

11281
20j
①



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MUTAGENICA EN
Salmonella typhimurium DE COMPUESTOS
N-NITROSADOS, DERIVADOS DE MEDICAMEN-
TOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICROBIOLOGIA)

P r e s e n t a :
MYRIAM ARRIAGA ALBA

Asesora: Cristina Cortinas de Nava

México, D. F.

1968

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	<u>PAG.</u>
I INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
II ANTECEDENTES	
1. <u>RELACION ENTRE CARCINOGENESIS Y MUTAGENESIS</u>	
1.1 Modelos de carcinogénesis química	4
1.2 Los compuestos N-nitroso como iniciadores del proceso de carcinogénesis	8
1.3 Riesgo de cáncer por la formación endógena de compuestos N-nitroso	14
2. <u>ANTIMUTAGENESIS</u>	
2.1 Definición y clasificación de antimutágenos	19
2.2 Sustancias que inhiben la formación de los compuestos N-nitroso	24
3. <u>GENERALIDADES SOBRE LOS COMPUESTOS N-NITROSOS</u>	
3.1 Definición de compuestos N-nitroso	31
3.2 Cinética de la formación de compuestos N-nitroso	33
3.3 Agentes que modifican la reacción de nitrosación	39
3.4 Fuentes de prescursores de la formación endógena de compuestos N-nitroso	42
3.4.1 Fuentes de nitritos y nitratos	42
3.4.2 Fuentes de compuestos nitrosables	44
3.4.3 Fuentes exógenas de compuestos N-nitroso	48
4. <u>PROPIEDADES MUTAGENICAS DE COMPUESTOS N-NITROSOS</u>	
4.1 Mecanismos de mutagénesis de compuestos N-nitroso	54
4.2 Mutagenicidad de nitrosaminas	57
4.3 Mutagenicidad de nitrosamidas	61
4.4 Mecanismos de activación de nitrosaminas	63
5. <u>MÉTODOS DE ESTUDIO PARA LA VALORACION DEL RIESGO DE EXPOSICION A COMPUESTOS N-NITROSOS</u>	
5.1. Sistemas de prueba para detectar mutágenos y carcinógenos	69
5.1.1 Sistema de Cepas de <u>Salmonella typhimurium</u> de Ames	72

	<u>PAG.</u>
5.1.2 Sistema de cepas de <u>Salmonella typhimurium</u> Uvr-/Uvr+	77
5.2 Excreción urinaria de mutágenos como un método de detección de poblaciones expuestas a compuestos N-nitroso	80
 III MATERIAL Y METODOS	
- COMPUESTOS QUIMICOS	84
- MEDIOS DE CULTIVO	85
- CEPAS BACTERIANAS	85
- REACCIONES DE NITROSACION <u>IN VITRO</u>	86
- DETERMINACIONES COLORIMETRICAS	87
- PRUEBAS DE MUTAGENICIDAD	88
- EFECTO DEL SISTEMA DE REPARACION	89
- PRUEBAS DE SOBREVIDA	89
- REACCIONES DE NITROSACION <u>IN VIVO</u>	90
- PREPARACION DE MUESTRAS DE ORINA	91
- ENSAYO DE MUTAGENESIS EN ORINAS	91
- ANALISIS MATEMATICO	92
- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DEL NITRITO DE SODIO CON RESPECTO A LA AMINA	93
- INHIBICION DE LA REACCION DE NITROSACION DEL MEBENDAZOL <u>IN VITRO</u>	94
- INHIBICION DE LA FORMACION DE MUTAGENOS DERIVADOS DE LA REACCION ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO <u>IN VIVO</u>	95
- EFECTO DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DE LA VITAMINA C CON RESPECTO AL NITRITO DE SODIO EN LA INHIBICION DE LA FORMACION DE MUTAGENOS EN ORINAS	96

	<u>PAG.</u>
- DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS Y CROMATOGRAFICAS DE LOS DERIVADOS MUTAGENICOS DEL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO	92
IV RESULTADOS	
- REACCIONES DE NITROSACION <u>IN VITRO</u>	98
- ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LOS DERIVADOS <u>N-NITROSO</u> DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS	98
- REACCIONES DE NITROSACION <u>IN VIVO</u>	114
- CINETICA DE LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON NITRITO DE SODIO Y MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS	117
- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO DE SODIO EN LA FORMACION DE MUTAGENOS DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS	124
- INFLUENCIA DEL SISTEMA DE REPARACION POR ESCISION EN LAS MUTACIONES INDUCIDAS POR COMPUESTOS <u>N-NITROSO</u> DERIVADOS DE PIPERAZINA Y MEBENDAZOL	133
- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DE NITRITO CON RESPECTO AL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA Y MEBENDAZOL	135
- EFECTO DEL SEXO EN LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON MEBENDAZOL Y NITRITO	144
- INHIBICION DE LA REACCION DE NITROSACION DEL MEBENDAZOL <u>IN VITRO</u> E <u>IN VIVO</u>	144
- CARACTERIZACION ESPECTROFOTOMETRICA Y CROMATOGRAFICA DE LOS PRODUCTOS DE REACCION ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO	151
V DISCUSION	
- FORMACION DE COMPUESTOS <u>N-NITROSO</u> DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS	155

	<u>PAG.</u>
- ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LOS PRODUCTOS DE REACCION ENTRE EL NITRITO DE SODIO Y MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS	157
- FORMACION DE COMPUESTOS MUTAGENICOS DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS Y NITRITO DE SODIO <u>IN VIVO</u>	162
- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO EN LAS REACCIONES <u>IN VIVO</u> CON MEDICAMENTOS AMINADOS	168
- EFECTO DEL SISTEMA DE REPARACION POR ESCISION SOBRE MUTACIONES INDUCIDAS POR LOS COMPUESTOS N-NITROSO DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS	169
- EFECTO DE LA VITAMINA C EN LA REACCION DE NITROSACION DEL MEBENDAZOL	171
- CARACTERIZACION DE COMPUESTOS MUTAGENICOS N-NITROSO DERIVADOS DEL MEBENDAZOL	173
VI CONCLUSIONES	176
- APENDICE 1. Medios de cultivo	179
- APENDICE 2. Valoración de moles N-N=O con N-Metil-n-nitroso Guanidina	182
VII BIBLIOGRAFIA	183

LISTA DE TABLAS

	<u>PAG.</u>
I Carcinogenicidad de compuestos <u>N</u> -nitroso	13
II Aminas que producen cáncer después de la reacción de nitrosación <u>in vivo</u>	17
III Compuestos que inhiben la reacción de aminas y amidas	25
IV Compuestos nitrogenados que pueden dar lugar a la formación de derivados <u>N</u> -nitroso	45
V Medicamentos detectados como precursores de la formación endógena de derivados <u>N</u> -nitroso	52
VI Condiciones óptimas de la reacción <u>in vitro</u> entre nitritos y medicamentos antiparasitarios aminados	101
VII Mutagenicidad de los productos generados por la reacción entre nitritos y medicamentos antiparasitarios en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	102
VIII Efecto mutagénico de la orina de ratones tratados por vía oral con nitrito de sodio y diferentes medicamentos antiparasitarios	115
IX Efecto de la concentración de nitritos en la excreción de mutágenos en la orina de ratones tratados con cloroquina	131
X Efecto de la concentración de nitritos en la excreción de mutágenos en la orina de ratones tratados con mebendazol	132
XI Efectos mutagénicos de derivados nitrosados del mebendazol en cepas de <u>Salmonella typhimurium</u> Uvr ⁻ /Uvr ⁺	134
XII Influencia del sexo en la excreción de mutágenos en orinas de ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio	144
XIII Efecto inhibitorio de la nitrosación del mebendazol <u>in vitro</u> por adición de vitamina C	145
XIV Espectro de absorción de los productos de la reacción entre el mebendazol y el nitrito de sodio	152

LISTA DE FIGURAS

	<u>PAG.</u>
1 Reacciones de oxidorreducción entre el ácido ascórbico, alfatocoferol y nitrilo de sodio	27
2 Metabolismo de nitrosaminas	66
3 Medicamentos antiparasitarios	100
4 Efecto mutagénico del producto de la reacción de nitrosación de piperazina en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	105
5 Efecto mutagénico del producto de la reacción de nitrosación de mebendazol en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	107
6 Efecto mutagénico del producto de la reacción de nitrosación de cloroquina (base) en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	109
7 Efecto mutagénico del producto de la reacción de dehidrohemetina con nitrito de sodio en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	111
8 Efecto mutagénico del producto de reacción entre el pamoato de pirantel y nitrito de sodio en <u>Salmonella typhimurium</u> TA1535	113
9 Excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con piperazina y cloroquina (base) junto con nitrito de sodio durante tres días consecutivos	119
10 Excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio durante tres días consecutivos	121
11 Excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con pamoato de pirantel y dehidroemetina con nitrito de sodio durante tres días consecutivos	123
12 Efecto de la concentración de nitrito de sodio en la excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con piperazina	126
13 Efecto de la concentración de nitrito en la excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con mebendazol	128

	<u>PAG.</u>
14 Efecto de la concentración de nitrito de sodio en la excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con cloroquina (base)	130
15 Influencia del tiempo de administración del nitrito de sodio con respecto a la cloroquina en la formación de mutágenos en orinas de ratón	137
16 Influencia del tiempo de administración del nitrito de sodio con respecto al mebendazol en la formación de mutágenos en orinas de ratón	139
17 Eliminación de mutágenos en orina de ratones ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio	141
18 Eliminación de mutágenos en orina de ratones tratados con cloroquina nitrito de sodio	143
19 Efecto de la concentración de vitamina C en la excreción de mutágenos en ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio	148
20 Influencia del tiempo de administración de la vitamina C en la excreción de mutágenos en la orina de ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio	150
21 Cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) del producto de la reacción <u>in vitro</u> entre el mebendazol y el nitrito de sodio	154

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Los compuestos N-nitroso son considerados en la actualidad como un grupo importante de mutágenos químicos, además de posibles agentes etiológicos del cáncer en el humano. Se sabe, en efecto, que estos compuestos son capaces de inducir cáncer en más de 22 especies diferentes de animales de laboratorio, habiéndose descrito también una alta incidencia de cáncer de esófago, colon y estómago en lugares en los que como en China, Japón y este de Africa, se ingieren alimentos con alto contenido de compuestos N-nitroso o de sus precursores.

Los compuestos N-nitroso pueden formarse durante la cocción y ahumado de los alimentos o encontrarse en bebidas alcohólicas y humo del tabaco. Sin embargo, se ha reportado que la mayor exposición de estos carcinógenos se debe a la formación endógena de los mismos en la cavidad ácida del estómago a partir de sus precursores, aminas, amidas y nitritos que pueden consumirse en bebidas, alimentos y medicamentos. La administración simultánea de medicamentos con grupos amino tales como la oxitetraciclina y la piperazina, se ha visto asociada, por ejemplo, con el desarrollo de cáncer en animales de laboratorio.

Se ha encontrado a la vez, que los alimentos contienen diversos compuestos capaces de antagonizar el efecto de los mutágenos químicos o de prevenir la formación endógena de los mismos,

proveyendo así una alternativa natural para moderar el riesgo de exposición a los diferentes carcinógenos químicos con los que el hombre está en contacto.

En México y varios países en vías de desarrollo, uno de los principales problemas de salud lo constituyen las enfermedades parasitarias por lo cual el uso de fármacos antihelmínticos y amebicidas es muy frecuente. Entre los principales medicamentos antiparasitarios se encuentran algunos que como la piperazina, mebendazol, cloroquina, dehidroemetina, pamoato de pirantel, iodoclorohidroxiquinoleína e hidroxinaftoato de bfenio presentan en su estructura grupos amino o amido. Esto puede dar lugar a la formación de compuestos N-nitroso mutagénicos y potencialmente carcinogénicos, de ingerirse los medicamentos junto con alimentos y bebidas ricas en nitritos.

Lo anterior llevó a plantear la presente investigación tendiente a evaluar la capacidad de los medicamentos citados de reaccionar con nitrito in vivo e in vitro y dar lugar a la formación de compuestos N-nitroso mutagénicos.

Al mismo tiempo el estudio se enfocó a detectar factores que favorecen o interfieren con la nitrosación de manera de presentar alternativas para prevenir la exposición de los pacientes a agentes genotóxicos.

OBJETIVO GENERAL.

Contribuir a evaluar y prevenir el riesgo de exposición a derivados nitrosados mutagénicos y potencialmente carcinogénicos provenientes de la nitrosación de medicamentos antiparasitarios aminados y nitritos provenientes de la dieta.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar las condiciones que favorecen la reacción entre medicamentos y nitrito de sodio in vitro.
2. Evaluar la mutagenicidad de los derivados nitrosados.
3. Valorar la actividad mutagénica de la orina de ratones expuestos a los medicamentos y nitrito por vía oral, como un indicador de la nitrosación endógena.
4. Caracterizar los factores que influyen en la formación endógena de los derivados nitrosados de los medicamentos.
5. Determinar el efecto de la vitamina C sobre la nitrosación de medicamentos in vitro e in vivo, como una alternativa para prevenir la formación de compuestos mutagénicos.

II ANTECEDENTES

1. RELACION ENTRE CARCINOGENESIS Y MUTAGENESIS

1.1 MODELOS DE CARCINOGENESIS QUIMICA

El proceso de carcinogénesis es muy complejo y evidentemente es consecuencia de muchos factores que conducen a la proliferación autónoma de las células malignas. La etiología de este padecimiento aún es muy confusa y sólo se han planteado diferentes teorías para poderla explicar. El modelo de iniciación-promoción es uno de los más aceptados. De acuerdo con él se ha definido al proceso de carcinogénesis como la transformación de una célula normal en una célula maligna. Para que este proceso se lleve a cabo se han propuesto tres etapas consistentes en: 1) iniciación, 2) promoción y 3) progresión.

El proceso de iniciación se refiere a la conversión de una simple célula normal en una célula pre-maligna en forma irreversible, mientras que la progresión se refiere a la amplificación de esta clona y al desarrollo de un estado invasivo, que avanza hasta dar lugar a la formación de metástasis (Trosko y Cheng, 1984).

La iniciación del proceso de carcinogénesis puede ser producida por diferentes factores que sean capaces de fijar una mutación

en forma heredable al ADN. Entre los principales agentes responsables de producir ese tipo de lesiones al ADN se han identificado factores físicos como las radiaciones naturales o inducidas, así como la formación de radicales libres generados en muchas ocasiones por los procesos metabólicos normales del organismo. Dentro de estos agentes capaces de desencadenar el proceso de carcinogénesis, se encuentran compuestos cuyo contacto se puede evitar o moderar, tales como los contaminantes ambientales o de ambientes laborales, mutágenos químicos provenientes de alimentos, medicamentos o tabaco.

El daño producido al ADN por cualquiera de estos compuestos no es necesariamente traducido en mutaciones o muerte celular ya que la célula cuenta con diferentes mecanismos de reparación. En efecto, una mutación al ADN es el resultado de la falta de reparación o de una reparación incorrecta que en ambos casos conducen a que una lesión al ADN pueda ser heredada de una célula a las células hijas. El daño producido al ADN puede o no causar alteraciones al fenotipo y puede permanecer en la célula como una lesión que le confiere el carácter premaligno.

El daño al ADN no reparado, puede además de inducir mutaciones heredables, producir efectos letales los cuales se traducen en muerte celular. Este efecto citotóxico puede actuar como un estímulo mitótico, induciendo hiperplasia de las células inducidas hasta pasar una forma premaligna a una forma maligna.

Consecuentemente el funcionamiento efectivo de los sistemas de reparación tiene un papel muy importante en las etapas de iniciación de carcinogénesis. Con base a estos hallazgos se ha considerado por un lado, que los fármacos citostáticos cuyo daño no puede ser corregido por el sistema de reparación por escisión son los más peligrosos para la salud, mientras que por otro, se ha mostrado que la presencia de sistemas de reparación propensos a error es necesaria para poner de manifiesto la actividad de algunos mutágenos químicos o de agentes como la luz ultravioleta (Elledge y Walker 1983, Inman et al. 1983, Trosko y Chang 1984, Trosko 1986).

El principal mecanismo de reparación libre de error que se ha identificado tanto en cepas de Escherichia coli, Salmonella typhimurium, células de mamífero como los fibroblastos, así como en los seres humanos, gracias al estudio de pacientes con Xeroderma pigmentosum, es el mecanismo de reparación por escisión. Para que este mecanismo de reparación se lleve a cabo se requieren varias enzimas como las correendonucleasas Uvr que hacen un corte en el extremo 5' de la base dañada mediante la hidrólisis de enlace fosfodiéster. La Uvr endonucleasa es una enzima constituida por tres subunidades que son el producto de los genes UvrA, UvrB y UvrC. La UvrA realiza el reconocimiento

primario de la lesión, sin embargo a falta de alguna de estas otras dos subunidades no se puede realizar el corte. Se ha propuesto que la subunidad UvrB es probablemente la más eficiente en la escisión de la base dañada ya que es la que se encuentra con mayor abundancia en la célula (Lindahl, 1982). Una vez escindido el nucleótido dañado éste es eliminado junto con alguna otras bases adyacentes por la actividad exonucleolítica 5' — 3' de la polimerasa I. Finalmente la brecha se llena también por la acción de la polimerasa usando como templete la hebra no dañada y los extremos de las dos cadenas son unidos por la acción de una ligasa (Sargentí y Smith, 1985).

1.2 LOS COMPUESTOS N-NITROSO COMO INICIADORES DEL PROCESO DE CARCINOGENESIS

Como ya se ha mencionado los compuestos nitrosados son capaces de inducir mutaciones al introducir grupos alquilos al ADN. En particular, la alquilación del oxígeno 6 de la guanina se ha identificado frecuentemente en las células de tumores inducidos por estos compuestos, por lo cual se considera que este tipo de lesión está involucrada en la fase de iniciación del cáncer (Bartsh y Montesano, 1984, Preussman y Stewart 1984, Shank 1975).

En cuanto a su actividad carcinogénica, existen diferencias notables en el comportamiento de las nitrosaminas y las nitrosamidas. Estas últimas por ser agentes alquilantes directos son capaces de inducir cáncer y tumores cerca del sitio de aplicación. Es por ello que la mayoría de las nitrosamidas producen tumores de piel después de su aplicación tópica o subcutánea. Mientras que al administrarse por vía oral, inducen tumores en el tracto digestivo, especialmente en el esófago, aunque pueden favorecer también el desarrollo de cáncer en la boca o en el estómago. Por otro lado, la administración de nitrosamidas por vía peritoneal induce cáncer de intestino o tumores en la cavidad peritoneal y la administración por vía parenteral da lugar en la mayoría de los casos a tumores pulmonares a excepción del grupo de las N-nitroso-alquil-ureas,

las cuales se han detectado como agentes neurocarcinógenos (Mirvish et al. 1987, Schmahl y Habs 1980, Preussman y Stewart, 1987).

Las nitrosaminas, al contrario, por no ser activas por sí solas no producen tumores en el sitio cercano a su aplicación ya que deben ser transformadas metabólicamente. Así pues, su vía de administración no influye en su especificidad por algún órgano (organotropismo). La especificidad de las nitrosaminas por un sitio blanco depende más bien de factores tales como la naturaleza química del compuesto, la dosis empleada y la especie animal en la cual se administre el compuesto.

Se sabe que el mecanismo de activación de las nitrosaminas es por lo general la α -hidroxilación y que la presencia de sustituyentes del hidrógeno en posición α disminuye no sólo su actividad mutagénica sino su potencia carcinogénica. Así, la *N*-nitrosopropil-amina es más activa que su isómero *N*-nitroso-dipropilamina. Este efecto no sólo se ha demostrado con las nitrosaminas alifáticas, sino que se observa también con las nitrosaminas aromáticas; por ejemplo que la 1-4-dinitrosopiperazina es más carcinogénica que la 2-6-dimetil-*N*-nitrosopiperazina (Preussman y Stewart 1984, Poor et al. 1980). Se sabe además que al incrementar el número de carbonos de la cadena lateral de las *N*-hidroalquil-*N*-nitrosaminas aumenta su potencia carcinogénica (Maekawa et al. 1986). Las *N*-alquilaril

nitrosaminas son carcinógenos muy potentes posiblemente por la formación de iones electrofílicos aromáticos o iones fenólicos formados después de la activación metabólica (Preussman 1983).

En estudios de carcinogénesis in vivo se ha encontrado que a dosis altas se puede reducir el tiempo de inducción de un tumor hasta un punto en el cual el compuesto no sea tóxico o no llegue a saturar las vías de activación metabólica. Sin embargo, otros trabajos señalan que el efecto de la dosis empleada no es solo cuantitativo sino que en muchos casos puede dar lugar a diferencias cualitativas en cuanto al tipo de tumores producidos. Por ejemplo, la N-nitrosodietilamina a dosis altas induce preferentemente tumores hepáticos en las ratas mientras que a dosis bajas en los mismos animales induce tumores de lengua y faringe, siendo muy escasos los tumores hepáticos. Con nitrosaminas cíclicas se ha encontrado también que las diferencias de dosis producen variaciones en el organotropismo del compuesto, como es el caso de la N-nitroso-dimetilfenilamina que a dosis bajas induce preferentemente adenocarcinomas de la nariz y a dosis altas produce además papilomas de esófago (Crampton 1980, Guess y Hoel 1977, Lijinsky 1982a, Lijinsky y Taylor 1978).

Las diferencias descritas en el organotropismo en distintas especies obedece en parte al tipo de metabolismo del animal en que se estudie. La dietilnitrosamina, por ejemplo, induce

cáncer de hígado en diferentes especies pero no en el hamster chino; en ratón no induce cáncer de riñón lo que si ocurre en la rata, puerco y pollo en los cuales genera adenocarcinoma de riñón (Schanhl y Habs 1980, Lijinsky et al. 1987). Se ha señalado que la susceptibilidad a los carcinógenos está influenciada por la edad del animal en estudio, incrementándose la resistencia a las nitrosaminas con la edad de las ratas (Lijinsky y Kovatch 1986).

Aunque la carcinogenicidad de los compuestos N-nitroso ha sido suficientemente demostrada en estudios en animales, no ha podido ser corroborada en el ser humano. Existen en efecto, pocas evidencias directas de que este grupo de compuestos sea directamente responsable del cáncer en el hombre. En el caso de las N-nitrosoureas que se emplean como agentes antitumorales se ha reportado la aparición de leucemia no linfática después del tratamiento con ellas. A la vez que se ha identificado la presencia de nitrosaminas específicas del tabaco en la saliva de personas en alto riesgo de adquirir cáncer de lengua, por el consumo de rapé (Prokopyk et al. 1987).

De 290 compuestos N-nitroso evaluados en 39 especies diferentes, se ha encontrado que el 92% de ellos son carcinogénicos (tabla 1) (Bogovsky y Bogovsky 1981). Existen datos que indican que el ser humano, al ser capaz de activar las nitrosaminas al igual que los animales, puede también ser sensible al efecto

carcinogénico de los compuestos N-nitroso. En efecto, se ha visto que tejidos humanos tales como bronquios y esófago, metabolizan las N-nitrosaminas produciendo derivados alfa-hidroxiados capaces de producir la alquilación de las bases de ADN de las células de dicho tejido (Harris et al. 1977, Preussman 1983).

TABLA I

CARCINOGENICIDAD DE COMPUESTOS N-NITROSO

COMPUESTO	PROBADAS	POSITIVAS	NEGATIVAS
NITROSAMINAS:			
SIMETRICAS	49	41	8
ASIMETRICAS	80	68	12
DINITROSAMINAS	4	4	0
CICLICAS	<u>71</u>	<u>60</u>	<u>11</u>
	204	173 (85%)	31 (15%)
NITROSAMIDAS			
NITROSOUREAS	55	53	2
NITROSOQUANIDINAS	8	5	3
NITROSOURETANOS	13	13	0
OTRAS NITROSAMIDAS	<u>10</u>	<u>8</u>	<u>2</u>
	86	79 (92%)	7 (8%)
TOTAL DE COMPUESTOS N-NITROSO	290	252 (87%)	38 (13%)

FUENTE: (PREUSSMAN 1983).

1.3 RIESGO DE CANCER POR LA FORMACION ENDOGENA DE COMPUESTOS N-NITROSO

Se considera en la actualidad que la principal fuente de exposición del ser humano a los compuestos N-nitroso potencialmente carcinogénicos, la constituye su formación dentro del organismo al reaccionar nitritos y aminas que se ingieren junto con bebidas y alimentos o medicamentos.

Se calcula que en los Estados Unidos el consumo diario de nitrosaminas preformadas es tan sólo de alrededor de 2 mg por persona (Preussman 1983, Lijinski, 1982).

En animales de experimentación se ha comprobado que la formación endógena de nitrosaminas puede dar lugar al desarrollo de cáncer si se exponen a ellas en forma continua (Tabla II) (Lijinski 1980).

En los estudios de carcinogénesis inducida por la formación de compuestos N-nitroso in vivo ha sido muy difícil demostrar la formación de tumores con compuestos cuya reacción de nitrosación ocurre lentamente debido a que normalmente el nitrito se administra en el agua y la amina en los alimentos ya que en dichas condiciones de ensayo, los dos reactivos no llegan fácilmente a estar en el estómago simultáneamente y en concentraciones adecuadas. Así por ejemplo, aunque es bien

conocida la carcinogenicidad de los derivados N-nitroso de dietilamina, piperidina, tiociclo-hexilamina, N-metilacetamida, citrulina y metilguanidina, no se ha podido demostrar la formación de tumores en roedores tratados con nitrito y dichos compuestos (Druckey et al. 1973, Mirvish et al. 1975, Lijinsky 1980).

En lo que concierne a las poblaciones humanas, existen evidencias indirectas de que el consumo de precursores de nitrosaminas o de las propias nitrosaminas constituyen un factor importante en el riesgo de cáncer. Al estudiarse comparativamente dos regiones de China con alto y bajo riesgo de cáncer de esófago en el hombre y los animales domésticos se encontró que el contenido de nitrosaminas especialmente en los vegetales fué muy superior en las regiones de alto riesgo. Además, el contenido de aminas secundarias y especialmente de nitrito en el suelo y los granos fué del doble de lo que se detectó en el área de bajo riesgo (Lu et al. 1986, Yang et al. 1980). En otros estudios se ha señalado que el contenido de nitrito y nitrato en lugares con alto riesgo de cáncer como Colombia, es muy elevado (Cuello et al. 1976). El cáncer nasofaríngeo se ha visto también que es muy frecuente en la región cantonesa de China, en Túnez y en grupos esquimales del este de Groenlandia. En estos lugares se encontró que en los alimentos que las poblaciones consumen con una frecuencia mayor de tres veces por semana hay un alto contenido de nitrosaminas y

sus precursores, especialmente en los pescados preservados de China y Groenlandia y en carnes de carnero de Túnez (Poirier et al. 1987).

El tabaquismo es posiblemente el factor etiológico del cáncer en el humano que más se ha estudiado, habiéndose demostrado que las nitrosaminas propias del tabaco pueden formarse en la saliva de personas con el hábito de mascar tabaco y rapé en un área central de Rusia (Zardie et al. 1985, Belinsky et al. 1987).

TABLA II

AMINAS QUE PRODUCEN CANCER DESPUES DE LA REACCION
DE NITROSACION IN VIVO

COMPUESTO	ORGANO AFECTADO	REFERENCIA
MORFOLINA	HIGADO	123
METILBENZILAMINA	ESOFAGO	123
HEPTAMETILAMINA	PULMON, ESOFAGO	123
HEPTAMETILENEMINA	PULMON, ESOFAGO	129
CLORDIAZEPOXIDO	TRAGUEA, SISTEMA NERVIOSO	123
TOBULTAMIDA	ESTOMAGO, HIGADO	123
AMINOPIRINA	HIGADO	123, 224
MONUROM	ESTOMAGO, HIGADO	123
DISULFIRAM	ESOFAGO	123
OXITETRACYCLINA	HIGADO	123, 225
LUCANTONA	HIGADO	123
METAPIRILENO	HIGADO	123
METIL-DODECIL-AMINA	VEJIGA	123
THIRAM	ESTOMAGO	123
PIPERAZINA	PULMON, ESOFAGO	219
METIL-UREA	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, PULMON, ESOFAGO	155
ETIL-UREA	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL, PULMON, ESOFAGO	155

TABLA II

COMPUESTO	ORGANO AFECTADO	REFERENCIA
N-METILANILINA	PULMON	155
CIMETIDINA	ESTOMAGO	203

2. ANTIMUTAGENESIS

2.1 DEFINICION Y CLASIFICACION DE ANTIMUTAGENOS

El término antimutágeno se refiere a un factor o compuesto que es capaz de reducir la frecuencia de mutación tanto natural como inducida. Sin embargo, en el estudio del fenómeno de antimutagénesis deberá tenerse la precaución de diferenciar la antimutagénesis verdadera de la aparente. Debe entenderse por antimutagénesis verdadera la reducción del número de revertantes o mutantes, sin que esto se deba a una reducción falsa debida a la muerte celular (Clarke y Shankel 1975).

En la naturaleza existen un gran número de mutágenos que actúan por diferentes mecanismos, lo mismo ocurre con los antimutágenos. Estos últimos han sido clasificados de acuerdo a sus diferentes mecanismos de acción en dos grupos principales: desmutágenos y bioantimutágenos. El término desmutágeno se refiere a compuestos químicos o procesos bioquímicos que actúan fuera de la célula, mientras que el término bioantimutágeno se ha empleado para designar aquellos compuestos o factores que intervienen intracelularmente cuando el daño al ADN inducido por un mutágeno ya ha sido producido.

Dentro del grupo de los desmutágenos se encuentran inactivadores químicos o enzimáticos de los mutágenos, procesos de

inactivación física por la adsorción del mutágeno a un compuesto de alto peso molecular, compuestos o factores que impidan la activación metabólica de un pro-mutágeno y finalmente aquellos factores que impiden la formación de los mutágenos a partir de sus precursores. Dentro del grupo de los bio-antimutágenos se encuentran aquellos que promueven la reparación inespecífica, como es el caso de la reparación por un mecanismo de recombinación de dos segmentos del ADN. Otro tipo de bioantimutágenos puede actuar estimulando los procesos de reparación libres de error o inhibiendo el proceso de reparación SOS propenso a error, así como incrementando la fidelidad de la ADN polimerasa en los procesos de replicación (Kada 1981, Kada et al. 1986).

Los compuestos antimutagénicos pueden también actuar como anticarcinógenos, por lo que se ha planteado que la amplia distribución de anticarcinógenos en la naturaleza es una forma natural de moderación a la exposición a mutágenos y carcinógenos (Ames 1983). Entre los anticarcinógenos se distinguen dos grupos de compuestos que son los bloqueadores y los supresores o antipromotores. Los primeros impiden que un carcinógeno sea biotransformado y llegue a la célula blanco y el segundo grupo son los que impiden que una vez que el proceso de carcinogénesis se ha iniciado se desarrollen los subsecuentes pasos de promoción y progresión (Hayatsu et al. 1981, Kenedy y Litte 1978, Moon et al. 1983, Wattenberg 1978, Wattenberg 1983).

La mayoría de los antimutágenos y anticarcinógenos conocidos han sido encontrados entre los componentes de la dieta. Existiendo por otro lado evidencias de que una dieta rica en vegetales está frecuentemente asociada a una baja incidencia de cáncer. Así se demostró que el riesgo de cáncer de colon es menor en personas que consumen frecuentemente col, brócoli y frijol. Posteriormente, se aisló de la semilla de frijol un compuesto proteico con un peso molecular de 8000 daltons, demostrándose que esta proteína posiblemente anticarcinogénica, inhibe los efectos de las radiaciones con rayos X, funciona como un inhibidor de proteasas y es capaz de capturar radicales libres de oxígeno (Yavellow et al. 1982, 1983). Otros compuestos de la dieta que como los retinoles y las flavonas son capaces de atrapar radicales libres del oxígeno pueden igualmente interferir con el proceso de inducción de carcinogénesis en animales de laboratorio. Los retinoles por su parte son capaces de disminuir las enzimas que incrementan el fenómeno de promoción del cáncer estimulado con ésteres de forbol, como es el caso de la ornitina descarboxilasa. A su vez los compuestos del tipo de la flavonas inhiben la formación de las oxigenasas, enzimas que son responsables de la activación de los hidrocarburos aromáticos como el benzo-(a)-pireno (Baird y Benbaum 1979, Bowtwell 1983, Sani et al. 1984, Verna et al. 1979, Wattenberg y Leong 1970). El retinol presente en alimentos es otro de los anticarcinógenos más importantes que gracias a sus propiedades antioxidantes es capaz de inhibir el cáncer de

glándula mamaria, recto y vejiga en animales de laboratorio. (Graham et al. 1983, Moon et al. 1983).

Además de los antimutágenos y anticarcinógenos ya mencionados en vegetales verdes y frutas se han detectado un gran número de compuestos que como la clorofila, carótenos, tocoferoles, esteroides vegetales, sales de selenio, flavonoides metilados, isotiocianatos aromáticos muestran actividad antimutagénica en pruebas realizadas in vitro, tales como los sistemas bacterianos de S. typhimurium y E. coli (Alekperow et al. 1981, Barale et al. 1983, Lai et al. 1980, Minakota et al. 1983, Morita et al. 1983, Newberne et al. 1983, Ong et al. 1986).

Otro grupo de compuestos antimutagénicos que se han encontrado en la naturaleza son aquellos que como el cloruro de cobalto, presente en la placenta humana estimulan los mecanismos de reparación por recombinación. Otros iones metálicos como el platino, a bajas concentraciones inducen el mecanismo de reparación por escisión. En los vegetales se han detectado también otros compuestos como el ácido tánico, pirogalol y aldehído de la canela inducen las correndonucleasas Uvr (Farm et al. 1986, Kada y Kanematzu 1978, Ohta et al. 1983, Shimoï et al. 1986).

Dentro del organismo se encuentran también sustancias que son capaces de interferir con la actividad de los mutágenos, tal es

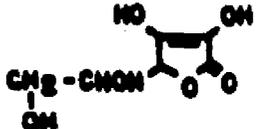
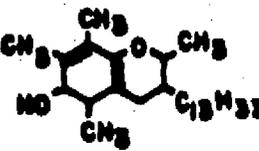
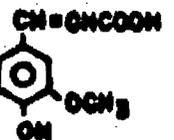
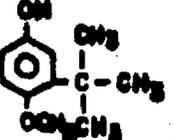
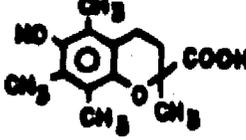
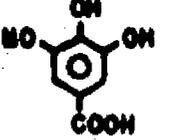
el caso de la hemina que se conoce que puede impedir in vitro la activación metabólica de derivados mutagénicos productos de la pirólisis de aminas aromáticas. También se ha demostrado que en las muestras de heces humanas se encuentran presentes algunos compuestos como los ácidos grasos linolénico y linoleico que son capaces de antagonizar el efecto mutagénico de numerosos compuestos como el benzo-(a)-pireno, productos de pirólisis del triptófano, metil-imidazo quinolinas y aflatoxina B en cepas de S. typhimurium, posiblemente mediante la inhibición de su activación metabólica (Hayatsu 1981, Hayatsu et al. 1981).

2.2 SUBSTANCIAS QUE INHIBEN LA FORMACION DE LOS COMPUESTOS N-NITROSO

La formación de los compuestos N-nitroso puede ser inhibida por diferentes compuestos que se encuentran naturalmente distribuidos en las plantas, dentro de los cuales se ha encontrado que la cafeína, ácido cafeico, alfa-tocoferoles (Vitamina E), ácido ascórbico (Vitamina C) pueden inhibir la formación in vitro de compuestos N-nitroso o pueden así mismo inhibir la formación de tumores en los animales tratados con nitrito de sodio, aminos, amidas o ureas.

Se demostró que en una reacción in vitro en jugo gástrico sintético, el ácido cafeico y el ácido ferúlico reaccionan en forma equimolar con el nitrito de sodio funcionando de este modo como bloqueadores de la reacción de nitrosación. La presencia de sustituyentes en el anillo del ácido cafeico, como ocurre en el caso de terbutil hidroxianisol y del trolox, disminuyó la eficiencia de los compuestos fenólicos para reaccionar con el nitrito de sodio (tabla III). La eficiencia del ácido cafeico y de la cafeína se pudo demostrar también en su capacidad de reducir tumores en ratones tratados con nitrito de sodio y nitrosomorfolina o en ratas tratadas con aminopirina y nitrito de sodio. El ácido gálico es otro compuesto fenólico, capaz de inhibir la formación de los compuestos N-nitroso in vivo (Mirvish et al. 1975, Kuenzing et al. 1984).

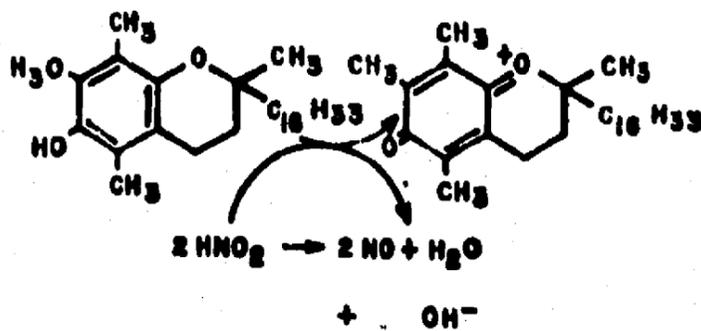
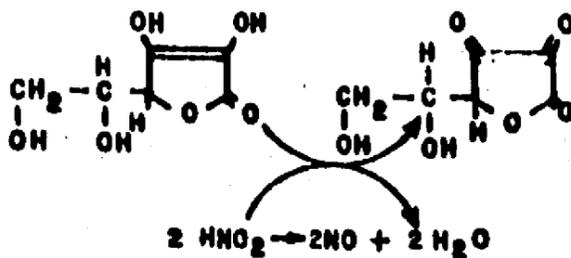
TABLA 111. COMPUESTOS QUE INHIBEN LA REACCION DE NITROSACION DE AMINAS Y AMIDAS.

COMPUESTO	FORMULA	FUENTE	REFERENCIA.
ACIDO-ASCORBICO		FRUTOS CITRICOS	153, 157, 160
ALFA-TOCOFEROL		HUEVO, CARNES, ACEITE DE MAIZ	157
ACIDO CAFEICO		TE NEGRO, CAFE	114, 160
ACIDO FERULICO		LEGUMBRES Y VEGETALES.	114
HIDROXITERBUTIL-ANISOL.		VERDURAS	114
TROLOX		VERDURAS	114
ACIDO GALICO		VERDURAS	114, 160

El alfa-tocoferol que es el principal componente de la vitamina E es un fenol altamente lipofílico que puede inhibir la reacción entre compuestos aminados y nitrito de sodio en fase orgánica o en emulsiones, o en una matriz de lípidos. El alfa tocoferol reacciona con nitrito de sodio reduciendo el nitrito a monóxido de nitrógeno (Fig. 1). Se ha demostrado que este compuesto puede inhibir fuertemente la formación de N-nitrosobutil amida a partir de N-butilamida. Se han descrito otros fenoles como el 4-metil-catecol que inhibe la reacción de nitrosación a concentraciones muy altas, pero por el contrario, a concentraciones muy bajas reacciona con ácido nitroso formando compuestos nitro que catalizan la reacción de nitrosación. En el caso del alfa-tocoferol debido a que el anillo está completamente sustituido no pueden ocurrir las reacciones catalíticas. Por otro lado se ha demostrado que la vitamina E inhibe in vivo la reacción entre la morfolina y el nitrito, además, gracias a su efecto antioxidante puede inhibir la formación de tumores de piel, decreciendo los niveles de ornitina descarboxilasa, glutatión libre y disulfóxido de glutatión, todos ellos compuestos involucrados en la promoción del cáncer. Por otro lado no se ha demostrado que el alfa-tocoferol sea carcinogénico por sí solo, sin embargo, existen evidencias de que puede promover el cáncer de colon inducido por dimetil-hidrazina (Mirvish 1986, Perchellet et al. 1985, Toth y Patiel 1983).

FIGURA 1. REACCIONES DE OXICOREDUCCION ENTRE EL ACIDO ASCORBICO, ALFA-TOCOFEROL Y NITRITO DE SODIO.

OXIDOREDUCCION ENTRE
EL ACIDO ASCORBICO Y
EL ACIDO NITROSO.



OXIDOREDUCCION ENTRE
EL ALFA-TOCOFEROL Y
EL ACIDO NITROSO.

El ácido ascórbico reacciona con el nitrito de sodio mediante una reacción de óxido-reducción formándose monóxido de nitrógeno y ácido dehidro-ascórbico (Fig. 2), ocurriendo esta reacción especialmente a un pH menor de 5.0. La reacción entre el ácido ascórbico y el nitrito de sodio se lleva a cabo mediante un ataque electrofílico del agente nitrosante al agente reductor. La afinidad del agente nitrosante es mucho mayor sobre dicho agente reductor que sobre la amina por lo que se ha demostrado en reacciones in vitro que este compuesto puede inhibir la formación de diferentes compuestos N-nitroso. Sin embargo, se ha visto que el monóxido de nitrógeno formado durante la reacción con el ácido ascórbico y el nitrito, al reaccionar con el agua regenera el ácido nitroso en la mezcla de reacción, razón por la cual se ha visto que para inhibir la nitrosación de aminas secundarias, que es más rápida que con las terciarias, se requiere de una relación molar de (1:2) de (nitrito : ácido ascórbico, mientras que en el caso de las aminas terciarias como la oxitetraciclina, una relación equimolar de vitamina C: ácido ascórbico (1:1) inhibe en un 100% la reacción de nitrosación (Bunton et al. 1959, Mirvish 1972).

El ácido ascórbico puede, además, inhibir la actividad mutagénica de la N-metil-N-nitrosoguanidina en presencia de iones cuproso (Cu⁺). Se sabe que la generación de peróxido de hidrógeno durante el proceso de auto-oxidación del ácido ascórbico es capaz de producir la descomposición del compuesto.

Pudiendo esta reacción ser inhibida por un agente quelante como el EDTA. Sin embargo, el ácido ascórbico no es capaz de disminuir in vivo las mutaciones inducidas por la MNNG en S. typhimurium TA100 en el ensayo vía el hospedero en ratón (Norkus y Kuremzing 1985).

A pesar de lo anterior se ha demostrado que el ácido ascórbico no solo bloquea la reacción de nitrosación in vitro, sino que al administrarse a animales tratados con nitrito de sodio y compuestos aminados como la aminopirina, dimetilamina, metilurea, y prolina, se inhiben tanto las mutaciones detectables en bacterias por el ensayo vía el hospedero como la frecuencia de tumores inducidos por la nitrosación endógena de compuestos aminados (Barale et al. 1986, Greenblat et al. 1973, Linitas et al. 1982, Mirvish 1986).

En un estudio realizado en perros se puso en evidencia que in vivo se requiere una relación molar de (3:1) de ascorbato de sodio con respecto al nitrito de sodio para lograr un 71% de inhibición de la nitrosación de la dimetilamina (Linitas et al. 1982). Resultados semejantes se dieron a conocer posteriormente en otro estudio, en el cual una dosis 10 veces mayor de vitamina C, a la requerida para inhibir la reacción in vitro, no fué capaz de disminuir los niveles de excreción urinaria de N-nitrosoprolina a la línea basal encontrada antes de que un grupo de voluntarios ingirieran prolina y nitrito (Leaf et al. 1987). Estos resultados indican que la inhibición de las reacciones de nitrosación in vivo parecen

estar influenciados por diversos factores como el pH, solubilidad de los compuestos y la rapidez de absorción de cada uno de ellos (Linitas et al. 1982).

Aunque el efecto de la vitamina C sobre mutágenos ya formados se ha discutido mucho, existen sin embargo evidencias, de que la vitamina C es capaz de alargar el periodo de inducción de cáncer, así como de reducir la gravedad de los tumores en animales de laboratorio tratados con dimetilhidrazina, dietilmetilestrol y dimetilnitrosamina. Paralelamente se han reportado datos que asocian la carencia de vitamina C a una frecuencia mayor de cáncer de estómago, esófago, laringe, boca y cervix (Mirvish 1986).

Sin embargo, el empleo de la vitamina C para prevenir el efecto de mutágenos químicos debe tomarse con mucha reserva ya que se ha demostrado que como resultado de la generación de peróxido de hidrogeno y radicales libres en el proceso de autooxidación de este compuesto, el ácido ascórbico es capaz de inducir rompimientos en la cadena del ADN. (Shamberger 1984). Además, existen evidencias de que la sal sódica del ácido ascórbico puede actuar como promotor del cáncer de vejiga e incrementar el cáncer de nariz inducido por el tabaco, así como el cáncer de esófago inducido por dietilnitrosamina (Fukushima et al. 1986, Mirvish 1986, Shamberger 1984). Lo expuesto no anula la posibilidad de emplear la vitamina C como un agente protector sino que enfatiza la necesidad de hacerlo mediante el estudio cuidadoso de las condiciones en las que interfiere con cada compuesto mutagénico particular.

3. GENERALIDADES SOBRE COMPUESTOS N-NITROSO

3.1 DEFINICION DE COMPUESTOS N-NITROSO

Los compuestos N-nitroso constituyen un grupo extenso de productos químicos cuyo interés de estudio surgió desde 1956 cuando Mac Gee y Barnes pusieron en evidencia la capacidad carcinogénica de la N-nitrosodimetilamina. Posteriormente se detectó la capacidad carcinogénica de diferentes compuestos químicamente asociados como son la nitrosometilurea y N-nitrosodietilamina. Con estos estudios se puso de manifiesto la actividad biológica de los compuestos N-nitroso, incrementándose el interés por el estudio de sus posibles implicaciones en el cáncer humano, así como en la identificación de las formas de exposición a estos agentes (Preussman y Stewart 1984).

Los compuestos N-nitroso se definen químicamente como el producto de la reacción catalítica a pH ácido entre el ion nitrito y diferentes compuestos nitrogenados. Estos compuestos se subdividen en nitrosaminas y nitrosamidas de acuerdo con el compuesto nitrogenado que ha dado lugar a su formación. Se denominan nitrosaminas los productos de la reacción del nitrito con aminas secundarias alifáticas (dialquilaminas, diaril y dialcorilaminas), aminas terciarias alifáticas y aminas secundarias y terciarias heterocíclicas, derivados pirimidínicos y enaminas. Las nitrosamidas son, por su parte, el producto de

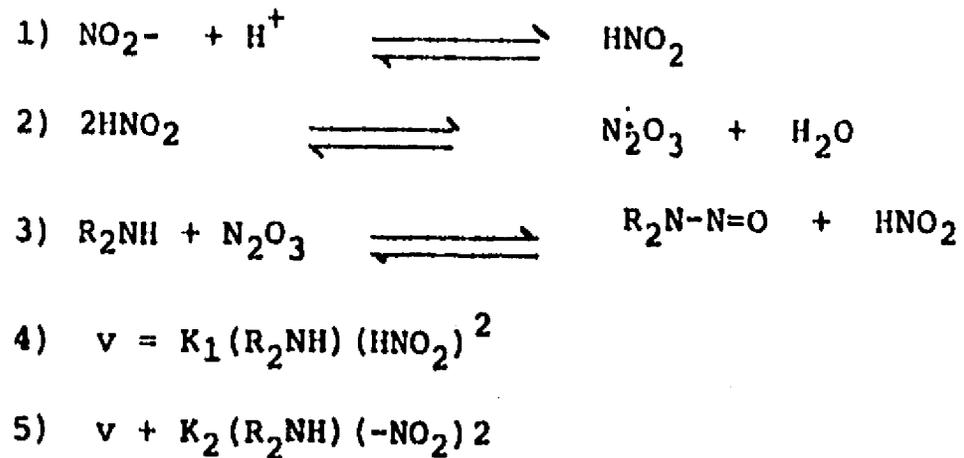
la reacción de N-alquilureas, N-alqui-carbamatos, hidroxilaminas, hidrazinas, hidrazonas y N-alquilamidas (Chow 1973, Fielder et al. 1972, Lijinsky et al. 1972, Mirvish 1975).

La reacción de nitrosación de los compuestos aminados que dan lugar a la formación de compuestos N-nitroso, (Tabla IV) se lleva a cabo con agentes nitrosantes como óxidos de nitrógeno, (NO , N_2O_3), cloruro o bromuro de nitrilo (NOCl , NOBr), sulfuro de nitrilo y de tetrafluoroborato de nitrilo (NOF_4BO_4). (Mirvish 1975, Preussman y Stewart 1984).

3.2 CINÉTICA DE LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS N-NITROSO

La cantidad de producto N-nitroso que se pueda formar a partir de sus precursores, ya sea en una reacción in vitro o in vivo depende de la constante de la reacción y de su origen. La reacción de nitrosación ocurre en varios pasos, en el primero, el nitrito de sodio es convertido en ácido nitroso. Posteriormente, el ácido nitroso es convertido en alguna de las especies reactivas como son el anhídrido nitroso (N_2O_3), nitrosil-tiocianato (ON-NCS), halogenuro de nitrilo (NOX), o ácido nitroso protonado ($H_2NO_2^+$) (MARVAH 1975).

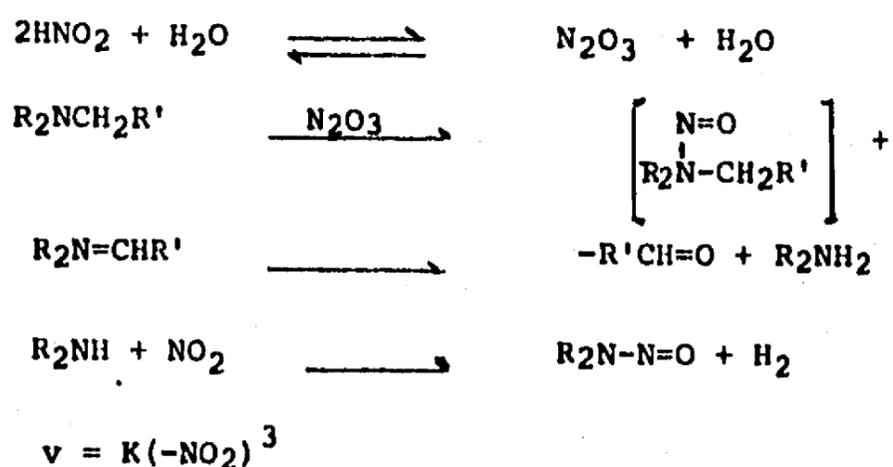
El agente nitrosante puede reaccionar con aminas alifáticas primarias, sin embargo, esta reacción genera una monoalquil nitrosamina que es muy inestable y se descompone dando lugar a un alqueno y un alcohol (Rakoff, 1974). La nitrosación de aminas secundarias alifáticas o aromáticas es una de las principales fuentes de compuestos N-nitroso y esta reacción puede ocurrir durante el cocimiento de los alimentos o en procesos de fermentación. La reacción entre el ácido nitroso y las aminas secundarias, a la inversa de las aminas primarias, produce compuestos N-nitroso muy estables. Esta reacción, en la mayoría de los casos, ocurre mediante la formación de anhídrido nitroso a partir de dos moléculas de ácido nitroso de acuerdo con las siguientes reacciones.



La velocidad de la reacción de nitrosación de aminas secundarias es proporcional a la concentración del anhídrido nitroso por lo cual la constante de la reacción está determinada por la concentración de la amina a la primera potencia y por el cuadrado de la concentración del nitrito, de acuerdo a las ecuaciones anteriores. El pH óptimo para que se lleven a cabo estas reacciones se ha calculado que es entre 2.5 y 4.0. Siendo el pH del jugo gástrico cercano a 3.5 pueden darse las condiciones para que la nitrosación de aminas secundarias se efectúe in vivo (Lijinsky y Epstein 1970, Mirvish 1970, Mirvish 1975).

En vista de que las aminas terciarias carecen de un hidrógeno libre, fácilmente reemplazable, durante mucho tiempo se supuso que este grupo de compuestos no reaccionaban con los agentes nitrosantes. Sin embargo, se ha reportado que existen mecanismos de reacción mediante los cuales las aminas

trisubstituidas pueden reaccionar con nitrito para producir una nitrosamina secundaria. El principal de estos mecanismos es la nitrosación desalquilativa que se lleva a cabo de acuerdo con las siguientes reacciones (Lijinsky et al. 1972b).



La reacción es más lenta que la nitrosación de aminas secundarias siendo su pH óptimo entre 3.5 y 5. Se ha reportado que la temperatura óptima para esta reacción es entre los 90 y 100°C. Sin embargo se ha encontrado que algunas fármacos que como la aminopirina contienen en su molécula grupos amino terciarios, pueden transformarse en nitrosaminas en condiciones fisiológicas. El rendimiento de estas reacciones en condiciones suaves puede ser como en el caso de la aminopirina de un 40% y en el caso de la oxitetracilina hasta de un 65% (Lijinsky et al. 1972a y 1972b, Lijinsky 1974, Ohta et al. 1986)

Las reacciones de nitrosación de sales cuaternarias de amonio no

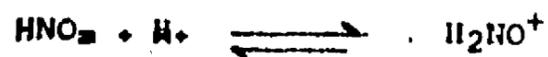
han sido muy estudiadas. Fiddler et al. (1972) detectaron la formación de dimetilnitrosamina a partir de clorohidrato de tetrametil amonio y de sales cuaternarias presentes en productos naturales como la carnitina, betaina y acetilcolina a pH = 5.0 y a una temperatura de 78°C. Siendo el rendimiento de reacción muy bajo en la mayoría de los casos, debido a que primero debe efectuarse la demetilación de un grupo para formar una amina terciaria que posteriormente es nitrosada mediante un mecanismo semejante al de dealquilación nitrosativa descrito para las aminas terciarias.

La nitrosación de ureas, carbamatos y amidas secundarias alifáticas ocurre frecuentemente en la naturaleza, pudiéndose realizar durante los procesos de cocción de los alimentos.

Estas amidas se generan por la reacción entre aminoácidos y ácidos grasos de alimentos, reaccionando posteriormente con el nitrito de sodio presente en los mismos (Kubaka y Gray 1980a, 1980b).

La reacción de amidas, carbamatos y guanidinas, depende de la concentración de nitrito y del grado de ionización del ácido nitroso más que el de la amida. Kabuka y Gray (1980) determinaron que la reacción de nitrosación de amidas se lleva a cabo con mayor eficiencia a un pH entre 1 y 2.5, disminuyendo considerablemente el rendimiento de la reacción al bajar la

concentración de iones hidrógeno, por lo cual a pH cercano a 3 el rendimiento de la reacción es muy bajo. La energía de activación para esta reacción es de 10 Kca/mol, por lo cual el rendimiento de la reacción se puede duplicar incrementando la temperatura de 30 a 40°C. La velocidad de la reacción de nitrosación de amidas está determinada por las siguientes reacciones:



$$v = k (\text{RNH.COR}') (\text{HNO}_2) (\text{H}^+)$$

$$v = k' (\text{RNH.COR}') (-\text{NO}_2) (\text{H}^+)$$

Las reacciones de nitrosación de compuestos nitrogenados, (aminas y amidas) pueden llevarse a cabo en la cavidad del estómago del hombre y de los animales. Existen evidencias que sugieren que la reacción in vivo sigue una cinética semejante a la que se ha reportado para la reacción in vitro. Aunque, debido a la dificultad de cuantificar los compuestos N-nitroso formados y a los diferentes factores que pueden modificar una reacción in vivo es difícil conocer con precisión la cinética de estas reacciones. No obstante, Oshima y Bartsh (1981) detectaron que la formación in vivo en humanos, de N-nitroso prolina a partir de nitrito y prolina sigue la cinética de las

reacciones de nitrosación de aminas secundarias observada in vitro. Por otro lado, Challis et al. (1982) han propuesto que la reacción de nitrosación in vivo a bajo contenido de nitrito está determinada por la concentración de este ión a la primera potencia. En otros estudios, tanto en animales como en pacientes con vagotomía fue difícil hacer una correlación del contenido de estos compuestos N-nitroso, pero se demostró que el contenido de estos compuestos es mayor cuando los valores de pH se encontraban entre 1.5 y 4.0 (Barnard et al. 1984, Barale et al. 1981, Linitas et al. 1983).

3.3 AGENTES QUE MODIFICAN LA REACCION DE NITROSACION

La formación endógena de compuestos nitrosados puede verse influida por múltiples factores que pueden actuar como catalizadores o inhibidores de las reacciones de nitrosación de aminas. De ahí que se recomienda tomar en cuenta este hecho cuando se evalúe la nitrosación de cualquier tipo de amina in vivo (Bartsh et al. 1986). A la vez, el empleo de inhibidores de la nitrosación se considera una alternativa viable para prevenir la exposición a compuestos que pueden constituir un riesgo para la salud humana.

Dentro de los catalizadores de la reacción de nitrosación se encuentran aniones nucleofílicos tales como los iones halogenuros especialmente, I-, Cl- Br-, y el ion tiocianato (NCS-) Dentro de estos agentes catalíticos se ha considerado que el ion tiocianato tiene un papel muy importante en la modificación de la cinética de la reacción in vivo ya que éste se encuentra normalmente en altas concentraciones en la saliva humana (Boylard et al. 1971, Fan y Tanenbraun 1973, 1974). El tiocianato en la mezcla de reacción genera el agente nitrosante ON-NCS, especialmente si el pH del medio está comprendido entre 2 y 3. La reacción de catálisis del tiocianato se representa mediante la siguiente ecuación:



En cuanto a la reacción de catálisis in vivo, no ha podido determinarse con precisión la influencia del ion tiocianato en la nitrosación endógena de aminas, sobre todo en las condiciones que privan en el estómago en donde el pH del jugo gástrico es cercano a 3.5. Se sabe, sin embargo, que la administración de tiocianato no ha logrado incrementar la frecuencia de tumores en animales tratados con nitrito de sodio, aminas o amidas (Mirvish 1975). Aunque por otro lado, en presencia de este ion en algunas ocasiones se han recuperado concentraciones de compuestos N-nitroso mayores a las esperadas como resultado de las reacciones de nitrosación in vivo (Challis et al. 1982).

Los iones halogenuros I-, Cl- y Br- catalizan la reacción mediante un mecanismo muy semejante al tiocianato, incrementando la concentración de iones nitrosantes dentro de la reacción, según se representa en la siguiente ecuación:



Se ha determinado que de los halogenuros, el bromo es el más activo y que el cloro tiene poco efecto sobre la reacción. A pesar de ello, su presencia puede tener más influencia en la formación de los compuestos N-nitroso in vivo debido a que es ingerido abundantemente con los alimentos en forma de cloruro de sodio (Boylard 1972).

Algunos fenoles que se encuentran en los vegetales pueden combinarse con los agentes nitrosantes para catalizar la reacción de nitrosación por medio del ácido nitroso, aunque un exceso de fenol puede por el contrario inhibir la reacción (Pignatelli et al. 1980).

3.4 FUENTES DE PRECURSORES DE LA FORMACION ENDOGENA DE COMPUESTOS N-NITROSO

3.4.1 FUENTES DE NITRITOS Y NITRATOS

La principal fuente de iones nitrosantes es el nitrito de sodio el cual puede ingerirse como tal o provenir de la reacción de reducción del nitrato. El nitrato se encuentra normalmente en la saliva, variando su concentración de una persona a otra. Este nitrato de la saliva pasa al estómago e intestino delgado en donde es absorbido y llega al torrente sanguíneo. Se ha demostrado que los iones cloruro y tiocianato tienen un papel muy importante en el transporte activo del ion nitrato, encontrándose que al elevarse el contenido de tiocianato se incrementa el contenido de nitrato en estómago y plasma. Otra parte del nitrato presente en la saliva es convertido in situ a nitrito por la flora bacteriana de la cavidad bucal, pasando este nitrito directamente al estómago. El nitrato que ha pasado de la saliva al estómago puede ser reducido a nitrito mediante la actividad nitrato-reductasa de las bacterias. Generalmente cuando el pH del estómago se encuentra en valores de 1 a 3 las cuentas bacterianas son muy bajas, pero éstas incrementan después de ingerir los alimentos así como el valor de pH del jugo gástrico, aumentando con ello la concentración del nitrito y de los compuestos N-nitroso (Barnard et al. 1981, Hartman 1982, Parks et al. 1981).

La actividad nitrato-reductasa de las bacterias se ha visto asociada a una enzima con un grupo molibdeno que es inducible en presencia de nitrato, especialmente en condiciones anaeróbicas. Se ha detectado, además, la presencia de una enzima bacteriana en Escherichia coli semejante a la nitrato-reductasa que cataliza la reacción de nitrosación en presencia de sus precursores (Calmels et al. 1987).

El nitrito y el nitrato presentes en la saliva pueden ingerirse con los alimentos como las carnes embutidas, vegetales que han sido abonados con nitratos, granos y aguas. De ellos los embutidos representan probablemente la principal fuente de nitritos y de nitratos, llegando a contener hasta 160 p.p.m. de nitrito en jamones y hasta 400 p.p.m en tocino y cecina. Los vegetales, por su parte, aunque son una fuente importante de nitritos y nitratos tienen sin embargo numerosas sustancias que pueden inhibir la reacción del nitrito con las aminos y amidas. Otra fuente importante de nitritos y nitratos la constituye el agua. Así, se ha relacionado una incidencia alta de cáncer en lugares en donde el contenido de estos iones es muy alto como en China y Colombia (Barnard et al 1982, Cuello et al. 1976, Yang 1980).

3.4.2 FUENTES DE COMPUESTOS NITROSABLES

Los alimentos, medicamentos y pesticidas son las principales fuentes de aporte de compuestos nitrogenados que pueden ser nitrosados (tabla IV). Los alimentos, en particular, constituyen una fuente importante y probablemente la más conocida de precursores de compuestos N-nitroso. Así por ejemplo, en pescados se han detectado aminas volátiles, mientras que en el jamón se ha encontrado N-propilamina e isopropilamina en carnes, como la de puerco contienen aminoácidos libres nitrosables como prolina, tirosina alanina, ácido glutámico, ácido aspártico y cisteína, N-metil glicina e hidroxiprolina . Aunque los aminoácidos esenciales pueden ser nitrosados, no existen evidencias de que puedan ser carcinogénicos (Lakritz et al. 1978). La creatinina presente en pescados secos y jamón asado ha sido identificada como un precursor de la metilurea. Este compuesto se forma a partir de un intermediario de la nitrosometilurea (Mirvish y Cairnes 1981). En los cereales como avena, maíz y arroz se han identificado poliaminas como cadaverina, espermina y putrefaccina (Maja 1978).

Otra fuente importante de exposición a precursores de los compuestos N-nitroso la constituyen los pesticidas entre los cuales se encuentran compuestos nitrosables que dan lugar a la formación de nitrosamidas como es el caso de N-alquilureas y del bisdialquil tiocarbamil disulfato (Mirvish 1975).

TABLA IV COMPUESTOS NITROGENADOS QUE PUEDEN DAR LUGAR A LA FORMACION DE DERIVADOS N-NITROSO.

COMPUESTO	FORMULA	REFERENCIA
DIALQUILAMINA	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{R}' \end{array}$	44, 51
DIARILAMINA	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	44
ALCARILAMINA	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{N}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{H} \end{array}$	151
AMINA TERCIARIA ALIFATICA	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{N}-\text{R}'' \\ \\ \text{R} \end{array}$	71
AMINA SECUNDARIA HETEROCICLICA		117, 154
AMINA TERCIARIA HETEROCICLICA		71, 155
N-ALQUILUREAS	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{O}=\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{R} \end{array}$	152, 159
N-ALQUILCARBAMATOS	$\begin{array}{c} \text{NH}-\text{R} \\ \diagup \\ \text{O}=\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{R} \end{array}$	152
N-ALQUILAMIDA	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	152
N-HIDROXILAMINAS	$\begin{array}{c} \text{R}_2-\text{C}-\text{N}-\text{R} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{N} \end{array}$	196
HIDRAZINAS	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{N}-\text{NH}_2 \end{array}$	152

TABLA IV. COMPUESTOS NITROGENADOS QUE PUEDEN DAR LUGAR A LA FORMACION DE DERIVADOS N-NITROSO, (continúa)

COMPUESTO	FORMULA	REFERENCIA
HIDRAZONAS	$R-CH=N-NH_2$	152
GUANIDINAS	$R-NH-C \begin{matrix} \nearrow NH \\ \searrow NH_2 \end{matrix}$	152
CIANAMIDAS	$R-NHC(=O)-NHR'$	152
OLIGOAMINAS	$R-N(R)-NH-R-NH-R$	167
INDOLES		174, 175
DERIVADOS DE PROLINA		113
N-ALQUILTIOUREAS	$R-N(R)-C(=S)-N(R)-R$	64
BIS-DIALQUIL TIO-CARBAMIL DISULFURO,	$R-N(R)-C(=S)-S-S-C(=S)-N(R)-R$	111
HIDROXICIALQUILUREAS,	$O-C \begin{matrix} \nearrow NH-ROH \\ \searrow NH-R \end{matrix}$	111

Diversos medicamentos que se emplean frecuentemente han sido detectados como una fuente de precursores de compuestos N-nitroso (tabla V). La administración de estos medicamentos junto con nitrato de sodio ha logrado en muchos casos inducir cáncer en los animales de laboratorio como es el caso de la piperazina, oxitetracilina, cimetidina y otros. El riesgo que representa la nitrosación de medicamentos como agente etiológico en el cáncer del humano no ha sido hasta ahora evaluado debido a la complejidad de factores que afectan las reacciones *in vivo*, además en la práctica debe considerarse que estos fármacos se administran sólo por periodos cortos (Lijinsky 1980, 1982, Schmall y Habs 1980, Schneider et al. 1977).

La exposición a compuestos nitrosables no solo puede provenir de fuentes exógenas como los alimentos, medicamentos y pesticidas, sino que se ha demostrado que durante el metabolismo de algunos compuestos se producen aminas secundarias conocidas como precursores de compuestos N-nitroso. Por ejemplo, en el metabolismo de las lecitinas se produce colina, que a su vez puede ser descarboxilada para formar dimetilamina. La flora del intestino tiene un papel muy importante en la producción de aminas nitrosables, las bacterias pueden generar piperidina y pirrolidina a partir de ornitina, cadaverina a partir de la descarboxilación de la lisina. No se conoce en que medida la formación de aminas secundarias dentro del organismo, contribuye a la generación endógena de compuestos N-nitroso ni se conoce su repercusión sobre la salud (Johnson 1977).

3.4.3 FUENTES EXOGENAS DE COMPUESTOS N-NITROSO

Los compuestos carcinogénicos N-nitroso se han detectado en diferentes fuentes a las cuales el hombre está expuesto. Posiblemente la más importante la constituyen los alimentos y las bebidas. Entre los alimentos en donde se han encontrado con mayor frecuencia se encuentran los embutidos, algunos quesos, leche descremada en polvo, pescado, cerveza, whisky y algunas bebidas alcohólicas del este de Africa (Commoner et al. 1978, De Serres et al. 1986, Lijinsky 1983, Scanlan 1983, Sen et al. 1979, Sugimura 1978).

Los productos preservados son una fuente muy importante de nitrosaminas y de sus precursores ya que durante su manufactura son tratados con nitrito de sodio. Existen diferentes trabajos en los que se ha reportado la presencia de N-nitrosopirrolidina, N-nitrosodimetilamina y N-nitrosopiperidina en carnes y tocinos variando las concentraciones desde 0.025 hasta 0.55 ug/Kg (Baker et al. 1986, Filder 1975, Fine et al. 1982, Poirier et al. 1987, Sugimura y Sato 1983).

Los compuestos mutagénicos que se han encontrado en alimentos pueden formarse durante los procedimientos de cocción, (Commoner et al. 1978, Kakuda y Gray 1980) o durante el almacenamiento de los productos. Existen evidencias de que las reacciones de nitrosación pueden ocurrir dentro de la matriz

lipida de las carnes mediante un mecanismo de reacción de radicales libres, más que por una reacción iónica como sucede en medio acuoso (Coleman 1978, Bharuka et al. 1979). En cuanto a los pescados, debido a su alto contenido de aminas nitrosables como dimetil y trimetilamina han sido objeto de numerosos estudios. Sin embargo, se han detectado niveles muy bajos en el contenido de N-nitrosodimetilamina y solo en pocas de las muestras estudiadas, debido posiblemente a que este compuesto es volátil y se pierda en el mismo proceso de cocción. Por otro lado se ha reportado que la concentración de nitroso dimetilamina puede ser cuatro veces mayor en pescados horneados en horno de gas con respecto a los que se han horneado en un aparato eléctrico, debido posiblemente a que durante la cocción en gas se producen óxidos de nitrógeno que reaccionan con las aminas (Fine 1982, Matsy et al. 1980, Pariza et al. 1983).

Además de las carnes y pescados se ha reportado que los productos lácteos como quesos y leche en polvo descremada pueden contener compuestos N-nitroso como la N-nitrosodietilamina. En algunos lugares de Europa se añade nitrato a los quesos para prevenir el crecimiento de especies de Clostridium. Al reducirse este nitrato se produce nitrito que puede dar lugar a la formación de compuestos N-nitroso, habiéndose detectado nitrosaminas en quesos, leches y mantequillas de dichos países (Fine 1982, Gough et al. 1978, Gray et al. 1979).

Los compuestos N-nitroso se han detectado también en algunos de los aditivos y saborizantes de alimentos como la salsa de soya y la pimienta blanca o negra. Así, el uso de estos saborizantes en alimentos curados con nitratos y nitritos representa una fuente adicional de exposición a compuestos N-nitroso (Osawa et al. 1981, Sujimura y Sato 1983).

Las principales fuentes de exposición de Nitrosaminas y nitrosamidas en bebidas lo representan las bebidas fermentadas. En la República Federal Alemana se detectaron nitrosaminas en el 70% de las muestras comerciales, otras de estas bebidas en donde se han encontrado nitrosaminas son el whisky, las bebidas alcohólicas del Africa y el ron (Fine 1982, Scanlan et al. 1980, Spiegelhalder et al. 1979).

Si bien los alimentos y bebidas representan la forma de exposición a nitrosaminas y nitrosamidas más importante y más frecuente en la población en general, cualitativamente no es la más significativa. La exposición ocupacional a nitrosaminas, aunque restringida a una parte de la población es importante debido a las altas concentraciones que estos compuestos pueden alcanzar en el ambiente de trabajo. En la industria del hule, por ejemplo, la N-nitroso-difenilamina se emplea como un retardante de la vulcanización, este compuesto a su vez puede intervenir en reacciones de transnitrosación dando lugar a la formación de varios compuestos carcinogénicos N-nitroso. En

este tipo de fábricas se ha detectado en el ambiente la presencia de nitrosodifenilamina, nitrosodimetilamina y nitrosomorfolina. También en la industria del curtido se han detectado niveles altos de nitrosaminas y en industrias químicas en donde se trabaja con aminas (Fine 1982).

El tabaco, que se ha identificado como uno de los principales factores etiológicos del cáncer en el humano es una de las principales fuentes de exposición exógena de nitrosaminas volátiles en los fumadores activos y pasivos. Recientemente se han detectado N-nitrosomorfolina y N-nitrosodietilamina en los concentrados de los tabacos. La cantidad formada de nitrosaminas depende del contenido de nitrito en el tabaco. Se ha reportado que el incremento del nitrito desde un 0.5% hasta un 1.0% de 1960 hasta 1980 ha incrementado el potencial carcinogénico del tabaco debido a la formación de derivados N-nitroso de la nicotina y de la nor nicotina. Estas nitrosaminas específicas del tabaco pueden formarse durante la práctica de fumar o de mascar tabaco y se ha puesto en evidencia que son carcinogénicas en animales de laboratorio (Hoffman y Adams 1981, Hoffman et al. 1982).

TABLA V

MEDICAMENTOS DETECTADOS COMO PRECURSORES DE LA
FORMACION ENDOGENA DE COMPUESTOS N-NITROSO

FARMACO	ACTIVIDAD	REFERENCIA
FENILMETRAZINA	ANOREXIGENO	130
MORFOLINA	ANESTESICO	124
PIPERAZINA	ANTIPARASITARIO	124
AMINOPIRINA	ANALGESICO	127, 131
CLORFENILAMINA	ANTIHIISTAMINICO	124
CICLIZINA	ENFERMEDAD MOTORA	124
DEXTROPROPOXIFENO	TRANQUILIZANTE	124
HEXAHIDROAZIFENIL- NITROPIOFENO	AGENTE ANTIHIISTAMINICO	124
HYCANTONA	ANTIESQUISTOSOMIASIS	124
LUCATONA	ANTIESQUISTOSOMIASIS	124
METADONA	NARCOTICO	124
METAPIRILENO	ANTIHIISTAMINICO	124
NIQUETAMIDA	ESTIMULANTE	132
OXITETRACICLINA	ANTIBIOTICO	131
QUINACRINA	ANTIMALARIA	124
TOLAZAMIDA	HIPOGLUCEMIA	130, 131
ANTIPIRINA	ANALGESICO	132
HIDROCLORATO DE PROPANOLOL	BLOQUEADOR BETA ADRENERGICO	43, 195
HIDROCLOROTIAZIDA	ANTIHIISTAMINICO	13
DIFENILHIDRAMINA	ANTIHIISTAMINICO	13

TABLA V

MEDICAMENTO	USO TERAPEUTICO	REFERENCIA
METAFENILENO	ANTIISTAMINICO	13
N-OXIDO DE DIMETIL DODECILAMINA	EMULSIFICANTE	13
CIMETIDINA	ANTIULCEROSO	202

4. PROPIEDADES MUTAGENICAS DE COMPUESTOS N-NITROSO

4.1 MECANISMOS DE MUTAGENESIS DE COMPUESTOS N-NITROSO

Las nitrosaminas y nitrosamidas difieren en lo que respecta a su actividad mutagénica. Existe información abundante señalando que, por lo general, las nitrosaminas son pro-mutágenos que requieren ser activados metabólicamente para inducir mutaciones. De ahí que, en sistemas biológicos carentes de las enzimas encargadas de su biotransformación se requiera acoplar homogenados de tejidos que contengan dichas enzimas (por lo general hígado de rata). Por el contrario en pruebas *in vivo* en roedores e insectos, son activados endógenamente (Cole et al. 1981, 1982; Preussman y Stewart, 1984).

Las nitrosamidas por el contrario son compuestos químicamente activos y pueden ser detectados prácticamente en cualquier sistema de prueba sin necesidad de ser biotransformadas (Lijinsky y Andrews 1979, Montesano 1973, Neale 1976, Shank 1975).

La actividad mutagénica de los compuestos N-nitroso se debe especialmente a su capacidad de alquilar el ADN. Las principales alquilaciones inducidas por estos compuestos ocurren en los átomos de nitrógeno de las posiciones 3, 6 y 7 de la guanina, las posiciones 1, 3 y 7 de la adenina, la posición 3 de

la timidina, así como en los grupos fosfatos (Preussman y Stewart 1984, Shank 1975).

Mediante técnicas de transcripción in vitro se ha detectado que la metilación en la posición 7 de la guanina no induce la incorporación errónea de bases por la ADN polimerasa, pero la 3-metil-citocina o la 3-etil-citocina dan lugar a una sustitución de bases. La alquilación en el átomo de oxígeno de la posición 6 de la guanina no sólo altera el apareamiento correcto de las bases sino que además altera la estabilidad y por consecuencia las propiedades fisicoquímicas de la doble hélice. La alquilación del oxígeno 6 de la guanina se ha comprobado que es uno de los mecanismos de inducción de mutaciones in vitro específicos de los compuestos N-nitroso. En efecto, cuando un polinucleótido de poli (dGdC) se trató con nitrosometilurea y se empleó posteriormente en estudios de transcripción in vitro no se pudo detectar la incorporación de dAMP. Dicho efecto no pudo ser demostrado al utilizarse otros agentes alquilantes que no eran derivados de los compuestos N-nitroso. Posteriormente se demostró la persistencia de la O MeG en el ADN después del tratamiento con N-nitrosometilurea, N-nitrosoetil-urea o N-nitrosodimetilamina (Abbot y Saffhit 1979, Goth y Rajewsky 1974, Kleihues y Margison 1974). Preussman y Stewart 1984).

Las alquilaciones en la adenina y timidina producidas por

compuestos N-etil-nitrosos y N-metil-nitrosos también pueden ser traducidas en substituciones de bases; Gutterplan y Chiu-Hu (1984), demostraron que la actividad mutagénica de N-nitrosoetilurea y N-nitroso-metilurea, así como la N-nitrosopirrolidina es efecto de la formación de aductos tanto en el par GC como en el par de bases AT.

4.2 MUTAGENICIDAD DE NITROSAMINAS

Empleando la cepa de Escherichia coli WU3610, Elespuru y Lijinsky (1976) detectaron la actividad mutagénica de siete nitrosaminas cíclicas después de ser biotransformadas. Sin embargo, estos autores no reportan haber encontrado una buena correlación entre los datos de carcinogenicidad y mutagenicidad de las nitrosaminas cíclicas. Posteriormente Araky et al., (1984) manifestaron que el empleo de cepas de Escherichia coli (WP2) es más sensible para detectar el efecto de N-nitrosodialquilaminas y alquilarilnitrosaminas que para las nitrosaminas cíclicas. Por su parte, el sistema de cepas de Salmonella typhimurium parece ser más sensible para la detección del efecto mutagénico de éstas últimas.

La capacidad mutagénica de diferentes grupos de nitrosaminas con diferentes estructuras químicas se ha podido valorar en varios estudios empleando el sistema de cepas de Salmonella typhimurium descrito por Ames en 1973. Dada la capacidad alquilante de estos compuestos y la consecuente generación de sustituciones de bases las cepas TA1535 y TA100 de S. typhimurium susceptibles de ser revertidas por dicho mecanismo, son las más sensibles para detectar la actividad de las nitrosaminas.

Las nitrosaminas alifáticas, por ejemplo, aunque son más activas en el sistema de cepas de Escherichia coli, también se ha visto

que pueden inducir mutaciones en la cepa de Salmonella TA1535 especialmente empleando el método de preincubación de la bacteria en presencia del compuesto y la fracción S9 del hígado de rata (Araky et al. 1984, Rao et al. 1979a). El empleo de la cepa TA1535 en el estudio de 16 nitrosaminas alifáticas asimétricas también confirmó que son mutagénicas, aunque en el caso de las nitrosaminas alifáticas simétricas la correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad no fue tan buena.

La capacidad mutagénica de las N-nitrosopiperidinas puede ser bloqueada si se encuentran grupos metilos en la posición alfa con respecto al enlace (-N-N=O). Por el contrario, la sustitución de las posiciones 3 y 4 del anillo de la piperidina incrementa su efecto mutagénico, encontrándose que la 3, 4 bromonitroso piperidina actúa como un mutágeno directo en la cepa de Salmonella typhimurium TA1535 (Rao et al. 1977b, Zeiger y Sheldon 1978a).

Los derivados N-nitroso de la piperazina, al igual que los de la piperidina, también inducen mutaciones por sustitución de bases en las cepas de S. typhimurium, pero en este caso se observa que las metilaciones de las posiciones 2 y 6 de la 1-4 dinitrosopiperazina no inhiben la actividad mutagénica del compuesto (Rao et al. 1978, Zeiger y Sheldon 1978b).

Otro de los factores que influyen en la mutagenicidad de las

nitrosaminas cíclicas es el tamaño del anillo, habiéndose determinado que las nitrosaminas de 6, 7 y 8 carbonos presentan mayor potencia mutagénica que las de menor número de carbonos. No obstante, la actividad de la N-nitrosoazetidina, N-nitrosopirrolidina y N-nitrosopiperidina puede detectarse fácilmente empleando el método normalizado de mutagenicidad descrito por Ames (1973), y McCann et al. (1975), mientras que, la nitrosohexametilamina, nitrosoheptametilamina, nitrosooctametilamina, y nitrosododecametilamina, solo pueden evaluarse mediante una modificación de la técnica; incubando la cepa con homogenado de hígado de rata previamente tratada con fenobarbital (Rao et al. 1979a).

Los derivados N-nitroso de la anilina, por su parte, son capaces de inducir mutaciones por sustitución de bases esencialmente en la cepa TA100 de S. typhimurium (c.f. 4.1). La presencia de sustituyentes en la posición del anillo varía la estequiometría y la configuración electrónica del compuesto incrementando también su potencia mutagénica (Jimo 1984).

Aunque en la mayoría de los casos los compuestos N-nitroso solo inducen mutaciones por sustitución de bases, existen en la literatura reportes sobre algunos de estos compuestos con estructuras específicas que pueden actuar también por un mecanismo de corrimiento de bases. Es así que Murphay y Corb (1983) demostraron que a partir de las oligoaminas se obtienen

derivados N-nitroso que en su mayoría solo actúan por el mecanismo de sustitución de bases. Sin embargo, se encontró que un radical N-butilo o N-propano adyacente a un grupo N-nitroso secundario puede dar al compuesto la capacidad de inducir mutaciones por corrimiento.

La mayor parte de los derivados N-nitrosados del indol y compuestos relacionados con triptofano y beta-carabinal indujeron mutaciones por sustitución de bases en S. typhimurium a excepción de los productos de nitrosación del 1-metil-indol o del indol-5-piruvato (Ohiai et al. 1981). Otro grupo de compuestos N-nitroso que pueden actuar por los dos mecanismos de mutagénesis, sustitución o corrimiento de bases, lo constituyen los derivados N-nitroso-metil-benzil-amina ya que éstos no solo se comportan como agentes alquilantes sino que también pueden ser agentes benzilantes. Este grupo de compuestos, además es capaz de inducir lisogenia del fago lambda en Escherichia coli (Wiessler et al. 1983).

4.3 MUTAGENICIDAD DE NITROSAMIDAS

Las nitrosamidas a diferencia de las nitrosaminas se comportan como ya se ha mencionado, como mutágenos y carcinógenos directos. Dentro de este grupo de compuestos son de gran interés los derivados N-nitroso de ureas y guanidinas que por sus propiedades citostáticas se han empleado como drogas anticarcinogénicas. La nitrosometil-urea y la 1-3-bis-cloro-etilurea se han utilizado, por ejemplo, en el tratamiento de la leucemia, enfermedad de Hodgkins, linfomas y carcinomas de células bronquiales. Estos agentes se comportan como alquilantes y pueden también producir entrecruzamientos. (Preussman y Stewart 1984).

La actividad mutagénica de este tipo de alquilantes puede ser detectada en cepas de *S. typhimurium* his- sensibles de ser revertidas mediante un mecanismo por sustitución de bases. Incrementando su potencia mutagénica con el tamaño del sustituyente n-alquilo (Lijinsky y Andrews 1979).

El empleo de cepas de *E. coli* Arg- ha sido también muy efectivo para mostrar la capacidad mutagénica de varias nitrosoureas como las N-alquil, N-hidroalquil, N-aloalquil y N-carboxialquil nitrosoureas, tanto en cepas eficientes como deficientes en el sistema de reparación por escisión. La actividad mutagénica en las cepas con un mecanismo de reparación intacto en una serie de

N-alquil-nitroso-ureas incrementó al aumentar el tamaño de la cadena, mostrando además la dependencia del sistema de reparación para manifestar su actividad mutaagénica. Al estudiar una serie de N-hidroxialquil-nitroso-ureas se obtuvieron resultados similares que con las alquil-nitroso-ureas. Por otro lado, la presencia de grupos hidroxilo (-OH), halogenuros, carboxi (COOH) y carboximetilo (COOCH₃) incrementa la potencia mutagénica de las nitroso-ureas en cepas deficientes en el sistema de reparación (Hakura et al. 1985, Kahda et al. 1987).

4.4 MECANISMOS DE ACTIVACION DE NITROSAMINAS

Ya se mencionó que la capacidad carcinogénica de las nitrosaminas, así como su efecto mutagénico solo se presentan si éstas son activadas se ha postulado, que el efecto de uno de estos compuestos sobre un órgano específico está determinado en parte por la capacidad de ese tejido para activarlo o eliminarlo, así como por su capacidad de corregir el daño inducido al ADN. También se ha postulado que la sensibilidad de una especie a un carcinógeno determinado puede estar relacionada con la capacidad de dicha especie para poder activar al compuesto.

Se sabe que las N-alquilnitrosaminas son activadas por un mecanismo de oxidación mediante el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P-450, el cual puede ser inducido por etanol, acetona y compuestos clorinados. La activación de las dialquilnitrosaminas ocurre mediante un mecanismo de alfa-C-hidroxilación, con la formación de un compuesto carbonilo (aldehído o cetona) y un ión dialquildiazonio. La activación mediante este mecanismo puede ser inhibida en una atmósfera de bajo contenido de oxígeno producida por una atmósfera de CO o N₂ o por la presencia de citocromo C, que interrumpe la cadena oxidativa o por la carencia del cofactor NADP⁺. La enzima responsable de la activación y metabolismo de la N-nitrosodimetilamina es la N-nitroso-dimetilamina-demetilasa,

que tiene la función de hidroxilación y nitración, así como la actividad de hidroxilación de los nitrosos (Mori et al. 1977, I'Anson et al. 1978, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, Mori et al. 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, Yoo et al. 1997).

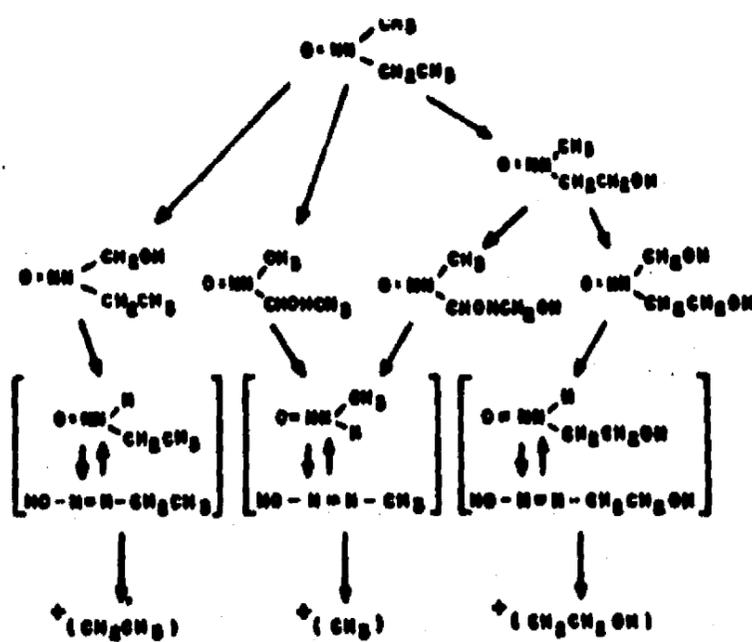
Aunque la vía de activación de nitrosaminas que más se ha estudiado es la de las nitrosaminas secundarias, nitrosodimetilamina y nitrosodietilamina, se conoce que la activación de la nitrosamina asimétrica *N*-nitrosodimetil-etilamina conduce a la formación de un derivado hidroxilado que puede ser hidroxetil-metil-nitrosamina o hidroximetil-etil-nitrosamina, tratándose en el primer caso de un mecanismo de beta- α -hidroxilación y en el segundo de alfa- α -hidroxilación. Un mecanismo semejante ha sido descrito para la activación de *N*-nitroso-propil-metil-nitrosaminas (Mori et al. 1986, I'Anson et al. 1986).

En cuanto al metabolismo de las nitrosaminas cíclicas, también se ha reportado que ocurre mediante la oxidación por medio de citocromo P-450; formándose como intermediarios compuestos alfa y beta hidroxilados (Figura 2) y posteriormente se generan los derivados ceto correspondientes. Se ha dado a conocer que la consecuencia biológica de la formación de metabolitos activos correspondientes a derivados *N*-nitrosados de la nicotina, es la formación de aductos metilados en el oxígeno 6 de la guanina

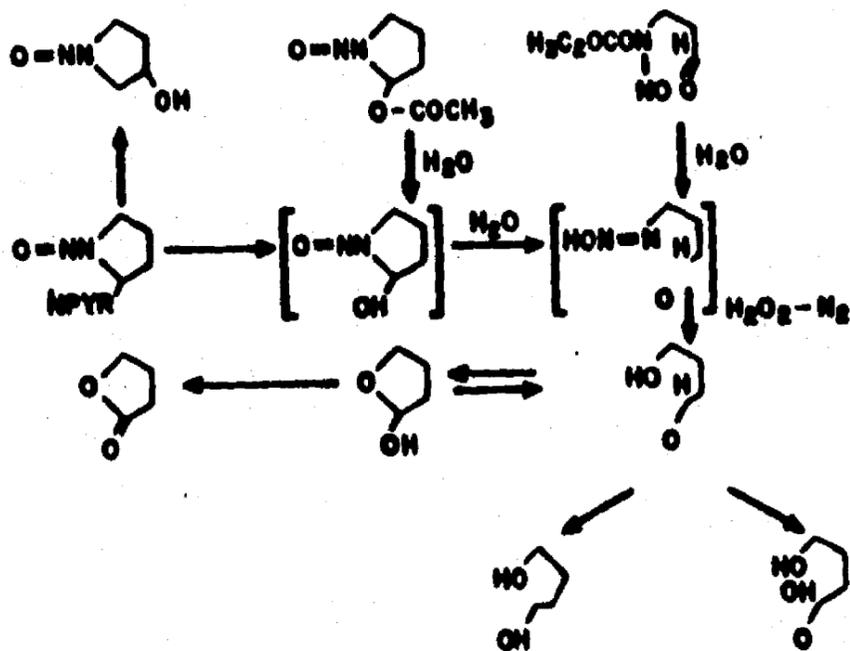
(0 MeG) del ADN del pulmón de la rata (Blensky et al. 1987, Razzauk et al. 1980).

Con el fin de establecer una relación órgano-especie, en cuanto a activación metabólica se refiere, se han realizado numerosos estudios in vitro con diferentes tejidos provenientes de diferentes especies. Habiéndose demostrado que el metabolismo de las nitrosaminas puede ser un proceso muy complejo por lo cual ha sido difícil lograr una correlación adecuada entre los resultados de estudios de carcinogénesis con las pruebas mutagénesis acopladas a la activación metabólica in vitro. En efecto, Longo et al. (1986) demostraron mediante la determinación acetaldehído, que la dietilnitrosamina, que es un carcinógeno para el tejido nasal del hamster, pero no de la rata, es metabolizado con mayor eficacia por los tejidos del hamster. Así mismo se encontró que compuestos hepatocarcinógenos como dietilnitrosamina y dimetilnitrosamina requieren ser activados por tejido hepático íntegro o con la fracción S9 de hígado de ratas no inducidas para poder inducir mutaciones por sustitución de bases en S. typhimurium TA1535. En el caso de la N-nitroso-metil-benzil-amina y N-nitroso-hidroxibutil-amina que son carcinógenos de esófago y vejiga no se logró activarlas con el tejido de hígado de rata sin inducción (Rummen y Pool 1984). Otros estudios reportan que las nitrosaminas cíclicas pueden ser activadas por tejidos de nariz, pulmón, e hígado de conejo, así como con el tejido nasal de la rata sin encontrarse

FIGURA 2. METABOLISMO DE NITROSAMINAS.



MODELO DEL METABOLISMO DE NITROSAMINAS ALIFATICAS



MODELO DEL METABOLISMO DE NITROSAMINAS CICLICAS.

ninguna relación órgano específica; como tampoco se encontró esta relación en el caso de las propil nitrosaminas, las cuales son activadas indistintamente con tejidos de rata, ratón o hamster para producir mutaciones en S. typhimurium o en células de mamífero V-79 (Dahl 1975, Mori et al. 1986, Siriani y Huang 1987).

Las diferencias en el metabolismo de drogas en distintas especies pueden deberse en gran parte a la diversidad de enzimas que intervienen en las vías metabólicas. Así, por ejemplo, se ha reportado que la N-nitrosopropil amina no es activada por tejidos de animales inducidos con 3-metilcolantreno, pero sí con fenobarbital. La N-nitrosometilamina, por su parte, solo es activada con células hepáticas previamente inducidas con Aroclor (Anderson et al. 1985, Mori et al. 1985b). Se ha descubierto mediante el uso de anticuerpos monoclonales, que los citocromos P-450 inducidos en el ratón con etanol o con acetona no son inmunológicamente idénticos (Ko et al. 1987).

El metabolismo de las nitrosaminas tanto en pruebas in vitro como in vivo se ve afectado por muchos otros factores, además de la gran diversidad de enzimas. Tal es lo que sucede con las sales biliares, especialmente el ácido litocólico, que incrementan la actividad de mutágenos directos como la N-metil-N-nitroso-guanidina. Compuestos de tipo esteroide, por su parte, pueden incrementar el riesgo de exposición a

carcinógenos (Rogers 1983, Willpart y Roberfroid 1986). Mientras que los iones de cadmio aumentan la potencia mutagénica de las nitil-nitroso-ureas inhibiendo las enzimas del sistema de reparación por escisión: observándose dicho efecto especialmente en cepas de S. typhimurium (Uvr+), independientemente de que porten el sistema de reparación propenso a error S.O.S.

En los estudios de metabolismo in vitro se ha encontrado que algunos de los disolventes frecuentemente usados como el dimetilsulfóxido, forman una interfase con el medio acuoso impidiendo así la activación metabólica de los compuestos N-nitroso, especialmente en el caso de las dialquilnitrosaminas (Mori et al. 1985). Un método de que se ha reportado como muy eficaz para el estudio de nitrosaminas, en particular a bajas dosis, es el ensayo vía el hospedero. Con este ensayo se ha obtenido mejor correlación de los datos de mutagenicidad y carcinogenicidad de las alquilnitrosaminas que con los métodos de activación in vitro mediante el uso de hepatocitos u homogenados de hígado de rata y de la cepa de S. typhimurium TA1535 (Keerlan et al. 1983).

5. METODOS DE ESTUDIO PARA LA VALORACION DEL RIESGO DE EXPOSICION A COMPUESTOS N-NITROSOS

5.1 SISTEMAS DE PRUEBAS PARA DETECTAR MUTAGENOS Y CARCINOGENOS

Más de veinte años de experimentación han permitido identificar que una gran mayoría de los compuestos carcinógenicos en bioensayos animales o que se han identificado como carcinógenos para el humano gracias a diferentes investigaciones epidemiológicas, son capaces de inducir mutaciones. Estos compuestos se encuentran distribuidos en la naturaleza ya sea en ambientes ocupacionales, como agentes terapéuticos, en el humo de tabaco y de los motores de combustion, así como en los alimentos. (Ames 1983)

La determinación de la mutagenicidad de muestras de agua, aire, componentes de los alimentos, medicamentos, emisiones de la combustion de energéticos constituye hoy en día una herramienta útil para identificar situaciones peligrosas para el ser humano y desarrollar medios de control o prevención de riesgos. De ahí que las pruebas de mutagénesis de corta duración sean consideradas como una excelente opción en el area de monitoreo ambiental. Estas pruebas, a diferencia de los bioensayos animales son más rapidas y posean una alta sensibilidad que las hace costo-efectivas. Además miden efectos biológicos que son relevantes para la salud humana y en algunos casos pueden

detectar actividad mutagénica a concentraciones por debajo de las que pueden detectarse los compuestos responsables por métodos químicos analíticos.

En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de pruebas con capacidad para detectar diversos daños al ADN. Entre ellas se encuentran pruebas cuyo propósito es valorar alteraciones genéticas relevantes para la carcinogénesis humana como son aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Entre estas pruebas se puede citar el análisis cromosómico de células de mamífero en cultivo o la determinación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas inducidas in vivo en médula ósea o sangre de roedores. Estas pruebas son de una gran capacidad predictiva de riesgo ya que se ha visto que tienen una gran sensibilidad (capacidad para detectar como positivos a agentes carcinogénicos) y una gran especificidad (capacidad para detectar como positivos a agentes no-carcinogénicos). Sin embargo estas pruebas requieren del análisis microscópico de un gran número de células y en algunos casos de reactivos costosos, como la bromodeoxiuridina empleada en el estudio de intercambio de cromátidas hermanas, por lo cual son más caras que las pruebas realizadas en sistemas bacterianos. (Brusick 1988, Brockman y De Marini 1988).

El empleo de las pruebas bacterianas tiene la ventaja sobre las pruebas de mamíferos, no solo de reducir costos, sino que por la rapidez con que se obtienen los resultados permiten reducir el tiempo de estudios de tamizado de compuestos mutagénicos y

carcinogénicos. Por otro lado, con el empleo de algunos de los sistemas bacterianos se puede tener un conocimiento más predictivo del tipo de daño genético que están produciendo los compuestos, facilitándose también el estudio de su metabolismo y farmacocinética.

Entre los sistemas de pruebas bacterianos más frecuentemente usados se cuenta con el sistema de Bacillus subtilis RecA-/RecA+ que solo detectan daño genototal y no mutaciones puntuales. En cuanto a su sensibilidad y especificidad el primero de estos sistemas no es aun bien conocido. En cuanto al sistema de E. coli, se conoce que tiene una alta especificidad y baja sensibilidad. Por otro lado, el sistema de cepas de Salmonella typhimurium His- (ensayo de Ames), es sin duda el mejor conocido. Debido a su alto valor predictivo se le ha considerado como un excelente recurso para detectar carcinógenos electrofílicos. Por otro lado, como se describe a continuación este sistema posee un amplia gama de opciones para poder detectar diferentes mecanismos de acción de los agentes potencialmente carcinogénicos. (Ashby y Tennant 1988).

5.1.1 SISTEMA DE CEPAS DE Salmonella typhimurium DE AMES

El sistema de Salmonella typhimurium introducido por Ames et al (1973) cuenta con diferentes cepas His- que pueden ser revertidas a su fenotipo original por la acción de un gran número de compuestos mutagénicos y carcinogénicos que actúan por diferentes mecanismos

A partir de la cepa silvestre de S typhimurium LT-2 se construyeron las cepas, TA1537 (hisC3076 uvrB), que contiene la inserción de una citocina en el gen hisC, mientras que la cepa TA1538 (hisD3052, uvrB) que presenta la delección de un par GC en el gen hisD, y la cepa hisD30018 contiene por su parte una citocina adicional en el gen hisD. Estas cepas pueden por lo tanto ser revertidas al fenotipo original His+ por compuestos capaces de inducir mutaciones por corrimiento de formato..

Otro grupo de cepas de este sistema son las que en el codon 96 del gen de hisG46 tienen un triplete GGG que codifica para la síntesis de prolina en lugar de un triplete GAG que codifica para la síntesis de leucina en la cepa silvestre de S. typhimurium LT2. Estas cepas solo pueden ser revertidas por mutágenos que actúan a un nivel de substitución en el par G/C, como es el caso de la cepa TA1535. Mientras que las cepas con una mutación sin sentido en el codon 207 del gen de histidina, hisG428 como las cepas UK814 y TA102 pueden ser revertidas por

transiciones AT \rightarrow TA (Barnes et al. 1984, Guttemplan y Hu 1984, Hartman et al. 1984). Las cepas hisG46 presentan mayor estabilidad en su genotipo que las cepas hisG428, por lo cual se han utilizado con mayor frecuencia para hacer un tamizado de compuestos N-nitroso, que son capaces de introducir al ADN daños que se traducen en mutaciones por sustitución de bases, los cuales ya se han descrito en la sección (4.1.).

Inicialmente las cepas de S. typhimurium desarrolladas por Ames no eran capaces de detectar el efecto mutagénico de varios compuestos carcinogénicos tales como derivados clorinados del benceno, aflatoxinas, benzo-(a)-pireno entre otros. Sin embargo este sistema fue mejorado mediante la introducción de un plásmido, pKm101 que contiene los genes umuB y umuC que promueven el mecanismo de reparación propenso a error (MacCarr et al. 1975, Maron y Ames 1983, Hartman et al. 1986). Así el sistema de Ames cuenta ahora con las cepas TA98 (hisD3052 pKm101), con mayor capacidad para detectar mutagénos que actúan por corrimiento de bases que su cepa homóloga TA1538 (hisD3052). De igual forma la cepa TA100 (hisG46 pKm101), fue obtenida al introducir el plásmido pKm101 en la cepa TA1535 (hisG46), dándole mayor sensibilidad para detectar compuestos capaces de inducir mutaciones por sustitución de bases en el par G/C del codon 96 del gen hisG. El sistema de Ames cuenta también con cepas con una alta capacidad para detectar transiciones A/T como es el caso de la cepa TA102 (hisG8976, pKm101 con una mutación hisG428 en el plásmido pAq1). Sin embargo, las cepas que contienen el plásmido pKm101 por tener un mayor número de

copias de los genes del sistema de reparación SOS. Propenso a error, presentan una frecuencia de mutación espontánea más alta que las cepas carentes del mismo. Con algunos compuestos como las nitrosaminas, las cepas con el plásmido no responden dando lugar a una frecuencia de reversión más alta que las cepas sin plásmido. Por lo anterior se prefiere, en estos casos trabajar con éstas últimas ya que son de más fácil manejo y los resultados en ellas más claros.

Las cepas del sistema de Ames más empleadas, TA1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 y TA102 al igual que la cepa UK814 poseen además una delección del gen rfa que las hace más sensibles al paso de los compuestos por carecer de una lipoproteína de la pared celular. Otra característica de estas cepas es una delección en el gen uvrB involucrado en el sistema de reparación por escisión la cual se ha introducido para mejorar la eficiencia del sistema en la detección de compuestos capaces de dañar el ADN, ya que el sistema de reparación por escisión podría en gran parte eliminar el daño inducido por esos compuestos (Gutterplan y Hu 1984, Maron y Ames, 1983, Nagao y Sujimura 1978).

La principal desventaja que presenta el sistema de cepas de S. typhimurium es que no puede detectar numerosos compuestos mutagénicos que como el acetil-amino-fluoreno, colorantes azo, etilmetanosulfonato, ciclofosfamida y nitrosaminas requieren de ser previamente transformadas metabólicamente para manifestar su efecto mutagénico. Este problema se ha resuelto mediante la

adición de la fracción S9 de hígado de rata previamente inducido con algún compuesto como aroclor o fenobarbital, según se había descrito anteriormente. Se han empleado otros muchos métodos de activación in vitro como el uso de hepatocitos íntegros de hígado de roedor o la activación con diversos tejidos animales mejorando así el uso del sistema de cepas de S. typhimurium (Felton y Merbert, Jones et al. 1981, Roberfroid et al. 1981).

Este sistema de prueba de mutagénesis se ha empleado en muchos laboratorios para detectar una gran variedad de compuestos, en general se ha reportado que este sistema presenta una alta reproducibilidad de los datos en diferentes experimentos (Anderson et al. 1984, MacPhee et al. 1984, McCoy et al. 1984). Si bien es muy difícil correlacionar los datos obtenidos en un sistema microbiano como éste con los resultados de los bioensayos animales de carcinogenicidad, este sistema ha sido útil para hacer un tamizado de compuestos potencialmente cancerígenos. Después del estudio de varios grupos de carcinógenos se ha aceptado que la prueba de Ames tiene una alta sensibilidad, esto significa que cerca del 90% de los carcinógenos probados son mutagénicos y una alta especificidad ya que cerca del 87% de los compuestos no carcinogénicos probados no son mutagénicos (Pool 1980, Rinkus y Legator 1979). La sensibilidad y sensibilidad de las pruebas de Ames varían sin embargo entre los diferentes grupos de compuestos químicos estudiados. En el caso de esteroides cíclicos y alifáticos, azo-naftoles, hidrazinas simétricas y tiocarbamilos, se ha notado que el sistema es muy eficaz..

En el caso de las nitrosaminas se ha detectado que alrededor del 86% de los compuestos con conocida carcinogenicidad pueden ser detectados por el sistema, empleando como método de activación la fracción hepática S9 de hígado de rata previamente inducido con aroclor. En cuanto a las nitrosoureas se ha observado que esta relación de compuestos mutagénicos y carcinogénicos es más baja. Aunque en términos generales se ha señalado que la relación entre mutagenicidad y carcinogenicidad es muy buena en el caso de los compuestos N-nitroso, no se ha observado una buena relación cuantitativa en cuanto a potencia mutagénica con este sistema, con respecto a la potencia carcinogénica conocida. Estas discrepancias se deben esencialmente a las diferencias metabólicas entre los distintos sistemas de activación in vitro con respecto a lo que ocurre in vivo (Andrews et al. 1978, Andrews y Lijinsky 1980).

5.1.2 SISTEMA DE CEPAS DE Salmonella typhimurium Uvr-/Uvr+.

Las cepas convencionales del sistema de Ames, por poseer una deleción en el gen uvrB no son capaces de efectuar correctamente la reparación por escisión. En vista de que los sistemas de reparación son muy importantes en el proceso de iniciación de carcinogénesis, se han incorporado al ensayo de Ames cepas homólogas a las ya existentes pero en las cuales se conserva intacto el gen uvrB y el mecanismo de reparación por escisión exento de error funciona adecuadamente. Por lo tanto dichas cepas solo son capaces de detectar el efecto de compuestos que producen en el ADN lesiones que no son correctamente reparadas. Entre las principales cepas de Salmonella typhimurium Uvr+ que se han introducido al sistema de Ames están la TA1975 que al igual que la TA1535 posee una mutación por sustitución de bases en el codon 96 del gen hisG46. la cepa UTH814 posee la misma mutación por sustitución de bases pero al igual que la TA100 contiene el plásmido pKM101. Entre las cepas UVR+ se tienen también cepas capaces de detectar compuestos que produzcan corrimiento de formato. La cepa TA1977 (hisC3052) contiene la misma deleción en el gen hisD que la cepa TA1538 pero carece de la deleción del gen uvrB. La cepa UTH1413 (hisD3052), Pkm101, es al igual que la TA98, sensible a ser revertida por mutagénos que ocasionen corrimientos de bases, siempre y cuando, estos no

sean reparados correctamente. Finalmente se cuenta con cepas UvrB+ capaces de detectar mutágenos que induzcan transiciones A/T como es el caso de la cepa TA2638 (hisG428, PkM101) y la cepa UK828 (hisG428). (Harvey y Cole 1986). A pesar de la dificultad de extrapolar los datos obtenidos en bacterias, se considera que si el daño inducido por algún compuesto en el ADN de bacterias puede ser corregido, su riesgo es menor dado que en el humano existen mecanismos de reparación semejantes.

Si se toma en cuenta la intervención de los mecanismos de reparación, puede clasificarse a los compuestos carcinogénicos en tres grupos; el primero de ellos lo constituyen aquellos compuestos cuyo efecto mutagénico solo se observa cuando el sistema de reparación por escisión funciona adecuadamente, como es el caso de mitomicina C y algunas nitrosoureas. El segundo grupo está formado por compuestos que son activos tanto en cepas de Salmonella typhimurium Uvr- como Uvr+ en forma dependiente de la dosis como es el caso de la mercaptopurina y el último grupo lo constituyen los compuestos que como la ciclofosfamida no causan ningún daño genotóxico en las cepas UvrB+ aún a concentraciones altas. En base a esta clasificación se ha propuesto que los compuestos del primer grupo representan un riesgo mayor para la salud, mientras que aquellos del segundo y tercer grupo son un riesgo menor. No obstante debe considerarse que la ciclofosfamida debido a su efecto citostático puede ser un carcinógeno para el humano (Inman et al. 1983, Matney et al. 1985).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El empleo de cepas con diferente capacidad de reparación tales como las del sistema S. typhimurium Uvr-/Uvr+ permite detectar también mutaciones letales cuya falta de reparación induce a la muerte celular, siempre y cuando se realicen en paralelo las pruebas de sobrevivencia. Otros sistemas bacterianos que contienen cepas con diferente capacidad de reparación que han sido también útiles para detectar el daño genotóxico de muchos compuestos son el de Escherichia coli pol A+/polA- y el Bacillus subtilis recA-/recA+ que miden daño letal al ADN (Nagao et al. 1982, Noguti y Kada 1972). No obstante, el sistema de cepas de S. typhimurium Uvr-/Uvr+ ha sido hasta ahora el mejor normalizado al haberse estudiado con él más de 20,000 compuestos.

5.2 EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS COMO UN METODO DE DETECCION DE POBLACIONES EXPUESTAS A COMPUESTOS N-NITROSO

Durante el proceso de transformación metabólica in vivo los compuestos precarcinógenos son convertidos en compuestos directamente activos, posteriormente, tanto el compuesto primario como sus metabolitos están sujetos a las reacciones de detoxificación dentro de las cuales se encuentran la conjugación con moléculas más polares que ayudan a la eliminación de dichos compuestos. Tal es el caso de la conjugación con glutatión y con el ácido glucurónico, siendo también importante la eliminación de metabolitos en forma de compuestos sulfanilicos.

La detección en orina de compuestos carcinogénicos, o de sus metabolitos, o la detección de la actividad mutagénica de las orinas se han considerado como herramientas muy útiles para detectar individuos que han estado expuestos a mutágenos y carcinógenos químicos. Además, el estudio de la excreción urinaria de mutágenos en orinas en animales ha sido empleado como un método para conocer las propiedades farmacocinéticas y el metabolismo de los compuestos (Baker et al. 1986, De Serres et al. 1986, Lawlor et al. 1987).

Considerando que la formación endógena de compuestos N-nitroso es la mayor fuente de exposición a este tipo de compuestos y la

dificultad que se presenta para valorar su exposición Ohshima y Bartsh (1981) propusieron un método mediante el uso de la cromatografía de líquidos a alta presión para la valoración cuantitativa de los derivados N-nitroso formados in vivo. Con este procedimiento se pudo detectar la presencia de derivados N-nitroso de la prolina en un grupo de voluntarios que habían ingerido prolina y betabeles con un alto contenido de nitrato. Posteriormente se ha reportado la excreción urinaria de los derivados N-nitrosados tanto de prolina como de hidroxiprolina y sarcosina en ratas tratadas con el aminoácido y nitrito de sodio. La detección de los compuestos N-nitroso derivados de prolina en la orina humana se ha propuesto como un método para conocer el grado de nitrosación endógena de este compuesto al ser consumido con diferentes fuentes de nitritos y nitratos, en vista de que se conoce que la N-nitroso prolina no es ni mutagénica ni carcinogénica. Empleando este método se detectó que los vegetales preservados en una zona de alto riesgo de cáncer de esófago en China proveen una fuente muy importante de nitritos y nitratos (Ohoshima et al. 1982).

El método analítico de Ohoshima y Bartsh se ha descrito especialmente para detectar derivados N-nitroso de prolina, hidroxiprolina y sarcocina, siendo aún muy difícil la valoración de la formación endógena de otro tipo de compuestos N-nitroso que pueden ser peligrosos para la salud. Sin embargo, existen otras alternativas como es el estudio de la actividad mutagénica en la orina de animales expuestos a carcinógenos químicos. Así por ejemplo, se pudo demostrar mediante el estudio de la

excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con benzo (a) pireno que la vía principal de detoxificación de este compuesto es su conjugación con glutatión (Benson et al. 1978). Empleando el sistema de cepas de S. typhimurium se pudo detectar en la orina de roedores el metabolito de la 2-amino-3,8-dimetil-amidazo quinoxalina (MeIQx), que es un carcinógeno formado en el proceso de cocción de las carnes (Pariza et al. 1983, Hayatsu et al. 1987).

La detección de mutágenos en orinas mediante el sistema de cepas de S. typhimurium se ha empleado para detectar poblaciones en riesgo de cáncer ya sea por exposición ocupacional o por tratamientos con drogas citostáticas, o en personas con el hábito del tabaquismo (Barale et al. 1986, Benowitz et al. 1986, Dvolihle et al. 1987, Everson et al. 1983, Lu et al. 1986).

El método de monitoreo de mutágenos en orinas mediante el sistema de cepas de S. typhimurium His- presenta sin embargo el gran problema de que cuando hay trazas de histidina en las muestras de orinas, especialmente humana, se obtiene un incremento significativo en el crecimiento de las colonias, siendo en ocasiones muy difícil discriminar un verdadero efecto mutagénico debido a los compuestos ahí presentes. Se han propuesto diferentes soluciones a este problema, siendo la más aceptada el uso de columnas XAD-2 propuesto por Yamasaky y Ames en 1977. Este método sin embargo, se ha visto que no es útil

Para concentrar compuestos polares como la ciclofosfamida, razón por la cual se han propuesto métodos alternativos de extracción como son el uso de disolventes orgánicos como el cloruro de metileno o el uso de resinas de poligosit-c-18, que a su vez son más efectivas para retener compuestos polares, pero no son capaces de retener los compuestos no polares (Duverger et al. 1987, Ohosima y Bartsh 1981). En otros estudios en los que se trataron ratones con compuestos carcinogénicos, como es el caso de la para-rosalnilina, la mutagenicidad de la orina se probó sin previo método de concentración. En este caso, con la orina de las ratas sin ningún tratamiento no se obtuvo ningún incremento significativo en el número de colonias observadas con respecto a las revertantes espontáneas His⁺ de la placa control. Tomándose como criterio de un resultado positivo, aquellas muestras de animales tratados que incrementaron dos o más veces el número de revertantes His⁺ con respecto al valor obtenido con el mismo número de células expuestas a un volumen igual de orina de los animales control (Lawlor et al. 1987).

III. MATERIAL Y METODOS

COMPUESTOS QUIMICOS

Los siguientes medicamentos fueron donados por compañías farmacéuticas localizadas en México: Mebendazol (Registro CAS No. 31431-39-7- Columbia), Hidroxinaftoato de Befenico (Registro CAS No. 3818-50-6, Columbia), Dehidroemetina (Registro CAS No. 3570-25-0, Roche), Cloroquina (base) (Registro CAS No. 54-05-07 Wintrop) Iodoclorohidroxiquinoleina (Registro CAS No. 130-26-7, Carnot), Pamoato de Pirantel (Registro CAS No. 2204-24-06, ICN Farmacéutica) y Hexahidrato de Piperazina (Registro CAS No. 110-85-0 Wintrop). Las estructuras químicas de estos medicamentos están representadas en la figura 3. El nitrito de sodio se obtuvo de Baker (Registro CAS No. 7632-00-0), el ascorbato de sodio se obtuvo de Merck (México), el Aroclor 1254 se obtuvo de Analabs Inc., la Beta-glucoronidasa, NADP y Glucosa-6-fosfato se obtuvieron de Sigma. El Cloruro de Metileno, Fenol y Acido Sulfúrico se obtuvieron de Baker.

MEDIOS DE CULTIVO

Se empleó el medio mínimo de Vogel-Boner según se describe en Maron y Ames 1983. El agar grado bacteriológico se obtuvo de Difco, el caldo nutritivo se obtuvo de Oxoid, (Inglaterra) y de Difco de México, el Agar nutritivo al 1.5% se obtuvo de Difco de México. Las sales inorgánicas requeridas en la preparación del medio mínimo de Vogel Boner se obtuvieron de Baker (México). (Ver apéndice 1).

CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de Salmonella typhimurium TA1535 (his G46 del rfa, del. UvrB) y TA1975 (his G46, del.rfa) fueron generosamente donadas por el Dr. Bruce Ames (Universidad de California, Berkley CA 94720).

REACCIONES DE NITROSACION IN VITRO

Las reacciones de nitrosación in vitro se realizaron siguiendo una modificación del método descrito por Murphay y Corb (1983). Las reacciones se realizaron a 37°C entre 30 y 60 minutos en un amortiguador de fosfatos (0.5M) a pH = 3.7, HCL (0.001M) a pH = 3.2, o amortiguador de citratos-HCl (0.2M) a pH = 4.2. Se emplearon diferentes relaciones molares de nitrito de sodio: fármaco: (3:1 a 6:1) tomando en cuenta el tipo de grupos amino presentes que contiene el medicamento. El nitrito de sodio, el medicamento aminado y las mezclas de reacción entre el nitrito de sodio y el medicamento se manejaron de la misma forma. Se realizaron extracciones con cloruro de metileno evaporándose después a 50°C. Los extractos se resuspendieron en 5ml de agua destilada antes de realizar las pruebas de mutagenicidad. Con el fin de obtener las curvas dosis respuesta se efectuaron de tres a cinco diluciones decimales.

DETERMINACIONES COLORIMETRICAS

La formación de compuestos N-nitroso se valoró mediante la reacción colorimétrica de Lieberman descrita por Vogel (1974). El enlace (-N-N=O) reacciona con fenol y ácido sulfúrico, para dar rojo de indofenol que puede ser detectado colorimétricamente. Los valores de densidad óptica se determinaron a 590nm en un colorímetro Baush and Lomb. Los resultados obtenidos se compararon con la intensidad de color obtenida con una curva estándar realizada con N-metil-N-nitrosoguanidina (apéndice 2).

PRUEBAS DE MUTAGENICIDAD

Los ensayos de mutagenicidad se realizaron en la cepa de Salmonella typhimurium TA1535 de acuerdo al método descrito por Maron y Ames (1983). La fracción S9 se preparó con hígados de rata macho wistar de 200 a 200 g de peso corporal, previamente inyectada con una mezcla difenil policlorada (200 mg/ml) Aroclor 1254 en aceite de maíz (500 mg/Kg) según se ha descrito anteriormente (Cortinas de Nava et al. 1983).

Las bacterias se expusieron a las diferentes diluciones de nitrito o medicamento, o a las diluciones decimales de las mezclas de reacción entre el nitrito y los medicamentos, en presencia y en ausencia de la mezcla S9. Como controles positivos se incluyeron N-metil-N-nitroso-guanidina, 10 g/caja petri, o ciclofosfanida con S9 200 g/caja petri. Se realizaron dos experimentos por separado empleando tres cajas petri en cada uno de ellos.

EFFECTO DEL SISTEMA DE REPARACION

Para estudiar el efecto del mecanismo de reparación por escisión sobre los derivados mutagénicos de medicamentos antiparasitarios y nitrito de sodio, las pruebas de mutagenicidad en la cepa Salmonella typhimurium TA1535, con nitrito de sodio, piperazina, mebendazol y sus derivados nitrosados se hicieron en paralelo con la cepa de Salmonella typhimurium TA1975, en la misma forma que se describe en la sección anterior. Las pruebas de mutagenicidad en ambas cepas se realizaron también en paralelo con un ensayo de sobrevida.

PRUEBAS DE SOBREVIDA

Un cultivo de 16 horas de la bacteria se diluyó en solución salina isotónica hasta una dilución que contenía alrededor de 10 células por mililitro. 100 ul de este cultivo se expusieron a los compuestos tratados con la mezcla S9 antes descrita en un tubo con 2 ml de caldo nutritivo (DIFCO) CON AGAR AL (0.6%). El contenido de estos tubos se vierte en agar nutritivo (DIFCO) y se incuban las placas a 37°C durante 24 horas, contándose después las unidades formadoras de colonias.

REACCIONES DE NITROSACION IN VIVO

Durante periodos de 3 a 5 días, de acuerdo al esquema terapéutico de cada fármaco, se trataron grupos de cinco ratones machos de la cepa CD-1 de 35 ± 2 g por vía oral con: 1) Agua destilada, 2) Nitrito de sodio (20, 40 y 80 mg/Kg), 3) Piperazina (65mg/Kg), 4) Cloroquina (base) (10 y 55 mg/Kg), 5) Dehidroemetina (25mg/Kg), 6) Pamoato de pirantel (50mg/Kg), 7) Hidroxinaftoato de befenio (1000mg/Kg), 8) Iodoclorohidroxiquinoleina (200mg/Kg), 9) Ciclofosfamida (20 mg/Kg), 10) Piperazina-nitrito de sodio (65-80, 65-40, 65-20 mg/Kg), 11) Mebendazol-nitrito de sodio ((3.5-80, 3.5-40, 3.5-20 mg/Kg), 12) Cloroquina (base)-nitrito de sodio (55-80, 55-40, 55-20 mg/Kg), 13) Cloroquina base-nitrito de sodio (10-80, 10-40, 10-20 mg/Kg), 14) Hidroxinaftoato de befenio y nitrito de sodio (1000-80 mg/Kg), 15) Iodoclorohidroxiquinoleina (200-80 mg/Kg) y 16) Pamoato de pirantel-nitrito de sodio (55-80 mg/Kg). Se trataron ratones hembra de la cepa CD-1 de 32 ± 2 g con: 1) agua destilada, 2) Nitrito de sodio (80 mg/Kg), 3) Mebendazol-nitrito de sodio (35-80 mg/Kg). En todos los casos los animales se trataron con los medicamentos contenidos en un volumen de de 0.5ml a 0.2 ml de solución de NaNO_2 .

Los animales se mantuvieron en cajas metabólicas de policarbonato dejándoles agua y purina-mice-Chow ad-libitum. Se recolectaron muestras de orina antes de administrar el primer tratamiento y 24 horas después de cada tratamiento.

REPARACION DE LAS MUESTRAS DE ORINA.

Las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga clinica MSE. Posteriormente se esterilizaron por filtración en una membrana millipore 0.45u y se conservaron a -20°C hasta su uso en las pruebas de mutagenicidad.

ENSAYO DE MUTAGENESIS CON ORINAS

La actividad mutagénica de las muestras de orinas se estudió en Salmonella typhimurium TA1535 en placas de medio mínimo de Vogel Boner, según se ha descrito por Maron y Ames (1983). Se trató la bacteria con 200 ul de orina en presencia de 200U de beta glucoronidasa contenidas en 100ul. Se incluyeron como controles la bacteria tratada solamente con beta-glucuronidasa, un volumen igual de orina del mismo grupo de animales antes del tratamiento y como control positivo, N-metil-N-nitroso-guanidina 10 ug por placa, así como la orina de animales tratados con ciclofosfamida.

ANALISIS MATEMATICO

La valoración de los resultados de las pruebas de mutagenicidad en orinas se efectuó comparando los resultados entre los diferentes grupos, sin tratamiento, con nitrito, con el medicamento o con el nitrito y el medicamento administrados casi simultáneamente mediante la prueba de t-student. Se considera que un resultado es estadísticamente significativo cuando su valor de P está comprendido entre 0.05 y 0.001, y que es positivo si incrementa dos o más veces el número de revertantes inducidas con un volumen igual de orina de los animales sin ningún tratamiento.

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DEL NITRITO DE SODIO CON
RESPECTO A LA AMINA.

Se trataron por via oral grupos de cinco ratones machos de la
cepa CD-1 de 35 ± 2 g con nitrito de sodio (80 mg/Kg) quince
minutos antes, simultáneamente, quince y treinta minutos después
de administrar mebendazol (35 mg/Kg) o cloroquina (base) (55
mg/Kg), por via oral durante tres días. Se recolectaron las
muestras de orina 24 horas antes del primer tratamiento y 24
horas después de cada tratamiento. Se estudió la actividad
mutagénica de dichas muestras según se ha descrito
anteriormente. Tomando como el 100% de la actividad mutagénica,
la que se ha recuperado del grupo tratado con nitrito de sodio y
el medicamento simultáneamente y calculando el porcentaje de la
actividad mutagénica recuperada con los otros grupos.

INHIBICION DE LA REACCION DE NITROSACION DEL MEBENDAZOL IN VITRO

Las reacciones de nitrosación del mebendazol se realizaron en un amortiguador de fosfatos pH=3.7 durante 20'. Se empleó una relación molar fármaco: nitrito de sodio (1:5). A las mezclas de reacción se añadió ascorbato de sodio en una proporción molar nitrito de sodio-ascorbato, 1:0, 1:0.025, 1:1 y 1:2. Simultáneamente se procesaron en condiciones semejantes, el mebendazol, el nitrito de sodio, ascorbato de sodio, ascorbato de sodio-nitrito de sodio, y mebendazol-ascorbato de sodio. Los productos de las reacciones se extrajeron con cloruro de metileno. El solvente orgánico se evaporó a 50°C. Las mezclas se disolvieron en 5 ml de agua destilada para realizar pruebas de mutagenicidad y análisis colorimétrico.

Las pruebas de mutagenicidad de los productos de nitrosación del mebendazol tratados con ascorbato de sodio se realizaron simultáneamente con el método de incorporación en agar (Maron y Ames 1983) o con una modificación del mismo. Una alícuota de 100ul de un cultivo de Salmonella Typhimurium TA1535 se pusieron en presencia de la mezcla S9 con agitación a 500 rpm durante 60', después se añadieron 2 ml de una solución de cloruro de sodio a 0.5% y agar al 0.6%, a una temperatura de 45°C. El contenido de este tubo se vertió en placas de medio mínimo de Vogel Boner y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Contándose después el número de revertantes hist.

INHIBICION DE LA FORMACION DE MUTAGENOS DERIVADOS DE LA REACCION
ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO IN VIVO

Se trataron ratonas machos de la cepa CD-1 de $35g \pm 2$ con: 1) agua, 2) mebendazol (35mg/Kg), 3) Nitrito de sodio (80 mg/Kg), 4) Ascorbato de sodio (400 mg/Kg), 5) Mebendazol-nitrito de sodio (35 - 80 mg/Kg), 6) Mebendazol-nitrito de sodio-ascorbato de sodio (35-80-200) y (35-80-400). Los tratamientos se administraron por vía oral, preparando cada solución por separado, y administrando el contenido de nitrito de sodio en un volumen de 0.2 ml, mebendazol en 0.3 ml, ascorbato de sodio en 0.2 ml, los animales controles se trataron con 0.7 ml de agua destilada. Todos los tratamientos se dieron durante tres días consecutivos, recolectándose orinas de todos los grupos 24 horas antes del primer tratamiento y 24 horas después de cada uno de los tratamientos.

Las muestras de orina se procesaron según se ha descrito anteriormente, y se probó la actividad mutagénica por el método de incorporación en agar de Salmonella typhimurium TA1535 en presencia de beta-glucuronidasa.

EFFECTO DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DE LA VITAMINA C CON
RESPECTO AL NITRITO DE SODIO EN LA INHIBICION DE LA FORMACION DE
MUTAGENOS EN ORINAS

Se trataron ratones machos de la cepa CD-1 de $35g \pm 2$ con : 1) Agua, 2) Nitrito de sodio (80 mg/Kg), 3) Mebendazol (35 mg/Kg), 4) Mebendazol y nitrito de sodio (35 - 80 mg/Kg), 5) Mebendazol Nitrito de sodio y ascorbato de sodio; administrando éste último ya sea simultáneamente con el tratamiento del compuesto aminado y el nitrito de sodio, quince minutos antes, o bien, quince o treinta minutos después del tratamiento. Las soluciones se prepararon y se administraron según se ha descrito en la sección anterior, recuperándose las muestras de orinas de la misma forma. El porcentaje de actividad mutagénica obtenido en los grupos de ratones tratados con ascorbato de sodio se calculó tomando como un valor del 100% el resultado observado en los animales tratados exclusivamente con nitrito de sodio y mebendazol.

DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS Y CROMATOGRAFICAS DE LOS
DERIVADOS MUTAGENICOS DEL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO

Se determinó el espectro de absorción ultravioleta entre (220 - 350 nm) del mebendazol, nitrito de sodio y el producto de nitrosación del mebendazol en un espectrofotómetro Beckman.

El producto de reacción de mebendazol y nitrito de sodio se caracterizó mediante cromatografía de líquidos a alta presión, empleando un detector específico de fotoconductividad para grupos sensibles de sufrir fotólisis, que es el detector modelo 965 de Tracor (254nmHf) sensibilidad 100X 5. Con un volumen de inyección de 25ul. Se empleó una columna de spheresolo 0005-2 (250- x 4 6mm, 5um), y como fase móvil se empleó (acetonitrilo, 15%, metanol 10%, H O 65%) con un flujo de 1.5 ml/min.

IV. RESULTADOS.

REACCIONES DE NITROSACION IN VITRO.

En la tabla VI se presentan las condiciones identificadas como óptimas para llevar a cabo la reacción de nitrosación de cinco de las drogas estudiadas: piperazina, mebendazol, cloroquina, dehidroemetina y pamoato de pirantel, en pH ácido y temperatura baja (37° C).

ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LOS DERIVADOS N-NITROSO DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

En la tabla VII se muestran los resultados de mutagenicidad obtenidos con el producto de la reacción de medicamentos que en su molécula contienen grupos amino secundarios y/o terciarios como son: piperazina, mebendazol, cloroquina y dehidroemetina, así como derivados pirimidínicos como el pamoato de pirantel. No se detecta actividad mutagénica en productos de reacción de hidroxinaftoato de bfenio, (una sal cuaternaria de amonio) o derivados halogenados de la quinolina como la iodoclorohidroxi-quinoleina. Las estructuras de estos compuestos se representan en la figura 3.

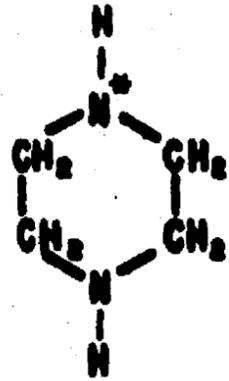
Las figuras 4 y 5 representan las curvas dosis-respuesta

obtenidas con los derivados nitrosados de piperazina y mebendazol respectivamente. Estos compuestos presentan un efecto mutagénico más evidente cuando el producto de la reacción fué activado metabólicamente con la fracción S9 del hígado de rata. La respuesta mutagénica en ausencia de activación metabólica solo se observa a concentraciones muy altas.

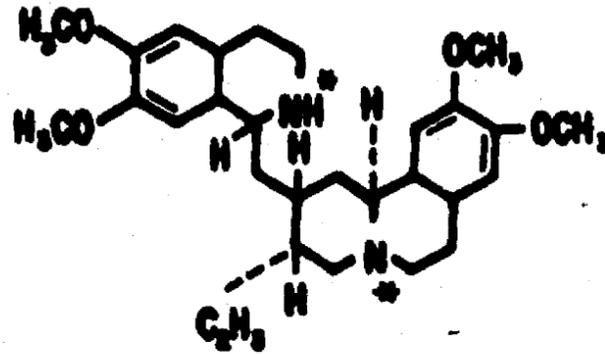
Las figuras 6 y 7 representan las curvas dosis respuesta obtenidas con los productos de la reacción de nitrosación in vitro de cloroquina (base) y dehidroemetina, respectivamente. En estos casos el efecto mutagénico unicamente se observó cuando el compuesto fué activado con la fracción S9 del hígado de rata.

La figura 8 representa la curva dosis respuesta obtenida con el producto de reacción entre nitrito de sodio y pamoato de pirantel. En este caso no se encuentran diferencias entre la actividad biológica en presencia o ausencia de la fracción S9.

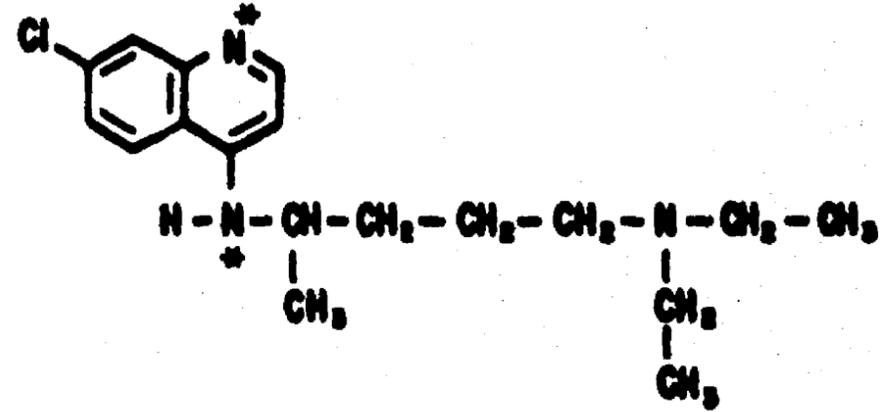
PIPERAZINA



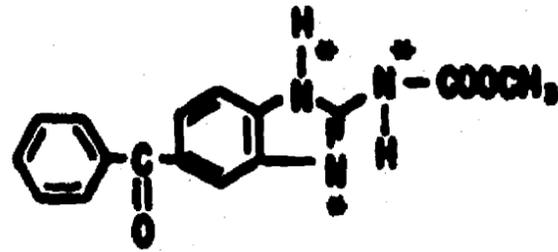
DEHIDROEMETINA



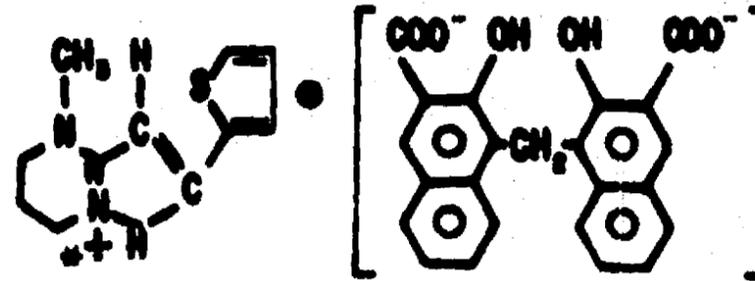
CLOROQUINA



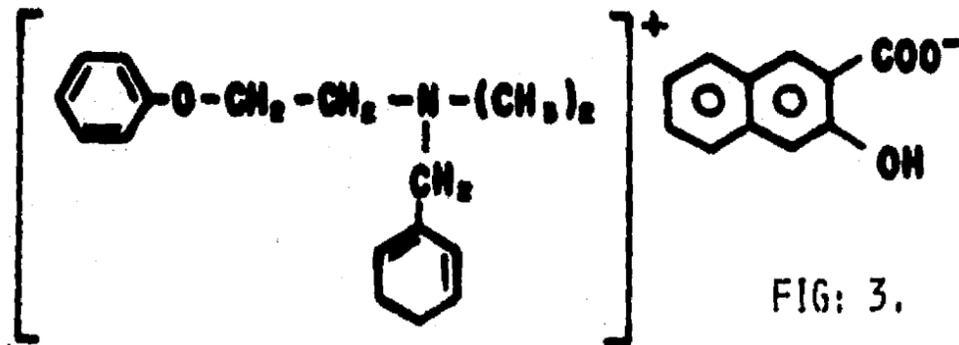
MEBENDAZOL



PAMOATO DE PRANTEL



HIPOXINAFTOATO DE BENFENIO



IDOCHLORHIDROXIQUINOLEINA

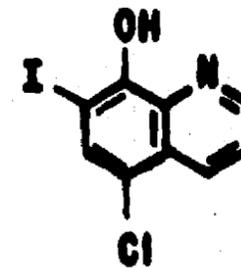


FIG: 3.

TABLA VI

CONDICIONES PARA LA PRODUCCION IN VITRO DE DERIVADOS N-NITROSO
A PARTIR DE NITRITO DE SODIO Y DIFERENTES MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

MEDICAMENTO (mg/ml) (mM)	NITRITO DE SODIO (mM)	AMORTIGUADOR	pH	TIEMPO DE REACCION (Min.)	RENDIMIENTO CALCULADO DE ENLACES (-N-N=O) (%)
Piperazina 86 (0.1)	20	Citrato/HCl (0.2 M)	4.2	30	38
Mebendazol 146	160 (92.3)	Citrato/HCl (0.2 M) Fosfato de sodio (0.5 M)	4.2 3.7	60 60	38 50
Cloroquina (base) 80	45 (0.65)	HCl (0.001 M) Citrato/HCl (0.2 M) Fosfato de sodio (0.5 M)	3.7 4.2 3.7	60 60 60	12 12 17
Dehydroemetina 60 (0.1)	50 (0.7)	HCl (0.001 M)	3.2	60	17
Pamoato de Pirantel 100 (0.17)	100 (1.4)	HCl (0.001 M) Citrato/HCl (0.02 M) Fosfato de Sodio (0.5 M)	3.2 4.2 3.7	60 60 60	65 47 69
Iodochlorhidroxiquinoleina 50 (0.17)	80 (1.1)	HCl (0.001 M) Citrato /HCl (0.2 M) Fosfato de Sodio (0.5 M)	3.2 4.2 3.7	60	No se encontraron niveles detectables de enlaces -N-N=O
Hidroxinaftoato de Befenio 250 (0.56)	120 (1.7)	HCl (0.001 mM) Citrato/HCl (0.2 M) Fosfato de Sodio (0.5 M)	3.2 4.2 3.7	60	No se encontraron niveles detectables de enlaces -N-N=O

a Concentraciones en la mezcla de reacción.

b Todas las reacciones se realizaron a 37°C.

c El rendimiento de uniones (-N-N=O) fue calculado mediante el método colorimétrico de Leiberman. Los valores se determinaron mediante una curva estándar de MNNG (apéndice 2)

TABLA VII

MUTAGENICIDAD DE PRODUCTOS GENRADOS MEDIANTE LA REACCION ENTRE NITRITO Y DIFERENTES
 MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS EN *Salmonella typhimurim* TA1538

MEDICAMENTOS (mg/ml)	NITRITO DE SODIO (mg/ml)	No. DE COLONIAS REVERTANTES HIS+/PLACA			
		CON S9		SIN S9	
		X	± S.D.	X	± S.D.
-	-	29.00	4.70	33.50	5.30
-	160.0	57.50	11.08	47.00	7.39
-	80.00	32.16	5.14	36.50	3.20
Piperazina 86	-	27.82	8.20	26.30	6.57
Piperazina 86	20.0	165.25	50.10	72.25	16.80
Mebendazol 146	-	29.16	6.46	19.00	5.88
Mebendazol 146	160.0	378.50	81.10	115.00	17.00
Cloroquina (base) 80	-	25.00	3.68	28.60	3.35
Cloroquina (base) 80	45.0	164.35	30.74	44.00	6.60
Dehidroemetina 60	-	32.16	9.20	38.16	8.50
Dehidroemetina 60	50.0	176.50	44.6	52.8	8.61
Pasoato de Pirantel 100	-	29.16	4.25	28.6	6.50
Pasoato de Pirantel 100	100.0	148.50	43.00	127.4	32.16
Iodochlorhidroxyquinoleina 50	-	32.16	9.20	38.16	8.09
Iodochlorhidroxyquinoleina 50.0	80.0	T		T	
5.0	8.0	33.30	1.80	T	
0.5	0.8	41.16	9.47	46.0	10.10
Hidroxinaftoato de Befenio 250	-	31.80	2.11	30.5	5.80

TABLA VII

MEDICAMENTOS (mg/ml)	NITRITO DE SODIO (mg/ml)	No. DE COLONIAS REVERTANTES HIS+/PLACA			
		CON S9		SIN S9	
		X	± S.D.	X	± S.D.
Hidroxinaftoato de bifenilo 250 10 g/Caja Petri	120.	35.60	9.72 1.069.30	31.16	5.22 210.07

- a Concentraciones originales en la mezcla de reacción, el medicamento, nitrito y medicamento-nitrito se trataron como se ha descrito en material y métodos.
- bx Promedio de dos experimentos reproducibles. (Tres caja petri por experimento).
- c] Toxicidad.

FIGURA 4

EFECTO MUTAGENICO DEL PRODUCTO DE NITROSACION DE PIPERAZINA EN
Salmonella typhimurium TA1535 - 0 - + S9. - - sin S9,
- x - nitrito de sodio + S9. (Tratados como se describe en
materiales y métodos. Control piprazina + S9 27.8 ± 8.2.
Revisión espontánea 29.0 ± 4.7.

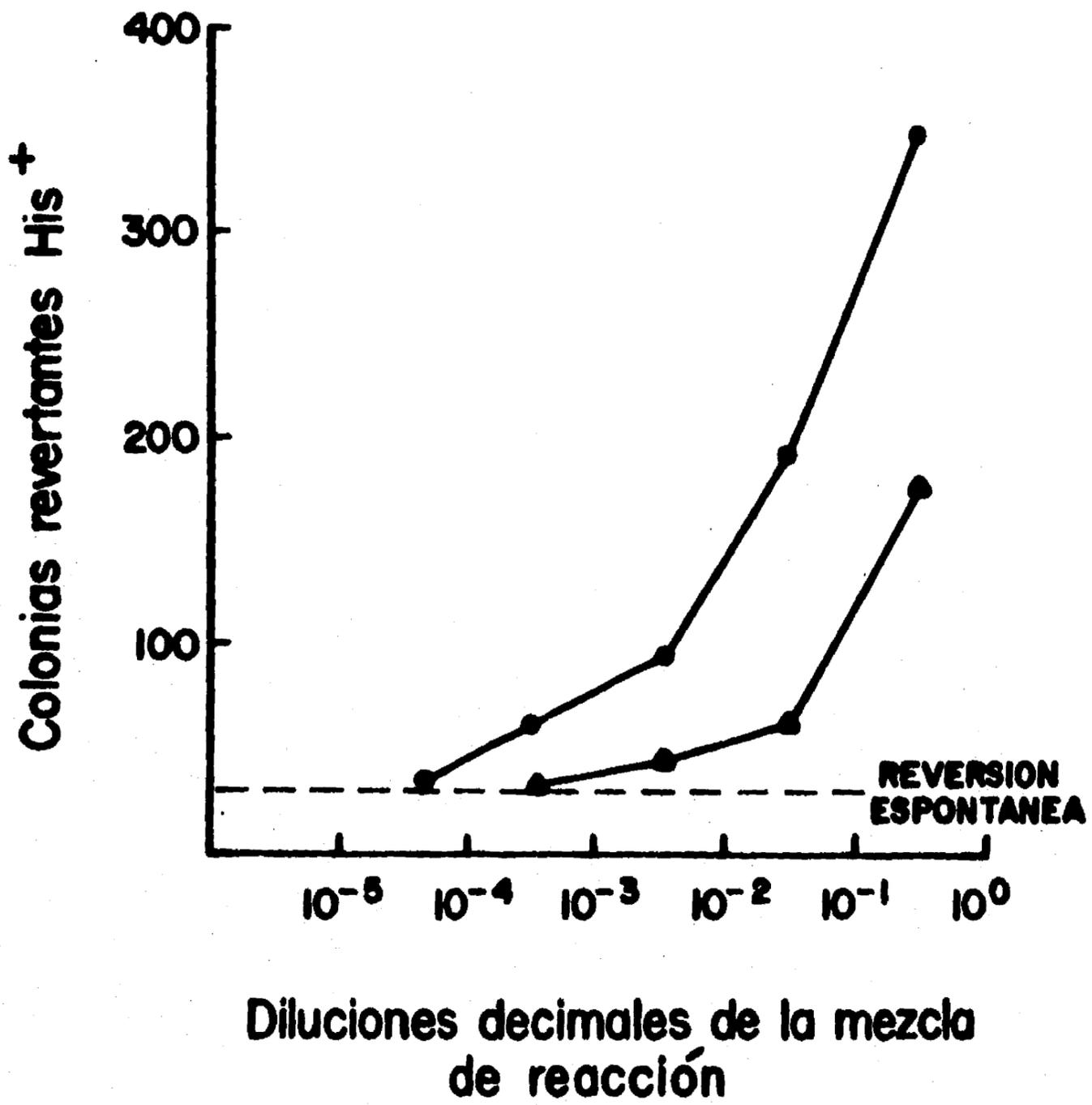


FIGURA 5

EFECTO MUTAGENICO DEL PRODUCTO DE LA REACCION DE NITROSACION DEL
MEBENDAZOL EN Salmonella typhimurium TA1535 - 0 - con S9,
- - sin S9, - - nitrito de sodio + S9 (tratados según se
describe en materiales y métodos. Control Mebendazol + S9 29.6
± 6.4, reversión espontánea 29.0 ± 4.7.

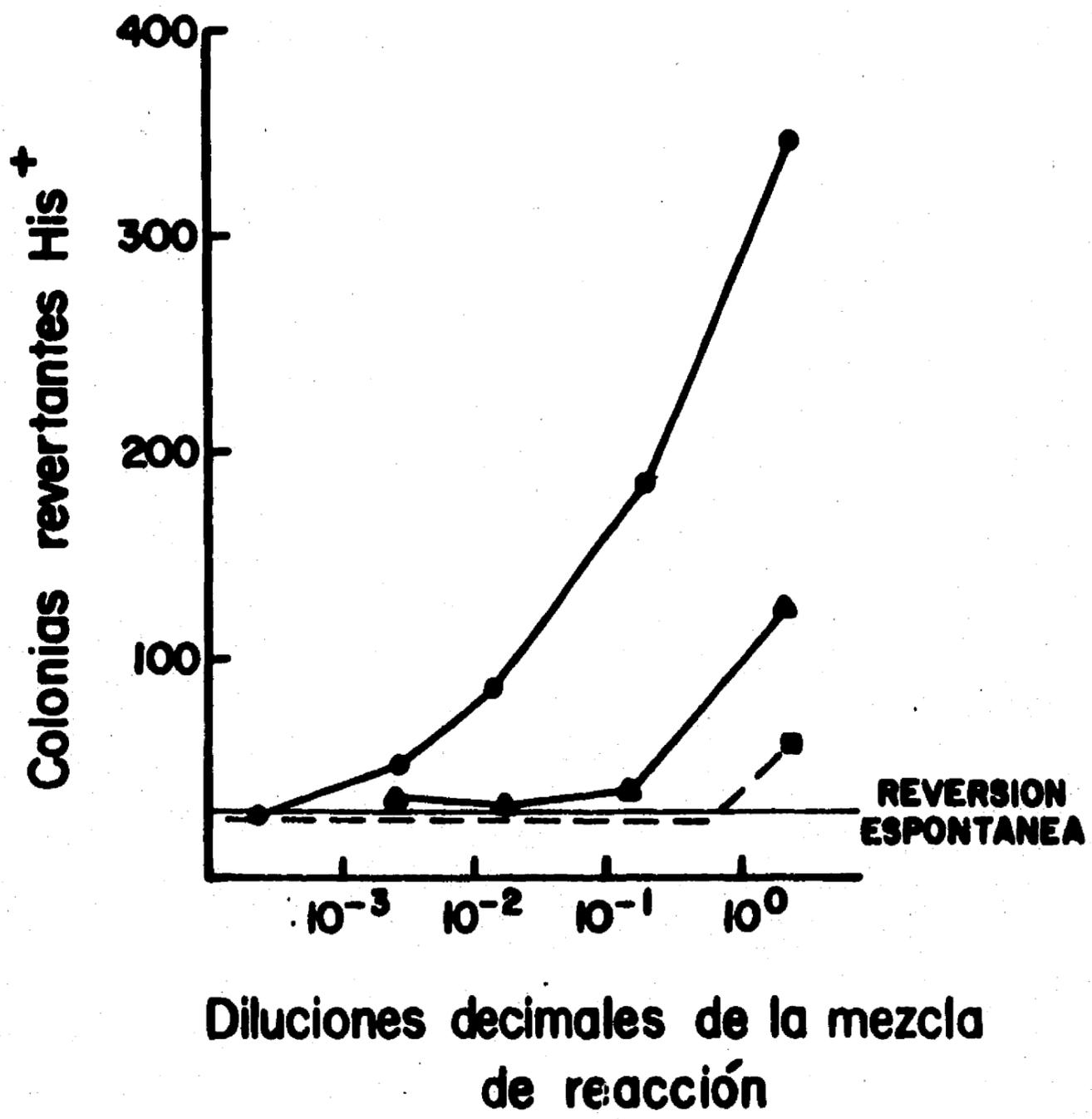
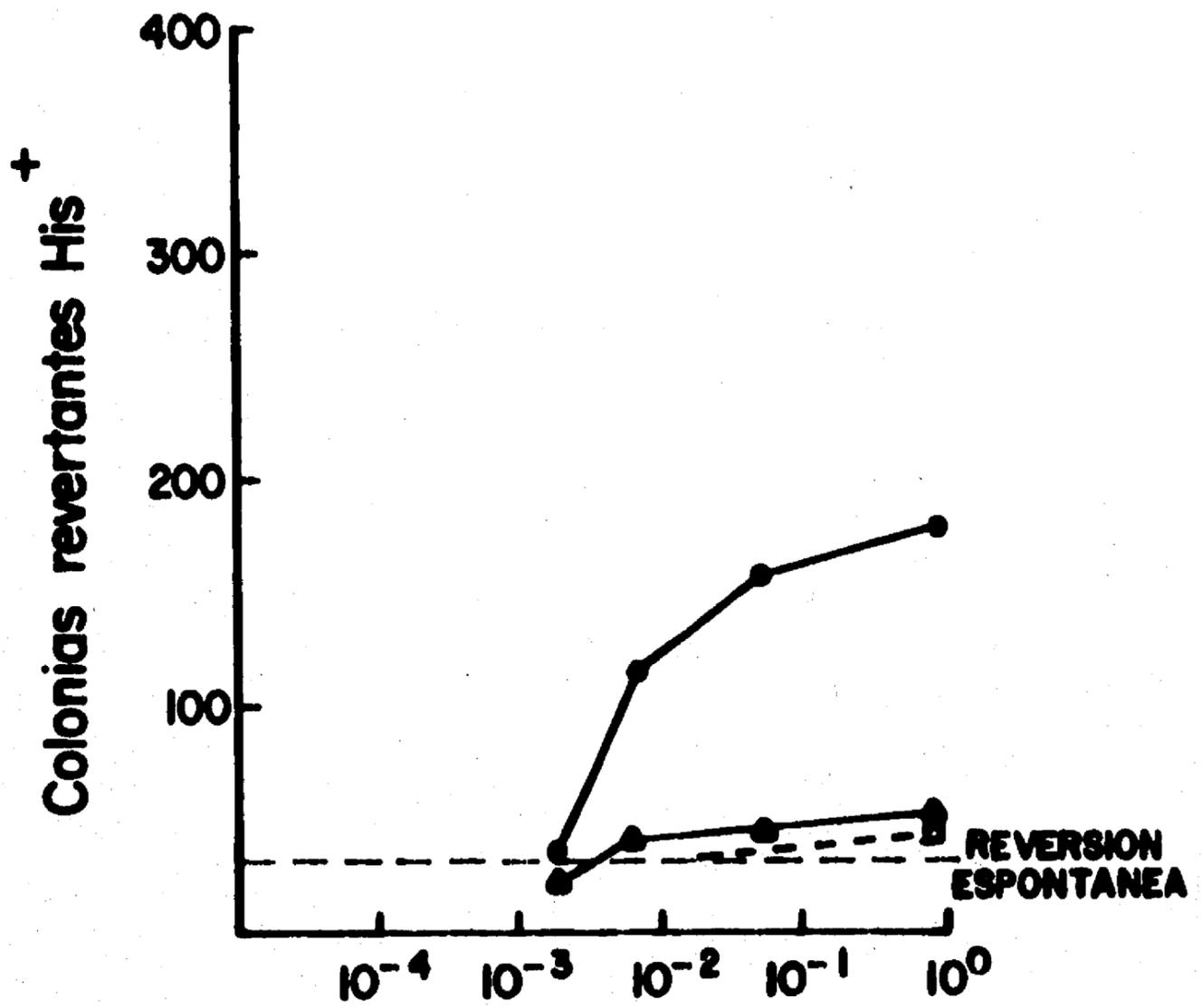


FIGURA 6

EFECTO MUTAGENICO DEL PRODUCTO DE LA REACCION DE NITROSACION DE
CLOROQUINA (BASE) EN Salmonella typhimurim TA1535 - - con
S9, - - sin S9, - - nitrito de sodio + S9, (tratados
como se describe en materiales y métodos. Cloroquina (base) +
S9 25.0 ± 3.6, Reversión espontánea 29.0 ± 4.7.



Diluciones decimales de la mezcla de reacción

FIGURA 7

EFFECTO MUTAGENICO DEL PRODUCTO DE LA REACCION DE DEHIDROEMETINA
CON NITRITO DE SODIO EN Salmonella typhimurim TA1535 - 0 -
con S9, - - sin S9, - - nitrito de sodio con S9.
(Tratados como se describe en materiales y métodos).
Dehidroemetina + S9 32.1 ± 9.2 , reversión espontánea 29.0 ± 4.7 .

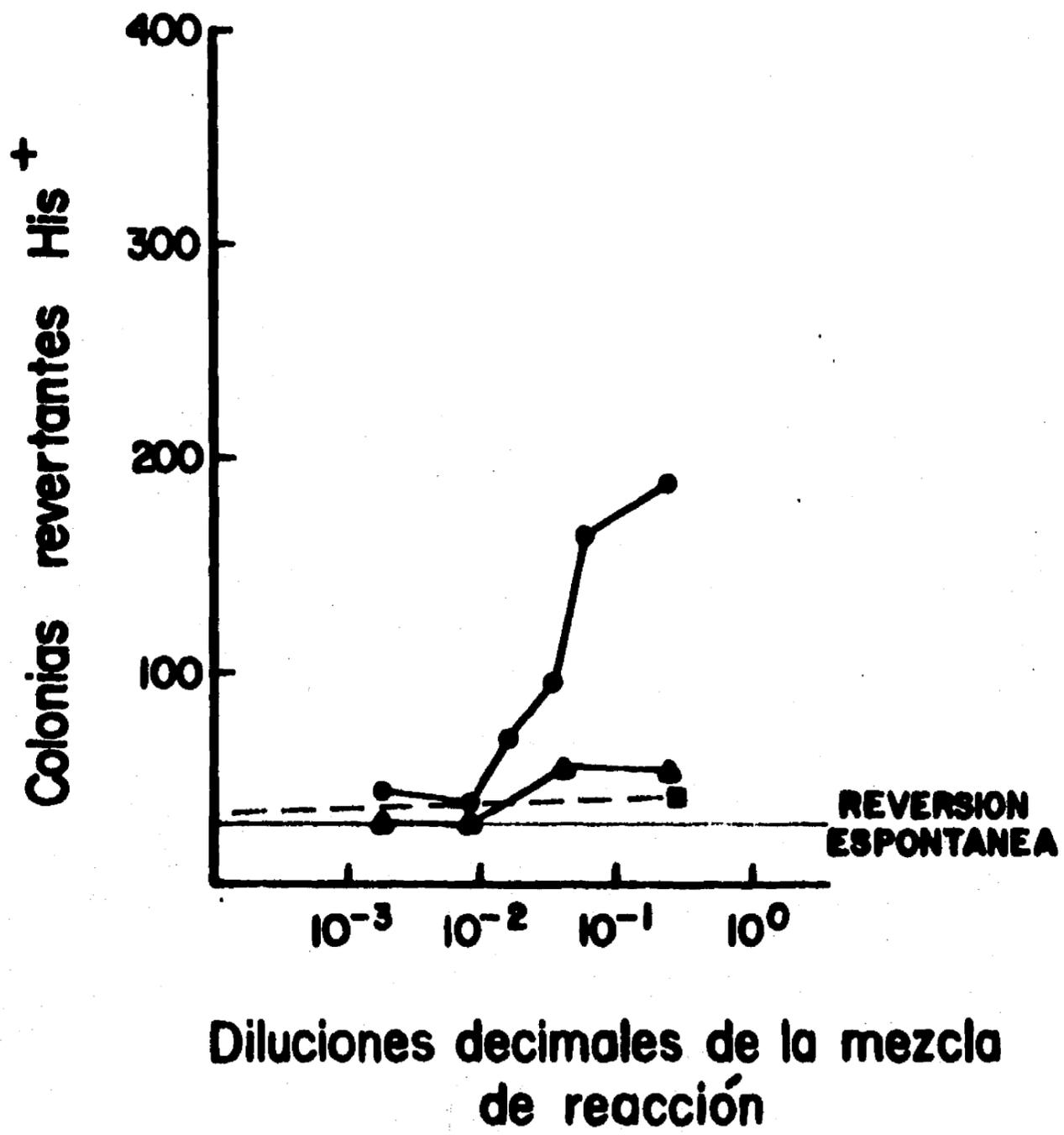
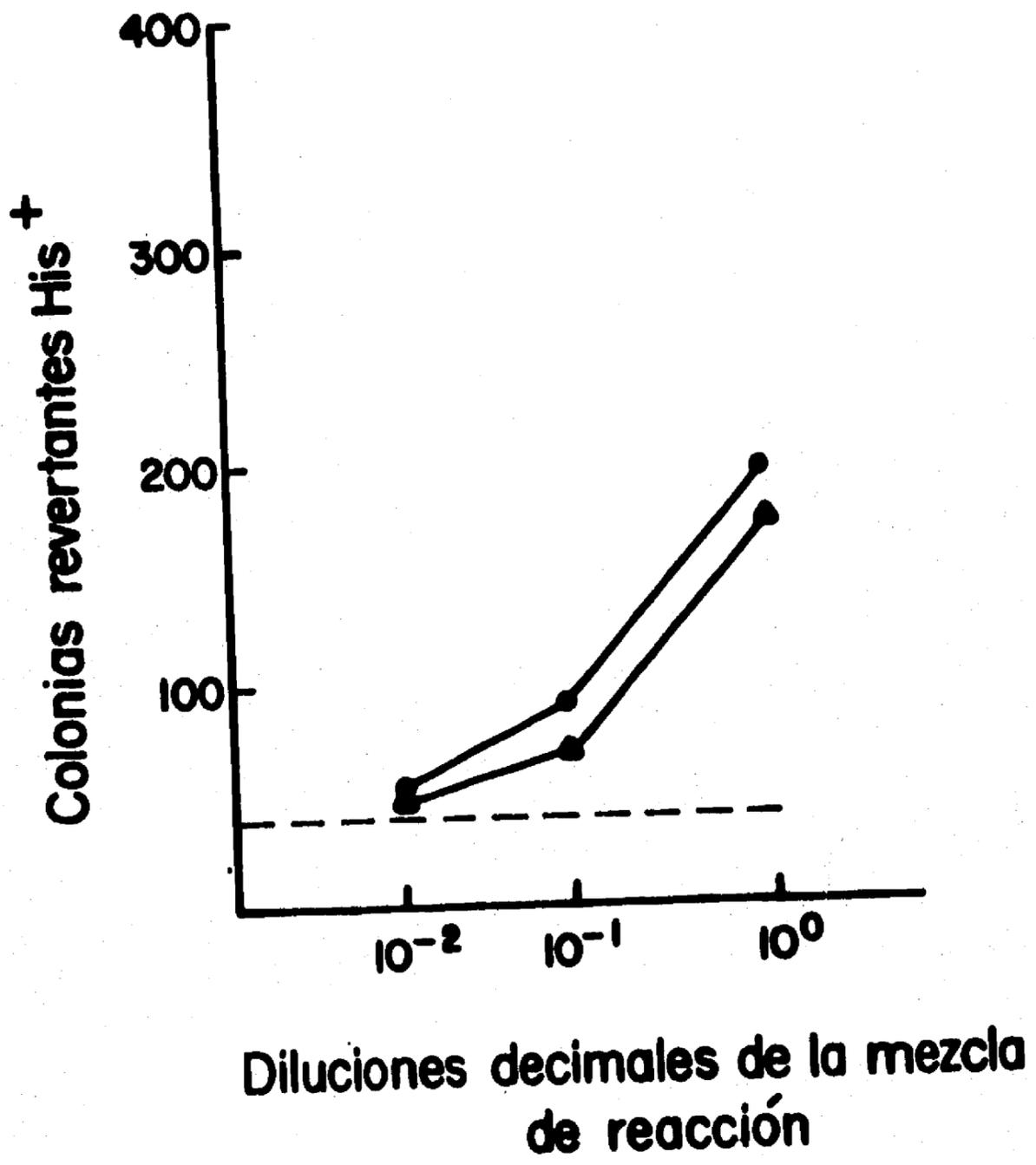


FIGURA 8

EFFECTO MUTAGENICO DEL PRODUCTO DE REACCION ENTRE EL PAMOATO DE
PIRANTEL Y NITRITO DE SODIO EN Salmonella typhimurim TA1535
- 0 - con S9, - - sin S9, - - nitrito de sodio con
S9, (tratados según se describe en materiales y métodos).
Pamoato de pirantel 22.5 ± 5.5 , Reversión espontánea 37.0 ± 4.7



REACCIONES DE NITROSACION IN VIVO

Los datos de la tabla VIII muestran que los ratones tratados con piperazina, cloroquina y mebendazol junto con nitrito de sodio presentaron un incremento estadísticamente significativo en la excreción de mutágenos en forma de derivados glucurónidos si se comparan estos datos con los obtenidos con animales tratados con los diferentes compuestos por separado, o con el grupo control. Se observa también un ligero incremento en la excreción de mutágenos en orinas de ratones tratados con nitrito de sodio y dehidroemetina, tanto en forma libre como conjugada. El grupo de ratones tratados con pirantel y nitrito de sodio solo muestra un ligero incremento de mutágenos conjugados con beta-glucuronidasa, no siendo este estadísticamente significativo si se le compara con respecto a los tres grupos controles correspondientes.

Los datos de la tabla VIII muestran que no se obtuvo ningún dato de actividad mutagénica en orinas de ratones tratados ni con hidroxinaftoato de bifenilo, ni con iodoclorohidroxiquinoleina, cuando estos medicamentos fueron administrados con nitrito de sodio.

TABLA VIII

EFECTO MUTAGENICO DE LA ORINA DE RATONES TRATADOS POR VIA ORAL CON NITRITO DE SODIO Y DIFERENTES MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

COMPUUESTOS	REVERTANTES/PLACA*			
	CON B-GLUCURONIDASA		SIN B-GLUCURONIDASA	
	X	±S	X	±S
URINA CONTROL**	37.3*	6.79	25.3	2.96
NaNO ₂ (80 mg/Kg)	42.0	10.42	43.3	7.40
PIPERAZINA (55 mg/Kg)	47.6	1.69	51.6	5.55
CLOROQUINA (55 mg/Kg)	48.0	2.94	50.0	10.03
DEHIDROEMETINA (25 mg/Kg)	34.6	6.23	31.6	11.32
FAMUATO DE PIRANTEL (50 mg/Kg)	44.76	11.01	27.3	1.24
PIPERAZINA: NaNO ₂ (65 : 80 mg/Kg)	105.6	11.67	47.6	11.89
CLOROQUINA: NaNO ₂ (55 : 80 mg/Kg)	101.6	12.2	67.3	7.58
DEHIDROEMETINA: NaNO ₂ (25 : 80 mg/Kg)	74.0	6.0	67.5	8.8
FAMUATO DE PIRANTEL : NaNO ₂ (50 : 80 mg/Kg)	60.3	2.09	41.0	7.20
LILOFOSFAMIDA (20 mg/Kg)	375.0	63.7		

* 3 Dias de tratamiento

* Promedio de tres placas por grupo

** Promedio de las revertantes inducidas por los ratones antes del tratamiento.

Reversión espontánea = 30.6 ± 3.0 g (con B-glucuronidasa), 30.33 ± 2.62 (sin B-glucuronidasa).

TABLA VIII

COMPUESTOS	REVERTANTES/PLACA*			
	CON B-GLUCURONIDASA		SIN B-GLUCURONIDASA	
	X	±S	X	±S
URINA CONTROL**	28.8	12.08	34.2	3.6
NaNO ₂ (80 mg/Kg)	46.0	7.78	41.6	1.6
2,6-DICHLOROHIDROXIQUINOLEINA (200 mg/Kg)	48.0	11.86	44.6	3.48
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO (1000 mg/kg)	32.6	5.25	35.3	6.11
2,6-DICHLOROHIDROXIQUINOLEINA + NaNO ₂ (200 mg + 80 mg/Kg)	44.6	7.43	28.3	4.14
HIDROXINAFTOATO DE BEFENIO + NaNO ₂ (1000 mg + 80 mg/Kg)	36.6	2.62	33.3	0.54

** 3 Dias de tratamiento
3 placas por grupo

* Promedio de colonias revertantes inducidas por la orina de los ratones antes del tratamiento
Reversión espontanea + 35.08 ± 4.08 (sin B-glucuronidasa) 31.3 ± 1.68 (con B-glucuronidasa)

CINETICA DE LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES
TRATADOS CON NITRITO DE SODIO Y MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS.

La excreción urinaria de mutágenos en animales tratados con piperazina y cloroquina (base), simultáneamente con nitrito de sodio no es considerable después de un solo tratamiento, pero como se muestra en la figura 9, la actividad mutagénica producida por el tratamiento de estos dos medicamentos aminados con nitrito se acumula al incrementar el número de tratamientos.

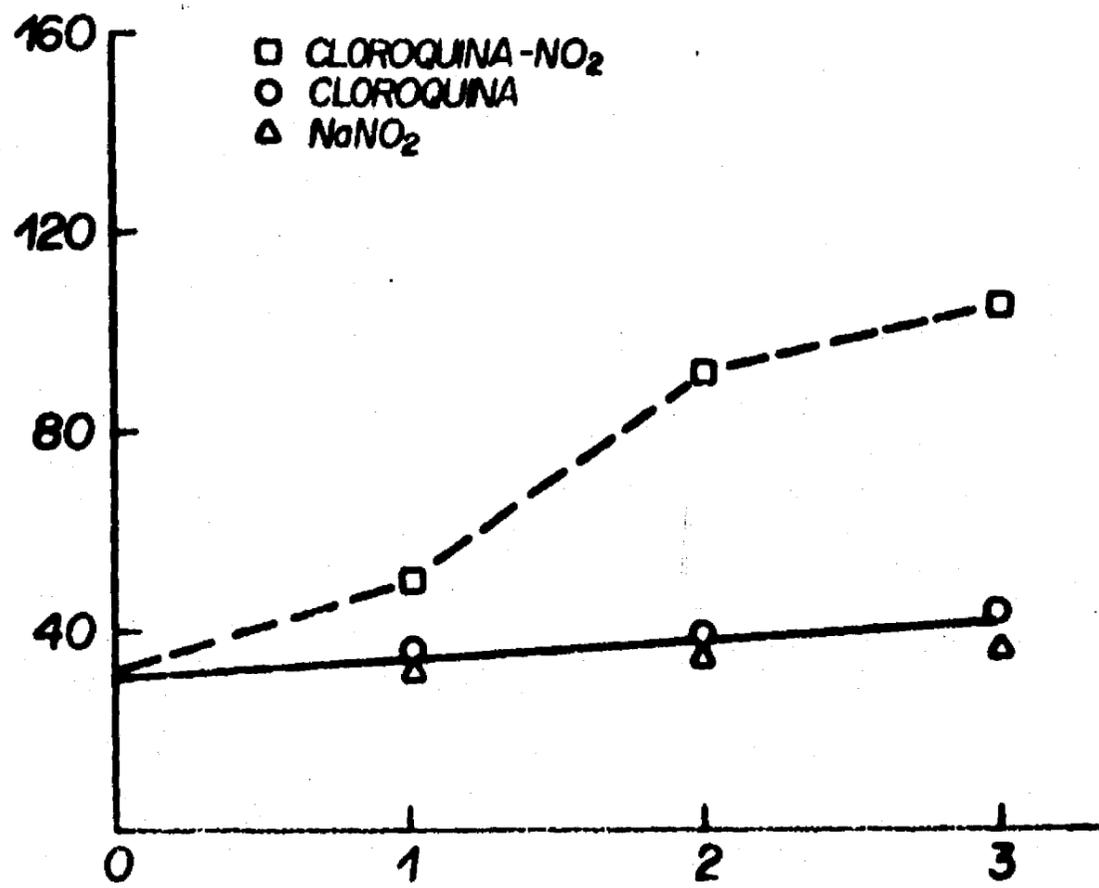
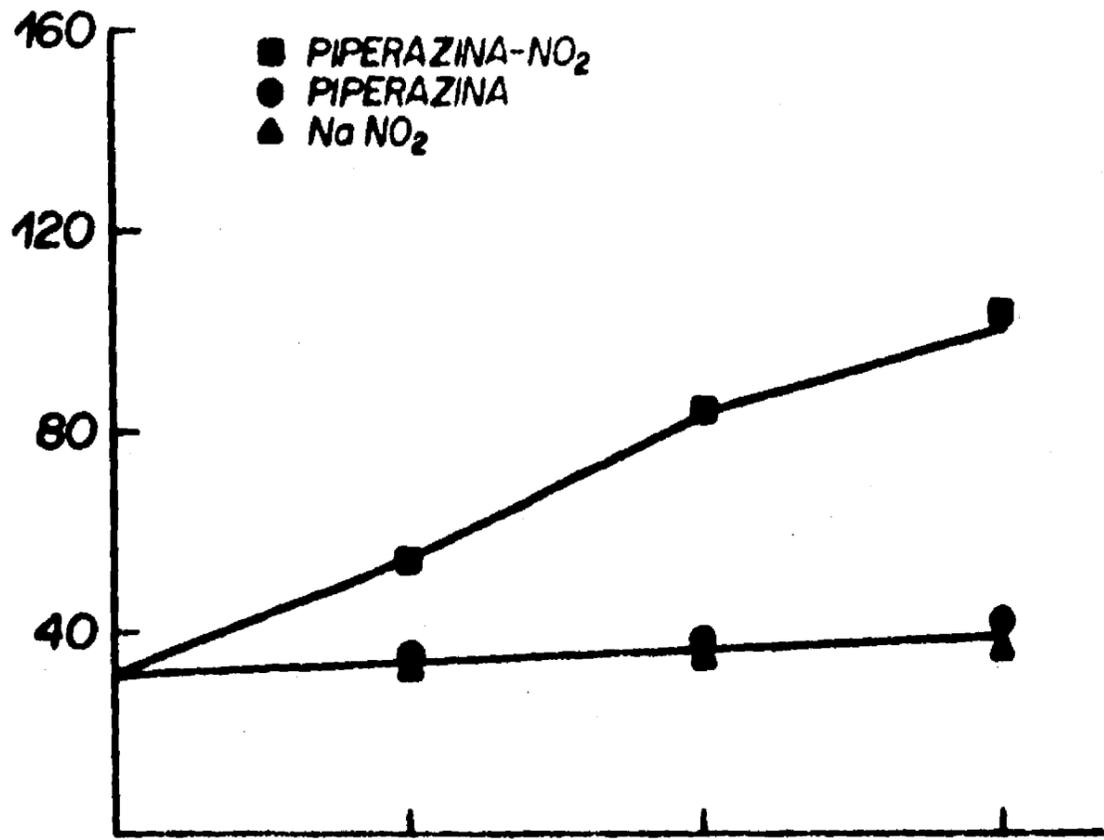
Los ratones tratados con mebendazol y nitrito de sodio excretan mutágenos en la orina después de 24 horas del primer tratamiento. No observándose un incremento notable en la actividad mutagénica de ratones tratados durante un período de tres días, según se puede observar en la figura 10.

Los tratamientos con pamoato de pirantel y dehidroemetina junto con nitrito de sodio, no producen un incremento de la actividad mutagénica en orina durante un período de tres días como puede observarse en la figura 11.

FIGURA 9

**EXRECIÓN URINARIA DE MUTÁGENOS EN RATONES TRATADOS CON
PIPERAZINA Y CLOROQUINA (BASE) JUNTO CON NITRITO DE SODIO,
DURANTE TRES DÍAS CONSECUTIVOS.**

Colonias revertantes His⁺



Días de tratamiento

FIGURA 10

**EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON
MEBENDAZOL Y NITRITO DE SODIO DURANTE TRES DIAS.**

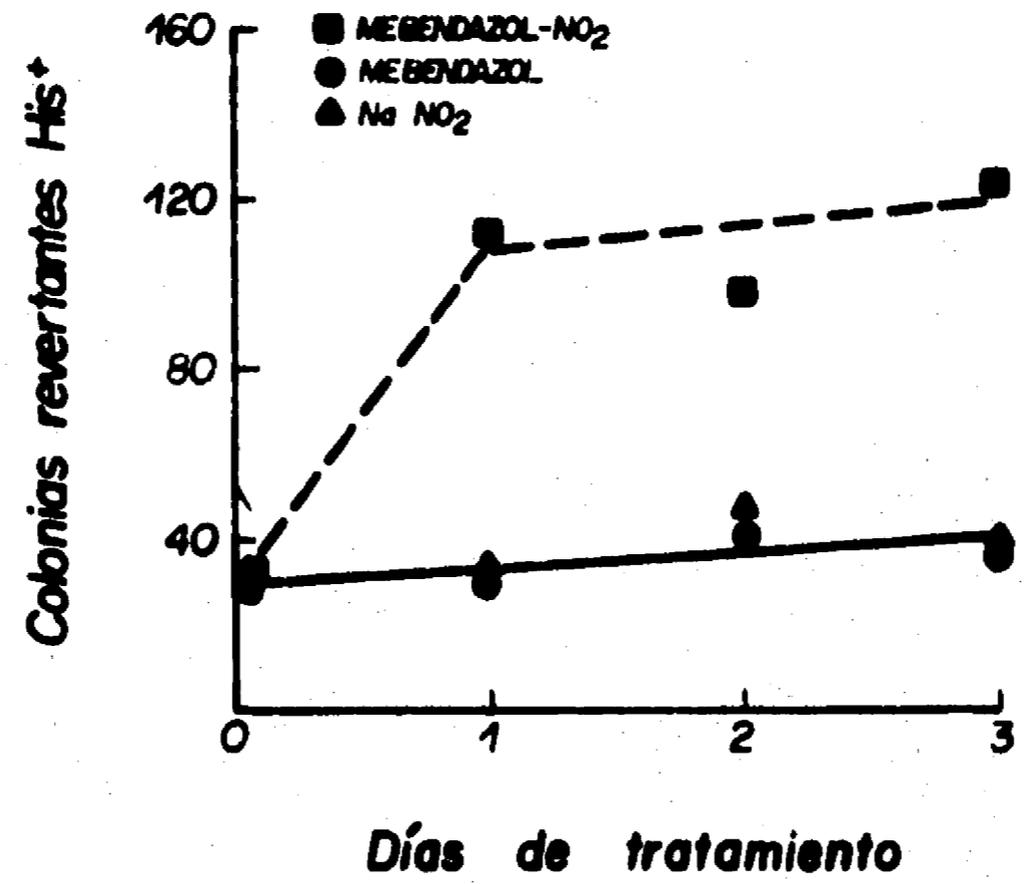
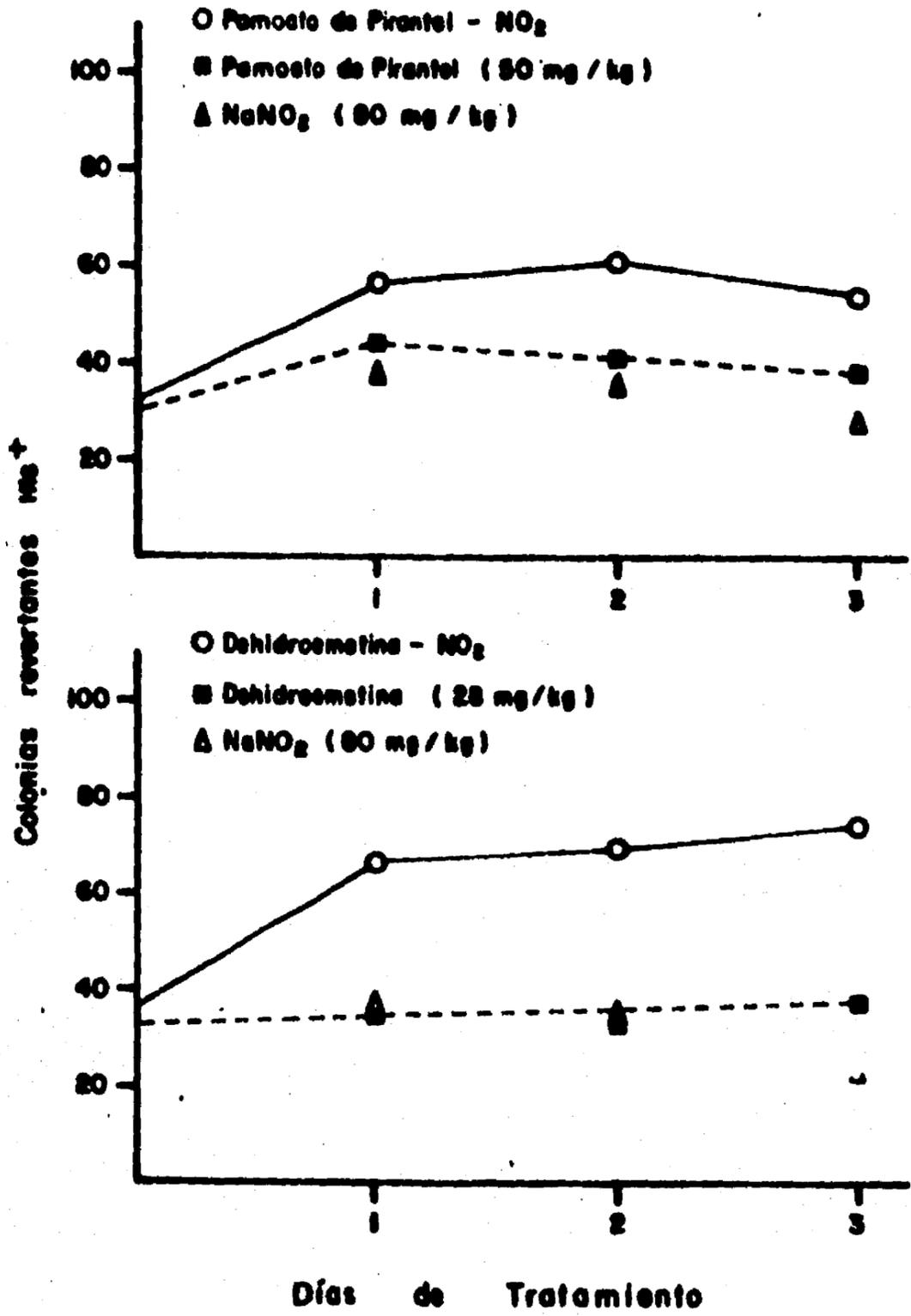


FIGURA 11

EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON PAMOATO DE PIRANTEL Y DEHIDROEMETINA CON NITRITO DE SODIO DURANTE TRES DIAS.



EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO EN LA FORMACION DE MUTAGENOS DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS.

Los datos presentados en las figuras 12, 13 y 14 muestran que la excreción urinaria de mutágenos en animales tratados con piperazina, mebendazol y cloroquina respectivamente se incrementa en forma directamente proporcional a la concentración de nitrito.

La tabla IX muestra que es posible obtener un incremento en la excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados tanto a la dosis terapéutica de cloroquina (base) (10 mg/Kg), como a una dosis de 55 mg/Kg, dependiendo la respuesta esencialmente de la concentración de nitrito de sodio.

La tabla X muestra evidencias de que en el caso de ratones tratados con mebendazol tanto a la dosis terapéutica (3.5 mg/Kg), como a una dosis cercana a la DL (35 mg/Kg) se puede obtener la formación de mutágenos en orina, en forma dependiente a la concentración de nitrito de sodio.

FIGURA 12

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO DE SODIO EN LA EXCRECION
URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON PIPERAZINA.**

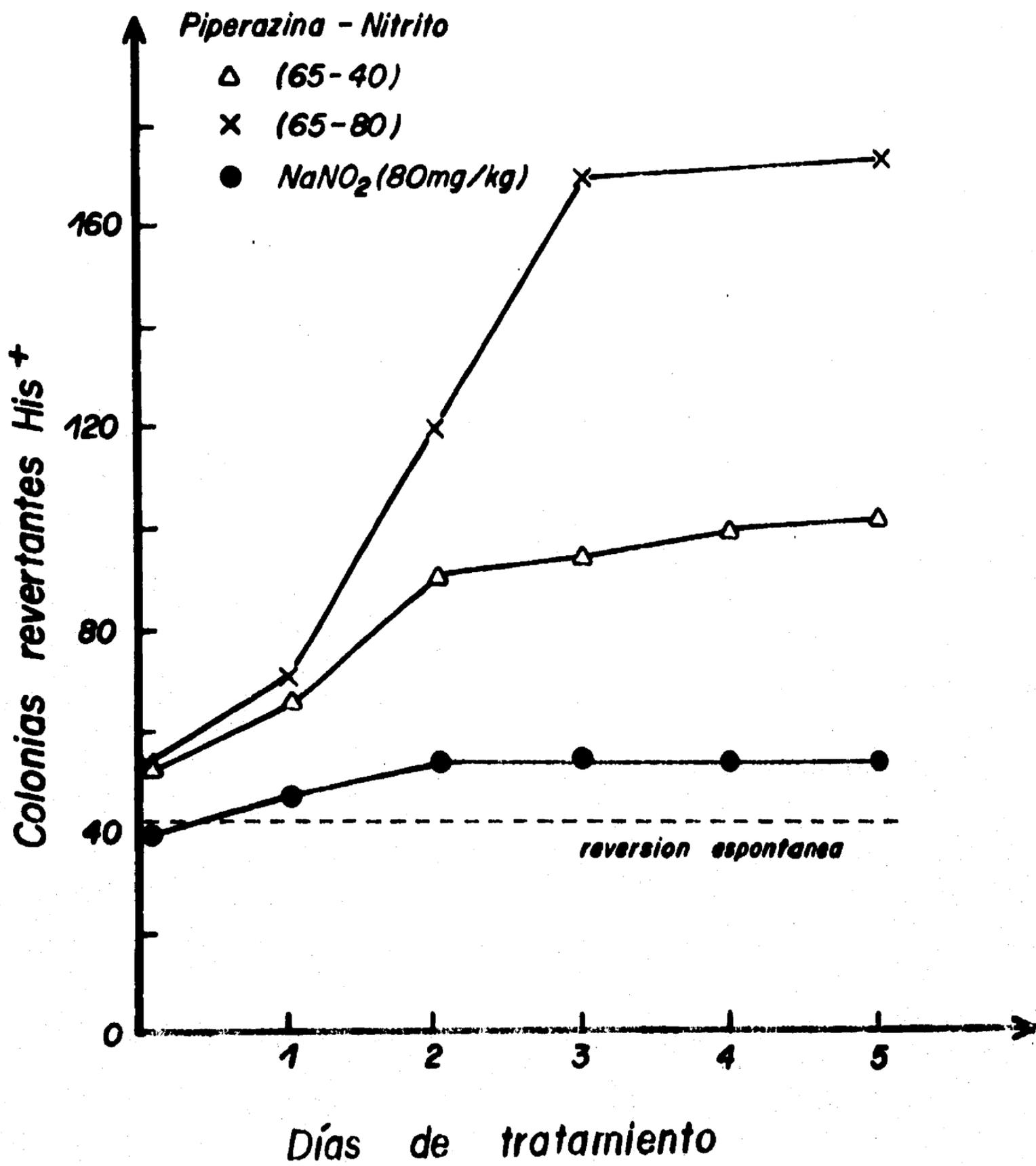


FIGURA 13

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO DE SODIO EN LA EXCRECION
URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON MEBENDAZOL**

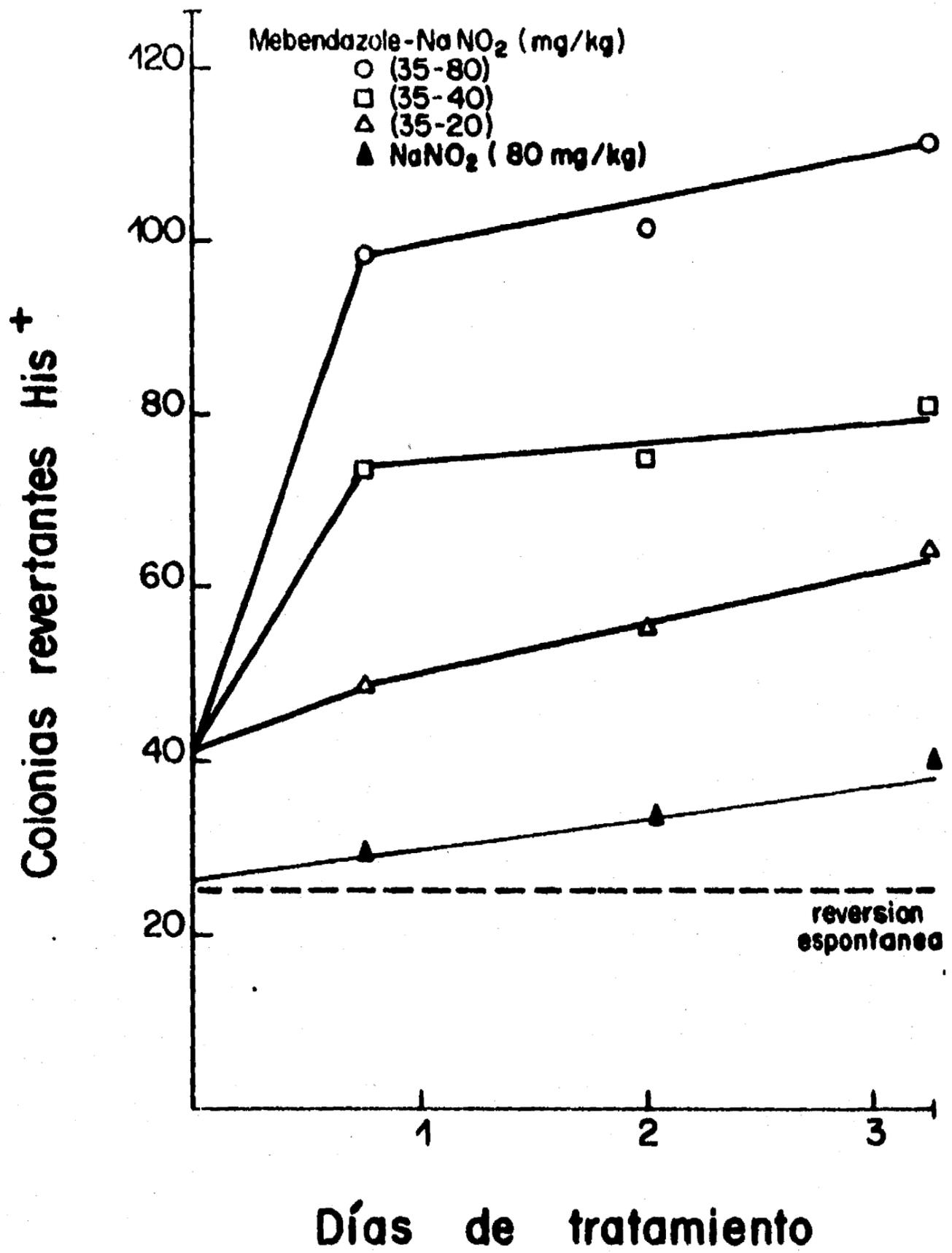


FIGURA 14

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO DE SODIO EN LA EXCRECION
URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON CLOROQUINA (BASE)**

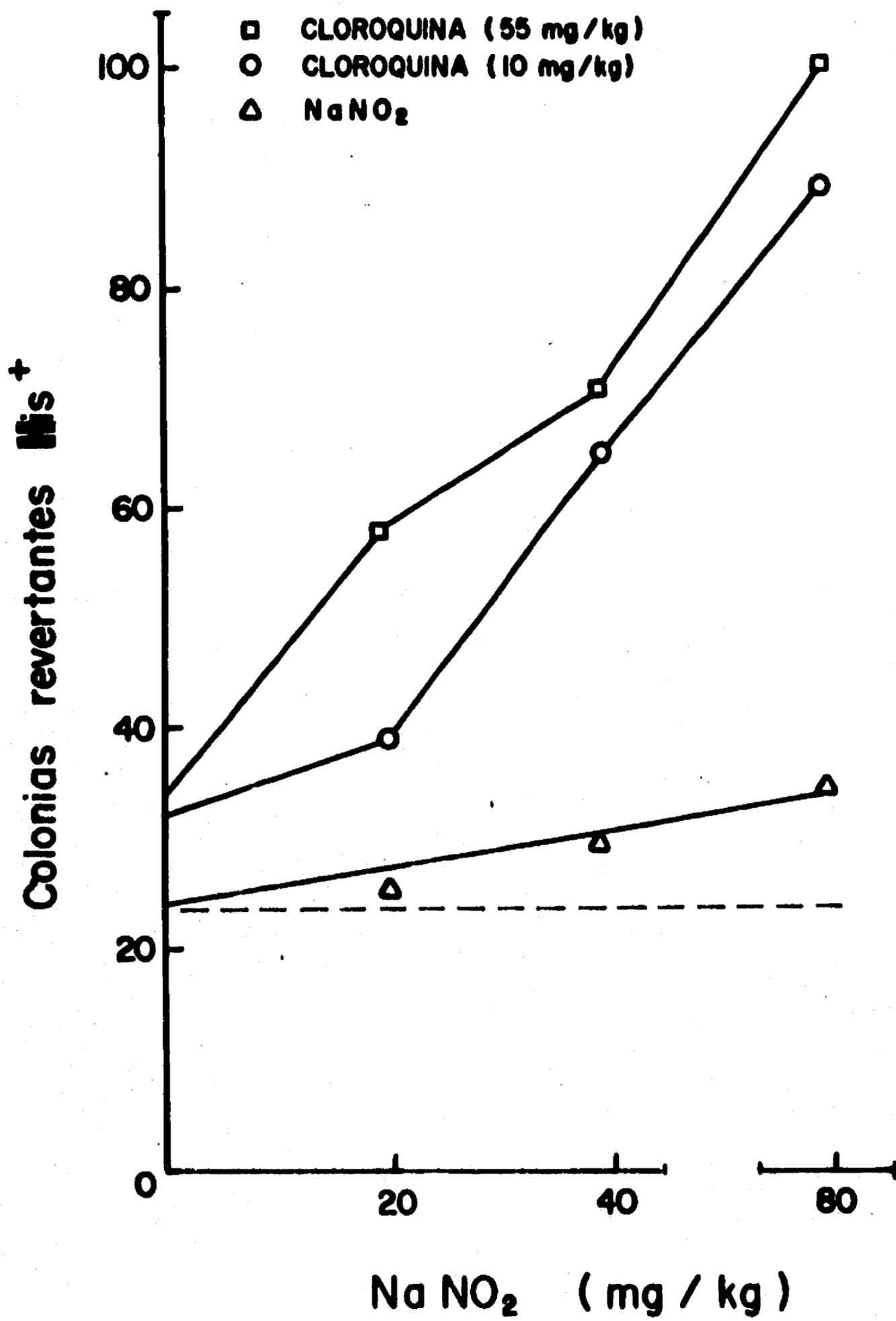


TABLA IX

EFFECTO DE LA DOSIS DE NITRITO DE SODIO EN LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS URALMENTE CON CLOROQUINA BASE

GRUPO No.	SUSTANCIAS	EXPERIMENTO 1			GRUPO No.	SUSTANCIA	EXPERIMENTO 2		
		S. <u>typhimurium</u> TA1535	± S	P			S. <u>typhimurium</u> TA1535	± S	P
	-	20.0	4.54	-	-	-	24.6	6.40	-
	B-glucuronidasa**	21.0	4.69	-	-	B-glucuronidasa	26.8	4.62	-
1	Cloroquina (55 mg/kg)*	34.0	3.74	-	6	Cloroquina (10 mg/kg)	32.8	5.90	-
2	NaNO ₂ (80 mg/kg)	30.6	3.40	-	7	NaNO ₂ (80mg/kg)	26.6	2.56	-
	Cloroquina - NaNO ₂ x					Cloroquina - NaNO ₂			
3	(55:80) (mg/kg)	<u>101.6</u>	12.2	(a)0.005	8	(10:80) (mg/kg)2	<u>89.3</u>	5.40	(d)0.005 (e)0.25
4	(55 : 40)	<u>70.0</u>	0.82	(b)0.005	9	(10:40)	<u>65.0</u>	4.08	(f)0.005 (g)0.10
5	(55 : 20)	57.6	6.02	(c)0.01	10	(10:20)	39.2	6.80	(h)0.20 (i)0.025

* Promedio de tres cajas
 ** Orina de tres ratones
 *** 200 u/caja

Incremento igual o superior al doble de la reversión espontánea
 () Comparaciones estadísticas: (a), (b) y (c) corresponden a las comparaciones de los grupos 3, 4 y 5 al grupo 1 (control);
 (d), (f) y (g) a las comparaciones entre los grupos 8, 9 y 10 con el grupo 6 (su control);
 (e), (g) e (i) resultan de las comparaciones entre los grupos 8, 9 y 10 con los grupos 3, 4 y 5 respectivamente.

TABLA X

EFFECTO DE LA DOSIS DE NITRITO DE SODIO EN LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS ORALMENTE CON EL MEBENDAZOL

GRUPO No.	SUSTANCIAS	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2			
		REVERTANTES* <u>S. typhimurium</u>		± S	P	REVERTANTES GRUPO No.		SUSTANCIAS <u>S. typhimurium</u>	
		TA1535						TA1535	
	-	24.0	2.9	-	-	-	30.0	13.4	
	b-glucuronidasa**	35.0	3.05	-	-	b-glucuronidasa	31.8	9.46	
1	Mebendazol (38 mg/kg)*	44.8	10.7	-	6	Mebendazol (3.5 mg/kg)	39.6	3.64	
2	NaNO2 (80 mg/kg)	42.1	10.42	-	7	NaNO2 (80mg/kg)	43.6	3.30	
3	Mebendazol-NaNO2* (35 : 80 mg/kg)	110.6	9.2	(a) 0.005	8	Mebendazol-NaNO2 (3.5 : 80 mg/kg)	86.0	10.6	(d) 0.05 (e) 0.01
4	(35 : 40)	80.0	3.26	(b) 0.005	9	(3.5 : 40)	67.3	7.12	(f) 0.005 (g) 0.05
5	(35 : 20)	64.3	3.40	(c) 0.01	10	(3.5 : 20)	60.6	9.84	(h) 0.05 (i) 0.01

* Promedio de tres cajas

• Orina de cinco ratones tratados durante tres días

** 200 u/caja

Incremento igual o superior al doble de la reversión espontánea

() Comparaciones estadísticas: (a), (b) y (c) corresponden a las comparaciones de los grupos 3, 4 y 5 al grupo 1 (control); (d), (f) y (g) a las comparaciones entre los grupos 8, 9 y 10 con el grupo 6 (su control); (e), (g) e (i) resultan de las comparaciones entre los grupos 8, 9 y 10 con los grupos 3, 4 y 5 respectivamente.

INFLUENCIA DEL SISTEMA DE REPARACION POR ESCISION EN LAS
MUTACIONES INDUCIDAS POR COMPUESTOS N-NITROSO DERIVADOS DE
PIPERAZINA Y MEBENDAZOL

Datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que los derivados N-nitroso de la piperazina sólo inducen mutaciones en la cepa de Salmonella typhimurium TA1975 UvrB+ a una concentración diez veces mayor que la requerida para inducir mutaciones en la cepa de Salmonella typhimurium TA1535 UvrB-. No se observa un efecto considerable en la inducción de mutaciones letales por este compuesto en ambas cepas. Con respecto a los derivados mutagénicos del mebendazol y nitrito de sodio se observa que son mutagénicos en las dos cepas de Salmonella typhimurium Uvr-/Uvr+. El producto de la reacción de nitrosación del mebendazol es más tóxico en la cepa que no posee el sistema de reparación por escisión. Observándose en los datos de la tabla XI un incremento en la sobrevivencia de la cepa Uvr+ con respecto a la Uvr-, expuesta a la misma dilución de la mezcla de reacción.

TABLA XI

EFFECTOS MUTAGENICOS DE DERIVADOS NITROSADOS DEL MEBENDAZOL EN CEPAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM Uvr⁻/Uvr⁺

TRATAMIENTOS	REVERTANTES/CAJA	TA1535 (Uvr ⁻)		TA1975 (Uvr ⁺)		
		SOBREVIDA UFC/CAJA	REVERTANTES/10 SOBREVIVIENTES	REVERTANTES/CAJA	SOBREVIDA UF/CAJA	REVERTANTES/10 SOBREVIVIENTES
	30.0	907.0	5.9	4.3	990.0	0.4
MEBENDAZOL + S9	29.6	590.0	5.0	4/6	896.0	0.5
NaN ₃ + S9	42.3	552.0	7.6	7.0	950.0	0.7
MEBENDAZOL + (0.25µM)*	39.0	366.0	10.0	17.3	928.0	1.8
NaN ₃ + S9 (9.58µM)	51.3	363.0	14.0	18.0	915.0	1.9
(2.7 µM)	67.3	83.3	80.0	23.0	799.0	2.8

UFC: Unidades formadoras de colonias. Promedio de tres cajas Petri.
 *) * Cálculo de enlaces -N-N=O.

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DE NITRITO CON RESPECTO
AL TRATAMIENTO CON CLOROQUINA Y MEBENDAZOL**

La formación de mutágenos en la orina de ratones tratados con cloroquina, sólo se presenta cuando ambas drogas se administran simultáneamente según lo muestran los datos de la figura 15.

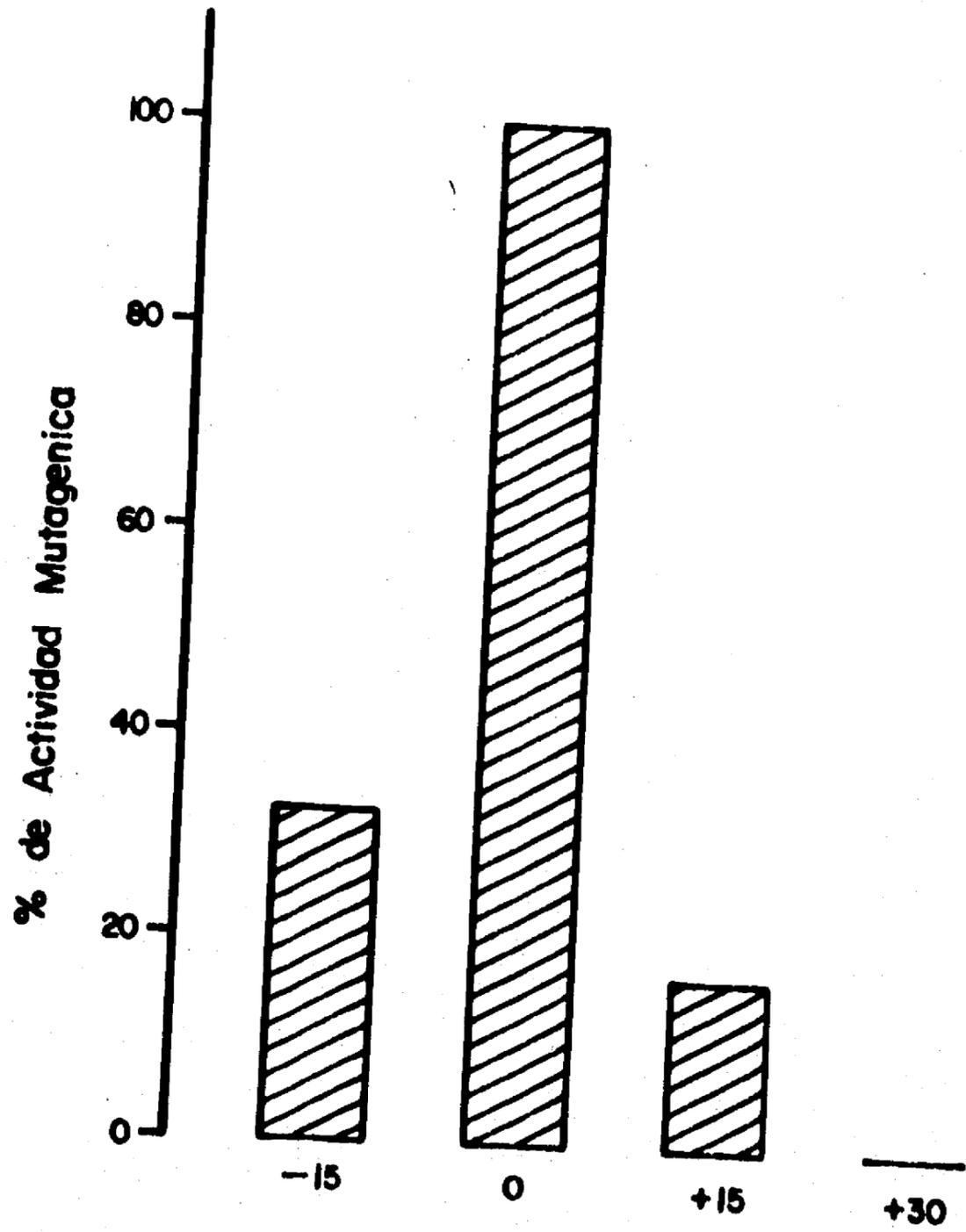
Los productos mutagénicos derivados de la reacción *in vivo* del mebendazol y el nitrito de sodio se forman si el medicamento y el nitrito de sodio son consumidos en un periodo no mayor de 15 minutos después del tratamiento con el compuesto aminado como lo muestra la figura 16, si el nitrito de sodio es ingerido quince minutos antes que el mebendazol, tampoco se recupera la actividad mutagénica en las orinas de los animales.

En la figura 17 se muestra que la excreción urinaria de mutágenos en la orina de ratones tratados con mebendazol y nitrito desaparece totalmente a las 48 horas después de haber suspendido el tratamiento.

En la figura 18 se muestra que la excreción urinaria de mutágenos en ratones tratados con cloroquina (base) y nitrito de sodio se recupera hasta 72 horas después de haber suspendido el tratamiento.

FIGURA 15

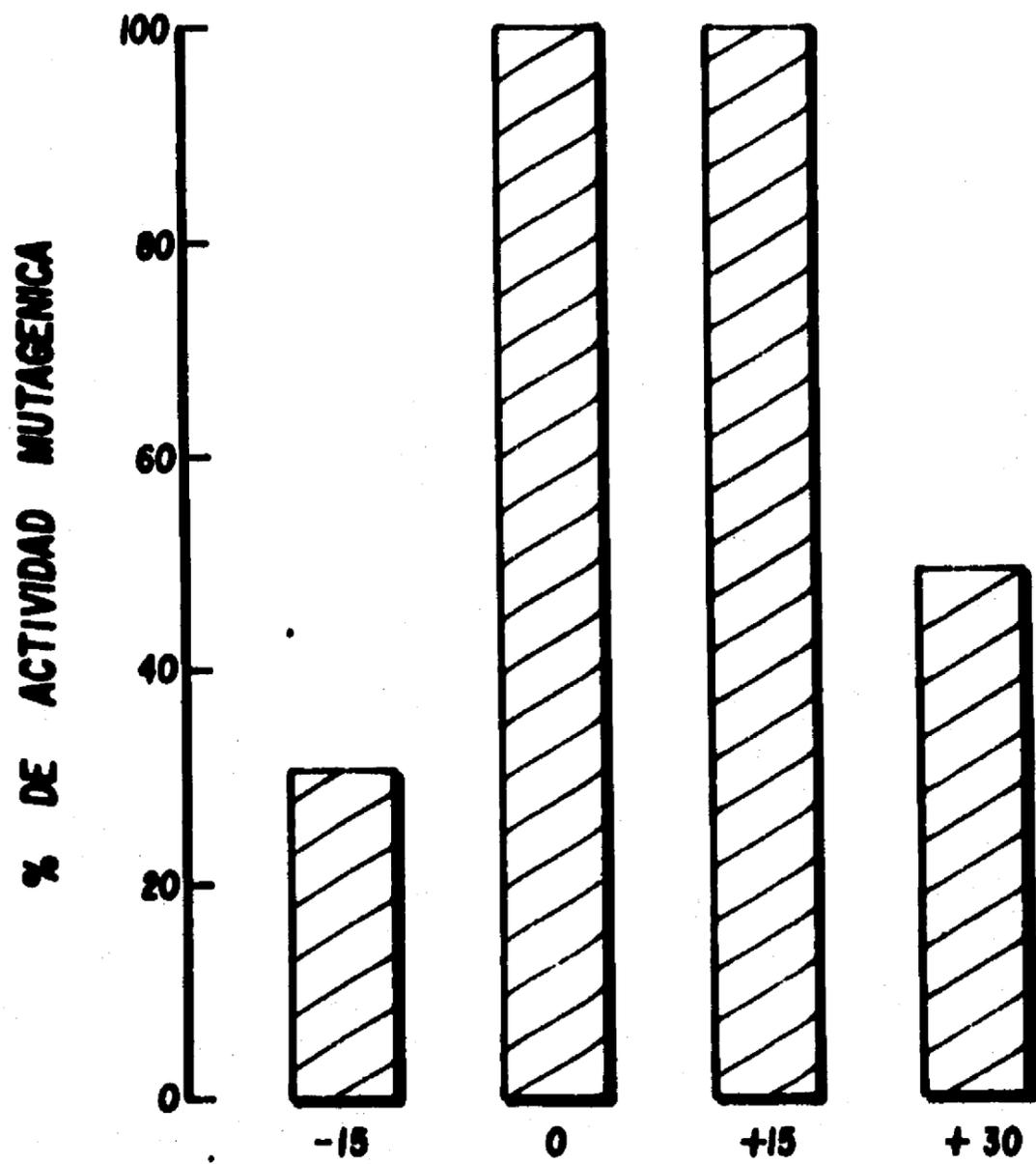
**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DEL NITRITO DE SODIO CON
RESPECTO A LA CLOROQUINA EN LA FORMACION DE MUTAGENOS EN ORINAS
DE RATON.**



Tiempo de administración del nitrito de sodio, en minutos antes y después del tratamiento con cloroquina

FIGURA 16

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DEL NITRITO DE SODIO CON
RESPECTO AL MEBENDAZOL EN LA FORMACION DE MUTAGENOS EN ORINAS DE
RATON**



TIEMPO DE ADMINISTRACION DEL NTRITO DE SODIO EN MINUTOS ANTES Y DESPUES DEL MEBENDAZOL

FIGURA 17

**ELIMINACION DE MUTAGENOS EN ORINA DE RATONES TRATADOS CON
MEBENDAZOL Y NITRITO DE SODIO.**

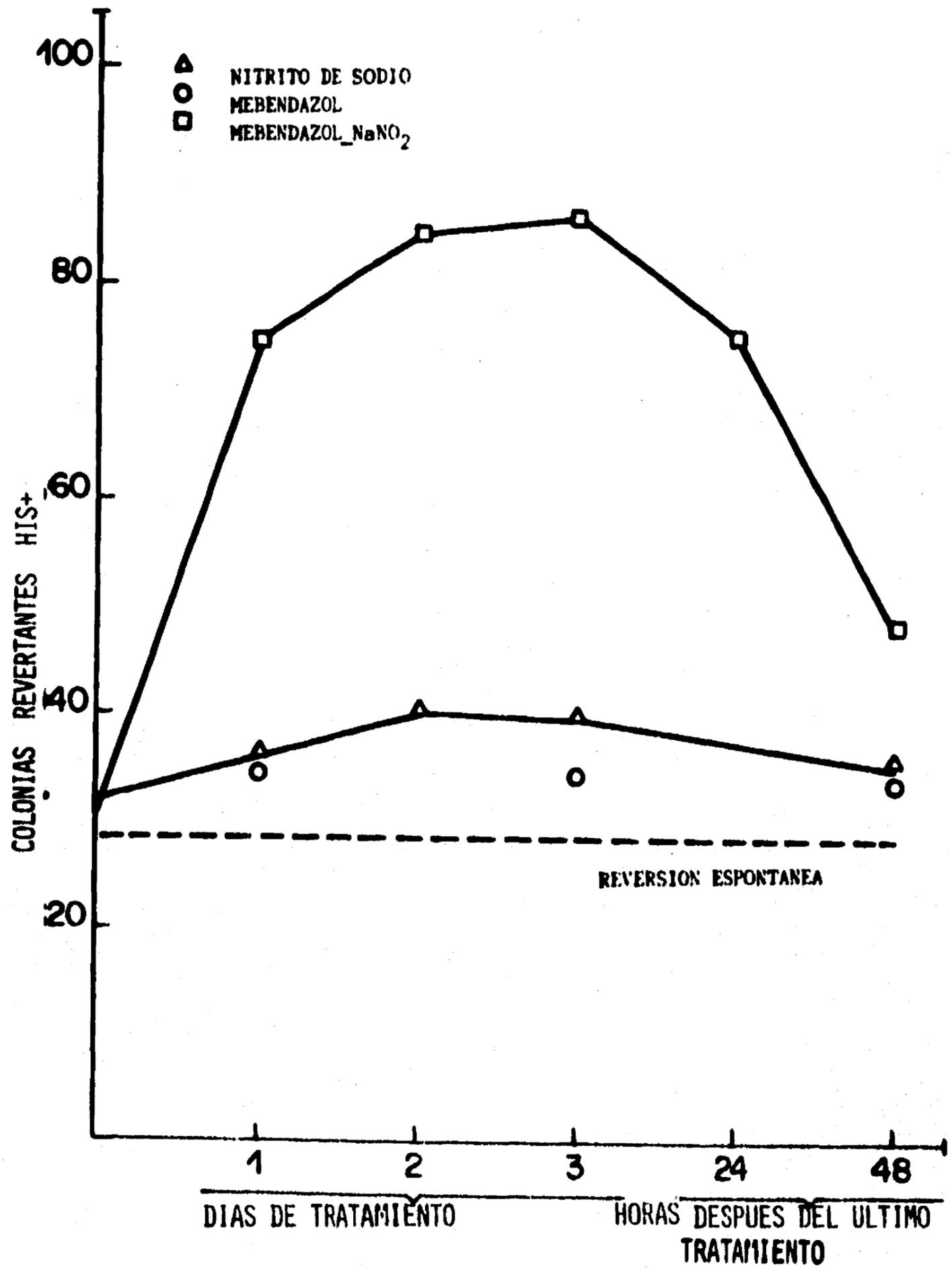
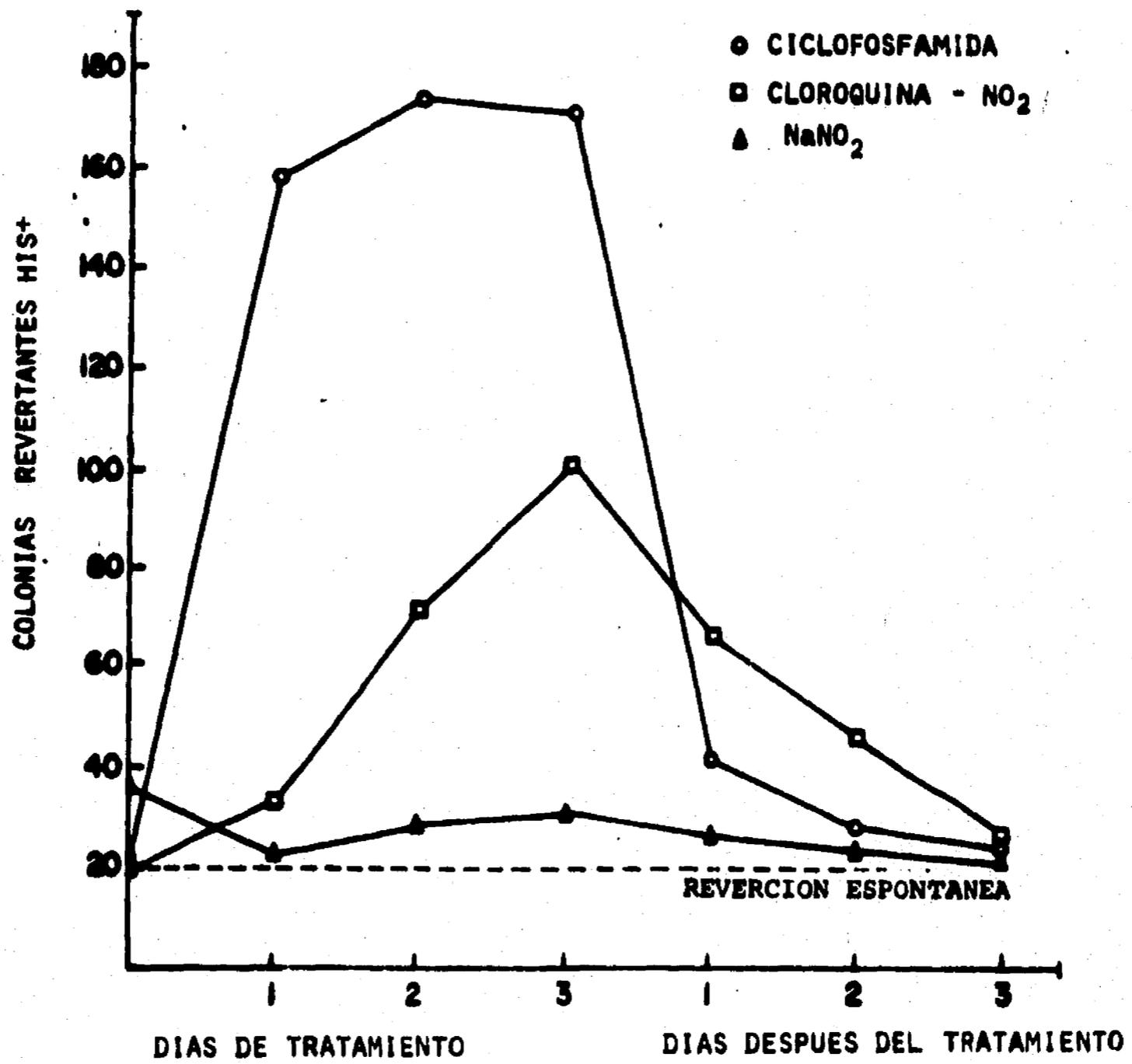


FIGURA 18

**ELIMINACION DE MUTAGENOS EN ORINA DE RATONES TRATADOS CON
CLOROQUINA (Base) Y NITRITO DE SODIO**



EFFECTO DEL SEXO EN LA EXCRECION URINARIA DE MUTAGENOS EN RATONES TRATADOS CON MEBENDAZOL Y NITRITO DE SODIO

Los resultados de la tabla XII indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la excreción urinaria de mutágenos entre ratones macho o hembra, tratados con mebendazol o con nitrito de sodio.

INHIBICION DE LA REACCION DE NITROSACION DEL MEBENDAZOL IN VITRO E IN VIVO

Los datos que se presentan en la tabla XIII presentan evidencias de que la reacción de nitrosación del mebendazol es rápidamente inhibida por la vitamina C en una concentración equimolar de nitrito de sodio: ascorbato de sodio.

Los datos de la figura 19 muestran que la formación de mutágenos in vivo es inhibida completamente cuando se administran cantidades de vitamina C en una relación molar (1:4) de nitrito de sodio versus vitamina C.

La inhibición de la reacción de nitrosación al mebendazol in vivo con la vitamina C, solo se lleva a cabo cuando dicha vitamina es administrada simultáneamente o hasta quince minutos después del tratamiento con mebendazol y nitrito de sodio. (Figura 20).

TABLA XII

EFFECTO MUTAGENICO DE LAS ORINAS* DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS
TRATADOS ORALMENTE CON MEBENDAZOL Y NITRITO DE SODIO

TRATAMIENTO	NUMERO DE REVERTANTES (ORINA DE MACHOS)	P	NUMERO DE REVERTANTES (ORINA DE HEMBRAS)	P
CONTROL	24.6 (± 1.9)	-	24 (± 2.9)	
SOLVENTE	35.6 (± 2.5)	-	41.6 (± 2.2)	
NaNO ₂ (80 mg/kg)	33.6 (± 1.6)	(1) 0.2	37.6 (± 5.56)	(5) 0.005
MEBENDAZOL (35 mg/kg)	25.6 (± 2.16)	(2) 0.005 (3) 0.005		(6) 0.005
MEBENDAZOL + NaNO ₂ (35 + 80 mg/kg)	110.6 (± 9.2)	(4) 0.03	99.6 (± 19.4)	(7) 0.005

(e) Desviación estándar

* 200 ul de orina tratada con beta glucuronidasa

(1) Comparaciones estadísticas entre machos tratados con NaNO₂ y machos control

(2) Machos tratados con mebendazol y nitrito vs machos tratados solo con mebendazol

(3) Machos tratados con mebendazol y nitrito vs machos tratados con nitrito

(4) Machos tratados con mebendazol y nitrito vs hembras tratadas con mebendazol y nitrito

(5) Hembras tratadas con nitrito vs hembras control

(6) Hembras tratadas con mebendazol y nitrito vs hembras control

(7) Hembras tratadas con mebendazol y nitrito vs hembras tratadas con nitrito de sodio

TABLA XIII

EFFECTO INHIBITORIO DE LA NITROZACION DEL MEBENDAZOL IN VITRO POR ADICION DE VITAMINA C

TRATAMIENTO	CALCULO DE ENLACES (-N-N=O)		CALCULO DEL RENDIMIENTO DE LA REACCION		% DE INHIBICION DE LA REACCION		S. typhimurium TA1535 REVERTANTES/CAJA			
	(b) EXP. 1	EXP. 2	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 1	EXP. 2	EXP. 1 I	EXP. 2	EXP. 1 II	EXP. 2
CONTROL	-	-	-	-	-	-	12.6	16.0	21.6	21.6
MEZCLA 69	-	-	-	-	-	-	17.0	16.3	20.6	33.0
CICLOFOSFAMIDA + 69 (500 ug/CAJA)	-	-	-	-	-	-	173.0	497.6	385.0	525.0
a) NaNO ₂ : VIT. C+69 (1:2 M)	-	-	-	-	-	-	14.3	19.0	20.6	29.6
b) VITAMINA C + 69 (2 M)	-	-	-	-	-	-	15.6	21.0	19.6	21.6
c) MEBENDAZOL + NaNO ₂ : VIT. C + 29										
1 : 0	36	51.0	16.0	21.40	0	0	47.3	46.0	135.3	72.3
1 : 0.25	18	16.0	9.0	9.0	53.0	65.0	19.0	33.0	41.0	67.0
1 : 0.50	10	13.0	5.0	5.45	74.0	74.0	14.0	14.0	17.0	53.0
1 : 1.0	ND.	0.9	-	0.37	100.0	82.3	16.0	21.0	20.0	48.0
1 : 2.0	-	ND.	-	ND.	-	100.0	-	21.0	-	32.6

a) Tratados como la mezcla de reacción (ver Métodos)

b) Las reacciones se realizaron en amortiguador de fosfatos 0.5M pH 3.7 con 150 mg de mebendazol, 170 mg de NaNO₂ (1.5M)

c) Relación molar NaNO₂ : Vitamina C.

I Ensayo usual en caja de Petri:

II Ensayo de reincubación

ND. No detectable

II Promedio de tres cajas

FIGURA 19

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE VITAMINA C EN LA EXCRECION DE
MUTAGENOS EN LA ORINA DE RATONES TRATADOS CON MEBENDAZOL Y
NITRITO DE SODIO.**

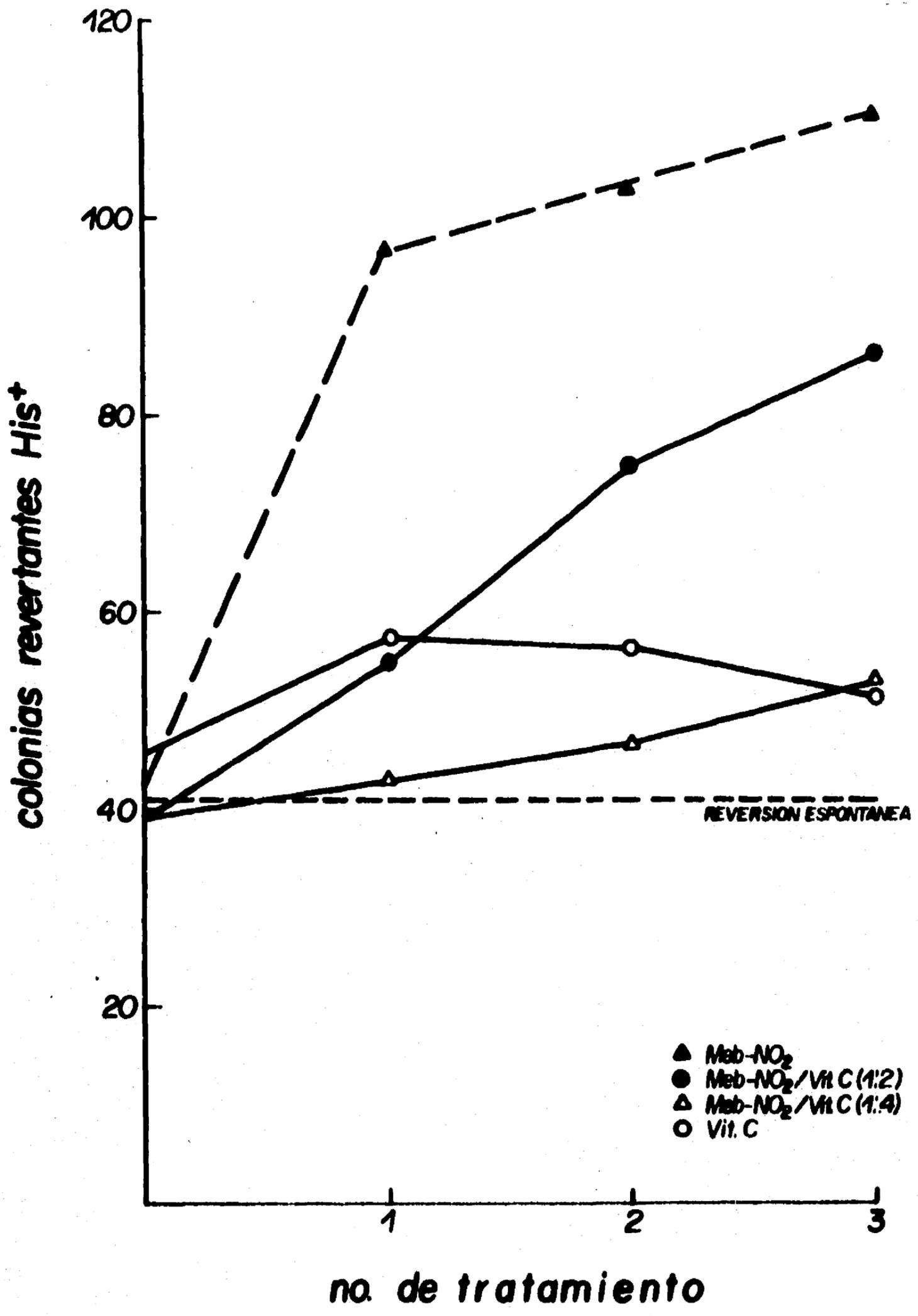
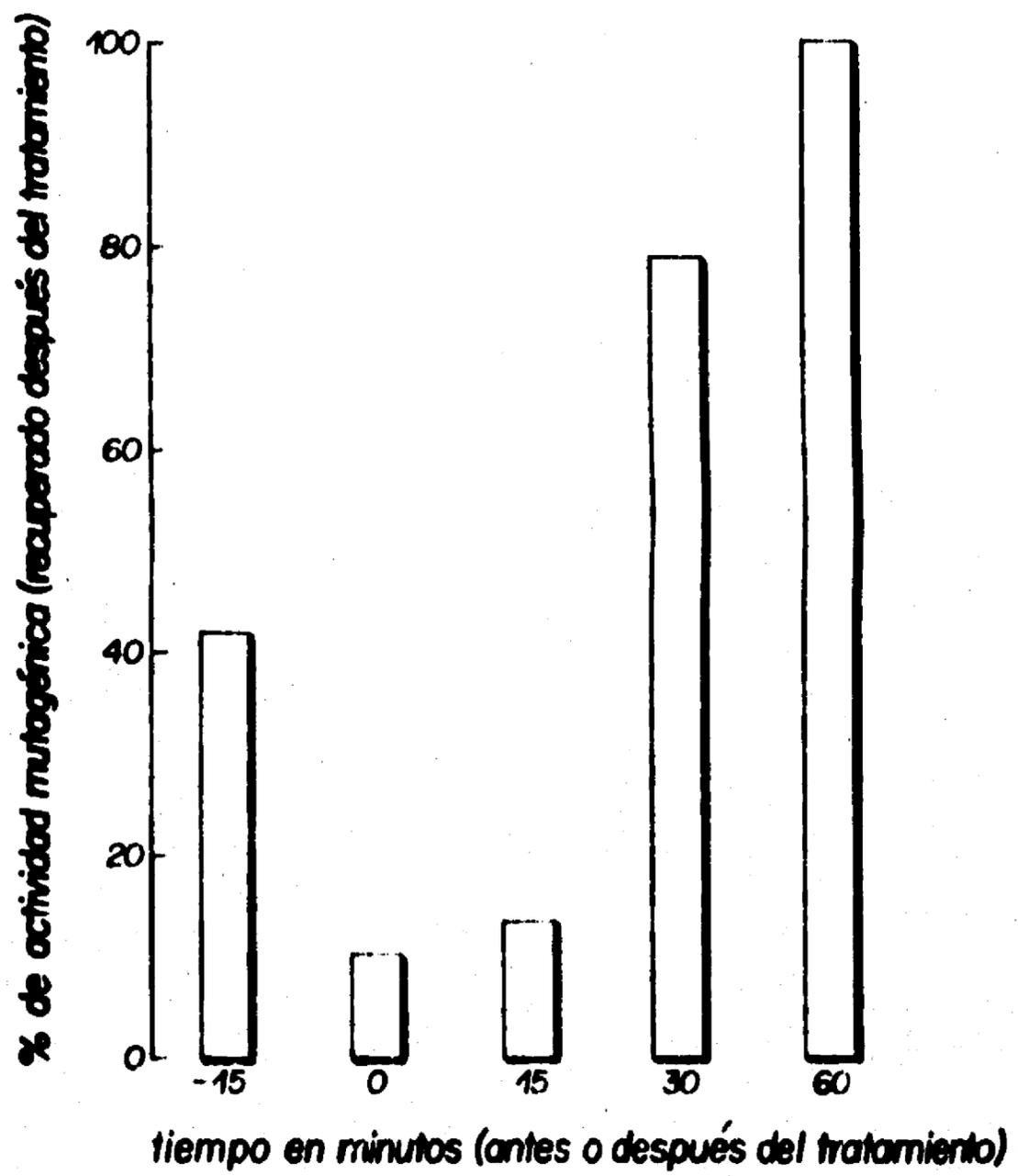


FIGURA 20

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADMINISTRACION DE LA VITAMINA C EN
LA EXCRECION DE MUTAGENOS EN LA ORINA DE RATONES TRATADOS CON
MEBENDAZOL Y NITRITO DE SODIO**



CARACTERIZACION ESPECTROFOTOMETRICA Y CROMATOGRAFICA DE LOS PRODUCTOS DE REACCION ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO

Los resultados de la tabla XIV muestran los picos máximos de absorción en el espectro ultravioleta, del mebendazol, el nitrito de sodio y el producto de reacción entre el nitrito y el mebendazol.

En la figura 21 se muestra la presencia de dos picos con los tiempos relativos de retención a los 6.5 y 8.0 minutos en el producto de reacción entre el mebendazol y el nitrito de sodio. El nitrito de sodio presenta un pico con un tiempo relativo de retención de 5.9 minutos. En mebendazol no pudo ser detectado con este método.

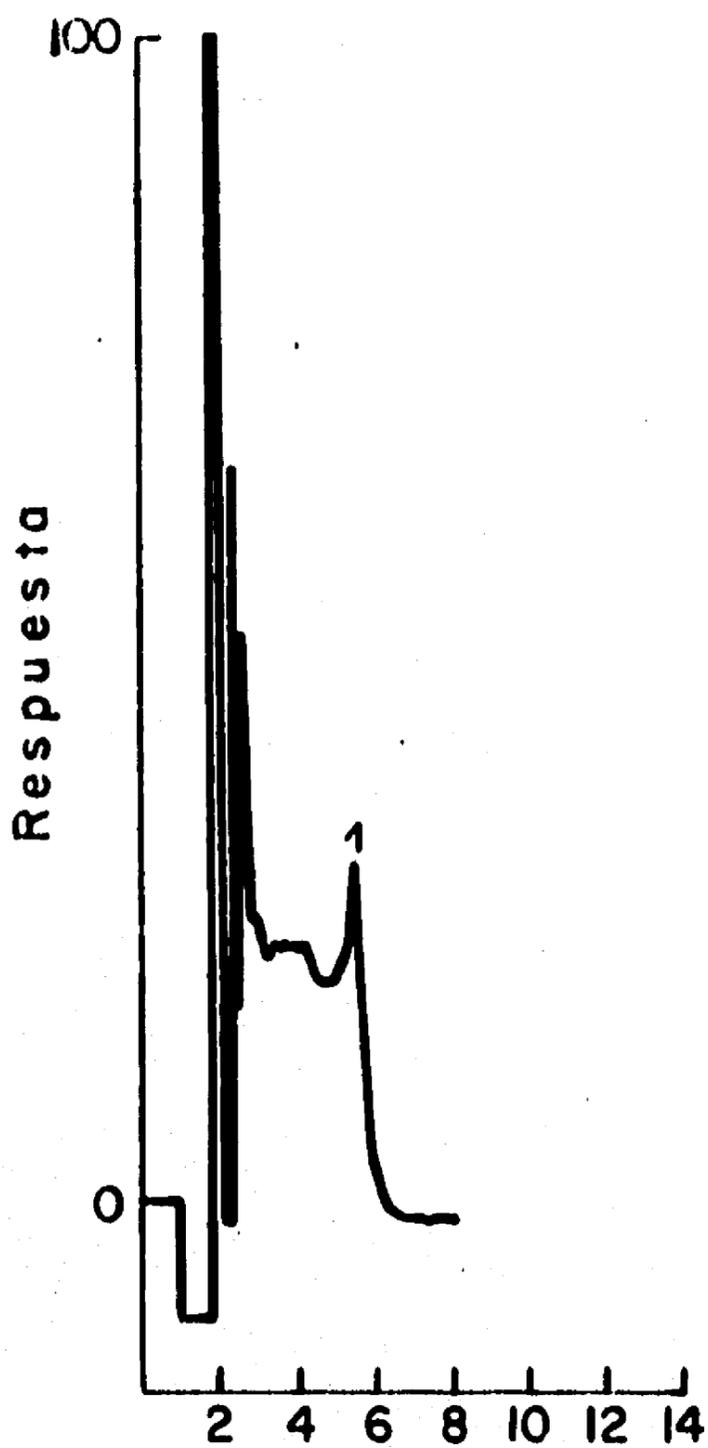
TABLA XIV

ESPECTRO DE ABSORCION DE LOS PRODUCTOS DE LA
REACCION ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO

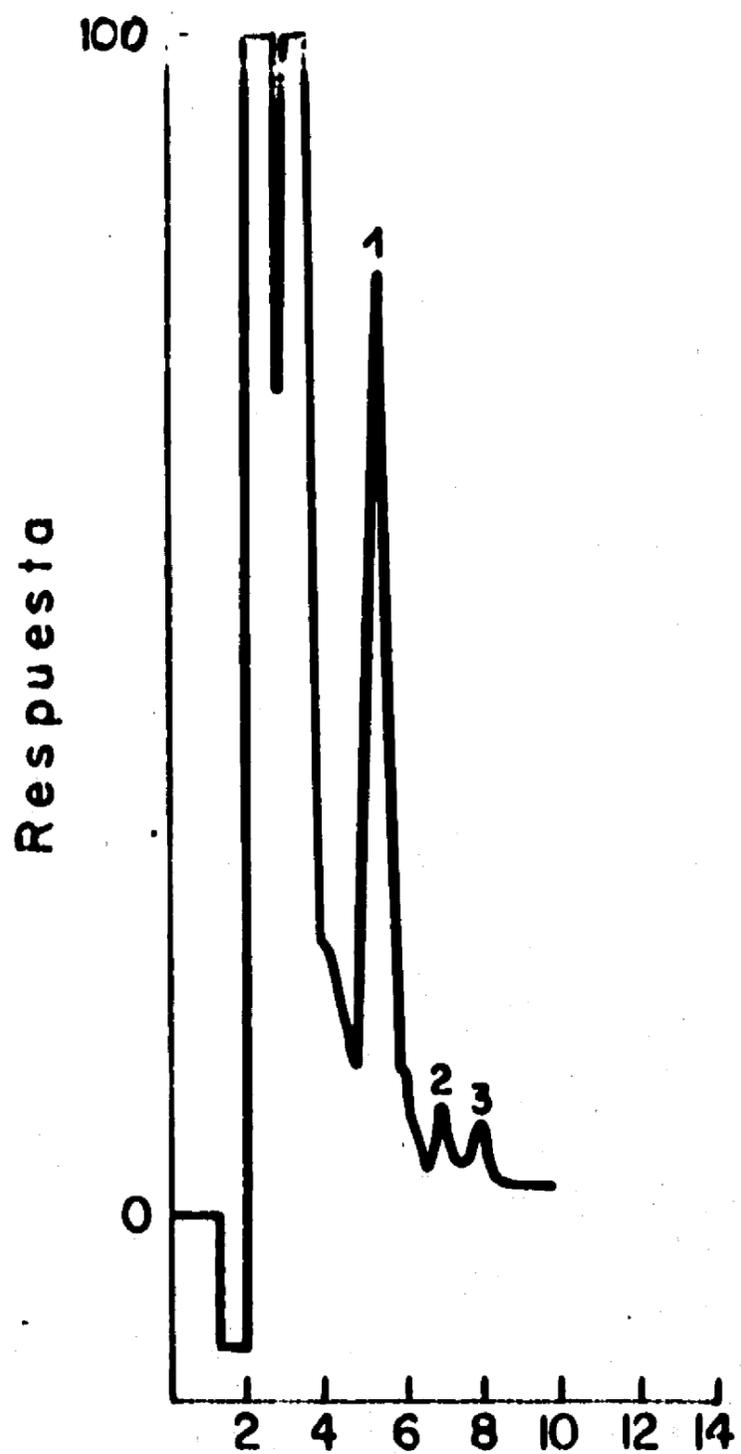
COMPUESTO	PICOS MAXIMOS DE ABSORCION EN EL ESPECTOR ULTRAVIOLETA		
NaNO_2	225 nm		
MEBENDAZOL	240 nm	275 nm	
MEBENDAZOL - NITRITO DE SODIO	225 nm	275 nm	345 nm

FIGURA 21

**CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION (HPLC) DEL PRODUCTO DE
LA REACCION IN VITRO ENTRE EL MEBENDAZOL Y EL NITRITO DE SODIO**



Tiempo (min.)



Tiempo (min.)

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS: SISTEMA DE BOMBAS 520 DE WATERS, COLUMNA SPHERESOSLO 005-2 (250x4.6MM, 5UM), FASE MOVIL: (ACETONITRILLO 15%; METANOL 10%; H₂O 65%); FLUJO 1.5ML /MIN. DETECTOR DE FOTOCONDUCTIVIDAD MODELO 965 DE TRACOR (254NMHG), SENSIBILIDAD 100x5; VOLUMEN DE INYECCION 25UL. IDENTIFICACIÓN DE PICOS: (1) NL TRITO DE SODIO; (2) Y (3) COMPUESTOS N-NITROSADOS.

V. DISCUSION

FORMACION DE COMPUESTOS N-NITROSO DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS

Los resultados que se presentan en este trabajo indican que los medicamentos antiparasitarios con grupos amino secundarios y terciarios alifáticos como la cloroquina, o aquellos que tienen grupos amino secundarios heterocíclicos como piperazina y dehidroemetina, o tanto grupos amido secundarios alifáticos como grupos amino secundarios heterocíclicos como el mebendazol o derivados pirimidínicos como el pamoato de pirantel, reaccionan en presencia de un exceso de nitrito de sodio a pH ácido y 37°C. Estos datos están de acuerdo con reportes anteriores en que se describe que los compuestos con grupos amino secundarios y terciarios reaccionan con nitrito de sodio cuando éste se encuentra en una concentración igual al cuadrado de la concentración molar de la amina, a bajo pH y temperatura de 37°C. Consecuentemente, este grupo de compuestos que pueden reaccionar bajo estas condiciones con nitrito de sodio, constituyen una fuente de precursores de nitrosaminas y nitrosamidas (Lijinsky 1974, Lijinsky y Singel 1975, Mirvish 1975).

En este estudio no se pudo detectar la formación de compuestos N-nitroso, ni la actividad mutagénica en la mezcla de reacción

de nitrito de sodio e hidroxinaftoato de bifenio, un compuesto que es químicamente una sal cuaternaria de amonio. Fiddler et al. (1972) reportaron la formación de compuestos N-nitroso a partir de sales cuaternarias de amonio. Sin embargo para obtener dichos compuestos estos autores emplearon una temperatura de 78°C en condiciones de reflujo. En este caso, empleando condiciones fisiológicas no fué posible detectar la formación de compuestos N-nitroso derivados de una sal cuaternaria de amonio.

Aunque se ha descrito que las aminas terciarias heterocíclicas y enaminas terciarias reaccionan con nitrito de sodio (Lijinsky y Singer 1979), en este trabajo no fué posible detectar la formación de un derivado N-nitroso de un compuesto halogenado, derivado de amina terciaria como la iodoclorohidroxiquinoleina en las condiciones empleadas. En el caso de las quinolinas no sustituidas los compuestos N-N=O pueden formarse aunque son muy inestables y dan lugar esencialmente a compuestos C-NO. En el caso de los derivados halogenados de las quinoleinas el agente nitrosante reacciona preferentemente con los sustituyentes halogenos posiblemente mediante un mecanismo de ataque nucleofílico (Acherson, 1967).

ACTIVIDAD MUTAGENICA DE LOS PRODUCTOS DE REACCION ENTRE EL NITRITO DE SODIO Y MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS.

Ninguno de los compuestos estudiados produjeron mutaciones por substitución de bases en Salmonella typhimurium TA1535 por si solos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en un estudio de la valoración de la actividad mutagénica de medicamentos antiparasitarios (Cortinas de Nava et al. 1983). No obstante, un exceso de nitrito de sodio en los blancos de reacción y en las mezclas puede producir mutaciones por substitución de bases. Razón por la cual se tuvo cuidado de eliminar el exceso de nitrito de sodio libre mediante un lavado adicional con extracciones de agua y cloruro de metileno.

Anteriormente ha sido descrita la actividad mutagénica de la 1-4 dinitroso piperazina en cepas de Salmonella typhimurium capaces de detectar mutaciones por substitución de bases, presentando este producto solo una leve respuesta positiva a concentraciones más altas, la cual se incrementó al tratarse el compuesto con homogenado de hígado de rata o hamster (Zeiger y Sheldon 1978). Los resultados presentados en el presente estudio muestran que el comportamiento del producto de la reacción entre nitrito de sodio y la piperazina en Salmonella typhimurium TA1535 es muy semejante al referido con la 1-4-dinitroso-piperazina en la misma cepa.

La dehidroemetina y la cloroquina (difosfato) solo inducen mutaciones en las cepas TA1537 y TA98, lo cual sugiere que estos medicamentos son capaces de inducir mutaciones por corrimiento de bases per se. La dehidroemetina requiere de la transformación metabólica para ser mutagénica, mientras que la cloroquina se comporta como un mutágeno directo. La cloroquina (difosfato) y dehidroemetina, se ha observado que pueden además inducir efectos genotóxicos en el ensayo de Escherichia coli polA-/pol A+ (Cortinas de Nava et al. 1983, Espinosa Aguirre et al. 1987). Por otro lado se ha demostrado que estos medicamentos son capaces de inducir aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos expuestos in vitro (Ostrosky-Wegman et al. 1984). En este trabajo se presentan evidencias de que estos compuestos por contener grupos amino secundarios pueden producir con nitrito de sodio compuestos N-nitroso del tipo de las nitrosaminas, ya que son capaces de inducir mutaciones por sustitución de bases en Salmonella typhimurium después de ser transformados metabólicamente, siendo este comportamiento muy similar a lo que se ha reportado con diferentes tipos de nitrosaminas (Rao et al. 1977, 1978, 1979, Zeiger y Sheldon 1978a, 1978b).

La actividad mutagénica del mebendazol se presenta en ausencia o presencia del homogenado de hígado de rata, aunque su efecto fue más evidente después de la activación metabólica. Esta respuesta puede ser posiblemente el resultado de la reacción tanto del nitrógeno secundario heterocíclico como del grupo amido secun

dario alifático de su molécula dando lugar a la formación de una nitrosamida que puede ser activa sin homogenado hepático. No obstante, en vista de que las reacciones de nitrosación se efectuaron a pH mayor a 3.0, el rendimiento de la formación de nitrosamida es posible que sea menor al de nitrosamina, ya que según se ha informado (Kubaka et al. 1980), las nitrosamidas se forman preferentemente a pH menor de 3.0. Este efecto se ve además reflejado en el hecho de que el producto de nitrosación del mebendazol es evidentemente más activo después de haber sido transformado metabólicamente debido posiblemente a la formación de una nitrosamina. Estos datos están de acuerdo también con los antecedentes que indican que las aminas secundarias heterocíclicas reaccionan más fácilmente que las amidas secundarias alifáticas (Mirvish 1975).

La respuesta del pamoato de pirantel en presencia o ausencia de la activación metabólica es difícil de explicar aunque puede ser probablemente debida a la formación de un compuesto similar al grupo de las nitrosamidas formado por la ruptura del doble enlace y formación de un grupo carbonilo adyacente al nitrógeno terciario heterocíclico del anillo de piperidina.

En este estudio no se pudo detectar actividad mutagénica en Salmonella typhimurium Ta1535 en el mezcla de reacción entre el nitrito de sodio y el hidroxinaftoato de bafenio. Tutikawa et al. (1978) describieron la formación de un compuesto genotóxico

en el ensayo de Bacillus subtilis recA+/recA- derivado de la reacción de nitrito de sodio e hidroxinaftoato de bifenio. Sin embargo, al no reportarse las condiciones de reacción empleadas en ese trabajo no es posible hacer comparaciones con los datos encontrados en el presente.

La iodoclorohidroxiquinoleína no indujo mutaciones ni corrimiento de bases en Salmonella typhimurium TA1537, TA98 y TA1538, ni por substitución de bases en las cepas TA1535 y TA100. (Cortinas de Nava et al 1983), pero presentó un efecto letal en Escherichia coli pol A+ en lugar de Escherichia coli pol A- (Espinosa Aguirre et al. 1987). En este estudio, aunque como ya se ha mencionado no se detectó la formación de compuestos N-nitroso y la mezcla de reacción fué muy tóxica para la cepa de Salmonella typhimurium TA1535.

Los compuestos N-nitroso son bien conocidos por inducir mutaciones por substitución de bases debidas esencialmente a la alquilación del oxígeno en posición 6 de la guanina. (Abbot y Safhil 1979). La cepa de Salmonella typhimurium TA1535 ha sido muy útil para realizar un tamizado de actividad mutagénica de diferentes grupos de nitrosaminas (Andew y Kijinsky, Keerplan et al. 1983, Rao et al. 1977, 1978, 1979). Por otro lado en muy raras ocasiones se ha reportado que los compuestos N-nitroso pueden inducir mutaciones por corrimiento de bases (Rao et al. 1977, Murphay y Corb 1983). En el presente trabajo el uso de

Salmonella typhimurium TA1535 ha sido muy útil para detectar cuales de los medicamentos antiparasitarios de mayor uso en México pueden ser fácilmente precursores para la formación de compuestos mutagénicos N-nitroso.

FORMACION DE COMPUESTOS MUTAGENICOS DERIVADOS DE MEDICAMENTOS
ANTIPARASITARIOS Y NITRITO DE SODIO IN VIVO

La administración oral de nitrito de sodio junto con medicamentos que son sales cuaternarias de amonio (hidroxinaftoato de bafenio) o derivados halogenados de aminas terciarias (iodoclorohidroxiquinoleina), no incrementó la excreción urinaria de mutágenos en ratones. Estos datos presentan evidencias de que dichos medicamentos no constituyen una fuente importante de precursores de la formación endógena de derivados N-nitroso. Los hallazgos reportados aquí en estudios realizados in vivo correlacionan con los datos obtenidos en el estudio sobre la nitrosación de medicamentos aminados in vitro (Arriaga Alba et al. 1987).

La excreción urinaria de mutágenos en el caso de los animales tratados con nitrito de sodio y dehidroemetina o pamoato de pirantel por vía oral, no es estadísticamente significativa cuando se comparan estos resultados con los grupos tratados con nitrito de sodio o el medicamento solo, siendo solamente significativos cuando se comparan con el grupo de animales control. Se observa además que los productos mutagénicos formados no se acumulan, al no incrementarse su actividad mutagénica después de varios tratamientos consecutivos. Estos resultados pueden ser indicativos de que si bien estos compuestos pueden reaccionar in vivo con nitrito de sodio, el

rendimiento de la reacción puede ser muy bajo, o la actividad mutagénica de los compuestos es muy leve, o posiblemente el producto se absorbe muy poco. En lo que se refiere al pamoato de pirantel se sabe que solo una parte de éste es absorbido reteniéndose el resto en heces, razón por la cual la reacción de nitrosación in vivo de este compuesto deberá ser mejor evaluada en relación a su influencia como un precursor de compuestos mutagénicos y carcinogénicos N-nitroso en el cáncer de colon. Aunque, por otro lado, es de considerarse que en la práctica terapéutica este compuesto solo se administra en una dosis única de un solo día. En lo que concierne a la dehidroemetina, al ser administrada usualmente por vía parenteral, se excluye el riesgo de formación de compuestos N-nitroso derivados de la misma, ya que esta reacción solo se lleva a cabo en el medio ácido del estómago.

La administración simultánea de piperazina junto con nitrito de sodio ha sido muy bien estudiada. Schneider et al. (1977) indujeron cáncer en ratas tratadas con estos compuestos. Por otro lado se demostró que al tratar ratones hembras preñadas con 1-4-dinitroso-piperazina se incrementó posteriormente la frecuencia de tumores en las crías de dichos animales al llegar éstas a la edad adulta (Borsonyi et al. 1980). Los datos del presente trabajo muestran evidencias de que la piperazina reacciona in vivo con el nitrito de sodio, formándose un compuesto mutagénico que puede ser retenido en el organismo.

excretándolo después en forma de un derivado glucoronido. La detección de mutágenos en la orina de ratones tratados con piperazina y nitrito de sodio que se presenta en este trabajo, puede ser un dato indicativo de que los organismos estuvieron expuestos a los derivados nitrosados carcinogénicos de la piperazina.

La cloroquina per se se ha demostrado que es un medicamento que se acumula por tiempo prolongado en el organismo, reteniéndose los niveles plasmáticos terapéuticos por más de 135 horas después de haber suspendido el tratamiento (Adelusi et al. 1981). El consumo de este compuesto se ha visto asociado con la aparición de anemia aplásica y leucemia en pacientes tratados durante periodos prolongados a causa del Lupus eritematoso. Por otro lado se ha demostrado que la cloroquina tiene una acción sinérgica coteratogénica con los rayos X (Yielding et al. 1976) y se ha visto que produce alteraciones auditivas y tumores en hijos de madres tratadas durante la gestación (Matz y Nauton 1968). En el presente estudio se muestran evidencias de que la cloroquina administrada tanto a una dosis cercana a la DL (55 mg/kg), como a una dosis semejante a la dosis terapéutica para el humano (10 mg/kg) junto con nitrito de sodio, genera en el organismo un compuesto mutagénico que al igual que la cloroquina per se se acumula en el organismo, siendo excretado en orina conjugado con ácido glucurónico. En este estudio se muestran por otro lado, evidencias de que para que se lleve a cabo la

reacción in vivo entre la cloroquina y el nitrito de sodio, este último debe ser ingerido en un lapso no mayor de quince minutos después del medicamento. Esto es consecuencia de que la cloroquina es absorbida muy rápidamente en el estómago (Adelusi et al. 1981) y la reacción de nitrosación ya no podrá llevarse a cabo por no estar los dos compuestos presentes en el mismo momento en el contenido del jugo gástrico.

El mebendazol por sí solo no presenta ningún efecto secundario en los pacientes que lo ingieren (Keyston y Murdoch 1979). Tampoco se ha reportado que sea capaz de inducir mutaciones en cepas de Salmonella typhimurium ni daño genotóxico en cepas de Escherichia coli Pol A+/ PolA- (Cortinas de Nava et al 1983 Espinosa Aguirre et al. 1987). Sin embargo, se ha descrito que el mebendazol produce alteraciones mitóticas (Styles 1973), y su uso se ha desaconsejado durante el primer trimestre del embarazo ya que además hay evidencias de que este compuesto puede ser teratógeno en ratas (De la Tour 1976).

En este trabajo se muestran evidencias de que al administrar por vía oral nitrito de sodio junto con mebendazol tanto a una dosis cercana a la DL (35 mg/kg) para el ratón, como a una dosis similar a la dosis terapéutica para el humano (3.5 mg/Kg) (en el tratamiento contra áscaris) se forman en el estómago compuestos mutagénicos para animales de ambos sexos. Este compuesto mutagénico es absorbido, metabolizado y se excreta en forma de

un derivado glucurónico sin que ocurra una acumulación importante del metabolito mutagénico, siendo éste completamente eliminado después de 48 horas de haber suspendido el tratamiento. Esta respuesta del derivado mutagénico del mebendazol y el nitrito de sodio es muy similar al comportamiento farmacocinético del compuesto original. en efecto, se ha reportado que el 50% de la dosis del compuesto administrada por vía oral es eliminada por orina después de 24 horas (Dawston et al. 1984).

Para que se lleve a cabo la reacción entre el mebendazol y el nitrito de sodio, al igual que en el caso de la cloroquina, es necesario que ambos reactivos se encuentren simultáneamente en el estómago. Así, si el nitrito de sodio se ingiere quince minutos antes de la amina, sólo aparece una pequeña parte de la respuesta mutagénica porque este compuesto es rápidamente eliminado de la cavidad del estómago (Linitas et al. 1982). En el caso del mebendazol que es un compuesto muy poco soluble, se retiene un poco más en el estómago y se absorbe más lentamente (Dawston y Watson 1985), por lo cual al administrarse el nitrito de sodio posteriormente, aún se recupera el 100% de la actividad mutagénica observada si los dos compuestos se administran simultáneamente. Sin embargo, al ingerirse el nitrito de sodio treinta minutos después que el compuesto aminado ya no podrán formarse ningún derivado mutagénico.

El mebendazol es el medicamento de elección en casos de ascaris y helmitiasis múltiples (Barrowan et al. 1984, Keyston et al. 1979). Además recientemente se ha empleado en forma prolongada y elevada por su eficiencia en casos de cirrosis (Diaz de León et al. 1980) y en pacientes con problemas autoinmunes debido a sus propiedades inmunoregulatorias (Miller 1980), por lo cual su uso se ha extendido en una gran parte de la población. En vista de estas razones y de las evidencias de que la presencia en la molécula de este fármaco de grupos amino y amido secundarios hacen que sea un precursor de la formación de compuestos N-nitroso mutagénicos, se ha seleccionado este compuesto para realizar estudios orientados a plantear alternativas para la evaluación y prevención del riesgo biológico de la formación in vivo de compuestos mutagénicos derivados de nitrito de sodio y medicamentos aminados.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRITO EN LAS REACCIONES IN VIVO
CON MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS.

Se conoce que la cinética de reacción de nitrosación in vivo está determinada por la concentración de la amina, multiplicada por la concentración del nitrito a la segunda potencia. En efecto en un estudio cuantitativo se demostró que la frecuencia de adenomas pulmonares inducidos en ratones por el tratamiento con piperazina y nitrito de sodio disminuía al disminuir la cantidad de nitrito de sodio disponible en el estómago en presencia de la amina (Greenblat y Mirvish 1973, Mirvish 1975). Los datos presentados en este trabajo muestran que efectivamente, la cantidad de compuestos mutagénicos y carcinogénicos que son excretados en la orina, es directamente proporcional a la dosis de nitrito de sodio ingerido tanto en el caso de la piperazina como en el de la cloroquina (base) y del mebendazol.

EFEECTO DEL SISTEMA DE REPARACION POR ESCISION SOBRE MUTACIONES INDUCIDAS POR LOS COMPUESTOS N-NITROSO DERIVADOS DE MEDICAMENTOS ANTIPARASITARIOS AMINADOS.

La reacción *in vivo* entre el nitrito de sodio y la piperazina produce un compuesto mutagénico que es capaz de inducir cáncer en los animales de laboratorio, sin embargo, se ha demostrado que la capacidad carcinogénica de este compuesto no es muy potente (Schneider et al. 1977). Por otro lado, se ha discutido que la capacidad de un compuesto para ser carcinogénico está muy relacionada con la capacidad de un organismo para reparar el daño al ADN producido por dicho compuesto (Trosco y Chang 1984).

En nuestro laboratorio se han presentado evidencias de que el producto de la reacción catalítica ácida entre la piperazina y el nitrito de sodio induce mutaciones en la cepa de Salmonella typhimurium TA1535 UvrB- que pueden ser corregidas si el sistema de reparación por escisión funciona correctamente como en la cepa de Salmonella typhimurium TA1975 UvrB+, observándose que se requieren dosis diez veces mayores para inducir mutaciones en esta última cepa. Por otro lado, en el caso de los derivados nitrosados del mebendazol se observa que son mutagénicos en las dos cepas de Salmonella typhimurium hisG46 tanto Uvr- como Uvr+, sin embargo en las cepas con un sistema de reparación por escisión íntegro se corrigen mutaciones letales inducidas por

este compuesto observándose una frecuencia de mutación menor que en el caso de las cepas que no son capaces de reparar el daño correctamente.

Por consiguiente, en este trabajo se presentan evidencias de que el buen funcionamiento del sistema de reparación por escisión constituye un mecanismo de defensa que presenta la célula para poder reducir el daño genotóxico por la actividad mutagénica de los compuestos N-nitroso. En trabajos anteriores se ha señalado que el grupo de fármacos citotóxicos y antitumorales cuyo daño puede ser reparado por la célula, empleando el sistema de cepas Salmonella typhimurium UvrB-/UvrB+, en una forma dependiente de la dosis podrían representar un riesgo menor para la salud que aquellos cuyo daño aún a dosis bajas no puede ser corregido por el sistema de reparación por escisión exento de errores (Imman et al. 1983, Matney et al. 1985).

EFFECTO DE LA VITAMINA C EN LA REACCION DE NITROSACION DEL
MEBENDAZOL.

La reacción de nitrosación entre el nitrito de sodio y diferentes compuestos aminados puede ser inhibida por el efecto de varios componentes de la dieta, especialmente los que se encuentran en los vegetales. Uno de estos componentes que ha mostrado ser más eficaz para disminuir el efecto mutagénico inducido por la formación endógena de compuestos N-nitroso es sin duda la vitamina C (Barale et al. 1983), además de ser capaz de disminuir la formación de tumores en animales tratados con aminos y nitrito de sodio (Mirvish 1986). En este trabajo se muestra que la reacción de nitrosación *in vitro* del mebendazol puede ser inhibida en más de un 80% cuando la vitamina C está en una relación molar de 1:1 respecto al nitrito de sodio y la inhibición es completa si la relación molar se incrementa a 1:2 de nitrito:vitamina C. Estos datos son muy semejantes a lo que se ha reportado anteriormente para la inhibición de la reacción de nitrosación de medicamentos antiparasitarios con grupos amino secundarios heterocíclicos como es el caso de la piperazina (Mirvish 1972).

La administración por vía oral de la vitamina C en la concentración óptima para inhibir la reacción de nitrosación *in vitro* del mebendazol, no logró reducir completamente la excreción urinaria de mutágenos en los ratones tratados con este

medicamento y nitrito de sodio, lo que si ocurrió cuando se administró una concentración dos veces mayor.

Los resultados obtenidos en este trabajo para lograr la eliminación completa de la excreción de mutágenos derivados de la reacción entre el mebendazol y el nitrito de sodio en el estómago del ratón, son similares a lo que se han reportado en otros estudios en donde las dosis óptimas requeridas para inhibir la reacción de dietilamina en perro y prolina en el humano, con nitrito y nitrato, fueron tres y diez veces mayores de las requeridas para inhibir la reacción de nitrosación *in vitro* (Linitas et al. 1983, Leaf et al. 1987). Lo que indica que la reacción *in vivo* está determinada por varios factores como son la presencia simultánea del nitrito de sodio y la vitamina C. En efecto, en este estudio se muestran datos que sugieren que la reacción de nitrosación del mebendazol sólo es inhibida cuando los reactivos nitrito de sodio y ascorbato de sodio se encuentran presentes en concentraciones suficientes y en el mismo momento, que en este caso, no debe exceder de quince minutos después de haberse ingerido los precursores del producto mutagénico.

CARACTERIZACION DE COMPUESTOS MUTAGENICOS N-NITROSO DERIVADOS DEL MEBENDAZOL

Los derivados mutagénicos de piperazina, mebendazol, cloroquina y pamoato de pirantel obtenidos en este trabajo pudieron ser detectados mediante la reacción colorimétrica de Lieberman. Sin embargo, este método colorimétrico puede presentar interferencias con dobles enlaces u otros grupos cromóforos así como exceso de iones nitrito libres en el medio, por lo cual no es eficiente para hacer una cuantificación apropiada de los compuestos mutagénicos. Mediante este método colorimétrico, no fue posible detectar la presencia de enlaces (-N-N=O) en las mezclas en que no se obtuvo una respuesta mutagénica como las provenientes del producto de reacción entre el nitrito de sodio y el hidroxinaftoato de bifenio o la iodoclorohidroxiquinoleina, lo cual indica que no se formaron compuestos nitrosados.

Otra alternativa para identificar la formación de enlaces N-N=O la constituye el análisis espectrofotométrico en el espectro ultravioleta. Aunque este método no es muy exacto y los picos máximos de absorción pueden estar influenciados por el disolvente en que se encuentre la muestra (Mirvish 1975). En este trabajo se encontró que el producto de reacción entre el mebendazol y nitrito de sodio presentó los picos máximos de absorción a 225 y 345 correspondientes a los enlaces (-N-N) y (-N=O) en medio acuoso respectivamente, (Kukaba et al. 1984) y el pico

de absorción a 275 nm que corresponde posiblemente al grupo imidazol (Dawston y Watson 1985).

Por último, el método de cromatografía de líquidos a alta presión HPLC se ha normalizado para la detección de numerosas nitrosaminas volátiles de bajo peso molecular como la dietilnitrosamina, dimetilnitrosamina, nitrosomorfolina y nitrosoprolina. Este método presenta la ventaja de que se pueden separar el compuesto para su posterior análisis químico y es factible su cuantificación en el caso de contar con un estándar conocido.

Adaptando un detector específico de fotoconductividad a un sistema de líquidos a alta presión, en este trabajo fue posible realizar un análisis preliminar del producto mutagénico de nitrosación del mebendazol (Butter y MacKinney 1984, Popovich et al. 1979). Se detectó que el producto mutagénico del mebendazol presenta en este sistema dos picos con tiempos relativos de retención de 6.5 y 8.0 minutos que no se presentan en los precursores del compuesto. El nitrito de sodio en este estudio pudo ser detectado con un pico de absorción a los 5.9 minutos, mientras que el mebendazol no dió ninguna señal con este detector. No obstante, la cuantificación de estos compuestos no se pudo efectuar al no contrarse con un estándar químicamente puro del compuesto mutagénico desconocido. Con los datos presentados en este trabajo solamente se plantean las bases

para poder realizar posteriormente la caracterización del compuesto mutagénico y para detectar más adelante poblaciones expuestas a la formación de derivados N-nitroso de medicamentos antiparasitarios.

VI. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se presentan evidencias de que los medicamentos antiparasitarios con grupos: a) amino secundarios heterocíclicos (piperazina, dehidroemertina y mebendazol), b) amino secundarios alifáticos (cloroquina, mebendazol), c) amino terciarios heterocíclicos (cloroquina, mebendazol), d) amido secundarios alifáticos (mebendazol), e) derivados pirimidínicos (pamoato de pirantel), pueden reaccionar a temperatura fisiológica y pH bajo produciendo compuestos mutagénicos capaces de inducir mutaciones por substitución de bases, que son probablemente compuestos N-nitroso.
2. Se detectó que los medicamentos antiparasitarios que reaccionan in vitro producen también in vivo la formación de compuestos mutagénicos capaces de inducir mutaciones por substitución de bases. Siendo en este caso, más significativa la respuesta obtenida con piperazina, cloroquina y mebendazol.
3. Se identificó que el mecanismo de reparación por escisión, descrito en células humanas, puede ser capaz de corregir los daños al ADN que se hayan inducido por compuestos mutagénicos y carcinogénicos producidos en la

reacción entre el nitrito de sodio y medicamentos aminados, especialmente si la exposición a dichos compuestos no es muy elevada.

4. Se observó que la formación de compuestos mutagénicos derivados de medicamentos antiparasitarios aminados *in vivo* depende de la concentración de nitrito ingerida, y del hecho de que ambos precursores se encuentren presentes simultáneamente en el estómago. Por lo cual la disminución del contenido de nitritos en la dieta y la ingestión de un medicamento aminado treinta minutos antes o después de consumir alimentos ricos en nitritos y nitratos proveen una alternativa para reducir el riesgo de la formación de compuestos mutagénicos N-nitroso derivados de medicamentos antiparasitarios aminados.
5. Se presentan evidencias, adicionales a las ya existentes, de que el consumo de una dieta con alto contenido de vitamina C es una alternativa práctica para reducir la formación de compuestos N-nitroso derivados de medicamentos aminados, en caso de que éstos sean ingeridos con alimentos ricos en nitritos y nitratos. Aunque queda por determinar si la vitamina C no interfiere con la actividad farmacológica de los medicamentos antiparasitarios estudiados.
6. Se establecen las bases preliminares para la detección de

compuestos mutagénicos N-nitroso derivados de la reacción entre el nitrito de sodio y el mebendazol, un fármaco antihelmíntico frecuentemente usado en países en vías de desarrollo.

APENDICE 1.

MEDIOS DE CULTIVO

CALDO NUTRITIVO OXOID.*

Disolver 2.5 g de medio en 100 ml de agua destilada.
Esterilizar en autoclave a 121 °C/20 minutos.

CALDO NUTRITIVO DIFCO.

Disolver 0.8g de medio en 100 ml de agua destilada.
Esterilizar en autoclave a 121 °C/20 minutos.

CALDO NUTRITIVO DIFCO

Disolver 8g de caldo nutritivo difco en una suspensión que contenga 15 g de bacto agar en 1000 ml de agua.
Esterilizar en autoclave a 121 °C/20 minutos. Vertir después en placas de petri.

* Los cultivos de cepas de Salmonella typhimurium de Ames, para pruebas de mutagénesis deben incubarse en caldo oxoid ya que otros caldos pueden contener mutagéneos derivados del producto de pirrolisis de aminoácidos. (Maron y Ames, 1983)

AGAR SUAVE DE SUPERFICIE

NaCl 0.5g.

Bactp Agar 0.6 g

10 ml de solución de histidina-biotina-requerimientos
minimos

Agua destilada c.b.p. 100 ml.

Esterilizar en autoclave a 121° C/20 minutos

vertir en tubos con 2 ml c/u.

MEDIO MINIMO DE VOGEL DONER

Solución a) Glucosa 10 g en 100 ml de agua
destilada.

Solución b) Bacto agar 7.5 g en 300 ml de agua
destilada.

Solución c) 90 ml de agua destilada

Esterilizar los tres soluciones por separado, a 121° C/20
minutos.

Mezclar asépticamente las tres soluciones estériles y vertir
en cajas petri.

SOLUCION DE SALES DE VOGEL BONER

Mezclar en 600 ml de agua destilada:

-Mg(OH) ₂ · 7H ₂ O	10g
-Acido Citrico	100g
-K ₂ HPO ₄ (anhidro)	500g
- NaNH ₄ HPO ₄ · 4H ₂ O	17g

Aforar la solución a 1000 ml, y esterilizar con cloroformo al 0.1%.

SOLUCION DE HISTIDINA BIOTINA (Requerimientos mínimos)

Histidino	0.007 g
Biotina	0.012 g
Agua destilada	100 ml

APENDICE 2

VALORACION DE MOLES $-N=N=O$
 Metil-Nitroso-guanadina
 (Método de Lieberman)

SOLUCION MADRE 0.01 g/4 ml MNNG

Nl de la Solución Madre	H ₂ O	g/ml	Moles $-N=N=O$ /ml	D.O. a 590 nm
1.00	0.	0.0025	2.38×10	1.98
0.80	0.2	0.0020	1.90×10	1.95
0.60	0.4	0.0015	1.4×10	1.50
0.30	0.7	0.00075	0.74×10	0.75
0.10	0.9	0.00023	0.238×10	0.22
0.05	0.95	0.000125	0.19×10	

-2 ml de fenol 2N

-1 ml de solución madre-

-Estratificar con mucho cuidado 1 ml de H_2SO_4 q.p.
 tapar el tubo, agitar con vortex, dejar reposar 10 minutos.

-Tomar las lecturas de D.O. a 590 nm.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1 ABBOT, P. J. y SAFFHILL, R. 1979.
DNA Synthesis with Methylated-Methylated Poly (dC-dG)
Templates. Evidence for a Competitive Nature to Miscoding
by O⁶-Methylguanine.
Biochimica et Biophysica. Acta. 562: 51 - 61.
- 2 ACHERSON, R. M. 1967
Heterocyclic Analogous of Naphtalin with One Heteroatom.
In Acherson, R. M. An Introduction to the Chemistry of
Heterocyclic Compounds.
Willey International Edition. 2^a Ed: 547 - 565.
- 3 ADELUSI, S. A., SAWODU, A. W. y SCKOLO, L. A. 1982.
Kinetics of Up-take and Elimination of Chloroquin in
Children with Malaria.
Br. J. Clin. Pharmacol. 14: 483 - 387.
- 4 ALEKPEROV, V. 1981.
Antimutagens and the Problem of Controlling the Action of
Environmental Mutagens. In Sugimura, T., Kindo, S y
Takeda, H. Environmental Mutagens and Carcinogens.
University of Tokyo Press. 361 - 368.
- 5 ALVARES, D., BICKERS, R. y KAPPAS, A. 1973.
Polichorinated Biophenyls: A New Type of Inducer of
Cytochrome.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (5): 1321 - 1325.
- 6 AMES, B. M., 1983.
Dietary Carcinogens and Anticarcinogens.
Science. 221: 1256 - 1263.
- 7 AMES, B. N., LEE, F. D. y DURSTON, W. E. 1973.
An Improved Bacterial Test System for the Detection and
Classification of Mutagens and Carcinogens.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (3): 782 - 786.
- 8 ANDERSON, D., BLOWERS, S. D. y CRADDOK, V. M. 1985.
The Effects of S9 Mix from Rat Esophagus Gland and Liver
on the Mutagenicity of the N-Methylaniline in Salmonella
typhimurium Assay.
Mutation Res. 142: 13 - 18.
- 9 ANDERSON, D., GREEN, M. H. L., MATTEN, I. E. y GUDLEY,
M. J. 1984.
An International Collaborative Study of "Genetic Drift"
in Salmonella typhimurium Strains Used in the Ames Test.
Mutation Res. 130: 1 - 10.

- 10 ANDERSEN, P. H. y JENSEN, N. J. 1984.
Mutagenic Investigation of Cadmium in Salmonella typhimurium and its synergism with two Nitrosamines.
Genetic Toxicology Testing. 138 (1) : 9.
- 11 ANDREWS, A. W. y LIJINSKY, W. 1980.
The Mutagenicity of 45 Nitrosamines in Salmonella typhimurium.
Tetragen. Carcinogen. Mutag. 1 : 295 - 303.
- 12 ANDREWS, A. W., THIBAUT, L. H. y LIJINSKY, W. 1978.
The Relationship Between Mutagenicity and Carcinogenicity of Some Nitrosamines.
Mutation Res. 51. 319 - 326.
- 13 ANDREWS, A.W., LIJINSKY, W. y SNYDER, S. W. 1984.
Mutagenicity of Amine Drugs and Their Products of Nitrosation.
Mutation. Res. 135 : 105 - 108.
- 14 ARAKI, A., MURAMATSU, M. y MATSHUSHIMA, T. 1984.
Comparison of the Mutagenicities of N-nitrosamines on Salmonella typhimurium TA100 and Escherichia coli WP2/PKM101 Using Rats and Hamster liver S9.
GANN 75 : 8 - 16.
- 15 ARRIAGA ALBA, M., ESPINOSA AGUIRRE, J. J. y CURTINAS DE NAVA, C. 1987.
Mutagenicidad de Compuestos N-nitroso Derivados de la Interacción entre Nitritos y Compuestos Aminados.
Tec. Aliment. (Mex.). 22 (2) 11 - 16.
- 16 ASHBY, J. y Tennant, W. 1988
Chemical Structure, Salmonella Mutagenicity as indicators of Genotoxic Carcinogenesis Among 22 Chemicals Tested in Rodents by the U.S. NCI/NTP.
Mutation Research. 204 (1), 17 - 15.
- 17 BAIRD, W. B. y BIRBAUN. 1979
Inhibition of 2-Fluorenamine-Induced Mutagenesis in Salmonella typhimurium by Vitamin A.
J. Nat. Cancer. Inst. 63 (4) : 1093 1096.
- 18 BAKER, R. S., DANTON HILL, U., BONIN, A. M., AURLASKAS, A., BRAITHWAITE, C., WOOTTON, M. y STEWART TRUSWELL, A. 1986.
Urine Mutagenicity as an Indicator of Exposure to Dietary Mutagens Formed in Cooking of Foods.
Environm. Healthl. Perspectives. 67 : 147 - 152.
- 19 BARALE, R., SOZI, G., TONIOLO, P., BORHGY, O., REALI, D., LOPIRENO, N., y DELLA PORTA, A. 1985.
Sister Chromatid Exchange in Lymphocytes and Mutagenicity in Urine of Nurses Handling Cytostatic Drugs.
Mutation. Res. 157 : 235 - 240.

- 20 BARALE, R., ZUCCONI, D., BERTANI, R., y LUPIRENU, N. 1983
Vegetals inhibit In Vivo the Mutagenicity of Nitrite
Combined with Nitrosable Compounds.
Mutation Research. 120 : 145 - 150.
- 21 BARALE, R., ZUCCONI, D. y LUPIRENU, N. 1983.
Formation In Vivo and Inhibition of Mutagenic N-nitroso
Compounds.
III International Conference on Environmental Mutagens.
Tokyo Japan. Sep. : 21 - 27.
- 22 BARNARD, J., BAVIN, P. M., BRIMBLECOMBE, D. W., GRAHAM,
D., DURANT, J., KEIGHLEY, B. 1982.
In Mac. Gee P. M. Nitrosamines and Human Cancer.
Bahbary Report. 12. Cold Spring Harbor Laboratory : 369 -
377.
- 23 BARNES, W. E., TEELEY, E. y EISENSTADT, E. 1984.
Base Sequence Analysis of His⁺ Revertants of His46
Missence Mutation in Salmonella typhimurium lester
Strains.
Environm. Mutag. 4 : 297.
- 24 BARROWMAN, M. M., MORINER, S. E. y BOGAN, J. A. 1984.
The Binding and Subsequent Inhibition of Tubulin
Polimerization in Ascaris Suum In Vitro by Benzimidazole
Anthelmintics.
Biochemical Pharmacol. 33 (19) : 3037 - 3040.
- 25 BARTSH, H. y MONTESANO, R. 1984.
Relevance of Nitrosamines to Human Cancer.
Carcinogenesis. 5 (11) 1381 - 1393.
- 26 BARTSH, H., OHSHIMA, H., NAIR, J., PIGNATELLI, B. y
CALMELS, S. 1986.
Modifiers of Endogenous Nitrosamines Syntesis and
Metabolism In M. Sankel, E. Hartman, R. Kada and A.
Hollander. Antimutagens and Anticarcinogenesis
Mechanisms.
Plenum Press New York and London. 87 - 102.
- 27 BELINSKY, S. A., WHITE, C. M., DEVEREUX, T. R., SWENBERG,
J. A. y ANDERSON, M. W. 1987.
Cell Selective Alkylation of DNA Rat Lung Following Low
Dose Exposure to the Tobacco Specific Carcinogen -4
(N-methyl-N-nitrosamino) -1- (3-pyridil -1 -butanone).
Cancer Res. 47 : 1143 - 1148.
- 28 BENOWITZ, N. J. y JACOB, P. 1986.
Reduced Tar Nicotin and Monoxide Exposure While Smoking
Untralow but not Low Cigarettes.
JAMA. 256 : 241 - 246.
- 29 BENSON, A. M., BATZINGER, R. P., OU, S. Y., BUEDING, E.,
CHA, Y. M. y TALALAY, P. 1978.

- Elevation of Hepatic Glutathion S-transferasa Activities and Promotion Against Mutagenic Metabolites of Benzo (a) Pirene by Dietary Antioxidants.
Cancer. Res. 38 : 4486 - 4495.
- 30 BHARUCHA, K. R., CROSS, C. K. y RUBIN, J. L. 1980.
Mechanism of N-nitrosopirrolidine Formation in Bacon.
J. Agric. Food Chem. 27 : 63 - 69.
- 31 BOGOVSKY, P. y BOGOVSKY, S. 1981.
Animal Species which N-nitroso Compounds Induce Cancer.
Int. J. Cancer. 27 : 471 - 474.
- 32 BORSZONY, I., TROKOR, G., PINTER, A., SURJAN, A., NADASDU, L., y ROLLER, P. 1980.
Carcinogenic Effects of Dinitrosopiperazin in Adult Swiss Mice After Transplacental or Translactational Exposure.
Cancer. Reseach. 40 2925 - 2927.
- 33 BOUTWELL, R. K. 1983.
Diet and Anticarcinogenesis in the Mouse Skin Two Stage Model.
Cancer Research. Suppl. 43: 2454 - 2468s.
- 34 BOYLAND, E. 1972.
The Effect of Some Ions of Physiologican Interest on Nitrosamine Syntesis. In Bogovsky, P., Preussman, P. y Walker. Eds. N-nitroso Compounds Analysis and Formation. IARC. Scientific Publication. 3. International Agency for Cancer Research, Lyon France. 124 - 126.
- 35 BOYLAND, E., NICE, E. y WILLIAMS, K. 1971.
The Catalisis of Nitrosation by Thiocyanate from Saliva.
Tood. Comet. Toxicol. 2 : 639 - 643.
- 36 BOYLAND, E. y WALKER, S. A. 1974.
Effect or Thiocyanate on Nitrosation of Amines.
Nature 248 : 601 - 602.
- 37 BROCKMAN, H. E y DE-MARINI, D. M. 1988.
Utility of Short-Term Test for Genetic Toxiciti in the Aftermath of NTP,S Analysis of 73 Chemicals.
Envirom. Molec. Mutagen 11: (4), 421-435.
- 38 BRUSICK, D. 1988.
Evolution of Testing Strategies for Genetic Toxicology.
Mutation Res. 205: (1-4), 69 - 78.
- 39 BUNTON, C. A. 1959.
Oxidation of Ascorbid Acid and Similar Reductones by Nitrous Acid.
Nature. 46 (55): 163 - 165.
- 40 BUTTER, C. J. y Mc KINLEY, W. A. 1984
Nitrosamine Analysis by GLC and HPLC Using Selective Detectors.

Tracor. Instruments. Tracor Inc. Rubbin Texas. 78721- TWA
210 - 847 - 1366.

- 41 CAMELS, S., OHSHIMA, H., ROSENKRANZ, H., MC LUY, E. y BARTSH, H. 1987.
Biochemical Studies on the Catalysis of Nitrosation by Bacteria.
Carcinogenesis. 8 (3) : 1085 - 1088.
- 42 CHALLIS, B. C., LOMAS, S. J. y REZEPA, H. S. 1982
A Kinetic Model for the Formation of Gastric N-nitroso Compounds. In Magee, P. N. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbury Report. 12. Cold Spring Harbor Laboratory : 243 -253.
- 43 CHEN, J. y RAISELDDANSE, L. H. 1983.
Drug Interactions 11. Formation of Nitrosamines from Therapeutic Drugs. Properties and Kinetics of the N-nitroso Propanodol from Nitrite and the Secondary Amine Propanolol-hydrochloride.
J. Pharmacol and Exp. Theraph. 225 (3) : 705 - 712.
- 44 CHOW, Y. L. 1973.
Nitrosamin Photochemistry.
Acc. Chem. Res. 6 : 354 - 360.
- 45 CLARKE, C. H. y SHANKEL, D. M. 1975.
Antimutagenesis in Microbial Systems.
Bacteriol. Rev. 32 (1) : 33- 53.
- 46 COLE, R. J., TAYLOR, N., COLE, J. y ARLETT, C. F. 1981.
A Model System for the Formation of N-nitroso Pirrolidine.
J. Food Technol. 13 : 55 - 59.
- 47 COLE, R. J., TAYLOR, N., COLE, J. y ARLETT, C. F. 1981.
Short Term Test for Transplacentari Active Carcinogens. 1. Micronucleus Formation in Fetal and Maternal Mouse.
Mutation. Res. 9) : 141 - 147.
- 48 COLE, R. J., TAYLOR, N., COLE, J y ARLETT, C. V. 1981.
Short Term Tests for Transplacental Micronucleous Test to Diethylnitrosamine.
Mutation. Res. 104 : 165 - 171.
- 49 COMMONER, B., VITAYATHIL, A. J., DOLARA, P., NAIR, S., NADYASTHA, G., LUCA, G. 1978.
Formation of Mutagens in Beef and Beef Extract During Cooking.
Science. 201 (8) : 913 -916.
- 50 CORTINAS DE NAVA, C., ESPINOSA AGUIRRE, J. J., GARCIA, L., ZAPATA, A. M. y MARTINEZ, E. 1983.
Mutagenicity of Antiamebic and Anthelmintic Drugs in the Salmonella typhimurium Microsomal Test System.
Mutation. Res. 112 : 79 - 91.

- 51 CRAMPTON, R. F. 1980.
Carcinogenic-Dose Response to Nitrosamines.
Oncology 37 : 251 - 254.
- 52 CUELLO, C., CORREA, P., HAENZEL, W., GURDILLO, G., BROWN, C., ARCHER, M. y MARTINEZ, E. 1983
Gastric Cancer in Colombia I. Cancer Risk and Suspect Environmental Agents.
J. Natl. Cancer. Inst. 57 : 1015 - 1020.
- 53 D'ACOSTA, J. A., CASTRO, C. R., DIAZ GOMEZ, M. I., DE FERREYRA, E. C. y DEFENDS, O. M. 1975.
Mechanism of Dimethylnitrosamine and Carbon Tetrachloride-Induced Liver-Necrosis. Similarities and Differences.
Toxicol. Appl. Pharmacol 32 : 474 - 481.
- 54 DAHL, A. R. 1985.
Mutagenicity of Some Dialkyl-nitrosamines and N-diethylmetylnitrosamine in Salmonella typhimurium with Rat and Rabbit Nasal, Lung and Liver S9 Homogenates.
Mutation. Res. 158 : 141 - 147.
- 55 DAWSON, M. y WATSON, T. R. 1985.
The Effect of Dose on the Bioavailability of Mebendazol
Br. J. Clin. Pharmac. 19 : 87 - 90.
- 56 DAWSON, P. J., WINSTON, E. G. y KEITH, G. 1984.
A Comparison of the Interaction of Anthelmintic Benzimidazoles with Tubulin Isolated from Mammalian Tissue and the Parasitic Nematode, Ascaridia Galli.
Biochemical Pharmacol 33 (7) : 1069 - 1074.
- 57 DELATOUR, P. 1976.
Embriotoxic and Antimitotic Properties of Parabendazole, mebendazol and Cambendazole.
C.R. Hevd. Seances Acad. Ser. D. 282 : 517.
- 59 DIAZ DE LEON, L., SANTAMARIA, P., MORALES, B., BARRIUS, K. y SOTO, H. 1984.
La Administración Crónica de Mebendazol y su Aplicación en la Cirrosis Hepática Experimental. En: Mecanismos de Acción de Fármacos. (Contreras, C., Cortinas de Nava, C. y Barragán, L. A. Eds).
Masson Publishing Inc., México.: 27 - 36.
- 60 DOLITTLE, D. J., REYNOLDS, J. H., ROBINSON, R. J., REYNOLDS, R. 1987.
Urinary Mutagenicity as a Measure of Exposure to Iar.
JAMMA. 257 (4) : 483 - 484.
- 61 DROFFNER, M. L. y YAMAMOTO, M. 1983.
Anaerobics Cultures of Salmonella typhimurium do not Exhibit Inducible Proteolytic Function of RecA gen. RecB. C. Function.
J. Bacterior. 156 (2) : 292 - 265.

- 62 DRUCREY, H., STEINHUFF, D., BEUTHNER, H. SCHNEIDER, H. and KLAMER, P. 1973.
Prüfung von Nitrit auf Chronische Toxische Wirkungen an Ratten.
Arzneimitt-Forsch. 13 : 320.
- 63 DUVERGER-VAN BOGAERT M., STECLA, L. y LEONARD, A. 1987.
Detection of Mutagenic Activity in Urine Samples Using a New Concentration Method.
Mutation. Res. 178 : 21 - 24.
- 64 ELESURU, R. K. y LIJINSKY, W. 1973.
The formation of Carcinogenic Nitroso Compounds from Nitrite and Some Types of Agriculture Chemicals.
Food. Cosmet. Toxicol. 11 : 807 - 817.
- 65 ELLEDGE, S. y WALKER, G. C. 1983.
Proteins Required for Ultraviolet and Chemical Mutagenesis.
J. Mol. Biol. 164 : 175 - 192.
- 66 ESPINOSA AGUIRRE, J. J., ARDUMIR, C., MEZA, M. T., CIENFUEGOS, E. y CORTINAS DE NAVA, C. 1987.
Genotoxicity in Escherichia Coli Pol A+/Pol A-.
Mutat. Res.
- 67 EVERSON, R. B, GAD-ELMANLA, M. M., ALITIA, E. M., CHEVLEN, S. S., THORGEISSON, L. A., ALEXANDER, P. M., FLACK, N., STAINO, M. y ZIEGLER, J. L. 1983.
Analysis of Human Urine for Mutagens Associated with Carcinoma of the Biliarzeal Bladder by the Ames Salmonella Plate Assay.
Cancer. 51 : 371 - 377.
- 68 FAN, T. Y. y TANNENBAUM, S. R. 1973.
Factors Influencing the Rate of Formation of Nitrosomorpholine Form Morpholine and Nitrite Aceleration by Thiocyanate and Other Amions.
J. Agric. Food. Chem. 21 : 237 - 240.
- 69 FARM, R. J., CUSICK, P. S. y MARINUS, m. g. 1986.
Studies on Mutagenesis and Repair Induced by Platinum Analogs.
Mutation. Res. 173 : 13 - 18.
- 70 FELTON, J. S. y NERBERT, D. W. 1975.
Mutagenesis of Certain Activated Carcinogenesis In Vitro Associated with Genetically Mediated Increases in Monooxygenase Activity and Cytochrome P-450.
J. Biol. Chem. 250 (17) : 6769 - 6778.
- 71 FIDDLER, W., PENSABENE, J., DUER, R. C. y WASSERMAN, A. E. 1972.
Formation of N-nitroso Dimethylamina from Natural Occurring Quaternary Amonium Compounds and Tertiary Amines.

- Nature (London) 236 : 307.
- 72 FILDER, W. 1975.
The Occurrence and Determination of N-nitroso Compounds.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 31 : 352 - 360.
- 73 FINE, H. D. 1982.
Nitrosamines in the General Environment and Food. In
Magee, P. M. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbury
Report. 132.
Cold. Spring Harbor Laboratory : 199 - 207.
- 74 FUKUSHIMA, S., SHIBATA, M. S., SHIRA, T., TAMANO, S. y
NUBUYUKI, I. 1986.
Roles of Urinary Sodium Ion Concentration and pH in
Promotion by Ascorbic Acid of Urinary Bladder
Carcinogenesis in rats.
Cancer. Res. 46 (4) : 1623 - 1626.
- 75 GODOY, H. M., DIAZ GOMEZ, M. y CASTRO, J. A. 1978.
Mechanisms of Dimetil Nitrosamine Metabolism and
Activation in Rats.
J. Natl. Cancer. Inst. 61 (5) : 1285 - 1289.
- 76 GOTH, R. y RAJEWSKY, M. F. 1974.
Persistence of 06-Ethylguanine in Rat Brain DNA:
Correlation with Nervous System Carcinogenesis by
Ethylnitrosourea.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71 (3) 639 - 643.
- 77 GOUGH, T. A., WEBBER, K. S. y COLEMAN, R. F. 1978.
Mechanisms of Dimetil Nitrosamine Content in U.K. Food.
Nature 272 : 161 0 162.
- 78 GRAHAM, S., DAYAL, H., SWANSON, M., MITTELMAN, A. y
WIKINSUN, G. 1978.
Diet in the Epidemiology of Cancer of the Colon and
Rectum.
J. Natl. Cancer. Inst. 61 (3) : 709 - 714.
- 79 GRAY, J. I., IRVIN, D. M. y KAKUDA, H. 1979.
Nitrates and Nitrosamines in Cheese.
J. Food. Prot. 42 : 263.
- 80 GREENBLATT, M. D. 1973.
Brief Communication : Ascorbic Acid Blocking of Aminopyrine
Nitrosation in N20/B1 Mice.
J. Natl. Cancer. Inst. 50 : 1055 - 1056.
- 81 GREENBLATT, M. D. y MIRVISH, S. S. 1973.
Dose Response Studies with Concurrent Administration of
Piperazine and Sodium Nitrite to Strain a Mice.
J. Nat. Cancer. Inst. 50 : 119 - 124.
- 82 GUESS, H. A. y HOEL, D. G. 1977.
The Effect of Host, and Dose on Latency Period.

- 83 GUTTEPLAN, H. y YOU CHIU HU. 1984.
Mutagenesis by N-nitroso Compounds in Salmonella typhimurium TA102 and TA104. Evidence for Premutagenic Adenine or Thymidin DNA Adducts.
Mutation. Res. 141 : 153 - 159.
- 84 HAKURA, A., KOHDA, K. y KAWZUE, Y. 1985.
Studies on Chemical Carcinogens and Mutagens. XXIX. Mutagenic N-trimethylsilylmethyl-N-nitrosoourea as a Biological Alkylating Agent Equivalent to N-methyl-n-nitrosoourea (MNU).
Mutation. Res. 157 : 87 - 93.
- 85 HARRIS, C. C., AUTRUP, H., STONER, G. D., TRUMP, B. F., HILLMAN, E., SCHAFTER, P. y JEFFRY, A. M. 1979.
Metabolims of Benzo (a) Pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine and Identification of the Mayor Carcinogen Adducts Formed in Cultured human Esophagus.
Cancer. Res. 39 : 4401 - 4406.
- 86 HARTMAN, P. E. 1982.
Nitrite Load in the Upper Gastrointestinal Tract. Past, Present and Future. In Magee, P. N. Nitrosamines and Human Cancer. Bhubury. Report 12.
Cold Spring Harbor. Laboratory 415 - 431.
- 87 HARTMAN, P. E., AMES, B. N., RUTH, J. R. BARNES, W. M. y LEVIN, D. E. 1986.
Target Sequencies for Mutagenesis in Salmonella typhimurium Histidine Requiring Mutants.
Environmental. Mutagen. 8 : 631 - 641.
- 88 HARTMAN, Z., HARTMAN, P. E., BARNES, W. E. y TULEY, E. 1984
Spontaneous Mutation Frequencies in Salmonella Enhancement of G/C to A.T Transversions and Depression of Detection and Framshift Mutation Frequencies Affored by Anoxigenic incubation.
Environmental Mutagen 6 (5) 633- 655.
- 89 HARVEY, F. J. y COLE, J. A. 1986.
Effects of Excision Repair and Plasmid pKml01 and Mutegenic and Cytotoxic Potencies of Antracycline Derivatives in Test Strains of Salmonella typhimurium.
Environmental. Mutagen. 8 : 797 - 815.
- 90 HAYATSU, H. 1981.
Modulation of Mutagenesis by Biological Substances. In Sugimura, T., Kondo, S., Takebe, H. Environmental Mutagens and Carcinogens.
University of Tokyo. Press. : 521 - 526.
- 91 HAYATSU, H., ARIMOTO, S., IUGAWA, K. and MAKITA, M. 1981
Inhibitory Effect of the Ether Extract of Human Feces an

Activities of Mutagens: Inhibition by Oleic and Linoleic Acids.

Mutation Res. 81 : 287 - 293.

- 92 HAYATSU, H., KASAI, H., YOKOYAMA, S., MIYAZAWA, I., YAMAIZUMI, A., SATO, S., NISHIMURA, S. ARIMOTO, S., HAYATSU, T. y OHRA, Y. 1987.
Mutagenic Metabolites in Urine and Feces of Rats Fed with 2-amino-3,8-dimethylimidazo (4, 5) Quinoxaline, a Carcinogenic Mutagen Present in Cooked Meat.
Cancer Research. 47 : 791 - 794.
- 93 HOFFMAN, D. y ADAMS, J. D. 1981.
Carcinogenic Tobacco Specific N-nitrosamines in Snuff and in the Saliva of Snuff Dippers.
Cancer. Res. 41 (11) : 4305 - 4308.
- 94 HOFFMAN, D., BRUNNEMANN, K. D., ADAMS, A. R. y HECHT, S. 1982.
N-nitrosamines in Tobacco Carcinogenesis. In Magee, P. M. Nitrosamines and Human Cancer. Banbury Report. 12. Cold., Spring Harbor Laboratory. : 211 - 220.
- 95 IMMAN, M. A., BUTLER, M. A., CONNOR, T. H. y MAINY, T. S., 1983.
The Effects of Excision Repair and Plasmid pKm101 on the Induction of His⁺ Revertants by Chemical Agents in Salmonella typhimurium.
Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 3 : 491 - 501.
- 96 JEONG-SOOK, H. Y., CHUNG, R. J., PATTEN, C. J., WADE, D. y YANG, C. S. 1982.
Nature of N-nitrosodimethylamine Demethylase and its Inhibitors.
Cancer Research. 47 : 141 - 143.
- 97 JINNO, K. 1984.
The Quantitative Structure-Activity Relationship Approach to the Mutagenicity of N-nitrosomethylamine Compounds.
Mutation Res. 141 : 141 - 143.
- 98 JOHNSON, K. A. 1977.
The Production of Secondary Amines by the Human Gut Bacteria and its Possible Relevance to Carcinogenesis.
Med. Lab. Sci. 34 : 131 - 143.
- 99 JONES, C. A., MARLINO, P. J., LIJINSKY, W. y HUBERMAN, E. 1981.
The Relationship Between the Carcinogenicity and Mutagenicity of Nitrosamines in a Hepatocyte Mediated Mutagenicity Assay.
Carcinogenesis. 2 (10) : 1075 - 1077.
- 100 KADA, T. 1981.
Mechanisms and Genetic Implications of Environmental Antimutagens. In Sugimura, I., Kondo, S., Iakebe, H.

Environmental Mutagens and Carcinogens.
University of Tokyo. Press. : 355 - 359.

- 101 KADA, T. y KANEMATSU, N. 1978.
Reduction of N-methyl-N-nitrosoguanidine Induced Mutations
by Cobalt Chloride in Escherichia Coli.
Proc. Japan. Acad. 54 Ser. B. (5) : 234 - 237.
- 102 KADA, T., TADASHI, I., TASHIRO, U y SHIRASU, Y. 1986.
Antimutagens and their Mode of Action. In Shankel, D.,
Hartman, P. E., Kada, T. y Hollander, A.
Wilson and Kundy Ed. Basic. Life Sciences.
19 Plenum Press : 181 - 186.
- 103 KAKUDA, Y. y GRAY, J. I. 1980a.
N-nitrosamides and their Precursors in Food Systems.
1. Formation of n-substituted Amides.
J. Agric. Food. Chem. 28 : 580 - 584.
- 104 KAKUDA, Y. y GRAY, J. I. 1980b.
N-nitrosamides and Their Precursors in Food Systems.
2. Kinetics of the Nitrosation Reaction.
J. Agric. Food. Chem. 28 : 584 - 587.
- 105 KAKUDA, Y. y LEE, M. L. 1980c.
N-nitrosamides and Their Precursors in Food Systems.
3. Influence on pH and Temperature and Stability of
N-nitrosamides.
J. Agric. Food. Chem. 28 : 588 - 591.
- 106 KEERLAAN, P., BOUTER, S. y MOHN, G. 1983.
Activation of Nitrosamines and other Carcinogens in Mouse
Liber 99, Mouse Hepatocytes and in Host Mediated Assay
Produces Different Mutagenic Responses in Salmonella
typhimurium TA1535.
Mutation. Res. 110 : 9 - 22.
- 107 KENNEDY, H. y LITTLE, D. 1978.
Protease inhibitors Suppress Radiation Induced Malignant
Transformation In Vitro.
Nature. 176 : 825.
- 108 KEYSTON, J. S. y MURDOCH, J. K. 1979.
Diagnostic and Treatment: Drugs Five Years Later Annals.
Ann. Int. Med. 91 : 585 - 586.
- 109 KLEIHUES, I. y MARGISON, G. P. 1974.
Brief Communication: Carcinogenicity of N-methyl-N-
nitrosourea: Possible Role of Excision Repair of O6
Methylguanine from DNA.
J. Natl. Cancer. Inst. 33 (6) : 1839 - 1841.
- 110 KO, I. Y., PARK, S. S., SONG, B. J., PATTEN, C., FAN, Y.,
HAG, Y. C., YANG, C. S. y VOGELBUIN. 1987.
Monoclonal Antibodies to Ethanol Rat Liver Cytochrome
p-450 that Metabolizes Aniline and Nitrosamines.
Cancer. Res 47 : 3202 - 3109.

- 111 KOHDA, D. H., NINOMIYA, S., WASHIZU, K., SHIRAKI, K., EBIE, M. y KAWAZOE, y. 1978.
Mutagenicity of a Series of N-alkyl-n-hydroxyalkyl N-haloalkyl and N-carboxyalkyl N-nitrosoureas in Escherichia coli Tester Strains. Dependence on the UvrA-Repair System.
Mutation Res. 177 219 - 228.
- 112 KUBACKA, W., LIBBEY, L. M. y SCANLAN, R. A. 1984.
Formation and Chemical Characterization of Some Nitroso Dipeptides N-terminal.
J. Agric. Food Chem. 32 : 401 - 404.
- 113 KUBACKA, W., y SCANLAN, R. A. 1984.
Kinetics of Nitrosation of Four Dipeptides N-terminal in Proline.
J. Agric. Chem. 32 : 404 - 406.
- 114 KUENZIG, W., CHAW, J., NORKUS, E., HALOWASCHENKO, H., NEWMARK, H., MERGENS W. and CURMEY, A. H. 1984.
Caffein and Ferulic Acid as Bloquers of Nitrosamine Formation.
Carcinogenesis. 5 (3) 309 - 313.
- 115 LAI, C. M., BUTLER, M. A. y MATNEY, T. S. 1980.
Antimutagenic Activity of Comon Vegetables and their Chlorophyl Content.
Mutation. Res. 77 : 245 - 250.
- 116 LAKRITZ, L., SPINELLI, A. M. y WASSERMAN, A. E. 1976.
Effect of Storage on the Concentration of Prolin and Other Free Amino Acids in Pork Bellies.
J. Food. Sci. 41 : 879 - 881.
- 117 LAWLOR, T. E., HAWORTH, S. R., LIJA, H. S., CAMERON, T. P. y DUNKEL, V. C. 1987.
Detection of Mutagenic Activity in the Urine of Rodent Treated with para-Rosaniline.
Environmental. Mutagen.) : 69 - 78.
- 118 LEAF, C. D., VECCHIO, A. J., RUE, J. y HATCHKISS, J. H. 1987.
Influence of Ascorbic Acid on N-nitrosoproline Formation in Humans.
Carcinogenesis. 8 (6) : 791 - 795.
- 119 LINDAHL, R. 1982.
DNA Repair Enzymes.
Ann. Rev. B Biochem. 51 : 61 : 87.
- 120 LIJINSKY, W. 1983.
Sumation and New Approches to Diet and Cancer.
Cancer Research (Suppl.) 43 : 2441 - 2443.
- 121 LIJINSKY, W. 1982.

- Carcinogenesis by Exposure to Nitrite and Amines. In Magee, P. M. Nitrosamines and Human Cancer. Barbury Report 12. Cold Spring Harbor Laboratory. : 561 - 565.
- 122 LIJINSKY, W. 1982a.
Dose Response Studies with Nitrosamines and species Differences. In Magee. Nitrosamines and Human Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. : 561 - 565.
- 123 LIJINSKY, W. 1980.
Significance of In Vivo Formation of N-nitroso Compounds. Oncology 37 : 223 - 226
- 124 LIJINSKY, W. 1974.
Reaction of Drugs with Nitrous Acid as a Source of Carcinogenic Nitrosamines. Cancer Research. 34 : 225 - 258.
- 125 LIJINSKY, W. y ANDREWS, A. W. 1979.
The Mutagenicity of Nitrosamides in Salmonella typhimurium. Mutation Res. 68 : 1 - 8.
- 126 LIJINSKY, W. y EPSTEIN, S. S. 1970.
Nitrosamines as Environmental Carcinogens. Nature 225 : 21 - 23.
- 127 LIJINSKY, W. y GREENBLATT, M. 1972.
Carcinogen Dimethylnitrosamine Produced In Vivo from Nitrite and Aminopirine. Nature New Biol. 236 177 -178.
- 128 LIJINSKY, W. y KOVATCH, M. 1986.
The Effect of Age on Suceptibility of Rats to Carcinogens, by Two Nitrosamines. Jpn. J. Cancer Res (Gann). 77 : 1222 - 1226.
- 129 LIJINSKY, W. y SINGER, S. 1975.
Formation of Nitrosamines from Tertiary Amines and Nitrous Acid. In Bogovsky, P. y Walcer, E. A. Ed. N-nitroso Compounds in the Environment. IARC Scientific Publications No. 9. International Agency for Research on Cancer. Lyon France : 111 - 114.
- 130 LIJINSKY, W. y TAYLOR, H. W. 1978.
The Change in Carcinogenic Effectiveness of Some Cyclic Nitrosamines at Different Doses. Z. Krebsforsch. 92 : 221 - 225.
- 131 LIJINSTY, W., CONRAD, E. y VAN de BOGART, R. 1972a.
Carcinogenic Nitrosamines Formed by Drug/Nitrit Interactions. Nature 239 : 165 - 167.
- 132 LIJINSKY, W., KEEFER, L., CONRAD, E. y VAN de BOGART, R. 1972b.

Nitrosation of Tertiary Amines, and some Biological Implications.

J. natl. Cancer. Inst. 43 : 1239 - 1243.

- 133 LIJINSKY, W., DOVATCH, R. M. y RIGGS, C. W. 1987.
Carcinogenesis by Nitrosodialkylamines and Azoxyalkamats Given by Gavage to Rats and Hamster.
Cancer. Res 47 : 2968 - 2972.
- 134 LINITAS, C., CLARCK, A., FOX, J. TANNENBAUM, S. K. y NEWBERNE, P. M.
In Vivo Stability of Nitrite and Nitrosamine Formation in The Dog Stomach: Effect of Nitrite and Amine Concentration and Ascorbic Acid.
Carcinogenesis. 3 (2) : 161 - 165.
- 135 LONGO, V., CITTI, L. y GERVASI, P. G. 1986.
Metabolism of Diethylnitrosamine by Nasal Mucosa and Hepatic Microsomes from Hamster and Rats: Species Specificity of Nasal Mucosa.
Mucosa Carcinogenesis. 7 (8) : 1323 - 1328.
- 136 LU, S. H., OHSHIMA, H., FUJIMIAN, Y., LI, F. M. BLETTIER, M. WAHRENDORF, J y BARTSH, H. 1986.
Urinary Excretion of N-nitroso Amino Acids and Nitrite by Inhabitants of a High and Low Risk Area for Esophageal Cancer in China: Endogenous Formation of Nitrosoproline and Its Inhibition by Vitamin C.
Cancer. Research 46 : 1485 - 1491.
- 137 MACPHEE, D. G. 1984.
Do the Salmonellatyphimurium Tester Strains Used in Mutagenicity Assays Display Plasmid Enhanced Genetic Drift?
Mutation. Res. 127 : 183 - 184.
- 138 MAGEE, P. M. y BARNES, J. M. 1956.
The Malignant Primary Hepatic Tumors in Rat by Feeding Dimethylnitrosamine.
Br. J. Cancer 10 : 114 - 1639.
- 139 MAJA, J. A. 1978.
Amines in Foods.
Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 10 : 373 - 403.
- 140 MATNEY, T. S., NGUYEN, T. V., CONNOR, I. H. DANA, W. J. y THEISS, J. C. 1985.
Genotoxic Clasification of Anticancer Drugs.
Teratogenesis. Carcinogen. Mutagen. 5 : 319 - 328.
- 141 MATZ, G. J. 1968.
Ototoxicity of Chloroquine.
Arch. otolaryngol. 88 : 370..
- 142 MANDEL, R. y PYSER, H. J. P. 1984.
Mutagenicity of Cadmium in Salmonella typhimurium and its Synergism with Two Nitrosamines.

- Mutation. Res. 138 : 9 - 16.
- 143 MANDEL, R. y PYSER, H. J. P. 1987.
Mechanism of Synergism in the Mutagenicity of Cadmium and N-Methyl-N-nitrosourea in Salmonella typhimurium. The effect of pH.
Mutation Research 176 : 1 - 10.
- 144 MARON, D. M. y AMES, B. M. 1983.
Revised Methods for the Salmonella typhimurium. Mutagenicity Test.
Mutation Res. 113 : 173 - 215.
- 145 MAEKAWA, A., ONODERA, H., TANIGAWA, K., FURUTA, J., KANNU, M., NOCHIZUKI, M. TAKIDA, K. y OKADA, M. 1986.
Carcinogenicity of N-alkyl-N-(1-hydroperoxyalkyl) Nitrosamines After Intravenous Injections in F 344 Rats.
Carcinogenesis. 7 (8) : 1313 - 1316.
- 146 MATSUI, M., OHSHIMA, H. y KAWATA, T. 1980.
Increase in the Nitrosamine Content of Several Fish Products upon Broiling.
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 46 : 587 - 590.
- 147 Mc CANN, J., SPINGARN, M. E., KUBORI, J. y AMES, B. N. 1975.
Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strains with R. Factors.
Proc. Nt. Acad. Sci. 72 (3) : 979 - 983.
- 148 Mc COY, E., PET EDWARDS, J., CHANKONG, V. y ROSENKRANZ, H. Z. 1984.
Phenotypic Instability of Salmonella typhimurium Tester Strains: Statistical Verification.
Mutation Res. 127 : 185 - 188.
- 149 MILLER, J. J. 1980.
The Imidazoles as Immunosuppressive Agents. Transplantation. Proceedings. 12 (2) : 300 - 303.
- 150 MINAKATA, H., KOMURA, H. NAKANISHI, K. y KADA, I. 1980.
Protoamin, an Antimutagen Isolated from Plants.
Mutation. Res 116 : 317 - 322.
- 151 MIRVISH, S. A. 1970.
Kinetics of Dimethylamine - Nitrosation in Relation to Nitrosamine Carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 44 : 633 - 639.
- 152 MIRVISH, S. S. 1971.
Kinetics of Nitrosamine Formation from Urea.
J. Ntl. Cancer. Inst. 50 : 745 - 750.
- 153 MIRVISH, S. S. 1972.
Ascorbate-nitrite Reaction, Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-nitroso Compounds.

- J. Nat. Cancer Inst. 78 (2) : 238 - 291.
- 163 MOON, R. C., Mc CORMIC, D. I. y METTA, R. G. 1983.
Inhibition of Carcinogenesis by Retinoids.
Cancer. Research. Suppl. 43 : 2469 - 2475.
- 164 MORY, Y., YAMAZAKI, H., TOYOSHI, K., EMI, Y., UCHIDA, K.
TSUTSUMI, M. y KNOSHIA, Y. 1985a.
Inhibitory Effect of Organic Solvents on the Mutagenicity
of N-Nitrosodialkylamines in Salmonella typhimurium .
Mutation. Res. 142 : 153 - 158.
- 165 MORI, Y., YAMAZAKI, H., TOYOSHI, K., DENDA, A. y KONISHI,
Y. 1986.
Mutagenic Activation of Carcinogenic Evidence for a
Cytochrome P-450 Dependent Reaction.
Carcinogenesis 6 (3) : 415 - 420.
- 166 MORI, Y., YAMAZAKI, H., TOYOSHI, K. DENDA, A. y KONISHI,
y. 1986.
Mutagenic Activation of Carcinogenic N-Nitrosopropylamines
by Liver S9 Fractions from Mice, Rats and Hamsters:
Evidence for a Cytochrome P450 - Dependent Reaction.
Carcinogenesis. 7 (3) : 375 - 379.
- 167 MORITA, K., HARA, M., y KADA, T. 1978.
Studies on Natural Desmutagens from Vegetable and Fruit
Factors in Inactivation of Mutagenic Pyrolysis from Amino
Acids.
Agric. Biol. Chem. 46 (2) : 1235 - 1238.
- 168 MURPHEY-CORB, H., HAY-LONG-KONG, y MURRAY, M. L. 1983.
Mutagenic Activity from Nitrosation of Oligoamines.
Environmental Mutagen. 5 : 101 - 109.
- 169 NAGARATMAN, N. 1978.
Aplasia and Leukemia. Following Chloroquine Therapy.
Postgrad. Med. J. 54. 108.
- 170 NAGAO, M. y SUGIMURA, T. 1978.
Environmental Mutagens and Carcinogens.
Ann. Rev. Gent. 12 : 117 - 159.
- 171 NEWBERNE, M., NAUSS, K. M. y CAMARGO, J. J. V. 1983.
Lipotrops, Immunocompetence and Cancer.
Cancer Research. (Suppl.) 43 : 2426 - 2434.
- 172 NOGUTI, T. y KADA, T. 1972.
Semi In Vitro Repair of Radiation Induced Damage in
Transforming DNA of Bacillus subtilis.
J. Mol. Biol. 67 : 507 - 512.
- 173 NORKUS, E. P. y KUENZIG, W. A. 1985.
Studies on the Antimutagenic Activity of Ascorbic Acid In
Vitro and In Vivo.
Carcinogenesis. 6 (11) : 1593 - 1598.

- 174 OCHIAI, M., WAKABAYASHI, K., SUJIMUTA, T. y NAGAU, M. 1986.
Mutagenicity of 30 Derivatives of Indol After Nitrite Treatment.
Mutation Res. 172 : 189 - 192.
- 175 OHE, T. 1982.
Mutagenicity of Pyrolysates from Guanidine Ureide Secondary Amines And Polyamines Found by Salmonella Mamalian Microsome Test.
Mutation. Res. 101 : 175 - 187.
- 176 OHSHIMA, H. y BARTSCH, H. 1981.
Quantitative Estimation of Endogenous Nitrosation in Humans by Monitoring N-nitroso Proline Excreted in the Urine.
Cancer. Res. 41 : 3658 - 3662.
- 177 OHSHIMA, H., BIGNATELLI, B. y BARTSCH, H. 1982.
Monitoring of Excreted N-nitrosoaminoacids as a New Method to Quantitative Endogenous Nitrosation in Humans. In Magee, P. M. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbury Report. 12.
Cold Spring Harbor Laboratory : 297 - 317.
- 178 OHTA, T., ASABE, Y. y TAKETANI, S. 1986.
Identification of Mutagenic Nitrosation of Aminopyrine and Evaluation of the Formation Under Stomach Conditions.
Chem. Pharm. Bull. 34 (9) : 3866 - 3872.
- 179 OHTA, T., WATANABE, K., MURIYA, M., SHIRASU, Y. y KADA, T. 1983.
Analysis of the Antimutagenic Effect of Cinnamaldehyde on Chemical Induced Mutagenesis in Escherichia coli.
Mutation. Res. 107 (2) : 219 - 227.
- 180 OHTA, T., WATANABE, K., MURIYA, M., SHIRASU, Y. y KADA, T. 1983.
Analysis of the Antimutagenic Effect of Cinnamaldehyde on Chemical Induced Mutagenesis in Escherichia coli.
Mol. Gen. Genet. 129 (3) : 309 - 315.
- 181 ONG, T. M., WHONG, W. Z., STEWART, J. y BROCKMAN, H. E. 1986
Chlorophyllin: A Potent Antimutagen Against Environmental and Dietary Complex Mixtures.
Mutation. Res. 173 : 111 - 115.
- 182 USAWA, T., ISHIBASHI, H., NAMIKI, M., YAMANAKA, N. y NAMIKI, K. 1981.
Formation of Mutagens by Paper-Nitrite Reaction.
Mutation. Res. 91 : 291 - 295.
- 183 USTRUSKY-WEGMAN, P., GARCIA, G., ARELLANO, L., ESPINOSA, J.J., MUNIERO, R. Y CORTINAS DE NAVA L. 1984

- Genotoxicity of Antiamebic, Anthelmintic and Antymucotic Drugs in Human Lymphocytes, Sister Chromatid Exchange, 25 years of Experimental Research. Eds R.R. Tice and A. Hglander. Plenum Press, N. Y.

- 184 PARIZA, M. W., LORETZ, L. L., STORKSON, J. M., HULLAND, N.C. 1983.
Mutagens and Modulator of Mutagenesis in Fried Ground Beef.
Cancer. Reserch. (Suppl.). 43 : 2445 - 2446.
- 185 PARKS, N. J., KROHN, K. A., MATHIS, C. A., CHASKU, J. H., GEIGER K. R., GREGOR, M. E. y PEEK, N. L. 1981.
Nitrogen-13-Labeled Nitrite and Nitrate: Distribution and Metabolism After Intratracheal Administration.
Science 212 : 58 - 60.
- 186 PERCHELLET, J. P., OWEN, M. D., POSEY, T. D., ORTEN, K. K., SCHNEIDER, B. A. 1985.
Inhibitory Effects of Glutathione Liver Raising Agents and Mouse Skin Tumor promotion by 12-Tetradecanol Phorbol-13 Acetate.
Carcinogenesis_ 1 567 - 573.
- 187 PIGNATELLI, B. M., FRIESEN, M. y WALKER, F. A. 1980.
The Role of Phenols in Catalysis of Nitrosamine Formation. In (Walker, E. A., Castegnaro, M., Criciate, L. y Borzonyi, B. Eds.) N-nitroso Compounds. Analysis Formation and Occurrence, IARC Scientific Publication No. 31. International Agency for Cancer Research. Lyon France : 93 - 109.
- 188 POIRIER, S., OHSIMA, H., DeTHE, G., HUBERT, A., BOUGADE, M. C. y BARTSCH, H. 1987.
Volatil Nitrosamine Levels in Common Foods from Tunisia Sout.
Inth. J. Cancer. 39 : 293 - 296.
- 189 POOL, B. L. 1980.
Mutagenicity Relevance of Short Term Test.
Oncology 37 : 266 - 271.
- 190 PROKOPCZYK, B., RIBERSON, A., BERTINATO, P., BRUNNEMANN, K. D. y HOFFMAN, D. 1987.
3-(Methylnitrosamino-Propionitrite Occurrence in Saliva of Betel Quid Chewers.
Cancer. Res. 47 : 467 - 471.
- 191 POPOVICH, D. J. DIXON, J. B. y EHRLICH, B. J. 1979.
The photoconductivity Detector - a New Selective Detector for NPC4LC.
J. Chromatog. Sci. 17 : 643 - 650.
- 192 POUR, P., GINGELL, R., LANGENBACH, R., NAGEL, D., GRANDJEAN, C., LAWSON, T. y SALMASI, S. 1980.
Carcinogenicity of N-nitrosomethyl (2-Isopropyl) Amine in

Syrian Hamster.
Cancer. Res. 40 : 3585 - 3590.

- 193 PREUSSMAN, R. 1983.
Public Health Significance of Environmental
N-nitrosocompounds. In Preussman, R. U., Neill, I. K.,
Eisenbrand, G., Spisgelhalder, B. y Bartsh, H. (Eds.),
IARC - Scientific Publication No. 45.
International Agency for Cancer Research.
Lyon France : 3 - 17.
- 194 PREUSSMAN, R. y STUART, B. W. 1984.
N-nitroso Carcinogens. IN Searle, C. E., Chemical
Carcinogens Monographs.
2^a Ed. A.C.E. Monographs.
Washington, D. C. : 643 - 731.
- 195 RAISFELD-DANSE, I. R. y CEN, J. 1983.
Drug Interactions III. Formation of Nitrosamines from
Therapeutic Drugs and Safety Assessment of Propanolol
Hydrochloride with Respect to the Intra-gastric Formation
of N-nitroso Propanolol Under Conditions Found in patients.
J. Pharmacol and Exp. Theraph. 225 (3) : 713 - 719.
- 196 RAKOFF, H. y ROSSE, M. C. 1974.
Química Orgánica Fundamental.
Ed. Limusa. México, D. F. : 562 - 564.
- 197 RAO, T. K., HARDIGREE, A. A., YOUNG, J. A., LIJINSKY, W. y
EPLER, J. L. 1977.
Mutagenicity of N-Nitrosopiperidines with Salmonella
typhimurium Microsomal Activation System.
Mutation. Res. 56 : 131 - 145.
- 198 RAO, T. K., RAMEY, D. W., LIJINSKY, W. y EPLER, J. L.
1979a.
Mutagenicity of Cyclic Nitrosamines in Salmonella
typhimurium Effect of Ring Size.
Mutation. Res. 62 : 21 - 26.
- 199 RAO, T. K., YOUNG, J. A., LIJINSKY, W. y EPLER, J. L.
1978.
Mutagenicity of Alifatic Nitrosamines in Salmonella
typhimurium.
Mutation. Res. 66 : 1 - 7.
- 200 RAO, T. K., YOUNG, J. A., LIJINSKY, W. y EPLER, J. L.
1978.
Mutagenicity of N-nitrosopiperazine Derivatives in
Salmonella typhimurium.
Mutation Res. 57 : 127 - 134.
- 201 RAZZOUK, C., MERCIER, M. y RUBERFROID, M. 1980.
Induction, Activation and Inhibition of Hamster, and Rat
Liver Microsomal - Arylamide and Acrylamide N-Hydroxylase.
Cancer. Res. 40 : 3540 - 3546.

- 202 REED, P. L., HANES, K., SMITH, P. L. R., WALLERS, D. L. y HOUSE, F. R. 1982.
The Effects of Cimetidine on Intra-gastric Nitrosation in Man. In Magee, P. N. Nitrosamines and Human Cancer. Bahbury Report. 12.
Cold Spring Harbor Laboratory : 351 - 364.
- 203 RINKUS, S. J. y LEGATOR, M. L. 1979.
Chemical Characterization of 465 Known or Suspected Carcinogens and their Correlation with Mutagenic Activity in the *Salmonella typhimurium* System.
Cancer Res. 39 : 3289 - 3318.
- 204 ROBERFROID, M., RAZZOUK, C., HERVERS, F. y VIEHE, H. G. 1981.
Microsomal Metabolic Activation, Mutagenicity and Antimutagenicity. In Sugimura, T., Kondo, S., Iakabe, H. (Eds.) Environmental Mutagens and Carcinogens.
University of Tokyo Press. : 511 - 520.
- 205 ROGERS, A. E. 1983.
Influence of Dietary Contents of Lipids Lipotropic Nutrients and Chemical Carcinogens in Rats.
Cancer Res. (Suppl. 43) : 2477 - 2484.
- 206 RUMRUEN, K y POOL, B. L. 1984.
Metabolic Activation Capabilities of S9 and Hepatocyte from Uninduced Rats to Convert Carcinogenic N-nitrosamines to Mutagens.
Mutat. Res. 140 : 147 - 153.
- 207 SANI B. P., DAWSON, M. I., HOBBS, P. D., CHAN, R. L. y SCHIFF, L. J. 1984.
Relationship Between Binding Affinities to Cellular Retinoic Acid - Binding Protein and Biological Potency of a New Series of Retinoids.
Cancer Res. 44 : 190 - 195.
- 208 SARANGENTIN, N. J. y SMITH, K. C., 1985.
Spontaneous Mutagenesis and the Roles of DNA Repair, Replication and Recombination.
Mutation. Res. 154 : 1 - 27.
- 209 SATO, T., SUZUKY, V., USE, Y. y ISHIKAWA, I. 1984.
Desmutagenic Substance in Rater Extract of Wrack Pondweek. (potamogeton Oxyphilus Niquel).
Mutation. Res. 129 : 33 - 38.
- 210 SCANLAN, R. A. 1983.
Formation and Occurrence of Nitrosamines in Foods.
Cancer Res. (suppl 43) : 2435 - 2440.
- 211 SCANLAN, R. A., BARBOUR, J. F., HUTCHINGS, F. y LIBBER, L. M. 1980.
Nitrosodimethylamine in Beer.

- Food. Cosmet. Toxicol. 18 : 27.
- 212 SCHMAHL, D. y HABS, M. 1980.
Carcinogenicity of N-nitroso Compounds.
Oncology. 37 : 237 - 242.
- 213 SCHEIDER, V. J., WAZOK, R. y SCHWARZ, H. 1977.
Endogene Bildung Kanzerogable von Pharmaka und Nitrit an
Ratten.
Exp. Path. Bd. 13 : 32 - 43.
- 214 SEN, N. P., SEAMAN, S. y MILES, W. F. 1979.
Volatil Nitrosamines in Various Cured Meals.
J. Agric. Food. Chem. 22 : 2534.
- 215 SHANK, R. 1975.
Toxicology of N-nitroso Compounds.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 31 : 361 - 368.
- 216 SHAMBERGER, R. J. 1984
Genetic Toxicology of Ascorbic Acid.
Mutation. Res. 133 : 361 - 159.
- 217 SHIMOI, K., NAKAMURA, Y., TOMITA, I., HARA, Y. y KADA, T.
1986.
The Pyrogallol Related Compounds Reduce U. V. Induced
Mutations in Escherichia Coli B/r WP2.
Mutation. Res. 173 : 239 - 244.
- 218 SIRIANI, S. R. y HUANG, C. C. 1987.
Comparison of 69 Fractions from Rats and Mice and Chinese
Hamster to Metabolise Dietylnitrosamine to Intermediates
that Induce Sister Chromatid Exchanges in V 79 Cells.
Mutation Res. 188 : 7 - 11.
- 219 SPIEGELHALDER, B., EISENBRAND, B. y PREUSSMAN, R. 1979.
Contamination of Beer with traces of N-nitroso
Dimethylamine.
Food. Cosmet. Toxicol. 17 : 29.
- 220 STYLES, J. A. 1973.
Cytotoxic Effects of Various Pesticides In Vivo and In
Vitro.
Mutation Res. 21 : 50 - 51.
- 221 SUGIMURA, T. y SATO, S. 1983.
Lets be Scientific About the Problem of Mutagenesis in
Cooked Food.
Mutation. Res. 55 : 149 - 152.
- 222 SUGIMURA, T. y SATO, S. 1983.
Mutagens-Carcinogens in Food.
Cancer Research. (Suppl. 43) : 2451 - 221.
- 223 TANNEMBAUN, S. R., MORAN, D., RAND, W., CUELLO, P. y
CORREA, P. 1979.

- Gastric Cancer in Colombia. IV. Nitrite and Other Ions in Gastric Contents of Residents from a High Risk Region. J. Natl. Cancer. Inst. 62 : 9 - 12.
- 224 TAYLOR, M. W. y LIJINSKY, W. 1975.
Tumor Induction in Rats by Feeding. Aminopyrine or Oxitetraacyclin with Nitrite. Cancer. 16 : 211 - 215.
- 225 TOTH, B. y PATIL, K. 1983.
Enhancing Effect of Vitamine E on Murin Intestinal Tumorigenesis by 1'2 Dimethylhidrazine, Dihydrochloride. J. Nat. Cancer. Inst. 1983 : 1107 - 1111.
- 226 TROSCO, J. E. y CHANG, C. C. 1984.
A Possible Mechanism Link Between Tetatogenesis and Carcinogenesis. Inhibited Intracellular Communication. In Mutation Cancer and Malformation Plenum Press. : 529 - 541.
- 227 TROSCO, J. E. 1986.
Role of intracelular comunication inModifing the consequences of mutation in somatic cells. In DELVERI, m, Shankel, p., Hartman, E. y Kada, I. Antimuitzagens and anticarcinogens. Basic Life Science. 39; 439 457.
- 228 TUTIKAWA, K., SHINOI, M., y YGI, Y. 1977.
Mutagenicity of Products Generated by Reaction Between Cloroquine and Nitrite. Mutation. Res. 54 : 230 (Abstract).
- 229 VERMA, A. K., SHAPAS, B. G., RICE, H. M., y BUUTWELL, R. K. 1979.
Correlation of the Inhibition by Retinoides of Tumor Promoter Induced Mouse Epidermal Ornithine Decarboxylase Activity on Skin Tumor Promotion. Cancer. Research. 39 : 419 - 425.
- 230 VON-HOFE, E., KLEINHUES, P. y KEEFER, J. K. 1986.
Extend of DNA 2-Hydroxylethylation by N-nitrosomethylethylamine. Carcinogenesis. 7 (8) : 1335 - 1337.
- 231 VOGEL, A. 1974.
Practical Organic Chemistry. Including Quantitative Organic Analysis. Ed. Longman. : 648 - 653.
- 132 WADE, D., YANG, C. S., METRAL, C. J., RUMAN, J. M., HRABIE, J. A., RIGGS, C. W., ANJO, I., KEEFER, L. K. y MICO, B. M. 1978.
Deuterium Isotope Effect on Denitrosation of N-nitrosodimethylamine by Rat Liver Microsomes. Cancer. Res. 47 : 3373 - 3377.
- 233 WATTENBERG, L. W. 1983.

- Inhibition of Neoplasia by Minor Dietary Constituents.
Cancer Res. (Suppl. 43) 2448 - 2453.
- 234 WATTENBERG, L. W. y LEUNG, J. L. 1970.
Inhibition of Chemical Carcinogens.
J. ntl. Cancer. Inst. 60 (1) : 11-18.
- 235 WATTENBERG, L. W. y LEUNG, J. L. 1970.
Inhibition of the Carcinogenic Action by Flavones.
Cancer. Res. 30 : 1922 - 1925.
- 236 WIESSLER, M. ROMRUEN, K. y POUL, B. L. 1983.
Biological Activity of Benzylating N-nitroso Compounds.
Models of Activated N-nitrosomethylbenzylamine.
Carcinogenesis 4 (7) : 867 - 871.
- 237 WILLPART, M. y ROBERFRID, M. 1986.
Effects of Secondary Biliary Acids on the Mutagenicity of
N-methyl-N-nitrosoguanidine, 2-acetylaminofluorene and
2-nitrofluorene Towards Salmonella typhimurium Strains.
Carcinogenesis 7 (5) : 703 - 706.
- 238 WITTKIN, E. M. 1976.
Ultraviolet Mutagenesis and Inducible DNA Repair in
Escherichia coli.
Bacteriol. Rev. 40 (4) : 869 - 907.
- 239 YAMASAKI, E. y AMES, B. N. 1977.
Concentration of Mutagens from urine by Adsorption with the
Non Polar Resin XAD-2: Cigarette Smokers have Mutagenic
Urines.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74 : 3355 - 3559.
- 240 YANG, S. 1980.
Research on Esophageal Cancer in China: A Review.
Cancer. Res. 40 : 2633 - 2644.
- 241 YAVELON, J., FINLAY, T. H., KENEDY, A. R. y TRULL, W.
1983.
Bowman-brik Soybean Protease Inhibitor as an
Anticarcinogen.
Cancer. Res. (Suppl). 43 : 2454 - 2459.
- 242 YAVELLO, J., GIDLUND, M. y TRULL, W. 1982.
Protease Inhibitors from Legums Effectively Inhibit
Superoxide Generation in Response to TPA.
Carcinogenesis 3 (2) 135 - 138.
- 243 YIELDING, L. W. 1976.
Preliminary Studio of Caffeine and Chloroquin Enhancement
of X Ray Induced Birth Deffects.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 68 : 1356.
- 244 YOO, J. S. H., CHEUNG, R. I., PATTEN, L. J., WADE, D. y
YANG, C. S. 1987.
Nature of N-nitrosodimethylamine Demethylase and its

Inhibitors.

Cancer. Res. 42 : 3378 - 3383.

- 245 ZARDIE, D. G., BLETNER, M., TRAPEZNIKOV, V. N.,
KUIISHINOV, J. P., MARTIAKIN, E. G., PULJAKOV, B. P.,
PARSHIKOVA, S. M., TOTTEBERG, V. I., CHAMRAKULOU, F. S.,
HOAJEAVA, M. C., STICH, H. F., ROSIN, M. P., THURNHAM, D.
I., HJOFFMAN, D. y BRUNNEMANN, K. D. 1985.
Survey of Oral and Oesophageal Cancer.
Int. J. Cancer. 36 : 153 - 158.
- 246 ZEIGER, E. y SHELDON, A. T. 1978b.
The Mutagenicity of Heterocyclic N-nitrosamines for
Salmonella typhimurium.
Mutation. Res. 57 (1) : 1 - 7.
- 248 ZEIGER, E. y SHELDON, A. T. 1978a.
The Mutagenicity of N-nitrosopiperidine for Salmonella
typhimurium.
Mutation. Res. 57 : 85 - 89.