ISSN: 1988-2688
http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1

RCCV
Revista Complutense de Ciencias Veterinarias

Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2011 5(1):48-68

N-NITROSOPIPERIDINA Y N-NITROSODIBUTILAMINA (II): RELEVANCIA EN LA CARCINÓGENESIS QUÍMICA Y GENOTOXICIDAD

N-NITROSOPIPERIDINE AND N-NITROSODIBUTYLAMINE (II): RELEVANCE IN CHEMICAL CARCINOGENESIS AND GENOTOXICITY

García, A, Haza, AI y Morales, P*

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM.

*Correspondencia: pmorales@vet.ucm.es

RESUMEN

La N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA) han sido clasificadas como posibles carcinógenos en humanos. La NPIP causa tumores en esófago, y también en cavidad nasal, hígado y estómago, mientras que la NDBA es carcinógeno de vejiga urinaria. Ambas N-nitrosaminas son consideradas carcinógenos genotóxicos indirectos puesto que necesitan una bioactivación para generar metabolitos que reaccionen con el DNA. La principal lesión al DNA inducida por las N-nitrosaminas es el daño alquilativo. En el caso de la NDBA, la posición de alquilación es en el O6 de la guanina, formando la O^6 butilguanina y la O^6-4-hidroxibutilguanina. Sin embargo, esta N-nitrosamina alquila preferentemente proteínas. Por otra parte, la bioactivación de la NPIP genera metabolitos que reaccionan con el N2 de la guanina *in vitro*, aunque se desconocen sus efectos *in vivo*. Además, durante la activación metabólica pueden también producirse especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs). Las lesiones oxidativas y nitrativas más comunes son la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) y la 8-nitroguanina, respectivamente, que producen mutaciones y conducen a la carcinogénesis.

Palabras clave: N-nitrosopiperidina, N-nitrosodibutilamina, carcinogenicidad, genotoxicidad, daño alquilativo al DNA, daño oxidativo al DNA, especies reactivas del oxígeno, especies reactivas del nitrógeno.

ABSTRACT

N-nitrosopiperidine (NPIP) and N-nitrosodibutylamine (NDBA) have been classified as possibly carcinogenic to humans. NPIP causes tumours in oesophagus, and also in nasal cavity, liver and stomach, whereas NDBA is a bladder carcinogen. Both N-nitrosamines are considered indirect genotoxic carcinogens since they need a bioactivation to generate metabolites that react with DNA. The main DNA lesion induced by N-nitrosamines is the alkylative damage. In the case of NDBA, the alkylation position is in O6 of guanine, forming O^6 butylguanine and O^6-4-hydroxybutylguanine. However, this N-nitrosamine alkylates proteins preferably. On the other hand, NPIP bioactivation generates metabolites that react with N2 of guanine *in vitro*, although its *in vivo* effects are unknown. Moreover, during metabolic activation reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) can be also produced. The most common oxidative and nitrative lesions are 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG) and 8-nitroguanine, respectively, that produce mutations and lead to carcinogenesis.

Keywords: N-nitrosopiperidine, N-nitrosodibutylamine, carcinogenicity, genotoxicity, alkylative DNA damage, oxidative DNA damage, reactive oxygen species, reactive nitrogen species.

RELEVANCIA DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA EN LA CARCINOGÉNESIS QUÍMICA: IMPACTO EN LA SALUD HUMANA

Aunque la carcinogenicidad de las N-nitrosaminas es difícil de evaluar en humanos, son muchos los estudios epidemiológicos que relacionan la exposición a estos compuestos con la incidencia de diferentes tipos de cáncer. Por tanto, el balance resultante del consumo de vegetales, frutas o compuestos inhibidores de la nitrosación, y de aditivos empleados en la elaboración de productos cárnicos curados o de pescado salado puede ser determinante en esta asociación. Así, recientemente Liu *et al.* (2006) han observado que el consumo habitual de

productos cárnicos curados o de pescado acompañado ocasionalmente de vegetales está estrechamente vinculado con el riesgo de padecer leucemia aguda.

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

Existen diferentes vías por las que las N-nitrosaminas entran en contacto con el organismo: aérea (N-nitrosaminas volátiles), digestiva y cutánea (Rigel *et al.,* 2006). La mayoría de las N-nitrosaminas se metabolizan eficientemente en el hígado y aproximadamente el 60% de las N-dialquilnitrosaminas se degradan a CO_2 y se exhalan, aunque una pequeña parte se excreta por orina y una porción insignificante por heces.

La toxicidad sistémica de las N-nitrosaminas se descubrió de forma casual en los seres humanos. Los primeros casos de toxicidad aguda y mortalidad por N-nitrosaminas fueron descritos en 1937 (Freund, 1937), pero se pasaron por alto hasta 1954 cuando Barnes y Magee descubrieron la NDMA y estudiaron sus efectos cancerígenos en ratas (Barnes y Magee, 1954). La intoxicación aguda con la NDMA provoca hepatitis y necrosis de las células hepáticas, mientras que la administración crónica produce fibrosis hepática, proliferación de los conductos biliares e hiperplasia (Cameán y Repetto, 2007). Sin embargo, los órganos afectados tras la exposición a otras N-nitrosaminas no se ciñen exclusivamente al hígado. Así, tras el tratamiento de ratas con la NPIP se ha observado hiperplasia y formación de nódulos tumorales en el esófago, la cavidad nasal y la mandíbula inferior (Gray *et al.,* 1991), mientras que la exposición a la NDBA provoca lesiones hiperplásicas, papilomas y carcinomas en el urotelio (Okajima *et al.,* 1981).

La actividad tóxica de las N-nitrosaminas está estrechamente relacionada con los efectos mutagénicos y cancerígenos que inducen. Así, los procesos patológicos desencadenados por su actividad citotóxica, pueden considerarse como estadíos previos de procesos carcinogénicos. Estudios *in vivo* con diferentes N-nitrosaminas revelaron que estos compuestos son inhibidores de la actividad enzimática mitocondrial, lo que conduce a un

aumento en la formación de compuestos mutagénicos, derivados de las mismas (Hernández y Sastre, 1999). Este hecho viene a constatar que la actividad citotóxica de las N-nitrosaminas amplifica su capacidad mutagénica y cancerígena (Hakura *et al.*, 2005). Además, existen indicios de que algunas N-nitrosaminas inducen mutaciones en oncogenes. En concreto, se ha observado un posible punto de mutación en el oncogén *ras* por efecto de la actividad de compuestos N-nitroso (Hecht, 2008). Este tipo de mutación se ha detectado en diferentes procesos cancerígenos en la especie humana.

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

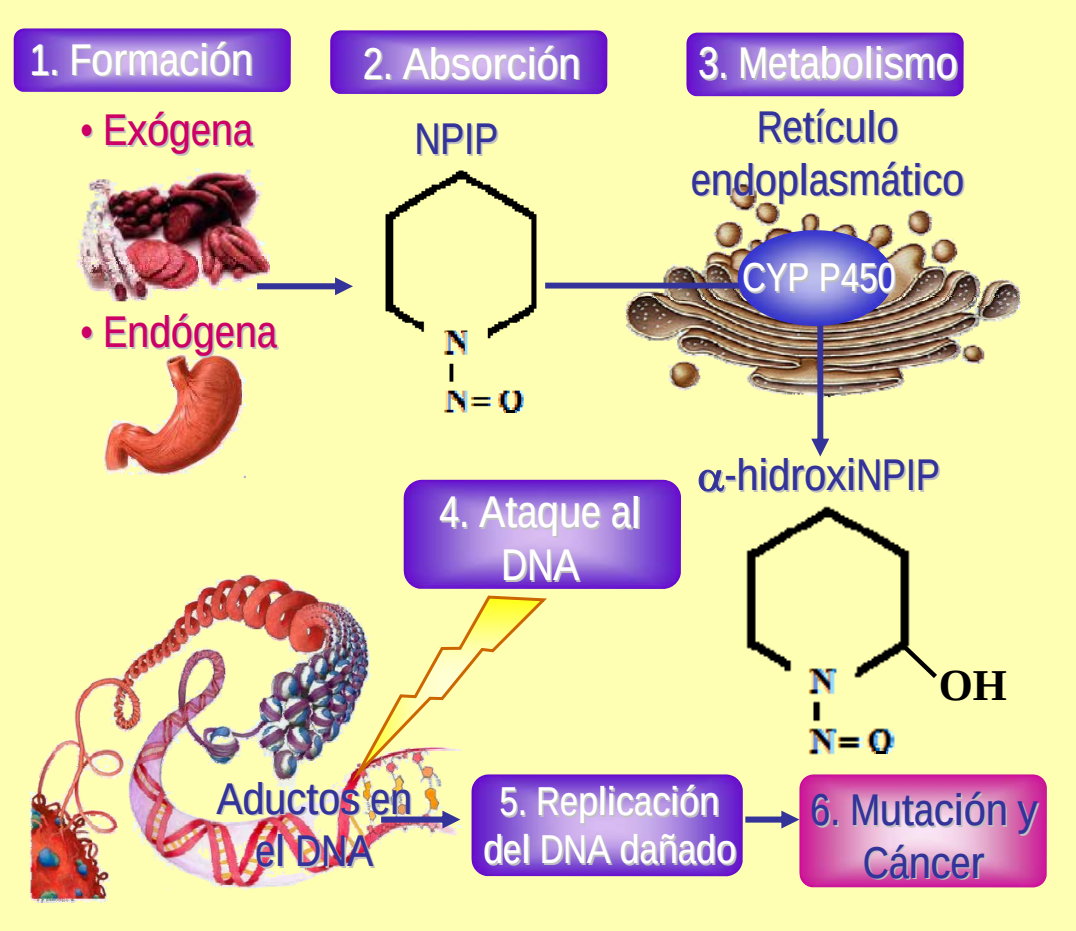

Figura 1. Carcinogénesis inducida por las N-nitrosaminas.

la detoxificación, y la interacción covalente de las especies reactivas con el DNA, produciendo el consecuente daño genotóxico. Por el contrario, la promoción se considera un proceso relativamente lento y reversible en el que se produce la proliferación y la acumulación de las células pre-neoplásicas. Por último, la progresión implica el crecimiento de un tumor con un alto potencial invasivo y metastásico. La **Figura 1** muestra la carcinogénesis inducida por las N-nitrosaminas.

El efecto cancerígeno desarrollado por las N-nitrosaminas se ha analizado en un elevado número de especies animales, incluyendo mamíferos, aves, peces y anfibios. Las N-nitrosaminas de estructura cíclica mayoritarias en la dieta, como la NPYR y la NPIP, han demostrado ser potentes carcinógenos en bioensayos realizados con roedores, encontrándose una alta incidencia de tumoración utilizando dosis diarias menores de 1 mg/kg de peso durante una exposición prolongada (Eisenbrand *et al.,* 1980). Sin embargo, Takayama *et al.* (2008) han observado que la exposición crónica a la NPIP provoca la aparición de tumores malignos en primates pero requiere dosis más elevadas, entre 40 mg/kg (vía intraperitoneal) y 400 mg/kg (vía oral). Por el contrario, Lijinsky y Reuber (1983) estudiaron en ratas la carcinogénesis producida por la NDBA, concluyendo que es un carcinógeno mucho más débil que otros N-nitroso compuestos en esta especie animal, ya que el 80% de los animales tratados con una dosis elevada [2 mM (0,33 mg/ml)] sobrevivieron durante 83 semanas.

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

Las N-nitrosaminas de estructura cíclica inducen tumores en un amplio rango de localizaciones tisulares (Wong *et al.,* 2003). La NPIP causa tumores en esófago, y también en cavidad nasal, hígado y estómago, mientras que su homóloga, la NPYR induce principalmente tumores en hígado, pero no en esófago de ratas (Druckrey *et al.,* 1967; Gray *et al.,* 1991). Wong *et al.* (2003) atribuyeron los diferentes efectos carcinogénicos a diferencias

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

En cuanto a la NDBA, es el primer carcinógeno de vejiga urinaria identificado en ratas, pero también produce tumores en pulmón, estómago e hígado (Druckrey *et al.*, 1967). Este compuesto se metaboliza en los hepatocitos, y el metabolito resultante se elimina en la orina, originando lesiones tumorales en la vejiga urinaria. Okajima *et al.* (1981) hallaron cistitis e hiperplasia en estadíos iniciales, que progresaron a papilomas y carcinomas de la vejiga urinaria en estadíos finales en perros a los que se les administraba la N-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina, metabolito resultante de la bioactivación hepática de la NDBA.

Por lo tanto, la susceptibilidad de un tejido al proceso cancerígeno estará asociada a la competencia metabólica de dicho tejido para convertir estos procarcinógenos en metabolitos carcinogénicos y, a la unión de estos metabolitos al DNA celular (Fujita y Kamataki, 2001). La **Tabla 1** muestra la actividad carcinogénica de la NPIP y de la NDBA, así como el alimento implicado.

Tabla 1. Actividad carcinogénica de la NPIP y de la NDBA (Tricker y Preussmann, 1991).

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

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

La genotoxicidad es la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos tóxicos heredables o no, dependiendo de si afectan a células germinales o a somáticas, respectivamente. Como consecuencia de dichos efectos tóxicos aparecen procesos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis, siendo estos en ocasiones de naturaleza irreversible. Sin embargo, el daño ocasionado en el DNA por la actividad de las N-nitrosaminas, se produce sólo en las células somáticas (Cameán y Repetto, 2007). Las N-nitrosaminas necesitan de un proceso de bioactivación para generar especies que reaccionen con el DNA. Este hecho hace que sean consideradas como genotóxicos indirectos (Fujita y Kamataki, 2001).

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

Daño alquilativo al DNA

La principal lesión al DNA inducida por las N-nitrosaminas es el daño alquilativo. Se sospecha que las N-nitrosaminas inducen efectos letales en las células e inician el proceso carcinogénico como resultado de la transferencia de un grupo alquilo (metilo, etilo, propilo o butilo) al DNA (Drabløs *et al.*, 2004).

Por primera vez en 1967, Magee y Barnes demostraron que la NDMA inducía un daño alquilativo al DNA. Tras la activación metabólica de las N-nitrosaminas se generan especies reactivas, como son el ión carbonio y el ión diazonio. Estos agentes tienen la capacidad de

producir alquilaciones en diferentes radicales de las bases nitrogenadas del DNA (Drabløs *et al.*, 2004). Las principales posiciones de alquilación del DNA son el N-3, -7 y O-6 de la guanina, el N-1,-3 y -7 de la adenina, el N-3, O-4 y O-2 de la timina y el N-3 y O-2 de la citosina, tal como se representa en la **Figura 2**.

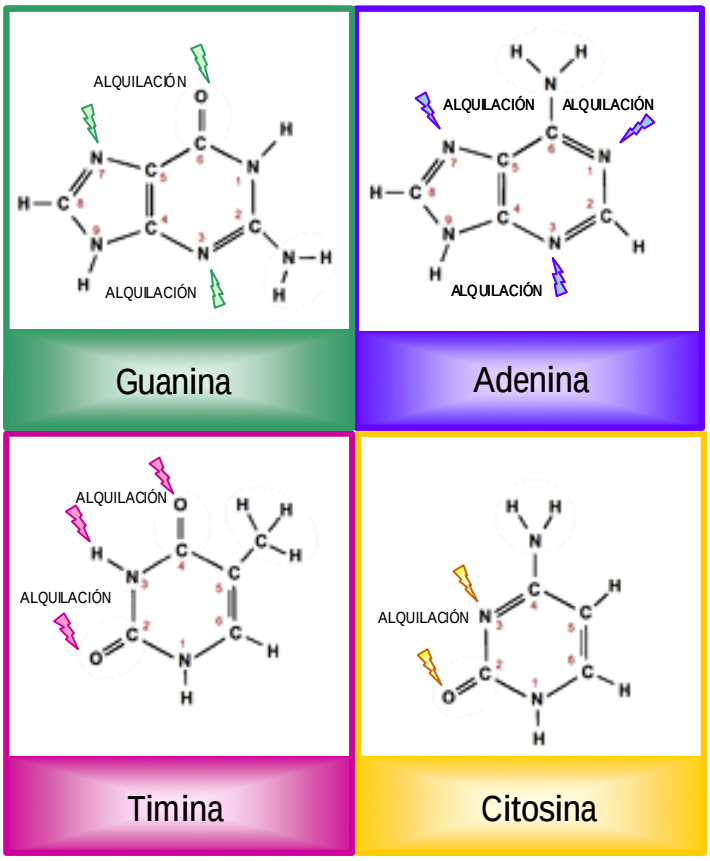

Figura 2. Principales posiciones de alquilación del DNA (Drabløs *et al.*, 2004).

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

la guanina, dando lugar a la formación de la O^6 butilguanina y la O^6-4hidroxibutilguanina (Airoldi *et al.,* 1994).

Un estudio de carcinogenicidad en ratas tratadas con la NDBA mostró que los niveles de O^6 butilguanina y O^6-4hidroxibutilguanina hallados en la vejiga urinaria eran 10 veces superiores a los detectados a nivel hepático (Airoldi *et al.,* 1994). El bajo contenido en la O^6 butilguanina y la O^6-4hidroxibutilguanina en el hígado podría ser resultado de una elevada actividad de la enzima O^6 alquilguanina DNA alquiltransferasa (AT) hepática (Gerson, 2004). Esto explicaría por qué la NDBA en ratas ejerce sus efectos carcinogénicos principalmente en la vejiga urinaria (Druckrey *et al.,* 1967).

Las O^6 alquilguaninas son reparadas en el DNA por la AT (**Figura 3 A**). Las ATs principalmente catalizan la transferencia del grupo metilo de la posición O6 de la guanina de la doble cadena del DNA a un residuo cisteína de su propia secuencia, restaurando así la guanina en el DNA (Gerson, 2004). Esta proteína no es específica para grupos metilo (Drabløs *et al.,* 2004), ya que las alquiltransferasas aisladas del hígado de rata, de los tejidos humanos, del hígado de mono y de *Escherichia coli* actúan también sobre la O^6 etilguanina. Por ello, la O^6 butilguanina y la O^6-4hidroxibutilguanina pueden ser también sustratos de esta enzima reparadora, aunque el índice de eliminación disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena alquilo.

Cuando la enzima reparadora se encuentra alterada, lesiones como la O^6 butilguanina y la O^6-4hidroxibutilguanina pueden acumularse en el DNA (**Figura 3 B**). La presencia de estas lesiones provoca bien la rotura de la cadena de DNA o bien la transición del par guanina-citosina a adenina-timina [GC:AT] que produce mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. La alteración en la expresión de estos genes conduce a un desequilibrio en el control del crecimiento celular (O'Brien y Brown, 2006).

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

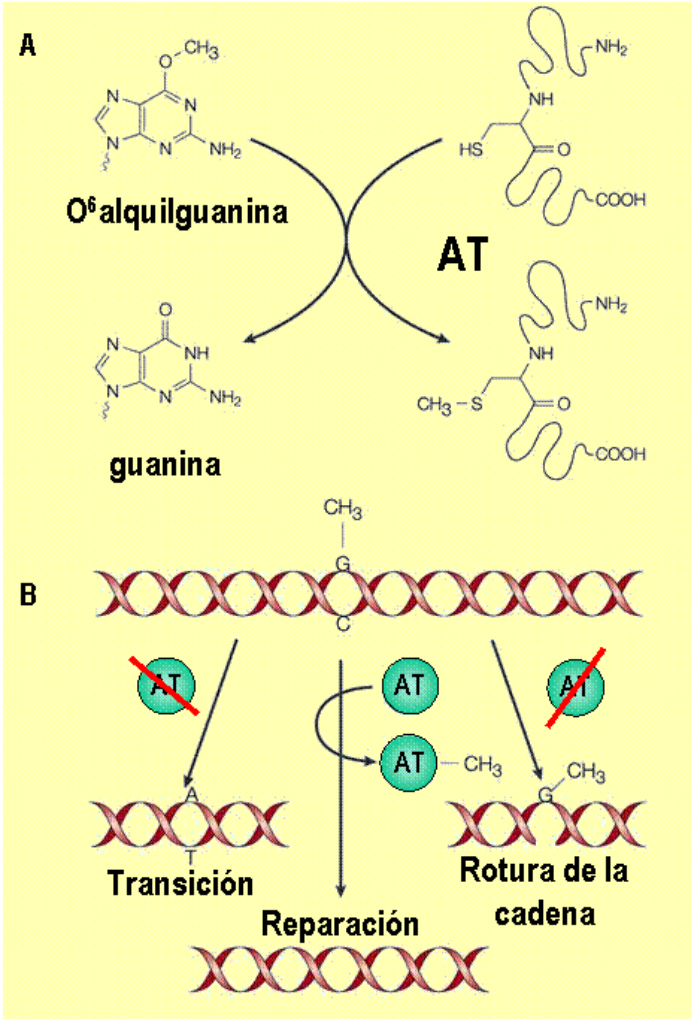

Figura 3. Mecanismo de reparación de la O^6 alquilguanina DNA alquiltransferasa (AT) (Gerson, 2004).

núcleo para interaccionar con el DNA. Además, estos grupos butilo son altamente reactivos, de tal forma que reaccionan rápidamente con las proteínas, ya que están más próximas que el DNA.

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

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

Daño oxidativo al DNA

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

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan EROs, ya que generalmente son más reactivas que la molécula de oxígeno en su estado fundamental. EROs es un término global utilizado para referirse tanto a radicales libres oxigenados como a otros derivados del oxígeno no radicales con capacidad de generar radicales libres. Entre las EROs que se producen en las células encontramos el anión superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) y el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$), y también otras especies no radicales [(el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno molecular "singlete" ($^1O_2$)] (Rigas y Sun, 2008). Además, existen también especies reactivas del nitrógeno (ERNs) (Moncada y Higgs, 1991), como el óxido nítrico ($ON^{\bullet}$) y el peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), entre otros, los cuales pueden inducir un daño *per se* o combinarse con las EROs para aumentar o atenuar el daño oxidativo.

Las EROs se pueden generar en todo el organismo a partir de fuentes endógenas, como son los productos de la respiración celular o de la respuesta inflamatoria, y también proceder de fuentes exógenas como consecuencia del metabolismo de los carcinógenos (el benceno, la aflatoxina, el benzo(a)pireno [B(a)P], etc.) (**Figura 4**). En el caso concreto de las N-nitrosaminas, el metabolismo oxidativo a través del citocromo P450 (CYP450) genera una variedad de especies radicales y no radicales, responsables de los efectos tóxicos de estos carcinógenos (Finkel y Holbrook, 2000). El CYP450 requiere oxígeno molecular y NADPH para oxidar el sustrato resultando en la formación de H_2O_2 y de $^{\bullet}O_2^-$. Así, un aumento en la actividad del CYP450 puede favorecer el consumo acelerado del oxígeno y aumentar la producción de las EROs.

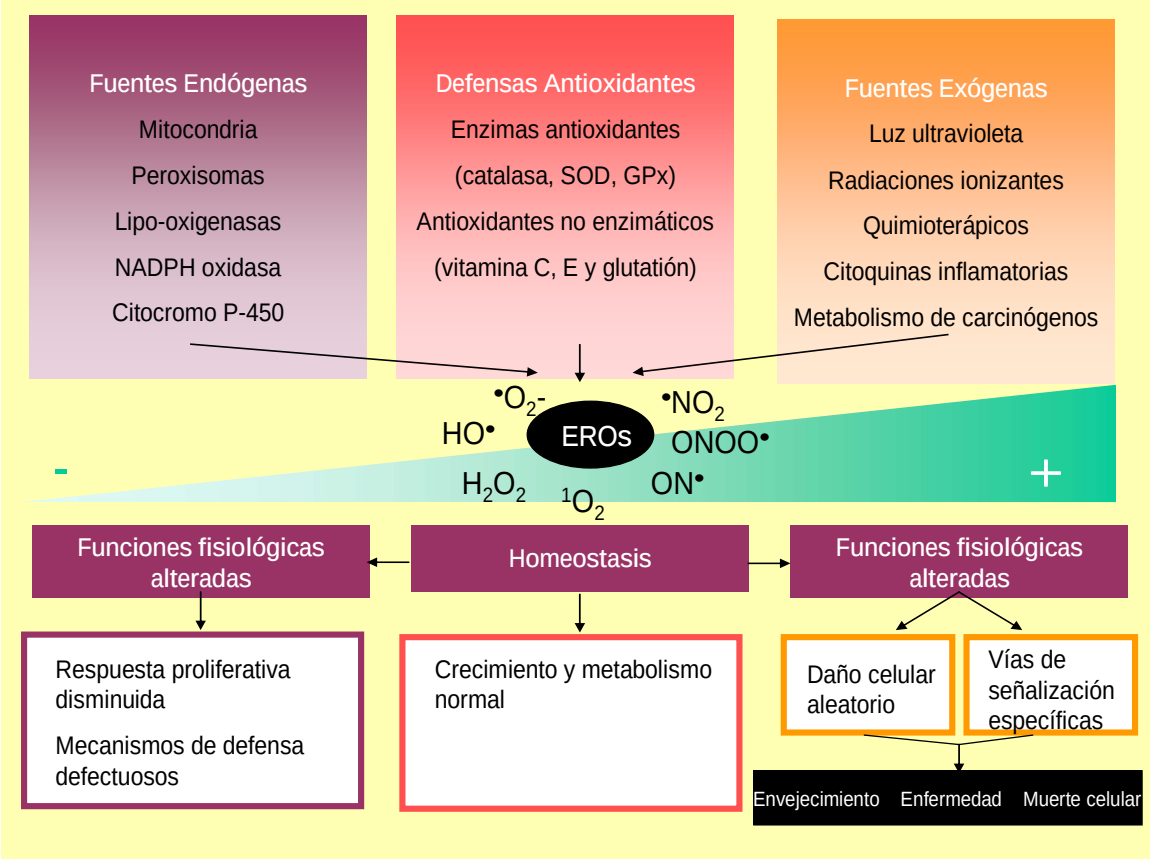

Figura 4. Fuentes y respuesta celular a las EROs (Finkel y Holbrook, 2000).

Recientes investigaciones han observado un aumento en la producción intracelular de las EROs en cultivos celulares humanos tras el tratamiento con N-nitrosaminas, como la 4-(metil-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), la NDMA y la N-nitrosomorfolina NMOR (Lin y Hollenberg, 2001; Robichová *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2006). Hiramoto *et al.*

(2002) han demostrado que se puede producir también una degradación no enzimática de las N-nitrosaminas (la NDMA y la NDEA) inducida por la reacción de Fenton, provocando la liberación del $ON^{\bullet}$. Si el $ON^{\bullet}$ reacciona con las EROs puede dar lugar a la formación de otras ERNs, como el dióxido de nitrógeno ($^{\bullet}NO_2$) y otros óxidos del nitrógeno (Williams y Jeffrey, 2000). Así, la reacción del $ON^{\bullet}$ con el $^{\bullet}O_2^-$ da lugar a la formación del $ONOO^{\bullet}$, una especie altamente reactiva que causa daño oxidativo y nitrativo al DNA.

Las EROs atacan todo tipo de moléculas biológicas, incluyendo sustratos lipídicos, proteínas y RNA aunque el DNA es la principal molécula diana de los procesos oxidativos (Kawanishi *et al.*, 2006). Por lo tanto, las EROs se consideran genotóxicas y están implicadas en el desarrollo de procesos carcinogénicos y enfermedades degenerativas (Evans, 2004; Loft y MØller, 2006). Una de las lesiones oxidativas más comunes, descubierta por Kasai y Nishimura (1984), es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), lesión oxidativa de la guanina que se forma a partir de la oxidación de la 2'-deoxiguanosina (dG) (**Figura 5**). Además, su base libre, la 8-hidroxiguanina (8-OHG), se utiliza como indicador de la lesión oxidativa y su determinación en la orina puede ser un marcador útil de la lesión del DNA.

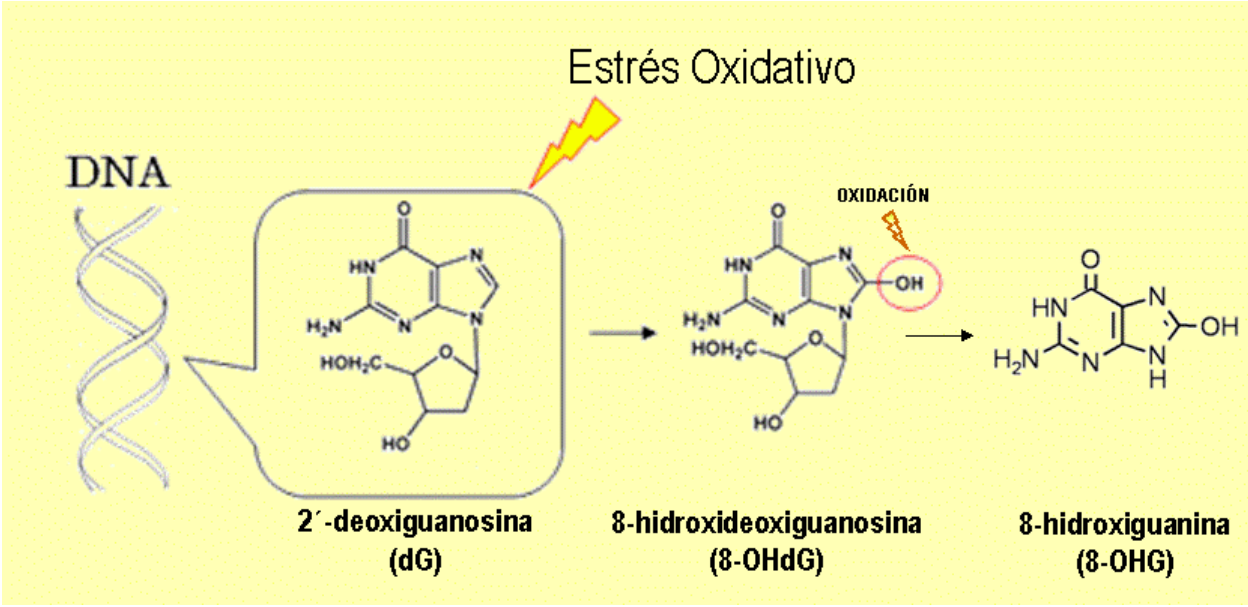

Figura 5. Estructura química de la 2´-deoxiguanina (dG), de la 8-hidrodeoxiguanina (8-OHdG) y de la 8-hidroxiguanina (8-OHG).

Cabe destacar que el tipo de lesión oxidativa generada en el DNA depende de la EROs que la produce, así el $^1O_2$ ataca preferentemente a la guanina e induce la formación de la 8-

OHdG (Epe, 1991). Esta a su vez puede conducir a una transición del par GC-AT, que podría ser la desencadenante del proceso cancerígeno. De hecho, en tumores humanos se ha comprobado que las transiciones del par GC-AT son las mutaciones que con mayor frecuencia se producen en el gen supresor de tumores *p53* (Harris y Hollstein, 1993). Por el contrario, el $^{\bullet}O_2^-$ y el H_2O_2 tienen muy poca reactividad para inducir este tipo de modificaciones (Fischer-Nielsen *et al.*, 1994), mientras que el $HO^{\bullet}$ genera una gran variedad de modificaciones en los cuatro tipos de bases nitrogenadas del DNA (Dizdaroglu, 1994).

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

Todos estas investigaciones preliminares han impulsado el estudio del daño oxidativo al DNA inducido por otras N-nitrosaminas presentes en los alimentos, como la NDMA. Lin y Hollenberg (2001) observaron un aumento en los niveles de la 8-OHdG en células GM2E1 (las cuales expresan la isoforma enzimática CYP 2E1) tratadas con la NDMA. Así, las EROs producidas durante la activación metabólica de la NDMA podrían contribuir a sus efectos genotóxicos.

La eliminación de estas lesiones oxidativas se produce a través de la vía de reparación por escisión de bases (REB). Esto implica la ruptura del enlace glucosídico de las bases oxidadas por las DNA glicosilasas y la subsiguiente eliminación del sitio ábasico resultante por las endonucleasas. Varias DNA glicosilasas han sido aisladas y caracterizadas. Éstas incluyen principalmente la formamidopirimidina-DNA glicosilasa (Fpg) y la 8-oxo-guanina glicosilasa (Ogg1), las cuales reparan las bases púricas oxidadas, incluyendo la 8-OHdG (Bacsi *et al.*, 2007), mientras que la endonucleasa III (Endo III), repara las bases pirimidínicas

oxidadas (Wang *et al.*, 2002). Jaiswal *et al.* (2001) observaron que el $ON^{\bullet}$, especie altamente reactiva, es capaz de inhibir la actividad de la Fpg y de la Ogg1. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado utilizando el ensayo cometa en combinación con DNA glicosilasas (Fpg y Endo III) que la NPIP y la NDBA pueden inducir un desequilibrio oxidativo en la célula, promoviendo la formación de la EROs y el daño oxidativo al DNA (García *et al.*, 2008).

En el caso de las ERNs, el $ONOO^{\bullet}$ puede mediar la formación de la 8-OHdG y de la 8-nitroguanina, ésta última es considerada un marcador del daño nitrativo al DNA (Yermilov *et al.*, 1995). Akaike *et al.* (2003) demostraron que la 8-nitroguanina se origina a partir de la formación del $ON^{\bullet}$ asociada a la inflamación en ratones con neumonía viral. Esta lesión es químicamente inestable y puede ser liberada espontáneamente resultando en la formación de un sitio apurínico (Yermilov *et al.*, 1995) (**Figura 6**). Por lo tanto, la 8-nitroguanina es una potente lesión mutagénica del DNA que conduce a la carcinogénesis, al igual que la 8-OHdG.

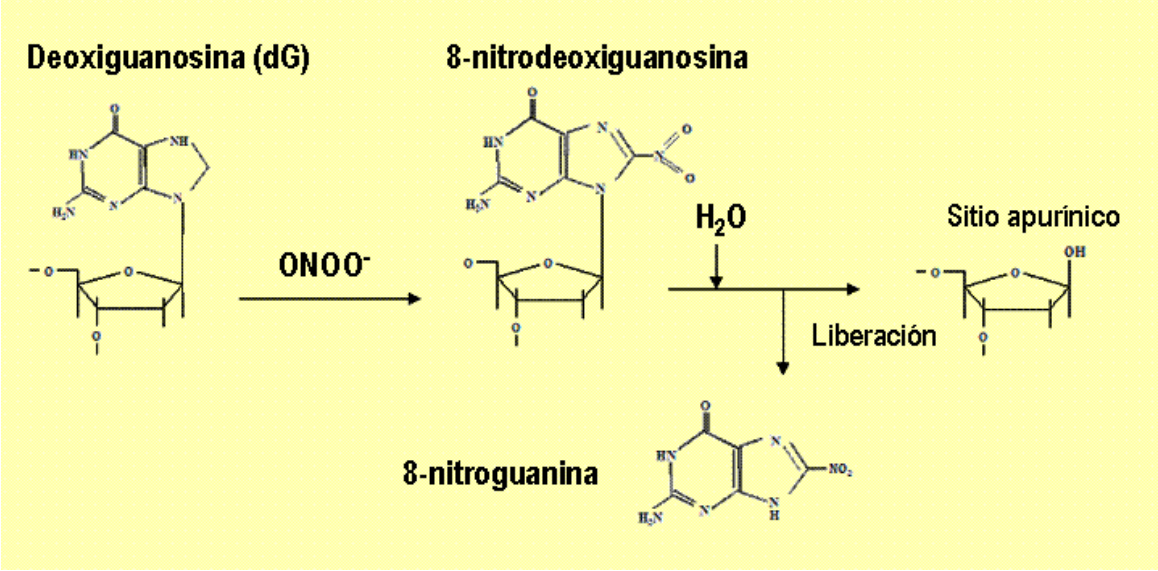

Figura 6. Formación de un sitio apurínico a partir de la 8-nitroguanina (Kawanishi *et al.*, 2006).

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

BIBLIOGRAFÍA

Airoldi, L., Magagnotti, C., Bonfanti, M., Chiappetta, L., Lolli, M., Medana, C., De Gregorio, G. y Fanelli R. 1994. Detection of O^6-butyl and O^6-(4-hydroxybutyl)guanine in urothelial and hepatic DNA of rats given the bladder carcinogen N-nitrosobutyl(4-hydroxybutyl)amine. Carcinogenesis 15: 2297-2301.

Akaike, T., Okamoto, S., Sawa, T., Yoshitake, J., Tamura, F., Ichimori, K., Miyazaki, K., Sasamoto, K. y Maeda H. 2003. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of Unites States of America 100: 685-690.

Bacsi, A., Chodaczek, G., Hazra, T.K., Konkel, D. y Boldogh, I. 2007. Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblasts cells. Mechanisms of Ageing and Development 128: 637-649.

Barnes, J.M. y Magee, P.N. 1954. Toxic properties of dimethylnitrosamine. British Journal of Industrial Medicine 11: 167-174.

Cameán, A.M y Repetto, R. Toxicología Alimentaria. Madrid: Díaz de Santos, 2007.

Chung, F.L. y Xu, Y. 1992. Increased 8 oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamineo)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. Carcinogenesis 13: 1260-1272.

Chung, F.L. 1999. The prevention of lung cancer induced by a tobacco-specific carcinogen rodents by green and black tea. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 220: 244-248.

Dizdaroglu, M. 1994. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas cromatography-mass spectometry. Methods in Enzymology 234: 3-16.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., VaagbØ, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G. y Krokan, H.E. 2004. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mecanisms and medical significance. DNA repair 3: 1389-1407.

Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. y Schmihl, D. 1967. Organotrope carcinogen wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitroeoverbindungen an BD-ratten. Krebsforschung 69: 103-201.

Eisenbrand, G., Habs, M., Schmähl, D. y Preussmann, R. 1980. Carcinogenicity of N-nitroso-3-hydroxypyrrolidine and dose-response study with N-nitrosopiperidine in rats. IARC Scientific Publications 31: 657-666.

Epe, B. 1991. Genotoxicity of singlet oxygen. Chemico-Biological Interactions 80: 239-260.

Evans, M.D., Dizdaroglu, M. y Cooke, M.S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation Research 567: 1-61.

Feig, D.I., Reid, T.M. y Loeb L.A. 1994. Reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Research 54: 1890s-1894s

Finkel, T. y Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 208: 239-247.

Fischer-Nielsen, A., Jeding, I.B. y Loft, S. 1994. Radiation induced formation of 8-hydroxy-2´-deoxyguanosine and its prevention by scavengers. Carcinogenesis 15: 1609-1612.

Freund, H.A. 1937. Clinical manifestation and studies in parenchymatous hepatitis. Annals of Internal Medicine 10: 1144-1155.

Fujita, K. y Kamataki, T. 2001. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. Mutation Research 483: 35-41.

García, A., Haza, A.I., Arranz, N., Delgado, E. y Morales, P. 2008. Efecto protector de compuestos organosulfurados, isotiocianatos y vitamina C frente al daño oxidativo y alquilativo al DNA inducido por N-Nitrosaminas. Alimentaria 391: 104-105.

Gerson, S.L. 2004. MGMT: its role in cancer etiology and cancer therapeutics. Nature Reviews. Cancer 4: 296-307.

Gray, R., Peto, R., Brantom, P. y Grasso, P. 1991. Chronic nitrosamine ingestion in 1040 rodents: the effect of the choice of nitrosamine, the species studied, and the age of starting exposure. Cancer Research 51: 6470-6491.

Hakura, A., Shimada, H., Nakajima, M., Sui, H., Kitamoto, S., Suzuki, S. y Satoh, T. 2005. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. Mutagenesis 20: 217-228.

Harris, C.C. y Hollstein, M. 1993. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. The New England Journal of Medicine 329: 1318-1327.

Hecht, S.S. 1994. Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines- a model for cancer prevention strategies. Drug Metabolism Reviews 26: 373-390.

Hecht, S.S. 2008. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. Chemical Research in Toxicology 21: 160-171.

Hernández, M. y Sastre, A. Carcinógenos y anticarcinógenos de la dieta. En: Tratado de Nutrición. Madrid: Díaz de Santos, 1999, Pág. 1147-1157.

Hiramoto, K., Ryuno, Y. y Kikugawa, K. 2002. Decomposition of N-nitrosamines, and concomitant release of nitric oxide by Fenton reagent under physiological conditions. Mutation Research 520: 103-111.

Jaiswal, M., LaRusso, N.F,, Nishioka, N., Nakabeppu, Y. y Gores, G.J. 2001. Human OGG1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. Cancer Research 61: 6388-6393.

Kasai, H. y Nishimura, S. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. Nucleic Acids Research 12: 2137-2145.

Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S. y Ma, N. 2006. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. Biological Chemistry 387: 365-372.

Kohen, R. y Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology 30: 620-650.

Leanderson, P. y Tagesson, C. 1992. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and enduclease activation. Chemico-Biological Interactions 810: 197-208.

Lijinsky, W. y Reuber, M.D. 1983. Carcinogenesis in fischer rats by nitrosodipropylamine, nitrosodibutylamine and nitrosobis (2-oxopropyl)amine given by gavage. Cancer Letters 19: 207-213.

Lijinsky, W., Keefer, L., Loo, J. y Roos, A.E. 1973. Studies of alkylation of nucleic acids by cyclic Nitrosamines. Cancer Research 33: 1634-1641.

Lin, H.L. y Hollenberg, P.F. 2001. N-Nitrosodimethylamine-mediated formation of oxidized and methylated DNA bases in a cytochrome P450 2E1 expressing cell Line. Chemical Research in Toxicology 14: 562-566.

Lin, K., Shen, W., Shen, Z., Cai, S. y Wu, Y. 2003. Estimation of the potential for nitrosation and its inhibition in subjects from high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. Internacional Journal of Cancer 107: 891-895.

Liu, C.Y., Pan, P.C., Wu, M.T., Ho, C.K., Xu, X., Yi, L., Smith, T.J. y Christiani, D.C. 2006. Dietary exposure to nitrites and nitrosamines is associated with childhood acute leukemia. AACR Meeting Abstracts 473–c.

Loft, S. y Møller, P. 2006. Oxidative DNA damage and human cancer: need for cohort studies. Antioxidants & Redox Signaling 8: 1021-1031.

Magee, P.N. y Barnes, J.M. 1967. Carcinogenic nitroso compounds. Advances in Cancer Research 10: 163-246.

Moncada, S. y Higgs, E.A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, patology and clinical relevance. European Journal of Clinical Investigation 21: 361-374.

Murdok, D.J.L., Barnett, Y.A. y Barnett, C.R. 2004. DNA damage and cytotoxicity in pancreatic b-cells expressing human CYP2E1. Biochemical Pharmacology 68: 523-530.

NIOSH. The National Institute for Occupational Safety and Health. N-nitroso compounds in the factory environment. Publication nº 83-114. Cincinnati: NIOSH, 1983.

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

Okajima, E., Hiramatsu, T., Hirao, K., Ijuin, M., Hirao, Y., Babaya, K., Ikuma, S., Ohara, S., Shiomi, T. y Hijioka, T. 1981. Urinary Bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. Cancer Research 41: 1958-1966.

Rigas, B. y Sun, Y. 2008. Induction of oxidative stress as a mechanism of action of chemopreventive agents against cancer. British Journal of Cancer 98: 1157-1160.

Rigel, D.S., Friedman, R., Dzubow, L.M., Reintgen, D.S., Bystryn, J.C. y Marks, R. Cáncer de piel. En: Bases biológicas y epidemiológicas del cáncer de piel. Factores etiológicos en el cáncer de piel: ambientales y biológicos. España: Elservier, 2006, Pág. 61-71.

Robichová, S., Slamenová, D., Gábelová, A., Sedlák, J. y Jakubikova, J. 2004. An investigation of the genotoxic effects of N-nitrosomorpholine in mammalian cells. Chemico-Biological Interactions 148: 163-171.

Rom, W.N. y Markowitz, S.B. Environmental and occupational medicine. Lippincott: 2006.

Shu, L. y Hollenberg, P. 1996. Identification of cytochrome P450 isozymes in the metabolismo of N-nitrosodipropyl-,N-nitrosodibutyl- and N-nitroso-n-butyl-n-propylamine. Carcinogenesis 17: 839-848.

Sipowicz, M.A., Amin, S., Desai, D., Kasprzak, K.S. y Anderson, L.M. 1997. Oxidative DNA damage in tissues of pregnant female mice and fetuses caused by the tobacco-specific nitrosamine, 4-(methylnitrosamineo)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Cancer Letters 117: 87-91.

Takayama, S., Thorgeirsson, U.P. y Adamson, R. 2008. Chemical carcinogenesis studies in non human primates. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences 84: 176-188.

Tricker, A.R. y Preussmann, R. 1991. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. Mutation Research 259: 277-289.

Wang, M., Lao, Y., Cheng, G., Shi, Y., Villalta, P.W., Nishikawa, A. y Hecht, S.S. 2007. Analysis of adducts in hepatic DNA of rats treated with N-Nitrosopyrrolidine. Chemical Research in Toxicolology 20: 634-640.

Wang, T.S., Chung, C.H., Wang, A.S.S., Bau, D.T., Samikkannu, T., Jan, K.Y., Cheng, Y.M. y Lee, T.C. 2002. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. Chemical Research in Toxicology 15: 1254-1258.

Williams, G.M. y Jeffrey A.M. 2000. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 283-292.

Wong, H.L., Murphy, S.E., Wang, M. y Hecht, S,S. 2003. Comparative metabolism of N-nitrosopiperidine and N-nitrosopyrrolidine by rat liver and esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. Carcinogenesis 24: 291-300.

Xu, Y., Ho, C.T., Amin, S.G., Han, C. y Chung, F.L. 1992. Inhibition of tobaco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. Cancer Research 52: 3875-3879.

Yeh, S.L., Wang, W.Y., Huang, C.S. y Hu, M.L. 2006. Flavonoids suppresses the enhancing effect of β-carotene on DNA damage induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)1-butanone (NNK) in A549 cells. Chemico-Biological Interactions 160: 175-182.

Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B. y Ohshima, H. 1995. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite *in vitro*. Carcinogenesis 16: 2045-2050.

Young-Sciame, R., Wang, M., Chun, F.L. y Hecht, S. 1995. Reactions of α Acetoxi-N-nitrosopyrrolidine and α Acetoxi-N-nitrosopiperiden with deoxyguanosine: formation of N^2-Tetrahydrofyranyl and N^2-Tetrahydropyranyl adducts. Chemical Research in Toxicology 8: 607-616.

Zabala, A. 2002. Actividad antiproliferativa de bacterias lácticas de origen alimentario y humano y su efecto protector frente a la citotoxicidad de N-nitrosaminas volátiles. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.