park JB y Levine M. 2000. Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL60, U937 and Jurkat cells. *J Nutr* 130, 1297-1302.
- Park JH, Kim SY, Kim DW, Lee WG, Rhee KH y Youn HS. 2003. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and vitamin C levels in whole blood, plasma, and gastric juice, and pH of gastric juice in Korean children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37, 53-62.
- Park KK y Archer MC. 1978. Microsomal metabolism of N'-nitrosodi-n-propylamine: formation of products resulting from α - and β -oxidation. *Chem Biol Interact* 22, 83-90.
- Park S, Han SS, Par CH, Hahm ER, Lee SJ, Park HK, Lee HS, Kim WS, Jung CW, Park K y col. 2004. L-Ascorbic acid induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells via hydrogen peroxide-mediated mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2180-2195.
- Pastori M, Pfander H, Boscoboinik D y Azzi A. 1998. Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 582-585.
- Patil AJ, Gramajo AL, Sharma A, Chwa M, Seigel GM, Kuppermann BD y Kenney MC. 2009. Effects of benzo(a)pyrene on the retinal neurosensory cells and human microvascular endothelial cells *in vitro*. *Curr Eye Res* 34, 672-682.
- Pegg AE, Sciechitano D y Dolan ME. 1984. Comparison of the rates of repair of O⁶ alkylguanines in DNA by rat liver and bacterial O⁶ alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res* 44, 3806-3811.
- Pegg JM y Shahidi F. 2000. Nitrite curing of meat. En: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Food and Nutrition Press, Trumbull, Connecticut, USA, pp. 175-208.

BIBLIOGRAFÍA

- Pelkonen O y Raunio H. 1997. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* 105, 767-774.
- Pelkonen O, Rautio A, Raunio H y Pasanen M. 2000. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144, 139-147.
- Pensabene JW, Fiddler W y Gates RA. 1995. Nitrosamine formation and penetration in hams processed in elastic rubber nettings: N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine. *J Agric Food Chem* 43, 1919-1922.
- Pepponi R, Marra G, Fuggetta MP, Falcinelli S, Elena P, Bonmassar E, Jiricny J y D'Atri S. 2003. The effect of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, and cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 304, 661-668.
- Pérez-Cruz I, Cárcamo JM y Golde DW. 2003. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. 2003. *Blood* 102, 336-343.
- Pérez-Cruz I, Cárcamo JM y Golde DW. 2007. Caspase-8 dependent trail-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. *Apoptosis* 12, 225-234.
- Peter ME y Krammer PH. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-551.
- Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, Bacon J, O' Leary KA, Kroon PA, Knutson L y col. 2003. Absorption/ metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metab Dispos* 31, 805-813.
- Phillips WE. 1971. Naturally occurring nitrate and nitrite in foods in relation to infant methaemoglobinaemia. *Food Cosmet Toxicol* 9, 219-228.
- Plantin-Carrenard E, Braut-Boucher F, Bernard M, Derappe C, Foglietti MJ y Aubery M. 2000. Fluorogenic probes applied to the study of induced oxidative stress in the human leukemic HL-60 cell line. *J Fluoresc* 10, 167-176.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW y Vogelstein B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Pourazrang H, Moazzami AA y Fazly Bazzaz BS. 2002. Inhibition of mutagenic N-nitroso compounds formation in sausage samples by using L-ascorbic acid and α -tocopherol. *Meat Sci* 62, 479-483.
- Preussmann R, Schmähl D y Eisenbrand G. 1977. Carcinogenicity of N-nitrosopyrrolidine: dose-response study in rats. *Z Krebsforsch Onkol Cancer Res Clin Oncol* 18, 161-166.
- Prior TI y Baker GB. 2003. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J Psychiatry Neurosci* 28, 99-112.
- Proksch E. 2001. Toxicological evaluation of nitrosamines in condoms. *Int J Hyg Environ Health* 204, 103-110.
- Proulx L, Paré G y Bissonnette EY. 2007. Alveolar macrophage cytotoxic activity is inhibited by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a carcinogenic component of cigarette smoke. *Cancer Immunol Immunother* 56, 831-838.

R

- Ramírez Chamond R, Carracedo J, Moreno C y Guerra F. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin* 14, 367-374.
- Reh BD, DeBord DG, Butler MA, Reid TM, Mueller C y Fajen JM. 2000. O⁶-methylguanine DNA adducts associates with occupational nitrosamine exposure. *Carcinogenesis* 21, 29-33.
- Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF y Casper RF. 2001. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol* 15, 479-486.
- Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF y Casper RF. 2003. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *J Appl Toxicol* 23, 255-261.
- Richard J. 1996. Utilisation o bacériocines por la poduction d'aliments plus sûrs: mythe ou réalité?. *Lait* 76, 179-189.
- Rieger PG, Mejer HM, Gerle M, Vogt U, Groth T y Knackmuss HJ. 2002. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotechnol* 94, 101-123.
- Rigas B y Sun Y. 2008. Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. *Br J Cancer* 98, 1157-1160.
- Rigel DS, Friedman R, Dzubow LM, Reintgen DS, Bystryn JC y Marks R. 2006. Cáncer de piel. En: Bases biológicas y epidemiológicas del cáncer de piel. Factores etiológicos en el cáncer de piel: ambientales y biológicos. Elsevier España, pp. 61-71.

- Riso P, Visioli F, Erba D, Testolin G y Porrini M. 2004. Lycopene and vitamin C increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr* 58, 1350-1358.
- Ritter JK. 2000. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129, 171-193.
- Robichová S y Slamenová D. 2002. Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induce by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Lett* 182, 11-18.
- Robichová S, Slamenová D, Chalupa I y Sebová L. 2004 b. DNA lesions and cytogenetic changes induced by N-nitrosomorpholine in HepG2, V79 and VH10 cells: the protective effects of vitamins A, C and E. *Mutat Res* 560, 91-99.
- Robichová S, Slamenová D, Gábelová A, Sedlák J y Jakubikova J. 2004 a. An investigation of the genotoxic effects of N-nitrosomorpholine in mammalian cells. *Chem Biol Interact* 148, 163-171.
- Robins P, Harris AL, Goldsmith I y Lindahl T. 1983. Cross-linking of DNA induced by chloroethylnitrosourea is prevented by O⁶ methylguanine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 11, 7743-7758.
- Rocken C y Carl-McGrath S. 2001. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 19, 269-278.
- Rodríguez-Antona C, Bort R, Jover R, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M, Gómez-Lechón MJ y Castell JV. 2003. Transcriptional regulation of human CYP3A4 basal expression by CCAAT enhancer-binding protein α and hepatocyte nuclear factor-3 γ . *Mol Pharmacol* 63, 1180-1189.
- Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV y Gómez-Lechón MJ. 2002. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 32, 505-520.
- Roger R, Issaad C, Pallardy M, Léglise MC, Turhan AG, Bertoglio J y Bréad J. 1996. BCRABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine activated killer cells. *Blood* 87, 1113-1122.
- Roller S. 2003. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. Roller S (ed), Woodhead Publishing Ltd, Cambridge (England).
- Rom WN y Markowitz SB. 2006. Environmental and occupational medicine. Lippincott USA.
- Roomi MW, Netke S y Tsao C. 1998. Modulation of drug metabolizing enzymes in guinea pig liver by high intakes of ascorbic acid. *Int J Vitam Nutr Res* 68, 42-47.
- Roos W, Baumgartner M y Kaina B. 2004. Apoptosis triggered by DNA damage O⁶-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23, 359-367.
- Rose P, Whiteman M, Huang SH, Halliwell B y Ong CN. 2003. Phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci* 60, 1489-1503.
- Roth E, Manhart N y Wessner B. 2004. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 71, 161-168.
- Rouzaud G, Young SA y Duncan AJ. 2004. Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 125-131.
- Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M y col. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214-3122.
- Runge D, Kohler C, Kostrubsky V, Jager D, Lehmann T, Runge DM, May U, Stolz DB, Strom SC, Fleig WE y col. 2000. Induction of cytochrome P-450 (CYP)1A1, CYP1A2m and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated proteine (MPR-1) by prototypical inducers in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 333-341.
- Russell NJ y Gould GW. 2003. Food preservatives. Springer.Alemania.
- Russo M, Tedesco I, Iacomino G, Palumbo R, Galano G y Russo GL. 2005. Dietary phytochemicals in chemoprevention of cancer. *Curr Med Chem Immun, Endoc & Metab Agents* 6, 61-72.

S

- Saavedra A, Calderón E, Sierra E, Cortés C, Gaona FJ y Clemente M. 2004. Papel patofisiológico del óxido mitocondria. *Mensaje Bioquím* 28, 27-43.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G y Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874.

BIBLIOGRAFÍA

- Safe S. 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett* 120, 1-7.
- Salas VM y Burchiel SW. 1998. Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicol Appl Pharmac* 151, 367-376.
- Salonen JT, Nyysönen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L y col. 2000. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 248, 377-386.
- Salvesen GS y Dixit VM. 1997. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 14, 443-446.
- Salvesen GS. 2002. Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 38, 9-19.
- Sallustio BC, Harkin LA, Mann MC, Krivickas SJ y Burcham PC. 1997. Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrac acid and gemfibrozil: a novel role for Phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones?. *Toxicol Appl Pharmacol* 147, 459-464.
- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP y Orrenius S. 1999. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J* 18, 2040-2048.
- Samokyszyn VM y Marnett LJ. 1990. Inhibition of liver microsomal lipid peroxidation by 13-cis-retinoic acid. *Free Radic Biol Med* 8, 491-495.
- Sánchez-Escalante A, Djenane D, Torrescano G, Beltrán JA y Roncalés P. 2003 a. Antioxidant action of borage, rosemary, oregano and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere. *J Food Sci* 68, 339-344.
- Sánchez-Escalante A, Djenane D, Torrescano G, Beltrán JA y Roncalés P. 2003 d. Evaluation of antioxidant ability of hydrazine-purified and untreated commercial carnosine in beef patties. *Meat Sci* 64, 59-67.
- Sánchez-Escalante A, Djenane D, Torrescano G, Beltrán JA y Roncalés P. 2001. The effect of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Sci* 58, 421-429.
- Sánchez-Escalante A, Torrescano G, Djenane D, Beltrán JA y Roncalés P. 2003 b. Combined effect of modified atmosphere packaging and addition of lycopene rich tomato pulp, oregano and ascorbic acid and their mixtures on the stability of beef patties. *Food Sci Technol Int* 9, 77-84.
- Sánchez-Escalante A, Torrescano G, Djenane D, Beltrán JA y Roncalés P. 2003 c. Stabilization of colour and odour in beef patties by using lycopene-rich tomato and peppers as a source of antioxidants. *J Sci Food Agric* 83, 187-194.
- Santiago C, Bandrés F y Gómez-Gallego F. 2002. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Med Trab* 11, 130-140.
- Sanz B. 1993. Los alimentos como fuente de energía y de nutrientes. En: Aspectos de la nutrición del hombre. Fundación BBV. Bilbao.
- Sanz B. 2005. El variado mundo de los alimentos funcionales, nutracéuticos y suplementos dietéticos. En *Bioquímica y fisiopatología de la nutrición*. Cascales M, Espinós D y García P (eds).
- Sasaki YF, Sekihashi K, Izumiyama F, Nishidate E, Saga A, Ishida K y Tsuda S. 2000. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC Monographs and U.S. NTP carcinogenicity database. *Crit Rev Toxicol* 30, 679-799.
- Sassa S, Sugita O, Galbraith RA y Kappas A. 1987. Drug metabolism by human hepatoma cell, HepG2. *Biochem Biophys Res Commun* 143, 52-57.
- Savill J y Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
- Sawamura M, Wu Y, Fujiwara C y Urushibata M. 2005. Inhibitory effect of yuzu essential oil on the formation of N-nitrosodimethylamine in vegetables. *J Agric. Food Chem* 53, 4281-4287.
- Schaffer EM, Liu JZ, Green J, Dangler CA y Milner JA. 1996. Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer Lett* 102, 199-204.
- Scheuenpflug J; Krebsfanger N y Doehmer J. 2005. Heterologous co-expression of human cytochrome P450 1A2 and polymorphic forms of N-acetyltransferase 2 for studies on aromatic amines in V79 Chinese hamster cells. *Altern Lab Anim* 33, 561-577.
- Schneider J, Huh MM, Bradlow HL y Fishman J. 1984. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 259, 230-238.
- Schwartz LM y Osborne BA. 1994. Ced-3/ICE: evolutionary conserved regulation of cell death. *Bioassays* 16, 387-389.

BIBLIOGRAFÍA

- Schwarz D, Kisselev P y Roots I. 2005. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur J Cancer* 41, 151-158.
- Sebranek J y Bacus JN. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Sci* 77, 136-147.
- Sedgwick B y Lindhal T. 1982. A common mechanism for repair of O⁶ methylguanine and O⁶ ethylguanine in DNA. *J Mol Biol* 154, 169-175.
- Seki T, Tsuji K, Hayato Y, Morimoto T y Ariga T. 2000. Garlic and onion oil inhibit proliferation and induce differentiation in HL-60 cells. *Cancer Lett* 160, 29-35.
- Sen NP, Baddoo PA y Seaman SW. 1987. Volatile nitrosamines in cured meat packaged in elastic rubber nettings. *J Agric Food Chem* 35, 346-350.
- Sen NP, Seaman S y Miles WF. 1979. Volatile nitrosamines in cured meat products. Effect of cooking and recent trends. *J Agric Food Chem* 27, 1354-1357.
- Sen NP, Smith DC y Schwinghamer L. 1969. Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrate in human and animal gastric juice. *Food Cosmet Toxicol* 7, 301-307.
- Seow A, Shi CY, Chung FL, Jiao D, Hankin JH, Lee HP, Coetzee GA y Yu MC. 1998. Urinary total isothiocyanate (ITC) in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore: relationship with dietary total ITC and glutathione S-transferase M1/T1/P1 genotypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 775-781.
- Seow A, Yuan JM, Sun CL, Van Den Berg D, Lee HP y Yu MC. 2002. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 23, 2055-2061.
- Shahidi F. 2002. Research addresses bioactive components. *Food Technol* 56, 23.
- Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK y Talalay P. 1998. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 1091-1100.
- Shenoy NR y Choughuley AS. 1992. Inhibitory effect of diet related sulphhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines. *Cancer Lett* 65, 227-232.
- Shenoy NR, Choughuley ASU, Shetty TK y Bhattacharya RK. 1992. Nitrosation of piperine using different nitrosating agents: characterization and mutagenicity of the products. *J Agric Food Chem* 40, 2211-2215.
- Shi Y, Song Y, Wang Y, Wang Y, Liang X, Hu Y, Yu H, Guan X, Cheng J y Yang K. 2009. β -Benzene hexachloride induces apoptosis of rat setoli cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNKs and FasL. *Environ Toxicol* 16.
- Shibata MA, Fukushima S, Takahashi S, Hasegawa R y Ito N. 1990. Enhancing effects of sodium phenobarbital and N,N-dibutyl nitrosamine on tumor development in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* 11, 1027-1031.
- Shimada T y Fuji-Kuriyama Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 y 1B1. *Cancer Sci* 95, 1-6.
- Shimada T, Oda Y, Gillam EMJ, Guengerich P y Inoue K. 2001. Metabolic activation of polycyclic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos* 29, 1176-1182.
- Shu L y Hollenberg P. 1996. Identification of cytochrome P450 isozymes in the metabolism of N-nitrosodipropyl-, N-nitrosodibutyl- and N-nitroso-n-butyl-n-propylamine. *Carcinogenesis* 17, 839-848.
- Shu L y Hollenberg PF. 1997. Alkylation of cellular macromolecules and target specificity of carcinogenic nitrosodialkylamines: metabolic activation by cytochromes P450 2B1 and 2E1. *Carcinogenesis* 18, 801-810.
- Siegmund D, Mauri D, Peters N, Juo P, Thome M, Reichwein M, Blenis J, Scheurich P, Tschopp J y Wajant H. 2001. Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mediate up-regulation of c-Fos by Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) via FLICE inhibitory protein (FLIP)-regulated pathway. *J Biol Chem* 276, 32585-32590.
- Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC y Suschetet M. 1997. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Lett* 120, 195-201.
- Singh A y Shukla Y. 1998. Antitumor activity of diallyl sulfide on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 131, 209-214.
- Singh A, Arora A y Shukla Y. 2004 b. Modulation of altered hepatic foci induction by diallyl sulphide in Wistar rats. *Eur J Cancer Prev* 13, 263-269.
- Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R y Singh SV. 2004 a. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards

BIBLIOGRAFÍA

- growth of PC-3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis* 25, 83-90.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR y Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Sipowicz MA, Amin S, Desai D, Kasprzak KS y Anderson LM. 1997. Oxidative DNA damage in tissues of pregnant female mice and fetuses caused by the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Cancer Lett* 117, 87-91.
- Skulachev VP. 2000. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "It is better to die than to be wrong". *Life* 49, 365-373.
- Slattery ML, Kampman E, Samowitz W, Caan BJ y Potter JD. 2000. Interplay between dietary inducers of GST and the GSTM-1 genotype in colon cancer. *Int J Cancer* 87, 728-733.
- Slee EA, Adrain C y Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326.
- Solhaug A, Øvrebo S, Møllerup S, Lag M, Schwarze PE, Nesnow S y Holme JA. 2005. Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis characterization of unspecific effects of cell signalling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chem Biol Interact* 151, 101-119.
- Solhaug A, Refsnes M, Lag M, Schwarze PE, Husøy T y Holme JA. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 25, 809-819.
- Somasundaran K y El-deiry WS. 2000. Tumor supresor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5, 424-437.
- Sparmins VL, Barany G y Wattenberg LW. 1988. Effects of organosulfur compounds from garlic and onions on benzo [a] pyrene-induced neoplasia and glutathione-S-transferase activity in mouse. *Carcinogenesis* 9, 131-134.
- Sperandio S, de Belle I y Bredesen DE. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14376-14381.
- Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J y Bredesen DE. 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 11, 1066-1075.
- Spiegelhalter B y Preussmann R. 1983. Occupational nitrosamine exposure: Rubber and tyre industry. *Carcinogenesis* 4, 1147-1152.
- Spiegelhalter B, Eisenbrand G y Preussmann R. 1980. Occurrence of volatile nitrosamines in food: a survey of the West German market. En: N-nitroso compounds: analysis, formation and occurrence. Walker EA, Griecute L, Castegnaro M y Borzsonyi M (eds). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, Pillow PC, Amos CI, Lei L, de Andrade M, Gu X, Hong WK y Wu X. 2000. Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 9, 1017-1020.
- Sporn MB. 1976. The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
- Staacck R, Kingston S, Wallig MA y Jeffery EH. 1998. A comparison of the individual and collective effects of four glucosinolate breakdown products from brussels sprouts on induction of detoxification enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol* 149, 17-23.
- Steen HB. 2000. The origin of oncogenic mutations: where is the primary damage?. *Carcinogenesis* 21, 1773-1776.
- Steinmetz KA y Potter JD. 1991. Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2, 427-442.
- Steinmetz KA y Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96, 1027-1039.
- Stivarius MR, Pohlman FW, Mcelyea KS y Waldroup AL. 2002. Effect to hot water and acid lactic treatment of beef trimmings prior to ginding on microbiological, instrumental color and sensory properties of ground beef during display. *Meat Sci* 60, 327-334.
- Straif K, Keil U, Taeger D, Holthenrich D, Sun Y, Bungers M y Weiland SK. 2000. Exposure to N-nitrosamines, carbon black, asbestos, and talc and mortality from stomach, lung, and laryngeal cancer in a cohort of rubber workers. *Am J Epidemiol* 152, 297-306.
- Suliman A, Lam A, Datta R y Srivastava RK. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122-2133.
- Sultana S, Alam A, Sharma S y Khan N. 2004. 13-cis retinoic acid ameliorates benzoyl peroxide-induced oxidative stress and hyperproliferative response in murine skin: a chemopreventive study. *Cancer Detect Prev* 28, 200-207.
- Sumiyoshi H y Wargovich MJ. 1990. Chemoprevention of 1,2- dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice by naturally occurring organosulfur compounds. *Cancer Res* 50, 5084-5087.

BIBLIOGRAFÍA

- Sun J, Chu YF, Wu X y Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. *J Agric Food Chem* 50, 7449-7454.
- Sun SY, Hail N y Lotan R. 2004. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 96, 662-672.
- Sundaram SG y Milner JA. 1996 a. Diallyl disulfide inhibits proliferation of human tumor cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1315, 15-20.
- Sundaram SG y Milner JA. 1996 b. Diallyl disulfide induces apoptosis of human colon tumor cells. *Carcinogenesis* 17, 669-673.
- Surh YJ. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3, 768-780.
- Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC y col. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-580.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM y Kroemer G. 1999. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189, 381-393.
- Susin SA, Zamzami N y Kroemer G. 1998. Mitochondria as regulators of apoptosis; doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366, 151-165.
- Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Macho A, Dugas E, Geuskens M y Kroemer G. 1996. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184, 1331-1341.
- Suzuki E y Okada M. 1980. Metabolic fate of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the rat. *Gann* 71, 863-870
- Suzuki E, Mochizuki M, Wakabayashi Y y Okada M. 1983. *In vitro* metabolic activation of N'-N-dibutyl nitrosamine in mutagenesis. *Gann* 74, 51-59.
- T**
- Takayama S, Thorgeirsson UP y Adamson R. 2008. Chemical carcinogenesis studies in non human primates. *Proc Jpn Acad Ser B* 84, 176-188.
- Talalay P y Zhang Y. 1996. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem Soc Trans* 24, 806-810.
- Tannenbaum SR. 1984. A policy perspective on safety: nitrite and nitrate. Roche Public Issue Report, Hoffmann-La Roche Inc. Nutley, NJ.
- Tarpey MM, Wink DA y Grisham MB. 2003. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, 431-444.
- Taylor RC, Cullen SP y Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Review Mol Cell Biol* 9, 231-241.
- Temple N.J. 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutr Res* 20, 449-459.
- Teysier C y Siess MH. 2000. Metabolism of dipropyl disulfide by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos* 28, 648-654.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M y col. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thompson C, Bloch A y Hasler CM. 1999. Position of the american dietetic association: functional foods. *J Am Diet Assoc* 99, 1278-1285.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry NA y Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tilton SC, Givan SA, Pereira CB, Bailey GS y Williams DE. 2006. Toxicogenomic profiling of the hepatic tumor promoters indole-3-carbinol, 17 β -estradiol and β -naphthoflavone in rainbow trout. *Toxicol Sci* 90, 61-72.
- Tominaga Y, Tsuzuki T, Shiraishi A, Kawate H y Sekiguchi M. 1997. Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA-repair, methyltransferase, had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis* 18, 889-896.
- Top EM y Springael D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol* 14, 262-269.
- Trichopoulou A y Critselis E. 2004. Mediterranean diet and longevity. *Eur J Cancer Prev* 13, 453-456.
- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist M, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L y Trichopoulos D. 1995. Diet and overall survival in elderly people. *Br Med J* 311, 1457-1460.
- Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocké MC, Peeters PHM, van der Schouw YT, Boeing H, Hoffmann K, Boffetta P y col. 2005. Modified mediterranean diet and survival: EPIC elderly prospective cohort study. *BMJ* 330, 991.
- Tricker AR y Preussmann R. 1991. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation,

- mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res* 259, 277-289.
- Tsigarida E, Skandamis P y Nychas GJE. 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *J Appl Microbiol* 89, 901-909.
- Tsuda H, Mera Y, Seki K, Aoki T, Fukushima S y Ito N. 1987. Induction of tumors in the liver, urinary bladder, esophagus and forestomach by short-term treatment with different doses of N,N-dibutyl nitrosamine in rats. *Jpn. J. Cancer Res* 78, 227-234.
- Tsuda H, Uehara N, Iwahori Y, Asamoto M, Iigo M, Nagao M, Matsumoto K, Ito M y Hirono I. 1994. Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn J Cancer Res* 85, 1214-1219.
- Turkey RH y Strassburg CP. 2000. Human UDP-Glucuronyltransferases: metabolism, expression and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 581-616.
- Turner F, Smith G, Sachse C, Lightfoot T, Garner RC, Wolf CR, Forman D, Bishop DT y Barrett JH. 2004. Vegetable, fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer. *Int J Cancer* 112, 259-264.
- U**
- Uberti D, Yavin E, Gil S, Ayasola KR, Goldfinger N y Rotter V. 1999. Hydrogen peroxide induces nuclear translocation of p53 and apoptosis in cells of oligodendroglia origin. *Brain Res Mol Brain Res* 65, 167-175.
- Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Yonehara S, Takabayashi A, Yamaoka I y Yodoi J. 1998. Redox regulation of caspase-3-(like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome c. *J Immunol* 161, 6689-6695.
- Ueta E, Suzuki E, Nanba E, Tadokoro Y, Otsuka Y y Kurata T. 2001. Regulation of cigarette smoke-induced cytochrome P4501A1 gene expression in osteogenic disorder shionogi rat liver and in lung by large ascorbic acid dose. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2548-2551.
- Uhl M, Ecker S, Kassie F, Lhoste E, Chakraborty A, Mohn G y Knasmüller S. 2003 a. Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B(a)P) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. *Arch Toxicol* 77, 477-484.
- Uhl M, Helma C y Knasmüller S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res* 441, 215-224.
- Uhl M, Helma C y Knasmüller S. 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res* 468, 213-225.
- Uhl M, Laky B, Lhoste E, Kassie F, Kundi M y Knasmüller S. 2003 b. Effects of mustard sprouts and allylisothiocyanate on benzo(a)pyrene induced DNA damage in human derived cells: a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 23, 273-282.
- V**
- Valdés F. 2006. Vitamina C. *Actas Dermosifiliogr* 97, 557-568.
- Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot JC, Le Bon AM y Chagnon MC. 2003. Use of Hep G2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res* 536, 79-90.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izacovic M y Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- Van der Logt EM, Roelofs HM, Van Lieshout EM, Nagengast FM y Peters WH. 2004. Effects of dietary anticarcinogens and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferases. *Anticancer Res* 24, 843-849.
- Van Haften R, Haenen G, Evelo C y Bast A. 2003. Effect of vitamina E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev* 35, 215-253.
- Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W y Vandenabeele P. 2002. The serine protease Omi/ HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20-26.
- Van Vliet JJH, Vaessen HAMG, van den Burg G y Schortshorst RC. 1997. Twenty four hours duplicate diet study 1994; nitrate and nitrite: method development and intake per person per day. *Cancer Lett* 19, 305-307.

- Vargas del Río LM y Taborda G. 2006. Nitrosaminas en productos cárnicos: formación e impacto. *Biosalud* 5, 101-131.
- Venkatakrishnan K, Von Molte LL, Court MH, Harmatz JS, Crespi C y Greenblatt DJ. 2000. Comparison between cytochrome P-450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches. *Drug Metab Dispos* 28, 1493-1504.
- Ventanas S, Martín D, Ventanas J y Ruiz J. 2004. Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (I). *Eurocarne* 129, 95-114.
- Verkerk R, van der Gaag MS, Dekker M y Jongen WM. 1997. Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Lett* 114, 193-194.
- Vermeer ITM, Henderson LY, Moonen EJC, Engels LGBJ, Dallinga JW, van Maanen JMS y Kleinjans JCS. 2004. Neutrophil-mediated formation of carcinogenic N-nitroso compounds in an *in vitro* model for intestinal inflammation. *Toxicol Lett* 154, 175-182.
- Vermeer ITM, Moonen EJC, Dallinga JW, Kleinjans JCS y van Maanen JMS. 1999. Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res* 428, 353-361.
- Vermes I, Haabeb C y Reutelingsperger C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243, 167-190.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H y Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 339-351.
- Vicario IM. 1997. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. *Nutr Clin* 16, 19-28.
- Vindas R, Ortiz F, Ramírez V y Cuenca P. 2004. Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 52, 601-609.
- Vogt C. 1842. Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete (*Alytes obstetricians*). Solothurn: Jent und Gassman, pp 130.
- Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins TFX, Hansen DK, Porter JK. 2001. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environ Health Perspect* 109, 259-266.
- Wade RS y Castro CE. 1990. Redox reactivity of iron (III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur. *Chem Res Toxicol*, 3, 289-291.
- Walker R. 1996. The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochem Soc Trans* 24, 780-785.
- Wallace SS. 1998. Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 150, S60-S79.
- Walle T, Otake Y, Galijatovic A, Ritter JK y Walle UK. 2000. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in the human hepatoma cell line Hep G2. *Drug Metab Dispos* 28, 1077-1082.
- Walter CA, Zhou ZQ, Manguino D, Ikeno Y, Reddick R, Nelson J, Intano G, Herbert DC, McMahan CA y Hanes M. 2001. Health span and life span in transgenic mice with modulated DNA repair. *Ann NY Acad Sci* 928, 132-140.
- Wang M, Lao Y, Cheng G, Shi Y, Villalta PW, Nishikawa A y Hecht SS. 2007. Analysis of adducts in hepatic DNA of rats treated with N-Nitrosopyrrolidine. *Chem Res Toxicol* 20, 634-640.
- Wang SC, Chung JG, Chem CH y Chen SC. 2006. 2- and 4-Aminobiphenyls induce oxidative DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells via different mechanisms. *Mutat Res* 593, 9-21.
- Wang TS, Chung CH, Wang ASS, Bau DT, Samikkannu T, Jan KY, Cheng YM y Lee TC. 2002. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chem Res Toxicol* 15, 1254-1258.
- Wargovich MJ y Goldberg MT. 1985. Diallyl sulfide: A naturally occurring thioether that inhibits carcinogen-induced nuclear damage to colon epithelial cells *in vivo*. *Mutat Res* 143, 127-129.
- Watson W, Cai J y Jones D. 2000. Diet and Apoptosis. *Ann Rev Nutr* 20, 485-505.
- Wattenberg L. 1985. Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45, 1-8.
- Wattenberg LW, Borchert P, Destafney CM y Coccia JG. 1983. Effects of p-methoxyphenol and diet on carcinogen-induced neoplasia of the mouse forestomach. *Cancer Res* 43, 4747-4751.

BIBLIOGRAFÍA

- Wei Z y Lau BHS. 1998. Garlic inhibits free radical generation and augments antioxidant enzyme activity in vascular endothelial cells. *Nutr Res* 18, 61-70.
- Wenzel U, Nickel A, Kuntz S y Daniel H. 2004. Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis* 25, 703-712.
- Westerink WMA y Schoonen WGEJ. 2007 a. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 21, 1581-1591.
- Westerink WMA y Schoonen WGEJ. 2007 b. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 21, 1592-1602.
- Westin JB. 1990. Ingestion of carcinogenic N-nitrosamines by infants and children. *Arch Environ Health* 45, 359-369.
- Wettasinghe M y Shahidi F. 1999. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts defatted borage (*Borago officinalis* L) seeds. *Food Chem* 67, 399-414.
- Wettasinghe M y Shahidi F. 2000. Scavenging of reactive oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem* 70, 17-26.
- Wilkening S y Bader A. 2003. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 207-213.
- Willett WC. 2002. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science* 296, 695-698.
- Williams GM y Jeffrey AM. 2000. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol* 32, 283-292.
- Willingham MC. 1999. Cytochemical Methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 47, 1101-1109.
- Wong HL, Murphy SE y Hecht SS. 2003 b. Preferential metabolic activation of N-nitrosopiperidine as compared to its structural homologue N-nitrosopyrrolidine by rat mucosal microsomes. *Chem Res Toxicol* 16, 1298-1305.
- Wong HL, Murphy SE, Wang M y Hecht SS. 2003 a. Comparative metabolism of N-nitrosopiperidine and N-nitrosopyrrolidine by rat liver and esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. *Carcinogenesis* 24, 291-300.
- Wrick KL. 1994. The potential role of functional foods in medicine and public health. En: *Functional Foods*. Goldberg J (ed). Chapman and Hall. New York.
- Wu LT, Chu CC, Chung JG, Chen CH, Hsu LS, Liu JK y Chen SC. 2004. Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutat Res* 556, 75-82.
- Wu XJ, Kassie F y Mersch-Sundermann V. 2005. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res* 579, 115-124.
- Wu XJ, Stahl T, Hu Y, Kassie F y Mersch-Sundermann V. 2006. The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *J Nutr* 136, 608-613.

X

- Xiao D, Srivastava SK, Lew KL, Zeng Y, Hershberger P, Johnson CS, Trump DL y Singh SV. 2003. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis* 24, 891-897.
- Xiao H, Rawal M, Hahn ER y Singh SV. 2007. Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. *Cell Cycle* 6, 2826-2834.
- Xu X y Thornalley PJ. 2001. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukemia cells *in vitro*. *Biochem Pharm* 61, 165-177.
- Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C y Chung FL. 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 52, 3875-3879.

Y

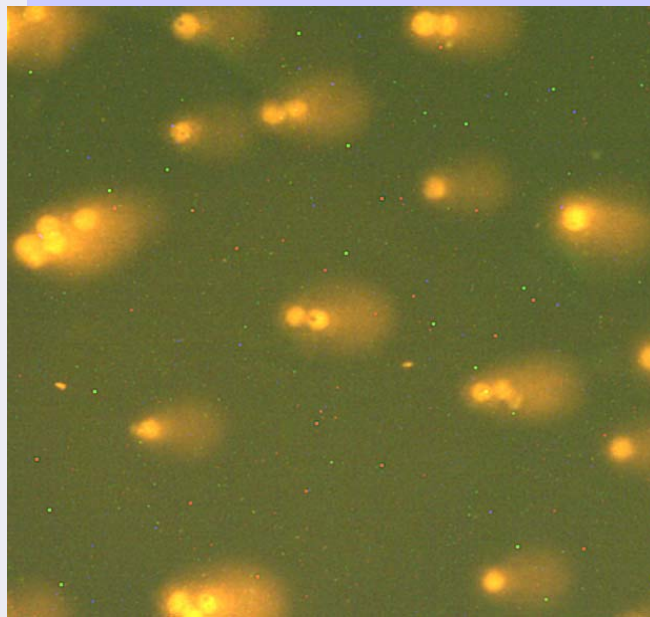
- Yang CS, Hong JH y Wang ZY. 1993. Inhibition of nitrosamines-induced tumorigenesis by diallyl sulfide and teas. En: *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. Wandron KW, Johnson IT y Fenwick QR (eds). The Royal Society of Chemistry, London, pp 247-252.

Z

- Yang MI, Lau SS y Monks JT. 2005. 2,3,5-tris(Glutathion-Syl) hydroquinone (TGHQ)-mediated apoptosis of human promyelocytic leukemia cells is preceded by mitochondrial cytochrome c release in the absence of a decrease in the mitochondrial membrane potential. *Toxicol Sci* 86, 92-100.
- Yeh SL, Wang WY, Huang CS y Hu ML. 2006. Flavonoids suppresses the enhancing effect of β -carotene on DNA damage induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)1-butanone (NNK) in A549 cells. *Chem Biol Interact* 160, 175-182.
- Yen CH, Mar M, Craciunescu C, Edwards LI y Zeisel S. 2002. Deficiency in methionine, tryptophan, isoleucine, or choline induces apoptosis in cultured cells. *J Nutr* 132, 1840-1847.
- Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B y Ohshima H. 1995. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxyxynitrite *in vitro*. *Carcinogenesis* 16, 2045-2050.
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H. Namba M y Asahi S. 2001. Establishment of the transformants expressing human cytochrome P-450 subtypes in Hep G2, and their implications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* 15, 245-256.
- Young-Sciame R, Wang M, Chun FL y Hecht S. 1995. Reactions of α Acetoxi-N-nitrosopyrrolidine and α Acetoxi-N-nitrosopiperiden with deoxyguanosine: formation of N²-Tetrahydrofuryl and N²-Tetrahydropyryl adducts. *Chem Res Toxicol* 8, 607-616.
- Yu FL, Bender PJ, Fang Q, Ludeke A y Welch B. 2003. Prevention of chemical carcinogen DNA binding and inhibition of nuclear RNA polymerase activity by organosulfur compounds as possible mechanism for their anticancer initiation and proliferation effects. *Cancer Detev Prev* 27, 370-379.
- Yu R, Mandlekar S, Harvey KJ, Ucker DS y Kong ANT. 1998. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and caspase-3-like protease activity. *Cancer Res* 58, 402-408.
- Yuan J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 9, 247-251.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ y Heintz N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15077-15082.
- Yurchenko S y Mölder U. 2007. The occurrence of volatile N-nitrosamines in estonian meat products. *Food Chem* 100, 1713-1721.
- Zamai L, Canonico B, Luchetti F, Ferri P, Melloni E, Guidotti L, Cappellini A, Cutroneo G, Vitale M y Papa S. 2001. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherente cells. *Cytometry* 44, 57-64.
- Zhang Y y Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res* 54, 1976s-1981s.
- Zhang Y, Tang L y Gonzalez V. 2003. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2, 1045-1052.
- Zhang Y. 2000. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* 21, 1175-1182.
- Zhang Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res* 555, 173-190.
- Zhao B, Seow A, Lee EJ, Poh WT, Teh M, Eng P, Wang YT, Tan WC, Yu MC y Lee HP. 2001. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase- MI, -TI polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomar. Prev* 10, 1063-1067.
- Zhou BJ, Li YH, Zhang XH, Xing LX, Yan X, Wang JL, Liu J y Xing X. 2006. Effects of vitamin C on apoptosis proliferation inhibition of human peripheral blood mononuclear cells induced by deoxynivalenol *in vitro*. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 40, 309-313.
- Zhou ZQ, Manguino D, Kewitt K, Intano GW, McMahan CA, Herbert DC, Hanes M, Reddick R, Ikeno Y y Walter CA. 2001. Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. *Proc Nat Acad Sci USA* 98, 12566-12571.
- Zhu H, Bannenberg G, Moldeus P y Shertzer H. 1994. Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. *Arch Toxicol* 68, 582-587.
- Zimmerman HJ. 1993. Hepatotoxicity. *Dis Mon* 39, 678-787.
- Zabala A. 2002. Actividad antiproliferativa de bacterias lácticas de origen alimentario y humano y su efecto protector frente a la citotoxicidad de N-nitrosaminas volátiles. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J y Ahmad M. 2003. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60, 6-20.
- Zhang X y Malejka-Giganti D. 2003. Effects of treatment of rats with indole- 3-carbinol on apoptosis in the mammary gland and mammary adenocarcinomas. *Anticancer Res* 23, 2473-2479.



CAPÍTULO III:
OTROS ARTÍCULOS
RELACIONADOS CON ESTA TESIS

1. Arranz N, Haza AI, **García A**, Moller L, Rafter J y Morales P. 2006. Protective effects of isothiocyanates towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *J Appl Toxicol* 26, 466-473.
2. Arranz N, Haza AI, **García A**, Rafter J y Morales P. 2007. Protective effects of organosulfur compounds towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food Chem Toxicol* 45, 1662-1669.
3. Arranz N, Haza AI, **García A**, Rafter J y Morales P. 2007. Protective effect of vitamin C towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Toxicol In Vitro* 21, 1311-1317.
4. Arranz N, Haza AI, **García A**, Delgado ME, Rafter J y Morales P. 2007. Effects of organosulfurs, isothiocyanates and vitamin C towards hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in human hepatoma cells. *Chem Biol Interact* 169, 63-71.
5. Uceró A, Haza AI, Arranz N, **García A** y Morales P. 2007. Agentes quimiopreventivos de la dieta (I): carotenoides, isotiocianatos y alilsulfuros. *Alimentaria* 388, 64-71.
6. Uceró A, Haza AI, Arranz N, **García A** y Morales P. 2007. Agentes quimiopreventivos de la dieta (II): indoles y polifenoles. *Alimentaria* 388, 72-78.
7. **García A**, Haza AI, Arranz N, Delgado E y Morales P. 2008. Efecto protector de compuestos organosulfurados, isotiocianatos y vitamina C frente al daño oxidativo y alquilativo al DNA inducido por N-Nitrosaminas. *Alimentaria* 391, 104-105.
8. Arranz N, Haza AI, **García A**, Delgado ME, Rafter J y Morales P. 2008. Inhibition by vitamin C of apoptosis induced by N-nitrosamines in HepG2 and HL-60 cells. *J Appl Toxicol* 28, 788-796.
9. Delgado ME, Haza AI, Arranz N, **García A** y Morales P. 2008. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur J Nutr* 47, 479-490.
10. Delgado ME, Haza AI, **García A** y Morales P. 2009. Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamine-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicol In Vitro* 23, 1292-1297.

