

00387

14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO MODULADOR DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA  
DIETA FRENTE AL PROCESO DE NITROSACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. PATRICIA RAMÍREZ VICTORIA

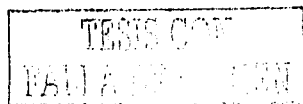
DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH ISABEL GUZMÁN RINCÓN

MÉXICO, D. F.



MAYO, 2003

COORDINACIÓN



A



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 esta 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.



REPÚBLICA NACIONAL  
 AVIENNA DE  
 MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
 POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OFICIO FCIE/DEP/0319/03

ASUNTO: Asignación de Jurado

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ  
 DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
 P R E S E N T E.

At'n: BIÓL. FRANCISCO J. INCERA UGALDE

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) M. EN C. PATRICIA RAMÍREZ VICTORIA, el jurado para presentar Examen de Grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS.

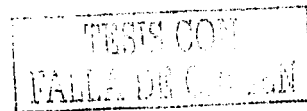
PRESIDENTE	DR.	RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
PRIMER VOCAL	DRA.	SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
SEGUNDO VOCAL	DRA.	ROSARIO RODRÍGUEZ ARNÁIZ
TERCER VOCAL	DRA.	MARÍA ESTHER DE LA ROSA DUQUE
SECRETARIO	DRA.	JUDITH ISABEL GUZMÁN RINCÓN
SUPLENTE	DR.	JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
SUPLENTE	DR.	MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

El título de la tesis es:

"Efecto modulador de algunos componentes de la dieta frente al proceso de nitrosación"

bajo la dirección del (a):

DRA. JUDITH ISABEL GUZMÁN RINCÓN



ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
 Cd. Universitaria, D. F., 8 de mayo del 2003  
 COORDINADORA DEL PROGRAMA

*Tila María Pérez Ortiz*  
 DRA. TILA MARÍA PÉREZ ORTIZ

TMPO\ASR\grf\*

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
 FIRMA: *Hebeida Cárdenas*

FECHA: *12-10-03* / *12-5-03*

B

## **AGRADECIMIENTOS**

Con sincero y profundo agradecimiento a la **Dra. Judith Guzmán Rincón** por la excelente dirección de esta tesis, por el tiempo dedicado a mi formación académica y profesional, por su confianza y apoyo, pero sobre todo por su invaluable amistad y cariño que llevaré conmigo por siempre.

Gracias Teacher

Mi más sincero agradecimiento a los Miembros del Jurado:

**Dr. Rafael Villalobos Pietrini**

**Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo**

**Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz**

**Dra. María Esther de la Rosa Duque**

**Dra. Judith Isabel Guzmán Rincón**

**Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre**

**Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**

Por el tiempo dedicado a la revisión de este manuscrito que enriqueció su contenido con sus valiosos comentarios y sugerencias.

Gracias por su gentileza y apoyo.



Quiero manifestar un especial agradecimiento a la **Dra. Sandra Gómez Arroyo** y al **Dr. Javier Espinosa Aguirre** que conformaron mi Comité Tutoral y a quienes debo gran parte de mi formación profesional, ya que estuvieron conmigo desde mis inicios en el posgrado apoyado y dirigiendo mis actividades académicas con gran acierto. Aprecio sobre todo la amistad que surgió durante este tiempo.

**Muchas gracias**

Mis agradecimientos se hacen extensivos para:

El CONACyT por la beca proporcionada durante mi estancia en el posgrado.

Las autoridades del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

El personal del Departamento de Biología del ININ por el apoyo brindado.

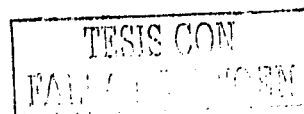
La Dra. Julieta Rubio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por su ayuda académica y técnica.

La Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña de la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades prestadas para la realización de los análisis químicos.

La Dra. Anaberta Cardador de la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo académico y técnico durante mis estancias en la UAQ.

La Dra. Judith Jiménez Guzmán de la Universidad Autónoma Metropolitana por la ayuda recibida en los análisis espectrofotométricos

La División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias, UNAM por el apoyo para la impresión de esta tesis.



# **DEDICATORIAS**

**Dedico este trabajo con profundo amor y agradecimiento:**

**A mi querido Dios**

**No solo porque me ha permitido culminar esta etapa tan importante en mi vida, sino porque me ha dado una familia maravillosa, una vida plena, amigos entrañables e innumerables satisfacciones.**

**A mis padres**

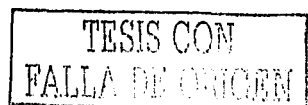
**María de la Luz Victoria Espinoza  
Jesús Ramírez Espinosa**

**Al amor de mi vida**

**Frank**

**A mi adorado hijito**

**Francisco Miguel**



**A mis queridos hermanos**

**Tere y Guillermo, Carlos, Cristina, Gabriel y Emilia,  
Adriana, Kate, Ale y David**

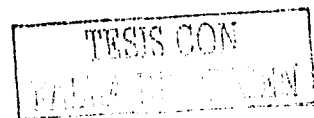
**A mis amados sobrinos**

**Gabriel, Michelle, Alejandra, Daniel, Alonso,  
Diana, Abraham y Uriel**

**A mis amigos inseparables**

**Xóchitl, Elizabeth, María, Lanto, Miguel, Jesús y Lanello**

F



# CONTENIDO

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Compuestos <i>N</i> -nitroso	2
1.1.1. Precursores de los CNO	3
1.1.2. Incidencia y Exposición	4
1.1.3. Metabolismo de los CNO	5
1.1.4. Formación endógena de los CNO y la prueba de la nitrosoprolina	7
1.1.5. Mutagénesis y carcinogenesis de los CNO	9
1.2. Antimutagenesis	11
1.2.1. Inhibidores de los compuestos nitroso	11
1.2.1.1. Vitaminas	13
1.2.1.2. Compuestos aislados de plantas	16
1.2.1.3. Metales	18
1.2.1.4. Mezclas complejas	19
1.2.1.5. Otros	21
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba	24
1.3.1. Citocromos P450 de <i>Drosophila</i>	24
1.3.2. Prueba de mutación y recombinación somáticas	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. General	28
2.2. Particulares	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Compuestos químicos	29
3.2. Determinaciones químicas	29
3.2.1. Obtención de los homogeneizados de chile ( <i>Capsicum spp</i> )	29
3.2.2. Determinación del ácido ascórbico	29
3.2.3. Determinación de la capsaicina y la clorofilina	30
3.3. Ensayos biológicos	30
3.3.1. Líneas y cruza de <i>Drosophila melanogaster</i>	30
3.3.2. Diseño experimental	31
3.3.2.1. Concentraciones	32
3.3.2.2. Tratamientos	32
3.3.3. Procesamiento del material y análisis estadístico	34



3.4. Reacción de nitrosación <i>in vitro</i>	37
3.4.1. Análisis de los espectros de absorción de los precursores y de la <i>N</i> -nitrosometilurea	38
3.4.2. Reacción de nitrosación a partir de sus precursores	38
3.4.3. Determinación del porcentaje del producto final de la reacción de nitrosación	38
3.4.4. Cinética de formación del producto final de la reacción de nitrosación	38
3.5. Análisis espectrofotométricos del ASC y CLO con la mezcla MU+NS	38
3.5.1. Ácido ascórbico	39
3.5.2. Clorofilina	40
3.5.3. Análisis estadístico	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Determinaciones	41
4.1.1. Obtención de lo homogeneizados de chile	41
4.1.2. Determinación del ácido ascórbico	41
4.1.3. Determinación de la capsaicina	42
4.1.4. Determinación de la clorofilina	42
4.2. Ensayos biológicos	43
4.2.1. Toxicidad	43
4.2.2. Evaluación genotóxica de los tratamientos simples y de las combinaciones simples	44
4.2.3. Genotoxicidad de la mezcla MU+NS y el efecto de los homogeneizados de chile	48
4.2.3.1. Cruza estándar	48
4.2.3.2. Cruza de biactivación elevada	49
4.3. Reacción de nitrosación <i>in vitro</i>	55
4.3.1. Espectros de absorción de los precursores MU y NS	55
4.3.2. Espectros de absorción de la mezcla MU+NS	55
4.3.3. Espectro de absorción de MNU y su comparación con la mezcla	56
4.3.4. Porcentaje del producto final de la reacción de nitrosación	57
4.3.5. Cinética de la reacción de nitrosación	57
4.4. Análisis espectrofotométricos del ASC y CLO con la mezcla MU+NS	61
4.4.1. Ácido ascórbico	61
4.4.2. Clorofilina	65
5. DISCUSIÓN	68
5.1. Determinación del ASC, CAP y CLO	68
5.2. Ensayos Biológicos	69
5.5.1. Genotoxicidad de la mezcla MU+NS	69
5.5.2. Efecto de los homogeneizados de chile sobre la mezcla MU+NS	71

5.3. Reacción de nitrosación <i>in vitro</i>	73
5.4. Análisis espectrofotométricos	74
5.4.1. Ácido ascórbico	74
5.4.2. Clorofilina	76
6. CONCLUSIONES	78
7. REFERENCIAS	79

1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ABREVIATURAS

A	Absorbencia	NPRO	N-nitrosoprolina
AGT	O <sup>6</sup> -alquilguanina alquiltransferasa	NPYR	N-nitrosopirrolidina
ASC	Ácido ascórbico	NS	Nitrito de sodio
BE	Cruza de bioactivación elevada	NTHZ	N-nitrosotiazolidina
CAP	Capsaicina	NTHZCA	N-nitrosotiazolidina ácido carboxílico
CLO	Clorofilina	O <sup>2</sup> alkThd	O <sup>2</sup> -alquil-timidina
CNO	Compuestos N-nitroso	O <sup>4</sup> alkThd	O <sup>4</sup> -alquil-timidina
CHI	Chilaca	O <sup>4</sup> EtThd	O <sup>4</sup> -etiltimidina
DMA	Dimetilamina	O <sup>6</sup> alkdGuo	O <sup>6</sup> -alquil-desoxiguanosina
DMBA	7-12- dimetilbenzoantraceno	O <sup>6</sup> alkG	O <sup>6</sup> -alquilguanina
EA	Espectros de absorción	O <sup>6</sup> MedGuo	O <sup>6</sup> -metil-desoxiguanosina
EC	Epicatequina	PIP	Piperazina
ECG	Galato epicatequina	POB	Chile poblano
EGC	Epigalocatequina	PRO	Prolina
EGCG	Galato epigalocatequina	SMART	Prueba de mutación y recombinación somáticas
ES	Cruza estándar	Trp-P-2	3-amino-1-metil-5H-piridol [4,3-b]indol
EtC	Etil carbamato	Vit.A	Vitamina A
FMT	Frecuencia de manchas totales	Vit.C	Vitamina C
GST	Glutación-S-transferasa	Vit.E	Vitamina E
ICH	Intercambio de cromátidas hermanas	α-TOC	α-tocoferol
MAN	Metilanilina	9cRA	Ácido retinoico 9-cis
MGMT	Metilguanina metiltransferasa		
MMS	Metil metano sulfonato		
MNNG	N-nitrosometilguanidina		
MNU	N-nitrosometilurea		
MOR	Morfolina		
MU	Metilurea		
MZN	Chile manzano		
NAB	N-nitrosoanabasina		
NAT	N-nitrosoanatabina		
NBMA	N-nitrosobenzilmetilamina		
NDBA	N-nitrosodibutilamina		
NDEA	N-nitrosodietilamina		
NDMA	N-nitrosodimetilamina		
NDPA	N-nitrosodipropilamina		
NMAN	N-nitrosometilanilina		
NMOR	N-nitrosomorfolina		
NMPz	N-nitrosomonopiperazina		
NNAL	4-(nitrosometilamina)-1-(3- piridil)-1-butanal		
NNK	4-(nitrosometilamina)-1-(3- piridil)-1-butanona		
NNN	N-nitrosornicotina		
NPIP	N-nitrosopiperidina		

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## RESUMEN

El efecto antimutagénico y el posible mecanismo de acción de algunos componentes de la dieta mexicana fueron estudiados empleando técnicas genéticas y químicas

A través de la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *Drosophila melanogaster* y por estudios espectrofotométricos se evaluó la capacidad inhibitoria de extractos de tres tipos de chile (*Capsicum spp.*): chilaca (CHI), manzano (MZN) y poblano (POB) sobre la reacción de nitrosación producida por la metil urea (MU) y el nitrito de sodio (NS).

Se administraron a larvas de 48 h. de edad de las cruzas estándar (ES) y de bioactivación elevada (BE) un tratamiento crónico simultáneo con los extractos de los chiles (12.5, 25 y 50 % v/v) en combinación con la mezcla de MU y NS (20 mM). Los resultados mostraron que las frecuencias de mutación basal fueron de 0.36 y 0.48 para las cruzas ES y BE, respectivamente. Las frecuencias de mutación producida por la reacción (MU+NS) fue de 1.73 (ES) y 26.46 (BE), esto es, 12 y 55 veces mayor a las tasas de mutación basales registradas para los grupos testigo. Sin embargo la presencia de los extractos de chile disminuyeron estas frecuencias entre un 50 % y 99 %. El extracto de MZN fue el más efectivo y el de la CHI el de menor efecto, lo que concuerda con el contenido de ácido ascórbico en los extractos siendo el MZN el que presentó los niveles más altos (104 mg/100 g), el POB el intermedio (85 mg/100 g) y la CHI el menor (47 mg/100 g). Estos resultados sugirieron que uno de los principales antimutágenos en los extractos de chile es el ácido ascórbico.

En la craza BE, que tiene niveles elevados de enzimas del citocromo P450, ocurre la mayor respuesta genotóxica y antimutagénica, indicando que este sistema está involucrado en la producción y en la inhibición del producto final de la mezcla MU+NS.

Los estudios *in vitro* mostraron que el producto final de la mezcla MU y NS es la *N*-nitrosometilurea y que el probable mecanismo antimutagénico del ácido ascórbico sobre la reacción de nitrosación es reduciendo el  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}$  ó compitiendo por el nitrito, ó ambos. Por su parte, la clorofilina pudo actuar capturando radicales libres e interceptando moléculas.

## ABSTRACT

The antimutagenic effect and the possible mechanism of action of certain foods common to the Mexican diet were studied employing genetic and chemical techniques.

Using the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* and spectrophotometry antimutagenic effects of three chili pepper extracts (*Capsicum spp.*), chilaca (CHI), manzano (MZN), and poblano (POB) against the nitrosation reaction produced by methyl urea (MU) and sodium nitrite (SN) were investigated.

Larvae, 48 h old, from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were fed in a chronic, simultaneous treatment with the chili extracts (12.5, 25 and 50 % v/v) in combination with the mixture of MU and SN (20 mM). The results showed a background mutation rate given as spots per wing of 0.36 and 0.48 for ST and HB, respectively. Mutation frequencies produced by the MU and SN mixture were 1.73 (ST) and 26.46 (HB) mutations per wing; that is, 12 and 55 times more than the background rate, respectively. However, the chili extracts decreased the above frequencies between 50 % and 99 %. The MZN chili extract was the most effective, the CHI extract was the least effective. Furthermore the MNZ extract had the highest level of ascorbic acid (104 mg/100 g), the poblano the intermediate (85 mg/100 g) and the CHI had the least (47 mg/100 g). These results suggest that one of the most active antimutagens in the chili extract is ascorbic acid.

The HB strain, that has elevated levels of cytochrome P450 enzymes, has the stronger genotoxic and antimutagenic response suggesting that the cytochrome P450 system is involved in the production and inhibition of the final product of the MU+NS mixture.

*In vitro* studies using spectrophotometry suggest that *N*-nitrosomethylurea is the final product of the MU and SN mixture, and that chlorophyllin (CLO) and ascorbic acid (ASC) interfere with the formation of this compound either by reducing  $\text{NO}_2$  to NO or competing for nitrite or both. Also the antimutagenic effect of CLO can be by scavenging free radicals, and intercepting genotoxic metabolites from the nitrosation reaction.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los hábitos alimenticios son esenciales para el desarrollo de un organismo, pero también influyen en su deterioro. Esta particularidad dual se debe a que entre los componentes de la dieta, específicamente la de humanos, se encuentran innumerables cantidades de elementos y sustancias tanto benéficas como perjudiciales que confieren esta característica (Sherman y Flaxman 2001).

Algunos de los agentes perjudiciales son conocidos como mutágenos y son compuestos (físicos o químicos) de origen natural o producidos por el hombre que alteran la estructura o la secuencia del DNA. Los mutágenos químicos se pueden dividir según su modo de acción, en agentes alquilantes, análogos de bases y agentes intercalantes que actúan directa o indirectamente a través de sus metabolitos, causando lesiones al DNA debido a la alteración, pérdida o adición de pares de bases a la molécula. También pueden producir uniones pirimídicas, rompimientos sencillos y de doble hebra, así como entrecruzamientos intra- e inter- hebra (Tuteja *et al.* 2001).

Estudios recientes sugieren una posible relación entre los mutágenos químicos presentes en la dieta, ya sea de manera natural o accidental y el desarrollo de ciertos tipos de cáncer como de estómago, esófago, nasofaríngeo, urinario y de colon, entre otros (van Poppel y van der Berg 1997). Evidencias epidemiológicas han mostrado que el cáncer de estómago (causado aparentemente por la ingesta de alimentos) es el segundo en ocurrencia a nivel mundial, superado sólo por el cáncer de pulmón (Parkin *et al.* 1999). Algunas investigaciones han demostrado que esta relación se debe a la presencia de nitritos y de óxidos de nitrógeno utilizados principalmente para preservar los alimentos. Estos compuestos reaccionan de acuerdo con las condiciones fisiológicas del organismo y se transforman en sus formas nitrosadas, conocidas como compuestos *N*-nitroso, los cuales son en su mayoría metabolitos carcinogénicos (Hirohata y Kono 1997, Palli *et al.* 2001).

## 1.1. COMPUESTOS N-NITROSO

El interés en el estudio de los compuestos *N*-nitroso (CNO) surgió en 1973, como resultado de la observación del daño en el hígado de personas ocupacionalmente expuestas a la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA). Desde entonces, se han realizado ensayos para conocer su toxicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad y metabolismo (Mirvish 1995). Los CNO se caracterizan por la presencia del grupo nitroso unido a un átomo de nitrógeno secundario ( $N=O$ ) y se dividen en nitrosaminas ( $R_1NNOR_2$ ) y nitrosamidas ( $R_1NNO.COR_2$ ). La Figura 1.1 muestra algunas nitrosaminas presentes en los alimentos.

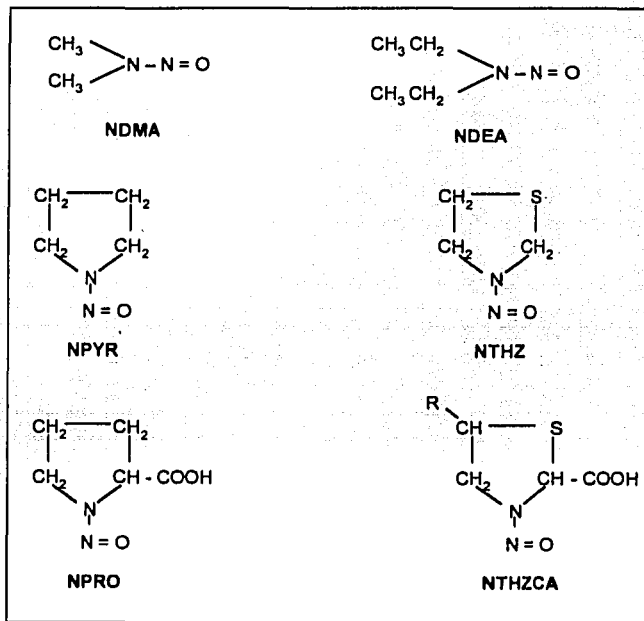


Figura 1.1. Estructura de algunas *N*-nitrosaminas presentes en alimentos  
(Tomado de Archer 1989)

NDMA=*N*-nitrosodimetilamina; NDEA=*N*-nitrosodietilamina; NPYR=*N*-nitrosopirrolidina;  
NTHZ=*N*-nitrosotiazolidina; NPRO=*N*-nitrosoprolina, NTHZCA=ácido carboxílico *N*-  
nitrosotiazolidino.



### 1.1.1. Precursores de los CNO

Los agentes precursores de los compuestos N-nitroso son de dos tipos: nitrosantes y nitrosables. En el primero se encuentran el nitrito y los óxidos de nitrógeno (dinitrógeno, tri- o tetraóxido) (Zolfigol *et al.* 2001). Sus principales funciones como aditivo en comidas y bebidas son:

- a) Inhibir la formación de toxinas generadas por *Clostridium botulinum*, que son extremadamente tóxicas y responsables de muertes por el consumo de alimentos contaminados por ellas.
- b) Dar el color rosado característico de las carnes, que es el resultado de la nitrosación del grupo hemo de la mioglobina para formar nitrosohemocromo.
- c) Evitar la oxidación del oxígeno y de los ácidos grasos. Cuando las carnes son almacenadas por semanas o meses tienden a desarrollar olores y sabores desagradables provocados por la oxidación de los ácidos grasos. No se sabe con certeza el mecanismo por el cual el nitrito inhibe esta oxidación, pero es claro que estabiliza el sabor de las carnes almacenadas (Bailey *et al.* 1991).

El segundo grupo de precursores son las aminas y las amidas secundarias, terciarias y aromáticas que son los compuestos que sufren la nitrosación. La mayoría de los alimentos derivados de animales y vegetales contienen gran cantidad de aminas y amidas, las cuales son inocuas por sí solas. Sin embargo, algunos de los métodos utilizados para preservar los alimentos pueden ayudar al incremento de sus niveles. Por ejemplo, los alimentos con alto contenido de proteínas como el pescado, al ser deshidratados y almacenados por periodos extensos, incrementan el contenido de aminas y amidas, que aunado a la cocción, favorecen la producción de compuestos nitroso (Layton *et al.* 1995). Los medicamentos, los alimentos e inclusive el agua contribuyen fundamentalmente a la presencia de estos precursores (Mirvish 1997).

### 1.1.2. Incidencia y exposición

Las vías comunes para el contacto con los CNO preformados en el medio son la inhalación y la ingestión. La exposición ocupacional, particularmente en las industrias de metales, del caucho y farmacéutica, así como el hábito de fumar, son los principales contribuyentes a la exposición exógena de estos compuestos. Por otra parte, la exposición endógena se deriva de la biosíntesis de los compuestos nitroso a partir de sus precursores (Bartsch y Spiegelhalder 1996). La Figura 1.2 muestra las principales fuentes de exposición a estos compuestos.

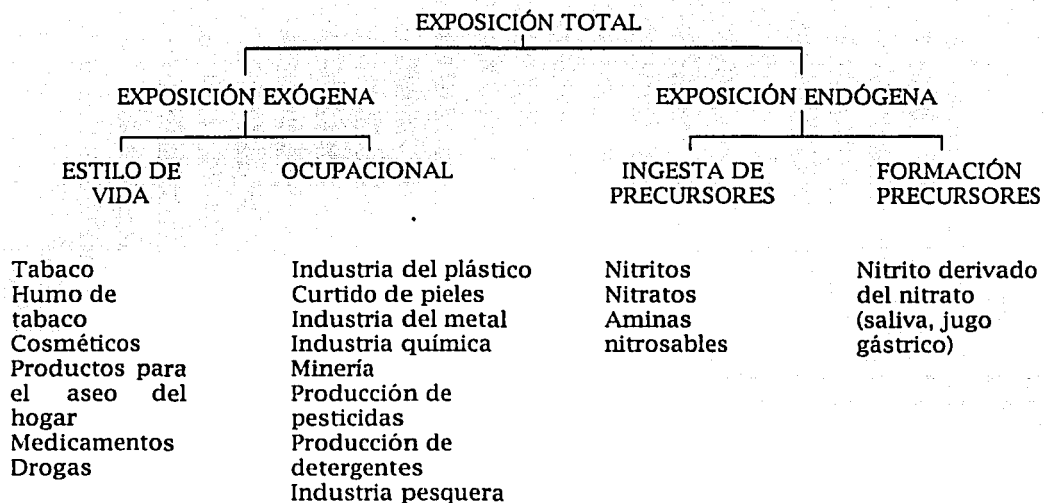


Figura 1.2 Principales fuentes de exposición a compuestos nitroso

Se conocen al menos dos vías por las cuales los CNO se producen durante el procesamiento o cocción de los alimentos. La primera es cuando los óxidos de nitrógeno (NOx) en dos de sus ocho estados de oxidación (+3 y +4) son capaces de nitrosar aminas, amidas u otros nucleófilos para formar compuestos N-, S-, O- ó C-nitroso. Por ejemplo, el nitrito en un ambiente ácido como el de las carnes procesadas, origina al dinitrógeno, tri- y tetraóxido de nitrógeno, que son capaces de nitrosar directamente a aminas o amidas (Deng *et al.* 1998). La segunda es cuando se utilizan temperaturas elevadas durante el procesamiento de alimentos en donde el nitrógeno molecular se oxida a sus formas NOx generando los CNO. Por ejemplo, durante el secado de la cebada de malta para la elaboración de cervezas y de whisky, la NDMA (y posiblemente otros compuestos S-, C-, O- ó N-nitroso) se crea cuando los compuestos NOx derivados de la combustión directa entran en contacto con aminas presentes en la malta. Es durante el proceso de fermentación que la NDMA aparece en el producto final. Un proceso similar opera cuando los alimentos son cocinados directamente en la flama, especialmente los que se asan (Bailey *et al.* 1991).

### 1.1.3. Metabolismo de los CNO

La principal vía de absorción de las nitrosaminas es a través del tracto gastrointestinal, seguido por el estómago y la vejiga; aunque existen evidencias de que también se absorben a través de la piel, pero con menor rapidez y en porcentaje bajo. Tras su absorción, las nitrosaminas se distribuyen por el torrente circulatorio y posteriormente sufren biotransformación (Mirvish *et al.* 1993).

Las nitrosaminas, como la NDMA y la N-nitrosodietilamina (NDEA), son compuestos estables que sólo se descomponen lentamente por acción de la luz o en soluciones acuosas ácidas. Necesitan de la activación metabólica para ejercer sus efectos genotóxicos y su metabolismo ocurre predominantemente en el hígado, pero puede llevarse a cabo en otros órganos como el riñón y el pulmón (Carmella *et al.* 1997). Las enzimas responsables de la activación de este tipo de carcinógenos son las oxidasas microsómicas de función mixta del citocromo P450. El metabolismo se inicia con la hidroxilación del carbón  $\alpha$  (puede ocurrir

adicionalmente una  $\beta$ - ó una  $\omega$ -hidroxilación). Estas hidroxinitrosaminas se descomponen espontáneamente para generar, monoalquilnitrosaminas, alquildiazohidróxidos y pares de iones de nitrógeno, sucesivamente. A estos dos primeros pasos se les conoce como desalquilación (Hovinen y Fishbein 1992). Los alquildiazohidróxidos se descomponen por heterólisis y forman los iones diazonio o diazoalcanos que son los metabolitos alquilantes intermedios responsables de los efectos biológicos adversos en DNA, RNA y proteínas (Huang *et al.* 1993).

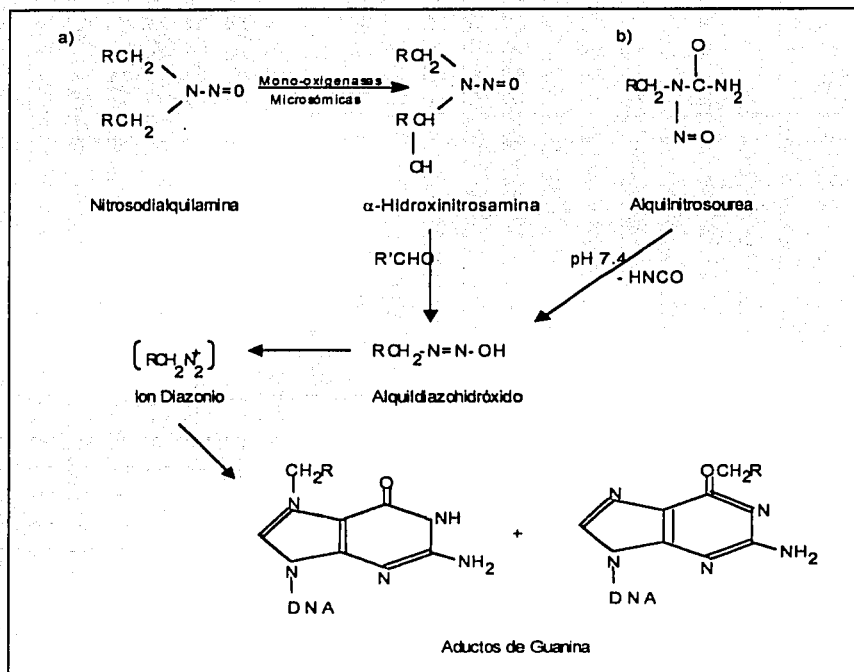


Figura 1.3. Bioactivación de los compuestos N-nitroso  
(Tomado de Archer 1989)

a) El primer paso dentro del metabolismo de las nitrosaminas es la hidroxilación del carbono  $\alpha$  a través de las enzimas microsómicas del citocromo P450. Durante este proceso se forma una  $\alpha$ -hidroxinitrosamina, que a su vez se descompone para producir un alquildiazohidróxido que genera finalmente al ion diazonio (estructura en corchetes), que son los metabolitos alquilantes intermedios responsables de los efectos biológicos inducidos a las macromoléculas. b) Por su parte, la descomposición de las nitrosamidas alquilantes intermedios ocurre por hidrólisis catalizada por bases y varía de acuerdo con el pH.

Por su lado, las nitrosamidas, como la *N*-nitrosometilurea (MNU) son termolábiles y menos estables. Ejercen su acción mutagénica de manera directa. Su metabolismo no está mediado por reacciones enzimáticas sino por su descomposición a especies alquilantes a través de la hidrólisis catalizada por bases y varía de acuerdo con el pH (Yang y Smith 1996). Sus metabolitos intermedios son muy inestables. Se ha determinado en un ambiente fisiológico que la  $\alpha$ -hidroxinitrosamina (el metabolito más estable) tiene vida media promedio de 1 a 10 segundos (Mochizuki *et al.* 1980). La Figura 1.3 muestra el metabolismo de los compuestos nitroso.

#### **1.1.4. Formación endógena de los CNO y la prueba de la nitrosoprolina**

La nitrosación endógena puede ocurrir a través de los siguientes mecanismos: (i) reacciones mediadas por bacterias, macrófagos y posiblemente células endoteliales y (ii) reacciones químicas, generadas particularmente por las condiciones ácidas del estómago. La primera de ellas puede ocurrir en sitios como boca, estómago, intestinos, vejiga urinaria y vagina. Depende en gran parte de la concentración de la flora bacteriana y de condiciones fisiológicas como la hipocloridria, anemia, uremias e infecciones prolongadas. La nitrosación a través de reacciones químicas ha sido considerada como la ruta más importante para la formación endógena de los compuestos nitroso en el estómago. Ambos mecanismos presentan factores que controlan la formación de los CNO como pH, concentración de nitrito, concentración de nitrógeno nitrosable, catalizadores/inhibidores y tiempo de incubación (Hill 1996).

La nitrosación gástrica se inicia a partir de la ingestión de los nitratos usados como preservadores en carnes, pescados, embutidos, quesos, productos fermentados y en general en alimentos perecederos. Después de que el nitrato ha sido absorbido por el tracto digestivo se supone que una cuarta parte del total ingerido es secretado a la saliva por un mecanismo de transportes de aniones en donde aparentemente sólo el 5 % del nitrato es reducido a nitrito por bacterias presentes en la cavidad oral. Al tragar la saliva, ésta eleva la concentración de

nitrito gástrico presente en condiciones normales de acidez estomacal (120  $\mu\text{g/L}$ ) favoreciendo la reacción de nitrosación (Mirvish *et al.* 1995).

La prueba de nitrosoprolina (NPRO) demostró por primera vez la formación de compuestos nitroso a partir de aminas y amidas en el estómago humano. La prueba consistió en alimentar a un hombre en ayunas con 325 mg de nitrato y 500 mg de L-prolina. Al analizar la orina secretada 24 h después, encontraron 160 nmol (23  $\mu\text{g}$ ) de prolina nitrosada que se originó bajo las condiciones ácidas normales del estómago. Esta fue la primera demostración clara de que los humanos pueden generar CNO *in vivo*. La nitrosación de la prolina es un indicador de la formación gástrica de nitrosaminas y de la capacidad nitrosante del estómago, pero no de los niveles gástricos de aminas y amidas. La nitrosación gástrica puede producir nitrosamidas u otros compuestos inestables que actúan directamente en el estómago para iniciar un proceso carcinogénico ó quizá CNO estables que induzcan cáncer en otros sitios del organismo (Ohshima y Bartsch 1981).

A partir de esta prueba se hicieron estudios *in vivo* de los CNO. En ratas F344 se evidenció la formación endógena de nitrosaminas específicas del tabaco al administrárseles (S)-nicotina y  $\text{NaNO}_2$ . Cuatro días después, se recobró su orina y se observó la presencia de tres metabolitos carcinogénicos de la nicotina, la N-nitrosornicotina (NNN), N-nitrosoanabasina (NAB) y N-nitrosoanatabina (NAT). Estos metabolitos no se encontraron en las ratas que fueron tratadas con nicotina sola o con nitrito de sodio solos, indicando que entre la nicotina y  $\text{NaNO}_2$  se produjo una reacción de nitrosación que originó a estos compuestos (Carmella *et al.* 1997).

*Drosophila melanogaster* ha sido otro de los organismos que han evidenciado la formación de los CNO *in vivo*. Utilizando la prueba de mutación y recombinación somáticas se evaluaron los efectos de la mezcla de metil urea (MU) y nitrito de sodio (NS) para producir la reacción de nitrosación, administrados por vía oral a larvas de 48 h de edad. Después de la emergencia de los organismos adultos se

observó que las frecuencias de mutaciones por ala fueron 5 veces más alta que la del testigo negativo. Los tratamientos con MU y NS por separado no generaron ningún daño. De estas observaciones se concluyó que se llevó al cabo la nitrosación endógena en donde el metabolito resultante de esta reacción fue la metilnitrosourea, proceso que se desarrolló principalmente en el tracto digestivo de las moscas de manera similar a lo que ocurre en el estómago de mamíferos. Este fue el primer trabajo en el que se evaluó esta reacción en un organismo diferente a mamíferos (Guzmán-Rincón *et al.* 1998).

#### 1.1.5. Mutagénesis y carcinogénesis de los CNO

La diferencia en la estabilidad entre nitrosaminas y nitrosamidas está correlacionada con la tendencia a generar tumores en sitios específicos. Por un lado, las nitrosamidas producen tumores en el órgano que inicialmente fue expuesto, mientras que las nitrosaminas inician tumores en sitios distantes (Bartsch y Spiegelhalter 1996).

Aunque las especies alquilantes derivadas tanto de las nitrosaminas como nitrosamidas inducen daño a macromoléculas celulares, su principal blanco es el DNA. Estos compuestos alquilnitroso tienen sus principales sitios de alquilación de bases en la posición *N7* y *O<sup>6</sup>* de la guanina, sin embargo, la posición *N3* puede ser atacada también. Otros sitios susceptibles son las posiciones *N1*, *3* y *7* de la adenina (Bochert *et al.* 1991, Kelly *et al.* 1998); el sitio *N3* de la citosina y del uracilo, así como el *N3* y *O<sup>4</sup>* de la timina (Singer y Essigman 1991). De éstos, la formación de aductos *O<sup>6</sup>*-alquil-desoxiguanosina (*O<sup>6</sup>*-alkdGuo), *O<sup>4</sup>*-alquiltimidina (*O<sup>4</sup>*-alkThd) y *O<sup>2</sup>*-alquiltimidina (*O<sup>2</sup>*-alkThd) están involucrados en la mutagénesis y carcinogenesis de algunos órganos en animales de laboratorio (Shuker y Bartsch 1994). En humanos, los aductos *O<sup>6</sup>*-metil-desoxiguanosina (*O<sup>6</sup>*-MedGuo) y *O<sup>4</sup>*-etiltimidina (*O<sup>4</sup>*-EtThd) se han relacionado con la incidencia de cáncer de esófago y páncreas (Li 2001). Los aductos *O<sup>6</sup>*-propilguanina y *O<sup>6</sup>*-metilguanina son los que se detectan con mayor frecuencia en la mucosa gástrica, por lo que se consideran responsables de iniciar el proceso carcinogénico en el estómago (Palli *et al.* 2001).

Se ha demostrado en glándulas mamarias de ratas, que los pares *O*<sup>6</sup>-alquilguanina (*O*<sup>6</sup>-alkG) con timina producen mutaciones por sustitución de bases G:C → A:T que inician el proceso carcinogénico. Esta transición es resultado de la replicación dispareja de la guanina metilada en la posición *O*<sup>6</sup> del codón 12 (GGA) del oncogén *H-ras*, mutación característica de adenocarcinomas inducidos por la exposición a MNU (Allay *et al.* 1999; Rajewsky *et al.* 2000).

Se ha detectado la formación de aductos por la metilación y piridiloxobutilación del DNA causados por las nitrosaminas específicas del tabaco, 4-(nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-(butanona) (NNK), 4-(nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-butanal (NNAL) y NNN en pulmón, esófago y mucosa nasal de ratas. Además se observó que la NNK indujo también rompimientos de hebra simple e incrementó los niveles de 8-oxodesoxiguanosina en el DNA (Hecht 1999). La Tabla I.1 muestra algunos sitios de incidencia de los CNO.

**Tabla I.1.- Sitios de exposición mutagénica y carcinogénica de algunos CNO**

CNO	ORGANISMO	SITIO	REFERENCIA
NBMA	Ratas	Esófago	Maliakal <i>et al.</i> 2002
MNU	Ratas	Riñón, estómago	Shiraki <i>et al.</i> 2002
MNNG	<i>Drosophila</i>	Ala, notum	Sidorov <i>et al.</i> 2001
NNK	Ratas	Hígado, pulmón, riñón, esófago	von Pressentin <i>et al.</i> 2001
NNN	Ratones	Lengua	von Pressentin <i>et al.</i> 2001
NDMA	Ratas	Hígado	Souliotis <i>et al.</i> 2002
	<i>Drosophila</i>	Ala	Negishi <i>et al.</i> 1991
NMPz	Ratas	Cavidad nasal	Spiegelhalder <i>et al.</i> 1984
NDEA	<i>Drosophila</i>	Ala	Negishi <i>et al.</i> 1991
NMAN	Ratas	Esófago	Tanaka <i>et al.</i> 1997

NBMA, N-nitrosobenzilmetilamina; MNU, N-nitrosometilurea; MNNG, N-nitrosometilnitrosoguanidina; NNK, 4-(nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-butanona; NNN, N-nitrosornicotina; NDMA, N-nitrosodimetilamina; NMPz, N-nitrosomonopiperazina; NDEA, N-nitrosodietilamina; NMAN, N-nitrosometilanilina.



## 1.2. ANTIMUTAGÉNESIS

La antimutagénesis y la anticarcinogénesis son áreas que comprenden el estudio de compuestos químicos de origen natural o sintético que muestran actividades moduladoras o inhibidoras ante los efectos causados por mutágenos y carcinógenos conocidos. Con el objeto de detectar su efectividad utilizan sistemas de prueba tanto *in vitro* como *in vivo* (Hayatsu y Negishi 1998).

Actualmente se sabe que algunos componentes de la dieta expresan una variedad amplia de actividades que pueden modificar la carcinogénesis de mutágenos, estas sustancias conocidas como antimutágenos presentan gran diversidad de orígenes, mecanismos y niveles de acción, inhibiendo o interviniendo en los múltiples procesos de la mutagénesis. Entre estos compuestos se encuentran los fenoles (catecoles), los ácidos cinámico, clorogénico, gálico, eláxico, ascórbico y retinoico, algunos tocoferoles, hidroquinonas, porfirinas y vitaminas. También las mezclas complejas como extractos de café, té, jugos de frutas, verduras y raíces; así como leche, productos de soya; caseínas, pectinas y gelatinas han sido determinados, entre muchos otros, como moduladores de la mutagénesis (De Flora 1998).

Es de gran interés el estudio de estos compuestos para identificar sus mecanismos de acción y la forma en que pueden utilizarse para la prevención de enfermedades de origen genético. La Tabla I:2 muestra una lista de antimutágenos presentes en la dieta y sus posibles mecanismos de acción.

### 1.2.1. Inhibidores de los compuestos nitroso

Los antecedentes de que los CNO inducen diferentes tipos de cáncer han generado el interés por realizar estudios que evalúen el efecto de inhibición de compuestos químicos de origen natural o sintético que exhiban propiedades antimutagénicas sobre mutágenos. Dentro de estos inhibidores se incluyen a las vitaminas, fenoles, tioles, metales, mezclas complejas y oxidasas de función mixta, entre otros.

**Tabla 1.2. Mecanismos de protección de compuestos naturales sobre mutágenos y carcinógenos.**  
(Modificado de De Flora 1998)

MECANISMOS	EJEMPLOS
<i>1. Mecanismos extracelulares</i>	
1.1. Inhibición de la absorción de mutágenos	Fibras alimenticias
1.2. Inhibición de la formación endógena de Mutágenos y carcinógenos.	
1.2.1. Inhibición de la nitrosación	Vitaminas (ácido ascórbico y $\alpha$ -tocoferoles, catequinas, ácido clorogénico y gálico, taninos, extractos de comida y bebidas.
1.2.2. Modificación de la microflora intestinal	Productos fermentados
1.3. Desactivación de mutágenos	Vegetales con actividad de peroxidasa. Fibras vegetales
<i>2. Mecanismos intracelulares.</i>	
2.1. Modulación del metabolismo	
2.1.1. Inhibición o activación de promutágenos y procarcinógenos	Plantas crucíferas, fenoles, arilaquil isotiocianatos, retinoides, flavonoides, clorofilina, $\beta$ -caroteno.
2.1.2. Inducción de las enzimas de la fase I	Fenoles naturales y sintéticos
2.2. Bloqueo o competencia	
2.2.1. Captura de moléculas electrofílicas	A. elágico, flavonoides y clorofilina.
2.2.2. Acción antioxidante	Provitaminas y vitaminas, polifenoles, flavonoides.
2.2.3. Protección de sitios nucleofílicos del DNA	A. Elágico, retinoides, poliaminas.
2.3. Inhibición de la replicación celular	Retinoides
2.4. Modulación de la reparación del DNA	Vainillinas, ácidos tánico y fólico
2.5. Control de la expresión génica	Retinoides
<i>3. Inhibición de la promoción de tumores</i>	
3.1. Inhibición de efectos genotóxicos	Vitaminas, antioxidantes.
3.2. Captura de radicales libres.	Antioxidantes
3.3. Inhibición de la proliferación y diferenciación celular	Retinoides
3.4. Protección de la intercomunicación celular	Retinoides, vitaminas, carotenos
3.5. Inducción de apoptosis celular	Retinoides, flavonoides.
3.6. Modulación de la transducción de señales	Flavonoides, retinoides.
<i>4. inhibición de la progresión de tumores</i>	
4.1. Inhibición de la vascularización de tumores	Retinoides
4.2. Efectos en el sistema inmune	Tocoferoles y retinoides

### 1.2.1.1. Vitaminas

*Vitamina C* (Vit.C). Fue la primera sustancia de origen natural que demostró inhibir la nitrosación de los CNO. Esta inhibición fue más efectiva para las aminas con una tasa de nitrosación lenta como la NDMA y para las aminas que se nitrosan a velocidad moderada como la morfolina (MOR) y piperazina (PIP). En aminas de nitrosación rápida como la metilnilina (MAN) la inhibición es incompleta (Stavric 1994).

En cepas TA1530 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, la actividad mutagénica de la NDMA, NDEA y *N*-nitrosomorfolina (NMOR) se redujo en presencia de Vit.C, pero contrariamente a lo que se esperaba, las concentraciones altas de la vitamina fueron menos efectivas que la concentración baja (Soden y Lucas 1998).

En células del criceto dorado, la Vit.C redujo la cantidad de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) inducidos por la *N*-nitrosometilguanidina (MNNG) cuando ambos compuestos fueron añadidos simultáneamente a las células. Sin embargo, el postratamiento 40 min después de la adición del mutágeno, mostró que la Vit.C no interfirió con la actividad de la MNNG, por el contrario, su efecto fue sinérgico provocando una mayor frecuencia de ICH. Se observó también al ser incubadas ambas sustancias 30 min previos a su administración, se obtenía menor rupturas de DNA comparada con los fragmentos de DNA inducidos por la MNNG en la ausencia de la Vit.C (Koropatnick y Stich 1980).

El ácido ascórbico (ASC) como también se le conoce, demostró inhibir la formación de NPRO en individuos de áreas con alta incidencia de cáncer. Se trataron a los sujetos simultáneamente con ASC y prolina (PRO). Al cabo de 24 h se observó en la orina recolectada la reducción de NPRO del 20% al 30% con respecto a los sujetos a los que no se les administró el inhibidor. Los pretratamientos con 450 mg de ASC previo a la administración de la PRO inhibieron 44 % la formación de NPRO. La inhibición mayor (79 %) se obtuvo cuando se pretrataron a los sujetos simultáneamente con ASC y PRO (Mirvish *et al.* 1995).

Estudios en *D. melanogaster* demostraron el efecto antimutagénico del ASC sobre dos precursores de la nitrosación, la metil urea y el nitrito de sodio. El ASC produjo reducción en la frecuencia de mutaciones totales por ala mayor al 50 %. Los autores concluyeron que la nitrosación pudo ser inhibida por el efecto antioxidante del ASC (Graf *et al.* 1998).

Entre las hipótesis que sugieren los posibles mecanismos de acción del ácido ascórbico como agente inhibidor de la nitrosación están: (i) Reducir el nitrito a nitrato (a pH de 4-6), el cual no es agente nitrosante, por lo tanto, no puede actuar directamente para formar los compuestos nitroso, (ii) destruir los radicales libres ayudando a inhibir el papel de los mutágenos en la promoción del cáncer, (iii) competir con aminas secundarias capturando la mayor cantidad de nitrito disponible y (iv) prevenir el metabolismo oxidante vía el sistema del citocromo P450. Actuando como agente antioxidante inhibe la producción de metabolitos electrofílicos (Mirvish 1997, Griffiths y Lunec 2001).

*Vitamina E* (Vit.E). Es un término colectivo que comprende 8 diferentes compuestos sintetizados de las plantas. El más efectivo es el  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOC) (Odin 1997).

Se ha observado que la actividad antimutagénica de la Vit.E hacia la mutagénesis inducida por la MNNG en cepas de *Escherichia. coli* depende del estado de la célula, si está en fase log, el  $\alpha$ -TOC reduce el efecto de la MNNG, pero si está en fase estacionaria, no tiene ningún efecto en la inducción de la mutagénesis. Su potencia antimutagénica fue más marcada en la cepa mutada que en la cepa silvestre lo que llevó a los autores a la conclusión de que los efectos antimutagénicos de la Vit.E están conectados con su influencia sobre la función de la polimerasa III (Kalinina *et al.* 1985).

Por otro lado, la inhibición de los efectos genotóxicos de la NMOR fue detectada en ratas de la cepa Wistar que fueron alimentadas con soluciones de la nitrosamina. Simultáneamente se adicionó a la dieta  $\alpha$ -TOC. Al término del experimento se

detectó que el inhibidor disminuyó significativamente la frecuencia de rompimientos en la cadena de DNA, así como las aberraciones cromosómicas ocasionados por la NMOR. El estudio sugirió que los mecanismos por los cuales el  $\alpha$ -TOC inhibió la formación del compuesto nitroso son similares a los del ácido ascórbico (Slamenova *et al.* 2002). Resultados similares se obtuvieron en ensayos con las líneas celulares V79 y Caco-2 (células de carcinoma de colon en humanos) en donde los efectos citotóxicos de la NMOR y MNNG fueron disminuidos por la presencia de la Vit.E, sugiriendo que la actividad antioxidante fue uno de los principales mecanismos de acción (Robichova y Slamenova 2002).

**Vitamina A (Vit.A).** Es un término no específico para referir a dos familias de diferentes compuestos, uno comprende a varios tipos de vitamina A preformada (ésteres de retinil, retinol y retinal) y la otra incluye a varios tipos de provitamina A encabezados por el  $\beta$ -caroteno (Love y Gudas 1994).

En *S. typhimurium* la sustitución de pares de bases y rompimientos de cadena sencilla del DNA así como el índice de ICH en células cultivadas de mamíferos fueron disminuidos por la presencia del retinol (De Flora *et al.* 1999). En estudios *in vivo*, la administración oral de retinil palmitato disminuyó la inducción de rompimientos de cadena simple en el DNA provocados por la NDMA (Webster *et al.* 1996) así como la producción de micronúcleos generados por la NNK en hepatocitos de ratas. Por su parte, el  $\beta$ -caroteno ha demostrado que bloquea la actividad mutagénica de la NDEA disminuyendo el índice de ICH en cultivos de glándulas mamarias de ratones (Alaoui-Jamali *et al.* 1991).

Se analizó la capacidad de quimioprevención del ácido retinoico-9-cis (9cRA) sobre la inducción de los tumores generados por la MNU en ratas de la cepa Wistar y se observó que el 9cRA no disminuyó la presencia de tumores. Sin embargo, al alternar el tratamiento con melatonina la reducción de tumores fue significativa. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el 9cRA y la melatonina actuaron para prevenir el daño. Sin embargo, los autores sugirieron que ambos compuestos actuaron de manera sinérgica modulando la actividad oxidante de la MNU (Teplitzky *et al.* 2001).

Los mecanismos antimutagénicos propuestos para los retinoides son similares a los de las Vit C y E, que incluyen: la captura de radicales libres, la inhibición de las enzimas del citocromo P450 y la modulación del proceso oxidante de los compuestos (Odin 1997).

#### 1.2.1.2. Compuestos aislados de plantas

**Capsaicina (CAP).** Es el principal componente de los frutos de chile. Sus propiedades quimiopreventivas son atribuidas a la modulación de la activación metabólica de promutágenos y a la interferencia de los metabolitos genotóxicos (Wattenberg 1985). En células de criceto dorado, la capsaicina inhibió el metabolismo de la NNK modulando las reacciones de reducción, N-oxidación y  $\alpha$ -hidroxilación del mutágeno, sugiriendo que el mecanismo involucrado fue la inhibición de las isoenzimas de las familias CYP1A y CYP2B (Miller *et al.* 1993).

**Ácidos fenólicos.** En el ensayo con *S. typhimurium* la actividad antimutagénica de los ácidos caféico, gálico, clorogénico y tánico hacia la mutagenicidad de MNNG y MNU ha sido demostrada. Los estudios polarográficos y espectrofotométricos revelaron la interacción entre estos CNO de acción directa y los fenoles, especialmente cuando estos últimos estuvieron presentes en exceso, sugiriendo que uno de los mecanismos por el cual inhibieron la mutagenicidad de los CNO es compitiendo por el nitrito disponible en el medio (Brockman *et al.* 1992, Kuo *et al.* 1992). Sin embargo, hay datos que sugieren que la inhibición de la MNU por el ácido elágico no parece causada por un mecanismo de competencia. Los estudios realizados *in vitro* con DNA hidrolizado mostraron que el ácido elágico no evitó la metilación de la guanina en la posición N-7 pero sí en la posición O<sup>6</sup>. La inhibición ocurrió sólo cuando la doble hebra del DNA fue usada como sustrato. Estos resultados sugirieron que el ácido elágico incapacita la mutagenicidad de la MNU a través de un mecanismo de unión afín entre éste y el dúplex de DNA (Dixit y Gold 1986).

**Isotiocianatos.** En experimentos a corto plazo, hembras de ratón A/J recibieron durante 4 días, 5  $\mu\text{mol}$  de varios (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-fenil-NCS seguido por una dosis de NNK

(10  $\mu\text{mol}$  por inyección i.p.). Dieciséis semanas después se cuantificó la presencia de tumores en pulmón y se observó que el fenitil-NCS y el arilalquil isotiocianato provocaron una marcada reducción en la formación de tumores. Los estudios moleculares mostraron que la metilación del DNA en la posición  $O^6$  era inhibida con mejor eficiencia por los isotiocianatos de cadena larga. Se observó una relación directamente proporcional entre el tamaño de la cadena metil de los isotiocianatos y el porcentaje de inhibición hacia la NNK (Morse *et al.* 1990, 1991).

Ratas machos de la cepa F344 que fueron tratadas con *N*-nitrosobenzilmetilamina (NBMA) desarrollaron tumores esofágicos al cabo de 25 semanas de tratamiento. El grupo experimental alimentado además de NBMA con fenitil-NCS mostró una disminución significativa en el número y el tamaño de tumores. Los autores sugirieron que los isotiocianatos bloquearon la formación de lesiones preneoplásicas y neoplásicas mediante la disminución de la formación de aductos  $N7$  y  $O^6$  metilguanina (Stoner *et al.* 1991).

El mecanismo plausible del efecto anticarcinogénico de los isotiocianatos es la modulación en el metabolismo del carcinógeno, ya sea inhibiendo su activación y/o acelerando su eliminación. Las evidencias se basan en las siguientes observaciones: (a) la formación de aductos de DNA y las modificaciones a nucleótidos, (b) las tasas de activación del carcinógeno y los niveles enzimáticos de la Fase 1 y (c) la actividad de las enzimas de la Fase 2 y los niveles de GSH (Hecht 2000, Seow *et al.* 2002).

*Catequinas.* En un estudio realizado en *S. typhimurium* se analizó el efecto de 5 catequinas, la epicatequina (EC) la epigalocatequina (EGC), la galato epigalocatequina (EGCG) y la galato epicatequina (ECG) sobre la nitrosación de las aminas secundarias DMA, MOR y MAN. Las aminas fueron incubadas con nitrito de sodio en presencia o ausencia de los agentes inhibidores. Los resultados mostraron que las cinco catequinas inhibieron más del 50 % la nitrosación de la DMA y MOR pero solo alteraron parcialmente la nitrosación rápida de la MAN. En casos excepcionales, la inhibición fue más efectiva que la del ácido ascórbico. El

estudio mostró además que la inhibición de la formación de la NDMA fue a razón molar de 1:2 catequina/nitrito respectivamente (Tanaka *et al.* 1994).

En una serie de experimentos paralelos, las nitrosaminas NDMA, NMOR y N-nitrosometilaniolina (NMAN) ya formadas fueron incubadas con EGCG. Al final del tratamiento no se detectó ningún tipo de degradación de las nitrosaminas. Dicha observación indicó que las catequinas no inhibieron el efecto de los CNO por descomposición de las nitrosaminas ya formadas, sino impidiendo la producción del compuesto nitroso. Por lo tanto, el mecanismo de acción antimutagénica sugerido para las catequinas, es la competencia con las aminas secundarias para utilizar el nitrito (Tanaka *et al.* 1994).

Este mismo mecanismo se sugirió para las catequinas que inhibieron el efecto de la combinación nitrito de sodio-metil urea reduciendo la frecuencia de mutaciones somáticas en *D. melanogaster* (Guzmán-Rincón *et al.* 1998).

**Flavonoides.** En investigaciones hechas en ratas macho de la cepa Wistar se administraron tratamientos con diosmina, hesperidina y la mezcla de ambos. Al mismo tiempo se les inyectó MNAN por 12 semanas. Los resultados mostraron que estos flavonoides disminuyeron los tumores esofágicos (papilomas y carcinomas) hasta 100 %. Los autores consideraron como posibles mecanismos de acción (1) la modulación de la activación metabólica de la MNAN, (2) la desintoxicación del carcinógeno y (3) la inhibición de la proliferación celular (Tanaka *et al.* 1997).

#### **1.2.1.3. Metales**

**Selenio.** En estudios de pre- co- y post-tratamientos realizados en las cepas TA100 y TA1535 de *S. typhimurium* se analizó el efecto del selenito de sodio y cafeína en contra de la mutagenicidad inducida por la MNU y MNNG. Los resultados del pretratamiento mostraron una relación dosis-respuesta entre el selenito de sodio y la mutagenicidad de los CNO. A mayor dosis de selenito de sodio, menor cantidad de mutaciones. En el cotratamiento, el selenito de sodio disminuyó en 50 % el



número de revertantes producidos por la MNNG y en el post-tratamiento no se observó influencia sobre la mutagenicidad de los CNO. El mecanismo por el cual el selenito de sodio inhibió la acción mutagénica de la MNU y MNNG todavía no está bien esclarecido. Sin embargo, se sugirió que existe la interacción extracelular mutágeno-antimutágeno antes de que los primeros ejerzan su acción mutagénica (Balansky 1992).

**Cobalto.** El clorito de cobalto redujo la frecuencia de mutaciones espontáneas en la cepa mutante NIG 1124 de *Bacillus subtilis* que se caracteriza por tener alterada la DNA polimerasa III. Se observó que las frecuencias de error en la duplicación del DNA fueron reducidas por la presencia del  $\text{CoCl}_2$ , aunque no se determinó el mecanismo exacto por el cual se llevó al cabo este proceso, se sugirió que existe la posible interacción del cobalto con la proteína recA que tiene un papel importante en la reparación del DNA (Inoue *et al.* 1981, Kiuchi *et al.* 1984).

**Cobre.** En DNA de ratas, la formación de aductos  $O^6$ -MeG y  $N^7$ -MeG producidos por la NDMA fue suprimida significativamente por la administración de acetato de cobre. Asimismo, en células de hígado de rata la tasa de metilación de núcleos provocados por la MNU también fue reducida. Algunos estudios han demostrado que ciertos iones metálicos son reconocidos por reaccionar con sitios nucleofílicos formando complejos de iones-bases y es probablemente esta característica la que evita que los ácidos nucleicos sean atacados por agentes genotóxicos (Demaut y Seils 1997).

#### **1.2.1.4. Mezclas complejas**

**Extractos de verduras y frutas.** En *D. melanogaster* se demostró que pretratamientos a larvas de 48 h de edad con extractos de chile *Capsicum spp.* inhibieron entre 50 % y 99 % la frecuencia de mutaciones causada por los metabolitos resultantes de la mezcla de metil urea y nitrito de sodio. Esta inhibición fue directamente proporcional al contenido de ASC presente en los extractos, sugiriendo que su actividad antimutagénica pudo ser causada por este

compuesto. Sin embargo, no se descartó otro tipo de inhibidores como  $\beta$ -caroteno, clorofilina, capsaicina, tocoferoles, entre otros (Ramírez-Victoria *et al.* 2001).

La formación de NPRO en humanos ha sido inhibida por diferentes extractos de frutas y verduras como el chile verde, la piña, el jitomate, la fresa, la zanahoria y el apio. Dieciséis sujetos consumieron durante 18 días consecutivos una dieta estándar baja en nitratos y ASC. Cada tercer día se les adicionó nitrato y PRO seguido por agua destilada. En los días restantes, además del nitrato y la PRO se les alimentó con los jugos antes mencionados. Un día después de los tratamientos se analizó el contenido de NPRO y se notó que, a excepción del jugo de apio, todos los extractos inhibieron significativamente la formación de la NPRO, siendo los de piña, tomate y chile verde los que inhibieron tan efectivamente como el ASC. Al parecer la nitrosación endógena fue bloqueada por el ascorbato presente en los jugos (Helser *et al.* 1992). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros investigadores que demostraron la inhibición de la NPRO con jugo de cáscara de naranja y té verde (Xu *et al.* 1993).

*Extractos de té.* Para estudiar la inhibición de aminas secundarias fueron utilizados 5 tipos de té verde, 1 de té tostado, 1 de té fermentado y 1 de té negro. En los experimentos *in vitro* se incubaron por separado DMA, MOR y MAN con una solución de nitrito de sodio y la presencia ó ausencia de los agentes inhibidores. Los resultados mostraron que las 5 variedades de té verde inhibieron eficientemente la producción de NDMA, NMOR y NMAN mientras que las variedades restantes elevaron ligeramente la formación de la NDMA e inhibieron con menor eficacia a la NMOR y NMAN. Los autores consideraron que el efecto inhibidor de los extractos se debió principalmente a la presencia de catequinas ya que los análisis de su contenido mostraron la presencia de EGC y EGCG principalmente en las variedades de té verde, lo que concuerda con el efecto de inhibición que mostraron hacia algunas aminas secundarias (Tanaka *et al.* 1994).

Estudios realizados en humanos demostraron que el consumo de 1 g de té verde por día bloquea parcialmente la síntesis endógena de la NPRO y el consumo de 3 a

5 g disminuye la formación de la NPRO hasta los niveles basales (Wu *et al.* 1993). Por otro lado, la formación de NDMA y *N*-nitrosopiperidina (NPIP) fue inhibida por el consumo de 2 g (4 tazas) de té verde, sin embargo, el consumo de 8 tazas implica un gran riesgo en el incremento en la producción de NDMA por mecanismos que aún no son conocidos (Vermeer *et al.* 1999).

#### 1.2.1.5. Otros

*Clorofilina* (CLO). Estudios realizados en *S. typhimurium* demostraron que la CLO disminuyó significativamente la cantidad de revertantes provocados por la NNK y NNN pero influyó ligeramente en los resultados con NDMA. Los mismos experimentos pero excluyendo diferentes cofactores de la mezcla S9 demostraron que la CLO interfirió en el ciclo de la NADPH, sugiriendo que interactuó con el sistema de transporte de electrones involucrados en la activación de los compuestos. Utilizando el ensayo *hprt* V79 se detectó también que la CLO inhibió el efecto de la NNK, NNN y NDMA pero no el de la MNU, estos resultados apoyan la hipótesis de que la modificación de la mutagenicidad de nitrosaminas ocurrió principalmente durante la activación metabólica de los compuestos (Romert *et al.* 1992).

En el ensayo de mutación y recombinación somáticas en el ala de *D. melanogaster* la NDMA, NDEA, NPIP y NMOR mostraron un alto efecto genotóxico. Sin embargo, la clorofilina disminuyó significativamente la frecuencia de manchas totales por ala obtenidas con estos compuestos. No obstante, el mecanismo por el cual se realizó esta inhibición no está bien esclarecido (Negishi *et al.* 1994).

*O*<sup>6</sup>-alquilguanina alquiltransferasa. Conocida como AGT ó ATasa, es una enzima codificada por el gen metilguanina metiltransferasa (MGMT). Repara los aductos *O*<sup>6</sup>-meG y *O*<sup>6</sup>-meT del DNA. Este tipo de lesiones es causado principalmente por agentes alquilantes y compuestos nitroso. Se han sugerido dos mecanismos por los cuales la AGT inhibe la mutagénesis provocada por los CNO: (1) removiendo el grupo metilo de los metabolitos carcinogénicos (Frosina 2000) y (2) por afinidad de unión estequiométrica 1:1 entre AGT:DNA (Rasimas *et al.* 2003).

*Alquilaminas.* Las alquilaminas n-propil-, n-butil-, n-hexil-, n-octil- y n-nonilamina, inhibieron la mutagenicidad de la NDMA en *Salmonella*, el efecto fue mayor cuanto mas grande era la cadena alquil del compuesto. Las actividades mutagénicas de otras nitrosaminas como la NDEA, nitrosopirrolidina (NPYR) y NMOR fueron reducidas solo por la n-hexilamina. Los compuestos serotina alquilamina, triptamina, epinefirina y norepinefirina fueron también capaces de reducir la mutagenicidad de la NDMA aparentemente bloqueando la metilación del DNA. Otro mecanismo sugerido fue la inhibición del proceso de activación de los compuestos (Negishi y Hayatsu 1982).

Otros compuestos que también han demostrado inhibir el efecto de los CNO son 3-aminoharman, benzamida, 5-bromodesoxiuridina, tetraclorito de carbono, coenzima A, cuferrón, citocromo c, 2,6-dicloro-4-nitrofenol, EDTA, elastatinal, ácido  $\beta$ -indolacético, helio, hidroquinona,  $\alpha$ -naftoflavona, análogos de NAD, bisulfato de sodio, estreptomycin, dióxido de carbono y nicotina, entre otros (Gichner y Veleminsky 1988; Shuller *et al.* 1991, Kirsch *et al.* 2000). Sin embargo, se ha observado que los resultados obtenidos con estos compuestos son limitados y poco consistentes, por lo que se necesitan más estudios para determinar su relevancia en el campo de la antimutagénesis.

Son varios los mecanismos por los cuales los antimutágenos inhiben el efecto de los compuestos nitroso: (a) formación de complejos mutágeno-antimutágeno; (b) competencia por aminas secundarias; (c) desactivación de enzimas metabólicas; (d) reducción del nitrito a nitrato; (e) captura de radicales libres; (f) prevención del metabolismo oxidante del P450; (g) interferencia en el transporte de electrones y (h) uniones afines antimutágeno-DNA. Sin embargo, es muy posible que existan otros mecanismos involucrados. La Tabla I.3 resume algunos de los mecanismos de inhibición hacia los CNO.

**Tabla I.3. Mecanismos de inhibición hacia los CNO**

INHIBIDOR	CNO	MECANISMOS
Ácido ascórbico	NDMA, NMOR, MNNG, NPRO, MNU.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captura de radicales libres.</li> <li>• Competencia por el nitrito.</li> <li>• Prevención del mecanismo oxidante.</li> <li>• Conversión del NO<sub>2</sub> a NO.</li> </ul>
α-TOC	MNNG, NMOR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reacción sobre la polimerasa III.</li> <li>• Captura de radicales libres.</li> <li>• Prevención del mecanismo oxidante.</li> </ul>
Retinoles	NDMA, NDEA, NNK	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captura de radicales libres.</li> <li>• Inhibición de las enzimas del P450.</li> <li>• Acción antioxidante.</li> </ul>
Fenoles	MNNG, MNU	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniones afines.</li> </ul>
Clorofilina	NNK, NNN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferencia con el transporte de e<sup>-</sup>.</li> <li>• Modulación del metabolismo.</li> </ul>
Isotiocianatos	NNK, NBMA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulación del metabolismo.</li> </ul>
Flavonoides	NMAN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulación del metabolismo.</li> <li>• Desintoxicación del carcinógeno.</li> <li>• Inhibición de la proliferación celular.</li> </ul>
Catequinas	NDMA, NMOR, NMAN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Competencia por el nitrito.</li> </ul>
Selenito de sodio	MNU, MNNG	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interacción molecular extracelular.</li> </ul>
Acetato de cobre	MNU	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de complejos iones-bases.</li> </ul>
O <sup>6</sup> AGT	CNO en general	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Removiendo el grupo metilo de los metabolitos carcinógenos.</li> <li>• Afinidad de unión estequiométrica AGT:DNA.</li> </ul>
Alquilaminas	NDMA, NDEA, NPYR, NMOR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la actividad metabólica.</li> </ul>

NDMA, N-nitrosodimetilamina; NMOR, N-nitrosomorfolina; MNNG, N-nitrosometilguanidina; NPRO, N-nitrosoprolina; MNU, N-nitrosometilurea; NDEA, N-nitrosodietilamina; NNK, 4-(nitrosometilamina)-1-(3-piridil)-1-butanona; NNN, N-nitrosornicotina; NBMA, N-nitrosobenzilmetilamina; NMAN, N-nitrosometilanilina; NPYR, N-nitrosopirrolidina.

### **1.3. *Drosophila melanogaster* COMO SISTEMA DE PRUEBA**

Existen muchas características que hacen a *Drosophila* un organismo idóneo para el estudio de la genética lo que deriva a realizar pruebas adecuadas de genotoxicidad. Entre sus ventajas están: (1) es un organismo pequeño, anatómicamente complejo y de fácil manejo, (2) su ciclo de vida es corto, (3) las condiciones para cultivarlas son simples, baratas y de fácil control. Pueden propagarse desde unas docenas hasta miles de organismos al mismo tiempo, (4) actualmente se conoce todo el genoma de la mosca de la fruta observándose que en sus 4 cromosomas existe un total de 180 Mb de secuencias totales; 140 Mb de secuencias eucromáticas y se han detectado entre 12 a 14 000 genes (Adams *et al.* 2000), (6) el espectro de valoración de riesgo genético que es detectado con el uso de este insecto es muy amplio y (7) puede realizar la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los microsomas del hígado humano, en donde se activan gran cantidad de carcinógenos y mutágenos indirectos. Las enzimas involucradas tienen acción de oxidasa y se caracterizan por carecer de especificidad al sustrato, tal como ocurre en el hígado de mamíferos (Saner *et al.* 1996). Estas ventajas confieren a *Drosophila* características adecuadas para utilizarlas como sistema de prueba (Katz y Foley 1993, Guzmán-Rincón y Graf 1995).

#### **1.3.1. Citocromos P450 en *Drosophila***

Tomando en cuenta que el efecto mutagénico de los CNO se debe en gran parte a la activación metabólica de estos compuestos, es importante considerar que *D. melanogaster* cuenta con enzimas de la familia de los citocromos P450 muy parecidas a las encontradas en vertebrados (Tijet *et al.* 2001). Están presentes en múltiples formas en muchos de sus tejidos a lo largo de su desarrollo, activando hormonas y feromonas, participando además en la desintoxicación y en la activación de numerosos xenobióticos. Las reacciones mediadas por estas enzimas son muchas y variadas al igual que en vertebrados, entre ellas están la hidroxilación del carbón, la desalquilación oxidante, la epoxidación, la hidroxilación aromática y las S- y N-oxidaciones (Amichot *et al.* 1998).

El grupo de enzimas del citocromo P450 en insectos más extensamente estudiado es el de la familia CYP6, que está involucrado en el metabolismo de insecticidas y de productos secundarios de plantas conocidos como aleloquímicos (Danielson *et al.* 1997) este grupo está relacionado filogenéticamente por sus secuencias de aminoácidos a la familia CYP3 de vertebrados, las principales isoformas que metabolizan drogas (Dombrowski *et al.* 1998).

### **1.3.2. Prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART)**

Uno de los bioensayos empleados para determinar la genotoxicidad de compuestos es la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART) en *D. melanogaster*, en donde es posible detectar un amplio espectro de eventos genéticos como mutaciones, deleciones, aberraciones cromosómicas, recombinación mitótica y conversión génica (Graf *et al.* 1984).

La prueba está basada en el hecho de que durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de *Drosophila* se presentan grupos de células empaquetadas conocidas como discos imagales. Estas células proliferan mitóticamente durante el desarrollo larvario hasta la metamorfosis en donde se diferencian en estructuras del cuerpo de la mosca adulta como ojos, alas y antenas, entre otras. Si ocurre una alteración en una de estas células se manifestará en todas las células descendientes las cuales formarán un clon de células mutantes. Si la alteración causa un cambio visible en el fenotipo, el clon de células mutantes podrá ser detectado como manchas celulares en la superficie del cuerpo de la mosca adulta (Graf *et al.* 1984, Guzmán-Rincón y Graf 1995).

La prueba SMART fue diseñada para detectar la pérdida de heterocigosis de marcadores genéticos adecuados los cuales determinan fenotipos que se expresan en los ojos y en las alas de las moscas. Dos marcadores han sido utilizados en la prueba del ala, el *mwh* que es recesivo en condición homocigótica y produce múltiples tricomas por célula en lugar de uno solo en condición normal y el marcador que produce tricomas con apariencia de flama (*flr*<sup>3</sup>) (Graf *et al.* 1984).

Más detalles sobre los marcadores y las cruzas utilizadas en la prueba SMART se proporcionarán en Materiales y Métodos.

El ensayo de genotoxicidad somática en *D. melanogaster* ha sido utilizado para detectar la inactivación de compuestos tóxicos así como la activación de promutágenos, siendo uno de los mejores ensayos para demostrar la reacción de genotoxinas en organismos eucariontes multicelulares a través de la expresión de las enzimas del citocromo P450 (Rodríguez-Arnaiz 1998, Kaya *et al.* 1999, Karekar *et al.* 2000).

Frölich y Würigler (1989) desarrollaron una nueva línea de moscas que presenta el alelo del gen R1 que les confiere una mayor resistencia al DDT. Esta línea, denominada de bioactivación elevada expresa de forma constitutiva una mayor cantidad de P450 lo que hace evidente una mayor respuesta genotóxica de promutágenos. Esta craza ha permitido detectar la genotoxicidad de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (Delgado *et al.* 1995) y aminas aromáticas (Rodríguez-Arnaiz y Aranda 1994) entre otros promutágenos que son también metabolizados por citocromos P450 de mamíferos.

Para correlacionar los datos obtenidos a través de SMART con aquellos observados en mamíferos, es importante conocer más acerca de la variedad de enzimas presentes en la mosca así como de su especificidad al sustrato. En este sentido Saner *et al.* (1996) realizaron un estudio molecular del CYP6A2 en dos cruzas de *D. melanogaster*, una con niveles normales de citocromo P450 y la otra con niveles elevados. Observaron a través del análisis del mRNA mayor cantidad de esta enzima en el tercer estado larvario de la mosca, lo que sugirió que la resistencia a insecticidas puede estar relacionado con la expresión del CYP6A2. La especificidad al sustrato fue determinada por la expresión heteróloga co-expresada de esta enzima con el cDNA del citocromo P450 NADPH-oxidoreductasa de humanos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, demostrando que es capaz de transformar a la aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) en un producto que induce recombinación en el DNA. Al igual que con la AFB<sub>1</sub>, otros dos promutágenos fueron metabolizados, el 3-amino-



piridol[4,3-*b*]indol (Trp-P-2) y el 7-12-dimetil-benzo-antraceno (DMBA), los cuales ya se habían detectado como compuestos genotóxicos en SMART, siendo la cruz que expresa niveles elevados del citocromo la de mayor sensibilidad genotóxica (Graf *et al.* 1984, Frölich y Würigler 1989).

La prueba SMART ha sido previamente utilizada para determinar el efecto genotóxico de algunas nitrosaminas como la NDMA (Graf *et al.* 1984), NDEA (Graf *et al.* 1983, 1984), NMOR (Surjan *et al.* 1985) y NPIP (Graf *et al.* 1989). Otros estudios han evidenciado la mutagenicidad de la NPYR, NDMA, NDEA, NDBA, NMOR y NPIP en este sistema, observando que a excepción de las dos primeras, el resto de las nitrosaminas tuvieron la habilidad de inducir recombinación mitótica en las células somáticas (Negishi *et al.* 1991).

Se ha empezado a utilizar la prueba SMART en organismos transgénicos donde se han expresado genes de mamíferos que codifiquen a ciertas enzimas como la GST. Los resultados han mostrado que las enzimas expresadas son biológicamente funcionales y confieren una hipersensibilidad a los efectos genotóxicos provocados por los mutágenos estudiados (Chroust *et al.* 2001).

También se ha detectado a través de este bioensayo la capacidad de inhibición de algunos compuestos sobre mutágenos y carcinógenos. Entre estos inhibidores están los funguicidas (Rahden-Staron 2002), aceites derivados de plantas (Idaomar *et al.* 2002), el selenio (Rizki *et al.* 2001), mezclas complejas (Ramírez-Victoria *et al.* 2001) y como ya se había mencionado, el ácido ascórbico y la clorofilina, entre otros.

Por lo anterior, se ha considerado al bioensayo *D. melanogaster*-SMART como un sistema adecuado para el estudio de la activación metabólica de compuestos nitrosos y sus posibles moduladores, substituyendo parcialmente a otras pruebas más laboriosas realizadas principalmente en mamíferos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GENERAL

Demostrar que algunos extractos de diversos tipos de chile inhiben la reacción de nitrosación *in vivo*, así como identificar algunos de sus componentes y sus posibles mecanismos de acción.

### 2.2. PARTICULARES

1. Determinar la genotoxicidad de la metil urea y del nitrito de sodio, así como de la mezcla de ambos a través del bioensayo de mutación y recombinación somáticas en larvas de las cruza estándar y de bioactivación elevada de *Drosophila melanogaster*.
2. Valorar la actividad inhibidora de los homogeneizados de los chiles manzano, chilaca y poblano sobre la reacción de nitrosación *in vivo*.
3. Estimar las concentraciones de clorofilina, ácido ascórbico y capsaicina en los homogeneizados de chile.
4. Realizar la reacción de nitrosación *in vitro* y determinar su espectro de absorción.
5. Efectuar ensayos espectrofotométricos para determinar la posible interacción del ácido ascórbico, la capsaicina y la clorofilina con los precursores de la nitrosación.
6. Determinar el posible mecanismo de acción del ácido ascórbico y de la clorofilina.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. COMPUESTOS QUÍMICOS

Los siguientes compuestos fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EU): metil urea (MU) CAS 598-50-5), nitrito de sodio (NS) (CAS 7632-00-0), N-nitrosometilurea (MNU) (CAS 684-93-5), capsaicina (CAP) (CAS 404-86-4), y Clorofilina Cu-Na (CLO) (CAS 11006-34-1). El ácido ascórbico (ASC) (F377827) fue adquirido de Merck Lab. (México).

#### 3.2. DETERMINACIONES QUÍMICAS

##### 3.2.1. Obtención de los homogeneizados de chile (*Capsicum spp.*)

Los chiles empleados en este trabajo fueron la chilaca (CHI), el manzano (MZN) y el poblano (POB), que se compraron en un supermercado local. Se lavaron y se les quitaron el tallo, las semillas y las venas para finalmente cortarlos en rajadas. Se extrajo el jugo por medio de un extractor automático (Turmix NOM 754) y se colocaron por separado en contenedores de plástico de 100 ml. Aproximadamente las tres cuartas partes del jugo se almacenaron en un ultrarrefrigerador (Kelvinator HFM151K6W1) a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , el restante se liofilizó en una liofilizadora tipo LabConco Freezone 12 a  $-40^{\circ}\text{C}$  y un vacío de  $10 \times 10^{-3}$  Mbarr. Cabe mencionar que todos los análisis biológicos y químicos realizados en este trabajo se hicieron con los mismos homogeneizados.

##### 3.2.2. Determinación del ácido ascórbico

La cuantificación se hizo a través del método de titulación 2,6-dicloroindofenol (DCP) determinado por la Asociación Oficial de Química Analítica (1990) (AOAC por sus siglas en inglés). La solución estándar de vitamina C se preparó pesando 10 mg de ácido ascórbico los cuales se aforaron a 10 ml con ácido acético al 5 % dando como concentración final 1mg Vit.C/ml. La solución titulante consistió de 25 mg de diclorofenol-indofenol mezclado con 12.5 mg de bicarbonato de sodio disueltos en 250 ml de agua destilada.

Se tomaron 10 ml de cada uno de los extractos de chile y se homogeneizaron con 50 ml de ácido acético al 5 % con el fin de inactivar a la ascorbato oxidasa endógena. Se aforaron a 100 ml con agua, se filtraron y se tomaron dos alícuotas de 10 ml de cada solución. Se colocó cada alícuota en un matraz y se titularon con la solución valorada de diclorofenol-indofenol hasta que la muestra virara a color rosado y permaneciera así por 10 segundos. Los cálculos se realizaron tomando como estándar los valores de la solución de indofenol, considerando que la cantidad consumida en mililitros a través de este método, equivale a un miligramo de vitamina C presente en la muestra analizada.

### 3.2.3. Determinación de la capsaicina y la clorofilina

Fueron hechas de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (1990). Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 de doble haz UV/VIS. Debido a que en el espectro visible la capsaicina tiene su mayor pico de absorción a los 280 nm y la clorofilina a los 405 nm, se emplearon estas longitudes de onda para realizar las lecturas. La cantidad de capsaicina fue calculada usando una curva estándar de capsaicina pura (0.5 µg/ml a 2.0 µg/ml;  $y = 3.03 \times 10^{-3} x + 2.1 \times 10^{-2}$ ; en donde  $y$  = absorbencia a 280 nm y  $x$  = concentración de capsaicina en µg/ml) con  $r=0.9992$ . Para la clorofilina (2.5 µg/ml a 20 µg/ml;  $y = -6.07 \times 10^{-3} x + 3.6 \times 10^{-2}$ ; en donde  $y$  = absorbencia a 405 nm y  $x$  = concentración de clorofilina en µg/ml) con valor de  $r=0.9998$ .

## 3.3. ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 3.3.1. Líneas y cruzas de *Drosophila melanogaster*

Se utilizaron 3 líneas de *D. melanogaster* con los siguientes marcadores genéticos (Lindsley y Zimm 1992).

- a)  $flr^3/In(3LR)TM3,ri\ p^r\ sep\ l(3)89\ Aa\ bx^{3/e}\ e\ Bd^{\delta}$ . Esta línea es portadora del marcador flare ( $flr^3$ ) que se reconoce fenotípicamente por la presencia de tricomas de forma irregular en tórax, abdomen y alas. Se ubica a 38.8 unidades de mapa en el cromosoma 3 y es letal en condición homocigótica.

Para mantener esta línea se necesita la presencia del cromosoma balanceador con inversiones múltiples (*TM3*) que además porta el marcador dominante *Bd<sup>f</sup>*, que permite el reconocimiento fenotípico de esta línea por la expresión de "serratia" (alas con bordes discontinuos). Siendo letal en condición homocigótica, la línea está formada por individuos heterocigotos para los marcadores *flr<sup>3</sup>* y *Bd<sup>f</sup>* es decir, individuos *flr<sup>3</sup>TM3, Bd<sup>f</sup>*.

- b) *ORR/ORR;flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri v<sup>r</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34</sup> e Bd<sup>f</sup>*. Además de los marcadores descritos anteriormente, esta línea porta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT y se caracteriza por tener niveles elevados del citocromo P450. Su capacidad metabólica se debe al gen IR, ubicado en el cromosoma 2 a 65.0 unidades de mapa.
- c) *mwh/mwh*. La línea portadora del marcador *mwh* se reconoce fenotípicamente por la alteración en el número de tricomas por célula en el ala, llegando a presentar de 2 a 7 en lugar de 1 como ocurre en el fenotipo silvestre. Este marcador se localiza en el cromosoma 3 a 0.3 unidades de mapa.

Con las líneas anteriores se realizaron dos cruzas, la estándar (ES)  $\text{flr}^3/TM3, Bd^f \times \text{flr}^3/mwh/mwh$ , y la de bioactivación elevada (BE)  $\text{ORR;flr}^3/TM3, Bd^f \times \text{flr}^3/mwh/mwh$ .

Ambas cruzas producen dos tipos de progenie las cuales se distinguen principalmente por la presencia del marcador *Bd<sup>f</sup>*. La primera progenie consiste de organismos transheterocigotos para los marcadores *mwh, flr<sup>3</sup>/mwh, flr<sup>3</sup>*, es decir, moscas con fenotipo de ala silvestre. En la segunda, están los organismos heterocigotos portadores del cromosoma balanceador con fenotipo de alas serratia *mwh, flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>f</sup>*.

### 3.3.2. Diseño experimental

Después de realizadas las cruzas se colectaron los huevos en frascos de cultivo de 250 ml con agar y levadura durante 8 h y se incubaron a 24 °C de temperatura y con 65 % de humedad relativa hasta completar 48 h. Posteriormente las larvas se removieron del medio y se lavaron con agua corriente. Se colocaron 150 a 200

individuos en tubos homeopáticos conteniendo 0.7 g de puré de papa (Maggi®) hidratados con 5 ml de las soluciones a probar.

### **3.3.2.1. Concentraciones**

Se realizaron ensayos preliminares para determinar la toxicidad de los compuestos y se establecieron las siguientes concentraciones: 20 mM para MU, NS y de la mezcla de ambos. Para los homogeneizados de chile se consideraron 12.5 %, 25 % y 50 % v/v.

### **3.3.2.2. Tratamientos**

Los tratamientos fueron crónicos vía oral a larvas de 48 h de edad de ambas cruza y se dividieron en cuatro series de la siguiente manera:

(1) Tratamientos simples:

(a) MU ó NS (20mM)

(b) CHI ó MZN ó POB (12.5 %, 25 % y 50% v/v)

(2) Combinaciones simples:

(a) MU + (CHI ó MZN ó POB)

(b) NS + (CHI ó MZN ó POB)

(3) Mezcla:

(a) MU + NS

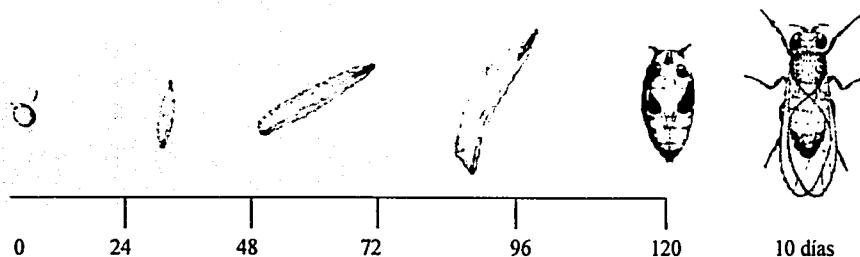
(4) Combinaciones dobles:

(a) (MU+NS) + (CHI ó MZN ó POB)

Se efectuaron 15 tratamientos con sus respectivos duplicados para cada experimento y para cada una de las cruza (Figura 3.1).

Estadio de desarrollo

Edad de la larva (h)



**Tratamientos simples:**

MU ó NS  
20 mM

CHI ó MZN ó POB  
12.5, 25 y 50 % c/u

**Combinaciones simples:**

MU + (CHI ó MZN ó POB)

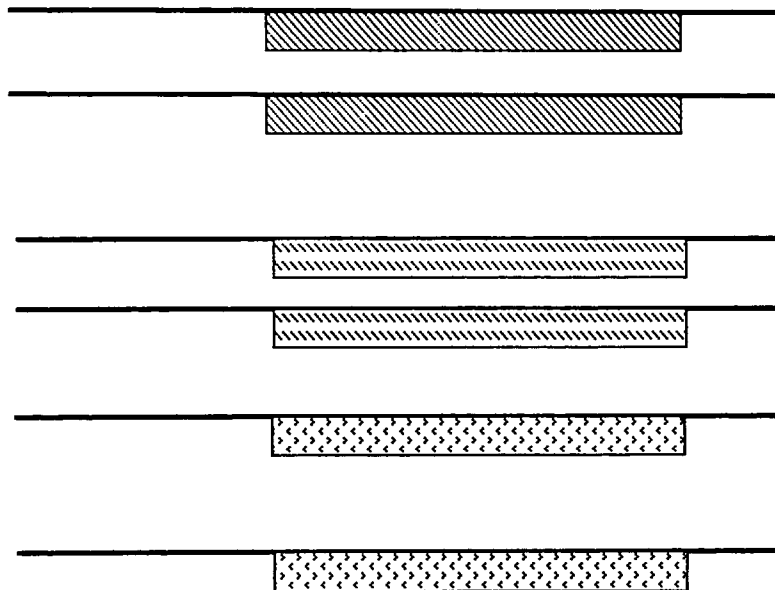
NS + (CHI ó MZN ó POB)

**Mezcla:**

MU+NS

**Combinaciones dobles:**

(MU+NS)+(CHI ó MZN ó POB)



**Figura 3.1. Tratamientos empleados en los ensayos biológicos con SMART**  
(Modificado de Guzmán-Rincón *et al.* 2000)

### 3.3.3. Procesamiento del material y análisis estadístico

Después que las moscas adultas emergieron, se colectaron y almacenaron en frascos de 25 ml con etanol al 70 %. Posteriormente se seleccionaron a los organismos transheterocigotos a los cuales se les disectaron las alas para hacer preparaciones permanentes con 40 alas por laminilla (20 ♀♀ y 20 ♂♂).

Las alas se revisaron en un microscopio óptico a 40x y se cuantificaron el número y el tipo de mancha según el siguiente criterio (Graf *et al.* 1984):

- a) Manchas simples chicas.- presentan un solo marcador (*mwh* ó *flr<sup>3</sup>*) y consisten de una o dos células afectadas.
- b) Manchas simples grandes.- se manifiesta sólo uno de los dos marcadores y el número de células que lo presentan es mayor a 2.
- c) Manchas gemelas.- exhiben los dos tipos de marcadores (tricomas múltiples y tricomas en forma de flama) y en su mayoría consisten de más de 2 células afectadas.

Los eventos genéticos que originan a las manchas simples son la deleción, mutación puntual, no disyunción y recombinación. Las manchas gemelas son originadas únicamente por recombinación mitótica. Sin embargo, la diferencia entre la recombinación que origina a manchas simples y la que origina a manchas gemelas es que la primera se lleva a cabo en el intervalo entre los marcadores (*mwh* y *flr<sup>3</sup>*) y la segunda en el intervalo entre el marcador *flr<sup>3</sup>* y el centrómero (Ramel y Magnusson 1992).

La Figura 3.2. muestra los eventos genéticos que originan a los distintos tipos de manchas.



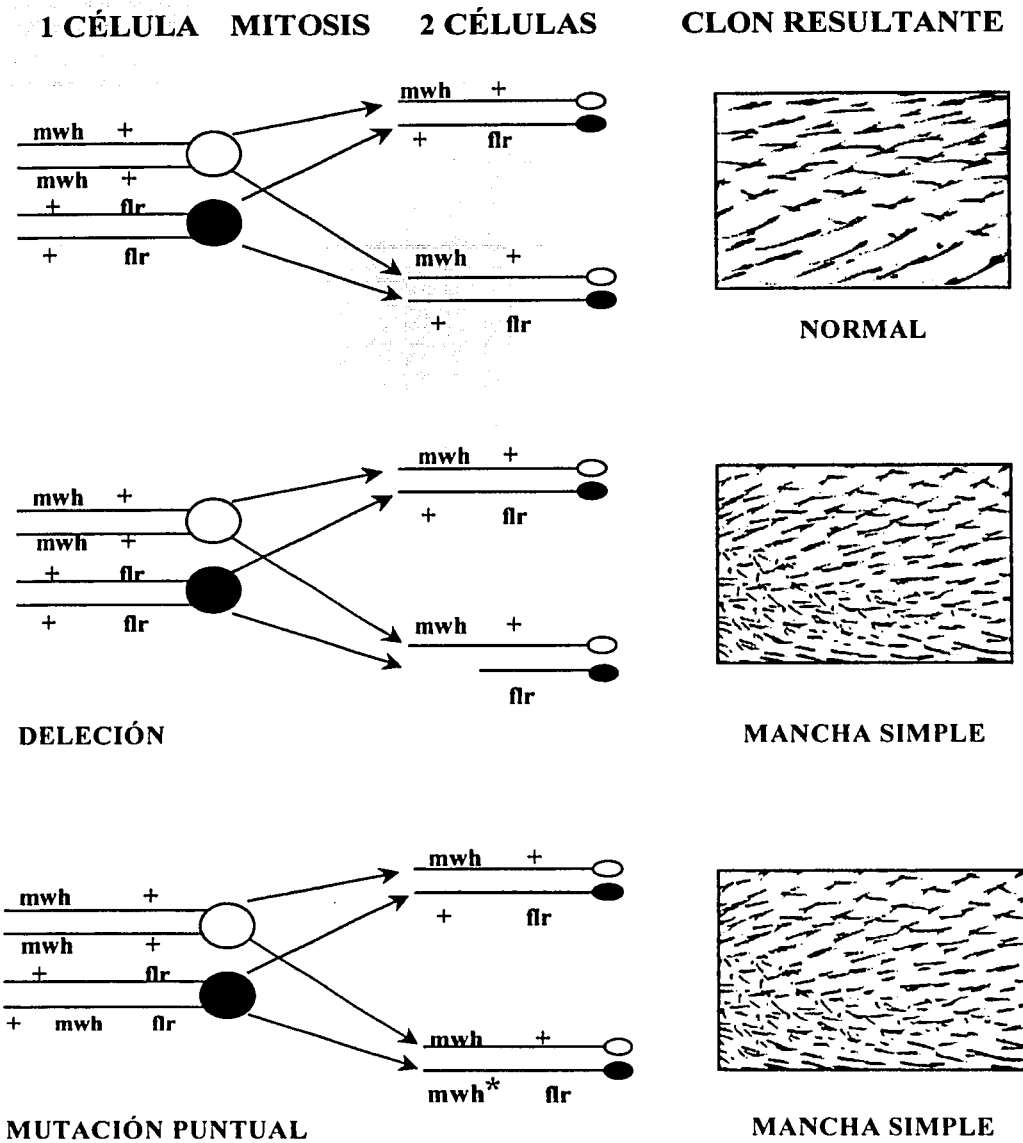


Figura 3.2. Eventos genéticos que dan origen a los distintos tipos de manchas en la prueba SMART-ala  
(Modificado de Graf *et al.* 1984)

TESIS CON  
FALLA DE CUMPLIMIENTO

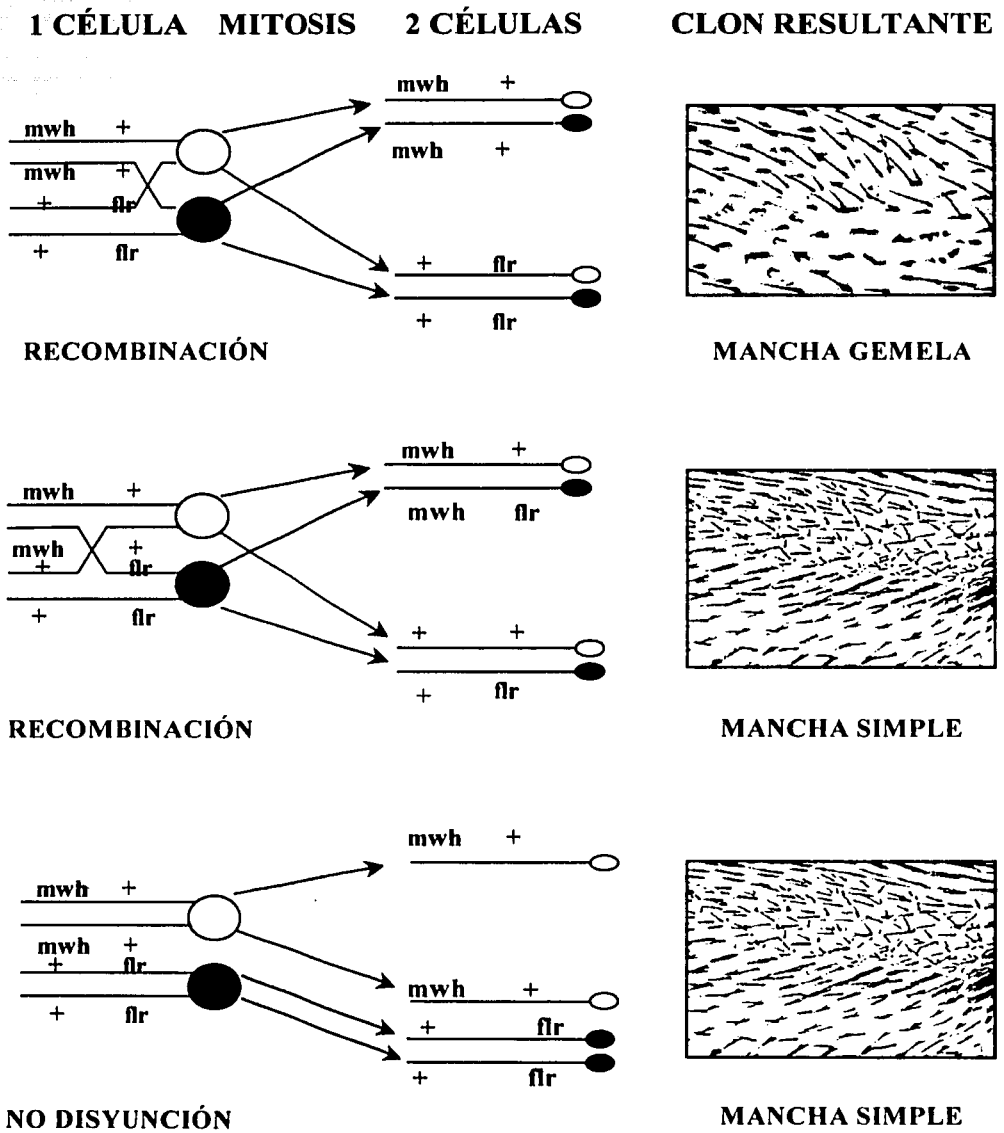


Figura. 3.2. Continuación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se debe considerar que aunque la mayoría de los clones grandes son continuos, algunos pueden presentar interrupciones debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo causadas por presiones tisulares o movimientos independientes. Por lo tanto, solo se contabilizan como clones independientes aquellos que se encuentren separados por tres hileras o más de tricomas normales (Würgler y Graf 1990).

El efecto genotóxico fue evaluado mediante la prueba de  $X^2$  de proporciones, con el paquete estadístico SMART versión para P.C. de Frei y Würgler (sin publicar). En general el análisis está basado en dos hipótesis: (1) la frecuencia de mutación (inducida mas espontánea) en grupos tratados no es más grande que la frecuencia de mutación en un grupo testigo y (2) la frecuencia de mutación inducida en las series tratadas es "m" veces mayor que la observada en grupos testigos. Ambas hipótesis son probadas a nivel de significancia del 5 %. El valor de "m" para las manchas chicas y para las manchas totales que presentan una frecuencia de mutación espontánea relativamente alta es =2. Para las manchas grandes y para las manchas gemelas, que tienen una frecuencia espontánea baja, el valor de m=5 (Frei y Würgler 1988).

La evaluación de los efectos genotóxicos se hizo comparando las frecuencias obtenidas de los grupos tratados con los testigos negativos y se decidió el resultado como positivo, débil positivo, no concluyente o negativo, utilizando un análisis de decisión múltiple (Shelby y Olson 1981). Para evitar los resultados dudosos en un diseño de prueba óptimo, deberán ser analizadas igual número de alas con un mínimo de 110 en todos los grupos experimentales (Frei y Würgler 1995).

### **3.4. REACCIÓN DE NITROSACIÓN *IN VITRO***

Antes de incubar la mezcla para realizar la reacción y observar su espectro de absorción, se analizaron los espectros de los precursores por separado. También se hizo para la MNU que se usó como testigo positivo a la reacción.

#### **3.4.1. Espectros de absorción de los precursores y de N-nitrosometilurea**

Se realizaron por separado los espectros de la MU y del NS en soluciones al 20  $\mu\text{M}$ . Para el espectro de la MNU se pesaron 0.02 g que se aforaron a 10 ml de los cuales se tomaron 10  $\mu\text{l}$  y se aforaron a 10 ml quedando una solución final al 20 mM.

#### **3.4.2. Reacción de nitrosación a partir de sus precursores**

Se mezclaron los precursores MU y NS a una concentración final de 20 mM. Se pesaron 0.074 g de MU y 0.069 g de NS, cada cual fue aforado a 25 ml. A esta mezcla se le ajustó el pH a 2.5 con HCl. Realizado el ajuste, se dejó incubar a temperatura ambiente (25 °C) y en agitación constante durante 60 min para realizar posteriormente los análisis espectrofotométricos.

#### **3.4.3. Determinación del porcentaje del producto final de la reacción de nitrosación**

Se realizó una curva patrón de la MNU a partir de su pico máximo de absorción (391 nm). Se utilizó el espectrofotómetro previamente descrito para realizar las lecturas. La cantidad del producto final fue calculada usando la curva estándar de MNU pura (20  $\mu\text{M}$  a 20 mM) con los siguientes valores:  $y = 0.050732 x + 0.187434$ ; en donde  $y = 391 \text{ nm}$  y  $x = \text{concentración de MNU en } \mu\text{M/ml}$ , con un coeficiente de correlación  $r = 0.9966$ .

#### **3.4.4. Cinética de formación del producto final de la reacción de nitrosación**

Se realizaron lecturas espectrofotométricas de la reacción a diferentes tiempos. La estrategia consistió en mezclar los componentes como se describió en el apartado 3.4.2b. A partir del ajuste de pH se hicieron lecturas cada 15 min iniciando en el tiempo cero hasta los 75 min. Posteriormente las lecturas se realizaron cada hora hasta las 6 h y finalmente se hizo una última a 24 h.

### **3.5 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DEL ASC Y CLO CON LA MEZCLA MU+NS**

Con el fin de observar si existe alguna interacción del ácido ascórbico y la clorofilina con la reacción de nitrosación, se recurrió a una modificación del

método de espectrofotometría por titulación utilizado por Dashwood *et al.* (1996). Se emplearon celdas de cuarzo estándar para el espectrofotómetro Perkin-Elmer descrito previamente, el cual estaba ligado al programa estadístico WinLamba 2 v.6. Los análisis consistieron en la lectura de los espectros de absorción de los compuestos así como de sus respectivas mezclas en un rango de 800 a 200 nm.

La hipótesis planteada fue la siguiente: si cada uno de los compuestos a probar tiene en el espectro picos máximos de absorción que difieren entre sí, entonces, al realizar la mezcla de ellos se podría observar su posible interacción en la modificación de estos espectros.

Basándose en esta hipótesis, se realizaron las lecturas de los espectros de absorción (EA) de la manera siguiente:

- a) ASC + (MU+NS)
- b) ASC + MNU
- c) CLO + (MU+NS)
- d) CLO + MNU

A continuación se detallan los pasos seguidos para la determinación de dichos espectros.

### 3.5.1. Ácido ascórbico

a) ASC + (MU+NS). Estos experimentos se llevaron al cabo incubando simultáneamente MU y NS (20 mM) y ASC a diferentes concentraciones que dependieron de los resultados del inciso 3.2.2, es decir, del análisis de la cantidad de Vit.C encontrada en los chiles. De este modo se utilizaron las cantidades reales de ASC que durante los ensayos *in vivo* las larvas pudieron consumir. Se procedió de acuerdo con el inciso 3.4.2. La razón de usar esta estrategia surgió del hecho de tratar de simular las condiciones dadas *in vivo*, en donde se agregó al medio de puré de papa una solución de MU y NS

seguida de cada una de las concentraciones de los homogeneizados de Chile. Al alimentarse las larvas de este medio, el pH de su tracto gastrointestinal (2-4) tuvo efecto tanto en la reacción MU+NS como en el ASC. Debido a que la incubación de la mezcla fue de una hora y tomando en cuenta que el ASC se oxida rápidamente cuando se encuentra en solución, la incubación se hizo en matraces Erlenmeyer de 25 ml con la boca cubierta por un globo inflado con gas nitrógeno, de esta manera se evitó en lo posible el contacto con el oxígeno. Además se cubrieron con papel aluminio para evitar el paso de la luz, ya que el ASC puede también sufrir oxidación por el contacto con la luz.

- b) ASC + MNU. Esta serie es la referencia a los experimentos de inciso anterior. La MNU (20 mM) se mantuvo como solución constante distribuida en tubos de ensayo a los cuales se les agregaron las mismas concentraciones de ASC del inciso anterior.

### 3.5.2. Clorofilina

- a) CLO + (MU+NS). Se siguió el mismo procedimiento que en el caso del ASC. Se hizo la incubación simultánea de los tres componentes en donde las cantidades de CLO variaron de acuerdo con las encontradas en los chiles.
- b) CLO + MNU. Se utilizó esta serie como referencia al inciso anterior y se siguió el mismo procedimiento del inciso 3.5.1.b.

Cabe mencionar que debido a la fotosensibilidad de la clorofilina, estos experimentos se llevaron al cabo con un mínimo de incidencia de luz cubriendo toda la cristalería utilizada con papel aluminio.

### 3.5.3. Análisis estadístico

La estadística se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, tomándose en cuenta las siguientes hipótesis:  $H_0$  = todos los tratamientos producen absorbencias iguales y  $H_a$  = al menos uno de los tratamientos produce cambio en la absorbencia. Se realizó también una prueba de comparación de medias de Tukey (Tukey's Honest Significant Difference Test) para comparar todos los tratamientos entre sí.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DETERMINACIONES

#### 4.1.1. Obtención de los homogeneizados de chile

Después de que a los chiles se les quitaron los tallos, semillas y venas, se pesaron y se obtuvieron las cantidades siguientes: 1500 g de chilaca los cuales produjeron 1027 ml de jugo; 1500 g de chile manzano con un total de 1000 ml y 1700 g de chile poblano de los cuales se extrajeron 1236 ml de jugo. Se tomaron 800 ml de cada uno para los ensayos biológicos. El resto se liofilizó y se utilizó para realizar los análisis químicos. Se obtuvieron aproximadamente 15 g de liofilizado por cada uno de los chiles.

#### 4.1.2. Determinación del ácido ascórbico

Los datos de la titulación mostraron que el chile manzano presentó la mayor cantidad de ASC con 104.4 mg/100 g de chile, seguido del poblano con 85 mg/100 g y finalmente de la chilaca con 47 mg/100 g. En los ensayos biológicos se aplicaron tres concentraciones de los homogeneizados de chile 12.5, 25 y 50 % v/v, estos volúmenes en ml de jugo concentrado corresponden a 0.625, 1.25 y 2.5 ml respectivamente. La Tabla IV.1 muestra la cantidad de ASC presente en los chiles así como la concentración (mmol) al realizar el ensayo biológico.

**Tabla IV.1. Concentración de ASC presente en los chiles**

Chile	ASC (mg/100g)	Ensayo biológico (%)	Jugo (ml)	ASC (mM)	ASC (mmol)
Manzano	104.4	12.5	0.625	1.11	0.005
		25	1.25	2.22	0.011
		50	2.5	4.44	0.022
Poblano	85	12.5	0.625	0.83	0.004
		25	1.25	1.66	0.008
		50	2.5	3.32	0.016
Chilaca	47	12.5	0.625	0.49	0.002
		25	1.25	0.97	0.004
		50	2.5	1.95	0.009

#### 4.1.3. Determinación de la capsaicina

El análisis químico de la capsaicina mostró que el chile poblano tiene la mayor concentración con 169.69  $\mu\text{g eq/ml}$  seguido de la chilaca con 85.13  $\mu\text{g eq/ml}$  y finalmente del manzano con 36.94  $\mu\text{g eq/ml}$ . Tabla IV.2.

**Tabla IV.2. Concentración de capsaicina en los chiles**

Chile	CAP ( $\mu\text{g eq/ml}$ )	Ensayo biológico (%)	Jugo (ml)	CAP (mM)	CAP (mmol)
Poblano	169.69	12.5	0.625	21.21	0.013
		25	1.25	42.42	0.053
		50	2.5	84.84	0.212
Chilaca	85.13	12.5	0.625	10.64	0.006
		25	1.25	21.28	0.026
		50	2.5	42.56	0.106
Manzano	36.94	12.5	0.625	4.62	0.002
		25	1.25	9.24	0.011
		50	2.5	18.47	0.046

#### 4.1.4. Determinación de la clorofilina

Los resultados mostraron que la chilaca presenta la mayor cantidad con 32.67  $\mu\text{g eq/ml}$  seguido por el chile poblano con 23.92  $\mu\text{g eq/ml}$  y del manzano con 18.28  $\mu\text{g eq/ml}$ . La Tabla IV.3 muestra estos resultados.

**Tabla IV.3. Microgramos equivalentes ( $\mu\text{g eq}$ ) de clorofilina presente en los chiles**

Chile	CLO ( $\mu\text{g eq/ml}$ )	Ensayo biológico (%)	Jugo (ml)	CLO (mM)	CLO ( $\mu\text{mol}$ )
Chilaca	32.67	12.5	0.625	5.64	0.028
		25	1.25	11.88	0.056
		50	2.5	22.56	0.113
Poblano	23.92	12.5	0.625	4.13	0.021
		25	1.25	8.26	0.041
		50	2.5	16.52	0.083
Manzano	18.28	12.5	0.625	3.15	0.016
		25	1.25	6.31	0.032
		50	2.5	12.62	0.063



La Tabla IV.4 resume las cantidades de ASC, CLO y CAP presentes en los homogeneizados. Se puede apreciar que cada uno de los chiles tiene una molécula de mayor abundancia con respecto a los demás. El ácido ascórbico se encontró distribuido de la siguiente manera: manzano>poblano>chilaca; la capsaicina: poblano>chilaca>manzano y la clorofilina: chilaca>poblano>manzano. Se observa en la misma tabla la cantidad en gramos de chile y los mililitros obtenidos después de procesarlos.

**Tabla IV.4. Concentración de moléculas presentes en los chiles**

Chile	ASC (mg/100g)	CAP (µg eq/ml)	CLO (µg eq/ml)	Material fresco (g) <sup>1</sup>	Jugo obtenido (ml)
Chilaca	47	85.13	32.67	1500	1027
Manzano	104.4	36.94	18.28	1500	1000
Poblano	85	169.69	23.92	1700	1236

<sup>1</sup>Peso de los chiles sin tallos, venas ni semillas.

## 4.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 4.2.1. Toxicidad

La recuperación de los organismos adultos al finalizar los tratamientos simples (MU, NS, CHI, MZN, POB) y de combinaciones simples (MU+CHI ó MZN ó POB; NS+CHI ó MZN ó POB) fue del  $95 \pm 2$  %. Lo que indica que las concentraciones y las dosis utilizadas no fueron tóxicas a las larvas de *Drosophila*. Cabe mencionar que previamente se habían realizado los estudios preliminares de toxicidad para determinar las dosis con las que se iba a experimentar. Sin embargo, vale la pena aclarar que esta relación no se modificó a lo largo de los experimentos llevados a cabo.

#### 4.2.2. Evaluación genotóxica de los tratamientos simples y de las combinaciones simples

Se realizaron al menos 3 experimentos y se compararon los resultados obtenidos en las distintas series así como en los testigos concurrentes. Como no existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se sumaron los resultados para incrementar los tamaños de muestras que fueron de 280 y 320 alas para los testigos negativos de las cruza ES y BE, respectivamente. Para los grupos tratados el tamaño de muestra fue de 120 alas.

Ni el nitrito de sodio ni la metil urea produjeron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo negativo. La frecuencia de mutación basal en el número total de manchas del testigo negativo fue de 0.36 para la cruza ES y 0.48 para la de BE. Los tratamientos con MU mostraron una frecuencia basal de 0.33 y 0.51 para ES y BE respectivamente. Para el NS las frecuencias fueron de 0.33 para ES y 0.53 para BE. La Tabla IV.5 muestra las frecuencias de mutación de estos grupos para todos los tipos de manchas.

**Tabla IV.5. Frecuencia de machas obtenidas con MU y NS**

Compuesto	No. Alas	Tipos de Manchas (número de manchas)			
		Chicas	Grandes	Gemelas	Totales
<b>Cruza estándar</b>					
H <sub>2</sub> O	280	0.32 (90)	0.04 (11)	0.00 (0)	0.36 (101)
MU (20mM)	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.01 (1)-	0.33 (40)-
NS (20mM)	120	0.32 (38)-	0.02 (2)-	0.00 (0)-	0.33 (40)-
<b>Cruza de bioactivación elevada</b>					
H <sub>2</sub> O	320	0.43 (138)	0.04 (13)	0.01 (3)	0.48 (154)
MU (20mM)	120	0.43 (52)-	0.08 (9)-	0.01 (1)-	0.51 (61)-
NS (20mM)	120	0.46 (55)-	0.04 (5)-	0.03 (4)-	0.53 (64)-

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988) para la comparación con el testigo concurrente: + = positivo; - = negativo; i = no concluyente.

Ninguna de las dosis de los tratamientos con los homogeneizados de los chiles presentaron efecto genotóxico a las larvas. El análisis estadístico mostró que los resultados no fueron significativos ( $p < 0.05$ ) con respecto a su testigo negativo. Para la cruce ES estas frecuencias estuvieron en un intervalo de 0.30 a 0.35 manchas por ala. Las combinaciones simples con los homogeneizados de Chile más MU ó NS tampoco fueron genotóxicas a las larvas. El rango de la frecuencia de manchas totales (FMT) que presentaron estuvo entre 0.32 y 0.40 para las combinaciones con MU y entre 0.32 y 0.48 para las combinaciones con NS (Tabla IV.6A).

La cruce BE mostró una frecuencia de mutación basal de 0.48 (con un total de 154 manchas en 320 individuos). Los tratamientos con los homogeneizados mostraron una FMT entre 0.39 y 0.55. Estas frecuencias comparadas con la de su testigo negativo, no fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Los mismos resultados se obtuvieron con las combinaciones simples con MU (FMT entre 0.37 y 0.53 manchas por ala) y NS (FMT entre 0.32 y 0.54) (Tabla IV.6B).

En ambas cruces el fenotipo de mancha predominante fue el que presentó el marcador *mwh*, siendo las manchas chicas (en su modalidad de 1 célula) las de mayor frecuencia, seguidas de las grandes y gemelas. Los porcentajes promedio de cada uno de estos tipos fueron de 92 %, 6 % y 2 %, respectivamente. Cabe mencionar que dentro de la categoría de manchas grandes, la cantidad de células afectadas no fue mayor de 32, siendo este resultado un indicador del número de ciclos en que las células de los discos imagales se dividieron antes de formar las alas de las moscas.

Las FMT que se observaron en los experimentos anteriores, mostraron que bajo estas condiciones, los tratamientos simples y de combinaciones simples no elevaron la frecuencia de mutación basal de los organismos, lo que permite tener una amplia gama de testigos que serán posteriormente comparados con los experimentos realizados con las combinaciones dobles, es decir, con la mezcla de ambos compuestos, MU y NS más la adición de cada una de las tres dosis de los chiles.

**Tabla IV.6. Resultados obtenidos en el ensayo SMART después de la exposición a tratamientos simples y combinaciones simples con MU, NS y tres concentraciones de los extractos de Chile**

**A. Cruza estándar**

Tratamiento (%)	No. Alas	Manchas por ala (número de manchas)			
		Chicas (1-2 cels.)	Grandes (>2cels.)	Gemelas	Totales
H <sub>2</sub> O	280	0.32 (90)	0.04 (11)	0.00 (0)	0.36 (101)
CHI 12.5	120	0.29 (35)-	0.01 (1)-	0.00 (0)-	0.30 (36)-
CHI 25	120	0.31 (37)-	0.03 (3)-	0.00 (0)-	0.33 (40)-
CHI 50	120	0.34 (41)-	0.01 (1)-	0.00 (0)-	0.35 (42)-
MZN 12.5	120	0.31 (38)-	0.01 (1)-	0.01 (1)-	0.33 (40)-
MZN 25	120	0.31 (37)-	0.03 (4)-	0.01 (1)-	0.35 (42)-
MZN 50	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.01 (1)-	0.33 (40)-
POB 12.5	120	0.30 (36)-	0.00 (0)-	0.01 (1)-	0.31 (37)-
POB 25	120	0.26 (31)-	0.03 (3)-	0.02 (2)-	0.30 (36)-
POB 50	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.00 (0)-	0.32 (39)-
MU 20 mM	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.01 (1)-	0.33 (40)-
MU+CHI 12.5	120	0.30 (36)-	0.02 (3)-	0.00 (0)-	0.32 (39)-
MU+CHI 25	120	0.31 (37)-	0.02 (2)-	0.01 (1)-	0.33 (40)-
MU+CHI 50	120	0.33 (40)-	0.02 (2)-	0.01 (1)-	0.36 (43)-
MU+MZN 12.5	120	0.32 (39)-	0.01 (1)-	0.01 (1)-	0.36 (43)-
MU+MZN 25	120	0.35 (42)-	0.04 (5)-	0.00 (0)-	0.38 (46)-
MU+MZN 50	120	0.37 (45)-	0.02 (3)-	0.00 (0)-	0.40 (48)-
MU+POB 12.5	120	0.37 (44)-	0.02 (2)-	0.00 (0)-	0.38 (46)-
MU+POB 25	120	0.30 (36)-	0.02 (3)-	0.03 (4)-	0.40 (48)-
MU+POB 50	120	0.35 (42)-	0.02 (2)-	0.02 (2)-	0.38 (46)-
NS 20 mM	120	0.32 (38)-	0.02 (2)-	0.00 (0)-	0.33 (40)-
NS+CHI 12.5	120	0.29 (35)-	0.03 (4)-	0.00 (0)-	0.32 (39)-
NS+CHI 25	120	0.32 (39)-	0.02 (3)-	0.01 (1)-	0.36 (43)-
NS+CHI 50	120	0.30 (36)-	0.05 (6)-	0.00 (0)-	0.35 (42)-
NS+MZN 12.5	120	0.29 (35)-	0.02 (3)-	0.00 (0)-	0.32 (38)-
NS+MZN 25	120	0.31 (37)-	0.03 (4)-	0.01 (1)-	0.35 (42)-
NS+MZN 50	120	0.32 (39)-	0.04 (5)-	0.00 (0)-	0.36 (43)-
NS+POB 12.5	120	0.29 (35)-	0.02 (2)-	0.01 (1)-	0.32 (38)-
NS+POB 25	120	0.39 (47)-	0.02 (2)-	0.03 (3)-	0.43 (52)-
NS+POB 50	120	0.44 (53)-	0.02 (3)-	0.02 (2)-	0.48 (58)-

Tabla IV.6. Continuación

**B Cruza de bioactivación elevada**

Tratamiento (%)	No. Alas	Manchas por ala (número de manchas)			
		Chicas (1-2 cels.)	Grandes (>2cels.)	Gemelas	Totales
H <sub>2</sub> O	320	0.43 (138)	0.04 (13)	0.01 (3)	0.48 (154)
CHI 12.5	120	0.32 (39)	0.03 (3)	0.00 (0)	0.55 (42)
CHI 25	120	0.36 (43)	0.03 (4)	0.00 (0)	0.39 (47)
CHI 50	120	0.37 (44)	0.03 (4)	0.00 (0)	0.40 (48)
MZN 12.5	120	0.36 (46)	0.01 (2)	0.00 (0)	0.40 (48)
MZN 25	120	0.41 (49)	0.03 (4)	0.00 (0)	0.44 (53)
MZN 50	120	0.37 (44)	0.02 (3)	0.01 (1)	0.39 (47)
POB 12.5	120	0.36 (43)	0.03 (3)	0.01 (1)	0.39 (47)
POB 25	120	0.37 (45)	0.05 (6)	0.02 (2)	0.44 (53)
POB 50	120	0.43 (51)	0.03 (4)	0.01 (1)	0.47 (56)
MU 20 mM	120	0.43 (51)	0.08 (9)	0.01 (1)	0.51 (61)
MU+CHI 12.5	120	0.36 (44)	0.03 (3)	0.01 (1)	0.40 (48)
MU+CHI 25	120	0.33 (40)	0.05 (6)	0.00 (0)	0.38 (46)
MU+CHI 50	120	0.43 (51)	0.03 (3)	0.00 (0)	0.45 (54)
MU+MZN 12.5	120	0.35 (42)	0.01 (2)	0.00 (0)	0.37 (44)
MU+MZN 25	120	0.43 (52)	0.01 (2)	0.00 (0)	0.45 (54)
MU+MZN 50	120	0.35 (42)	0.01 (2)	0.00 (0)	0.37 (44)
MU+POB 12.5	120	0.49 (59)	0.03 (3)	0.02 (2)	0.53 (64)
MU+POB 25	120	0.45 (54)	0.07 (8)	0.00 (0)	0.52 (62)
MU+POB 50	120	0.43 (51)	0.03 (3)	0.03 (3)	0.47 (57)
NS 20 mM	120	0.46 (55)	0.04 (5)	0.03 (4)	0.53 (64)
NS+CHI 12.5	120	0.47 (56)	0.04 (5)	0.00 (0)	0.51 (61)
NS+CHI 25	120	0.46 (55)	0.02 (3)	0.01 (1)	0.49 (59)
NS+CHI 50	120	0.47 (56)	0.02 (3)	0.01 (1)	0.50 (60)
NS+MZN 12.5	120	0.29 (35)	0.02 (3)	0.00 (0)	0.32 (38)
NS+MZN 25	120	0.39 (47)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.40 (48)
NS+MZN 50	120	0.32 (38)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.32 (38)
NS+POB 12.5	120	0.45 (54)	0.03 (4)	0.02 (2)	0.50 (60)
NS+POB 25	120	0.52 (62)	0.01 (1)	0.00 (0)	0.52 (63)
NS+POB 50	120	0.51 (61)	0.02 (2)	0.02 (2)	0.54 (65)

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988) para la comparación con el testigo concurrente: + = positivo; - = negativo; i = no concluyente.

### 4.2.3. Genotoxicidad de la mezcla MU+NS y el efecto de los homogeneizados de Chile

#### 4.2.3.1. Cruza estándar

- I. MU+NS. El efecto producido por la mezcla MU+NS resultó genotóxica a las larvas de los organismos tratados. La FMT del grupo experimental fue cinco veces mayor que el del testigo, siendo de 1.73 para el primero y 0.36 para el segundo. Esta tendencia se presentó en todos los tipos de manchas siendo las chicas las predominantes seguidas de las grandes y gemelas (Tabla IV.7). El fenotipo *mwh* fue el que tuvo mayor presencia con 206 clones/120 individuos.
- II. Chilaca. Los tratamientos simultáneos de la mezcla con este homogeneizado mostraron un efecto genotóxico al ser comparados con el testigo negativo. Sin embargo, este efecto fue menor que el que presentó la mezcla sola. Comparando las FMT de estas combinaciones con la obtenida con MU+NS, se observó que la CHI tuvo un efecto sobre la mutagenicidad de la mezcla, inhibiendo 36 %, 42 % y 56 % los efectos genotóxicos de la misma (Tabla IV.7).
- III. Manzano. El homogeneizado derivado de este Chile mostró en todas sus dosis, una FMT menor a la de la mezcla sola. Este efecto representó un porcentaje de inhibición de 44 %, 62 % y 75 % para cada dosis, respectivamente. La disminución en cada uno de los tipos de manchas fue proporcional, pero se evidenció más en las gemelas, las cuales presentaron solo 1/120 individuos comparadas con la de la mezcla que mostró 11/120 (Tabla IV.7).
- IV. Poblano. El extracto de este Chile disminuyó 40 %, 46 % y 61 % la FMT original de la mezcla. Al igual que con los concentrados anteriores, este decremento fue proporcional a la dosis. La distribución de manchas siguió el mismo patrón de los tratamientos con CHI y MZN siendo: chicas >grandes>gemelas.

En todos los casos los homogeneizados combinados con (MU+NS) disminuyeron el efecto genotóxico provocado por esta mezcla. Sin embargo, sólo la dosis del 50 % de los concentrados produjeron una inhibición mayor al 50 %

La Tabla IV.7 resume los resultados de las frecuencias de manchas obtenidas en la cruza estándar en sus combinaciones dobles.

**Tabla IV.7. Frecuencias de manchas por ala obtenidas en la cruza estándar con los tratamientos con la mezcla (MU+NS) y las tres dosis de los homogeneizados de Chile**

Tratamiento (%)	No. Alas	Manchas por ala (número de manchas)			
		Chicas (1-2 cels.)	Grandes (>2cels.)	Gemelas	Totales
(MU+NS) 20mM	120	1.33 (160)	0.31 (37)	0.09 (11)	1.73 (208)
(MU+NS)+CHI 12.5	120	1.00 (121)-	0.06 (7)-	0.05 (6)-	1.12 (134)-
(MU+NS)+CHI 25	120	0.89 (107)-	0.08 (9)-	0.04 (5)-	1.01 (121)-
(MU+NS)+CHI 50	120	0.71 (85)-	0.03 (4)-	0.03 (3)-	0.76 (92)-
(MU+NS)+MAN12.5	120	0.91 (110)-	0.04 (5)-	0.01 (1)-	0.97 (116)-
(MU+NS)+MAN 25	120	0.62 (74)-	0.02 (3)-	0.01 (1)-	0.65 (78)-
(MU+NS)+MAN 50	120	0.40 (48)-	0.03 (4)-	0.00 (0)-	0.43 (52)-
(MU+NS)+POB12.5	120	0.95 (114)-	0.03 (4)-	0.05 (6)-	1.03 (124)-
(MU+NS)+POB 25	120	0.84 (101)-	0.08 (9)-	0.03 (3)-	0.94 (113)-
(MU+NS)+POB 50	120	0.62 (75)-	0.03 (4)-	0.03 (3)-	0.68 (82)-

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988) para la comparación con el testigo concurrente: + = positivo; - = negativo; i = no concluyente.

#### 4.2.3.2 Cruza de bioactivación elevada

- I. MU+NS. El efecto provocado por la mezcla en esta cruza superó en mucho a la observada en la estándar. El incremento en el número de manchas totales con respecto al testigo negativo fue 55 veces mayor. De 154 manchas obtenidas como resultado de la mutación espontánea (0.48 manchas/ala) aumentaron a 3175 (26.46). De la misma manera se incrementó la frecuencia de manchas en todas las categorías (Tabla IV.8). El número de clones *mwh* encontrados en este tratamiento fue de 2449.
- II. Chilaca. Los resultados mostraron FMT de 9.80, 6.18 y 3.25 manchas/ala. Los porcentajes de inhibición de estas frecuencias con respecto al testigo

fueron el 63 %, 77 % y 88 % para cada dosis. La ocurrencia de las distintas categorías de manchas se presentó: chicas>grandes>gemelas (Tabla IV.8).

III. Manzano. Este homogeneizado disminuyó con mayor eficiencia las FMT producidas por la reacción MU+NS. Estas frecuencias fueron menores a una mancha por ala (0.75, 0.57 y 0.36) representando un porcentaje de inhibición del 97 %, 98 % y 99 % (Tabla IV.8).

IV. Poblano. Las FMT observadas con este concentrado fueron menores a la producida por la mezcla sola. Esta reducción fue proporcional a la dosis y sus porcentajes de inhibición fueron del 46 %, 59 % y 79 %.

Con excepción de la combinación (MU+NS)+POB 12.5 %, todos los homogeneizados ejercieron una inhibición mayor al 50 %.

Comparando la frecuencia de manchas totales encontradas en ambas cruzas, se observó que el efecto mutagénico provocado por la mezcla MU+NS fue más evidente en la cruz BE. Asimismo el efecto antimutagénico de los homogeneizados de Chile fue más efectivo en esta cruz.

La Tabla IV.9 muestra los porcentajes de inhibición de cada uno de los tratamientos con los homogeneizados de Chile sobre la mezcla MU+NS en ambas cruzas.

Las Figuras 4.1, 4.2 y 4.3, muestran los histogramas con las frecuencias de manchas totales observadas en todos los tratamientos con cada uno de los homogeneizados. La característica común en estas gráficas es la clara disminución dosis-respuesta de la frecuencia de mutaciones provocadas por la mezcla MU+NS, así como la respuesta negativa de los tratamientos simples y de combinaciones simples.



**Tabla IV.8. Frecuencias de manchas por ala obtenidas en la cruz de bioactivación elevada con los tratamientos con la mezcla (MU+NS) y las tres dosis de los homogeneizados de chiles.**

Tratamiento (%)	No. Alas	Manchas por ala (número de manchas)			
		Chicas (1-2 cels.)	Grandes (>2cels.)	Gemelas	Totales
(MU+NS) 20mM	120	19.57 (2348)	3.79 (455)	3.10 (372)	26.46 (3175)
(MU+NS)+CHI 12.5	120	6.92 (831)-	2.00 (240)-	0.87 (105)-	9.80 (1176)-
(MU+NS)+CHI 25	120	4.13 (496)-	1.56 (187)-	0.49 (59)-	6.18 (742)-
(MU+NS)+CHI 50	120	2.16 (259)-	0.83 (100)-	0.26 (31)-	3.25 (390)-
(MU+NS)+MAN12.5	120	0.40 (48)-	0.24 (29)-	0.11 (13)-	0.75 (90)-
(MU+NS)+MAN 25	120	0.40 (48)-	0.12 (15)-	0.06 (5)-	0.57 (68)-
(MU+NS)+MAN 50	120	0.29 (35)-	0.05 (6)-	0.01 (2)-	0.36 (43)-
(MU+NS)+POB12.5	120	10.7 (1289)-	2.37 (285)-	1.12 (134)-	14.23 (1708)-
(MU+NS)+POB 25	120	8.13 (976)-	1.83 (219)-	0.84 (101)-	10.80 (1296)-
(MU+NS)+POB 50	120	3.67 (441)-	1.27 (152)-	0.52 (62)-	5.46 (655)-

Análisis estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988) para la comparación con el testigo concurrente: + = positivo; - = negativo; i = no concluyente.

**Tabla IV.9. Porcentajes de inhibición de cada uno de los extractos de chile sobre la mezcla MU+NS en ambas cruas.**

Extracto/ Concentración %	ES (%)	BE (%)
CHI 12.5	36	63
CHI 25	42	77
CHI 50	56	88
MZN 12.5	44	97
MZN 25	62	98
MZN 50	75	99
POB 12.5	40	46
POB 25	46	59
POB 50	61	79

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

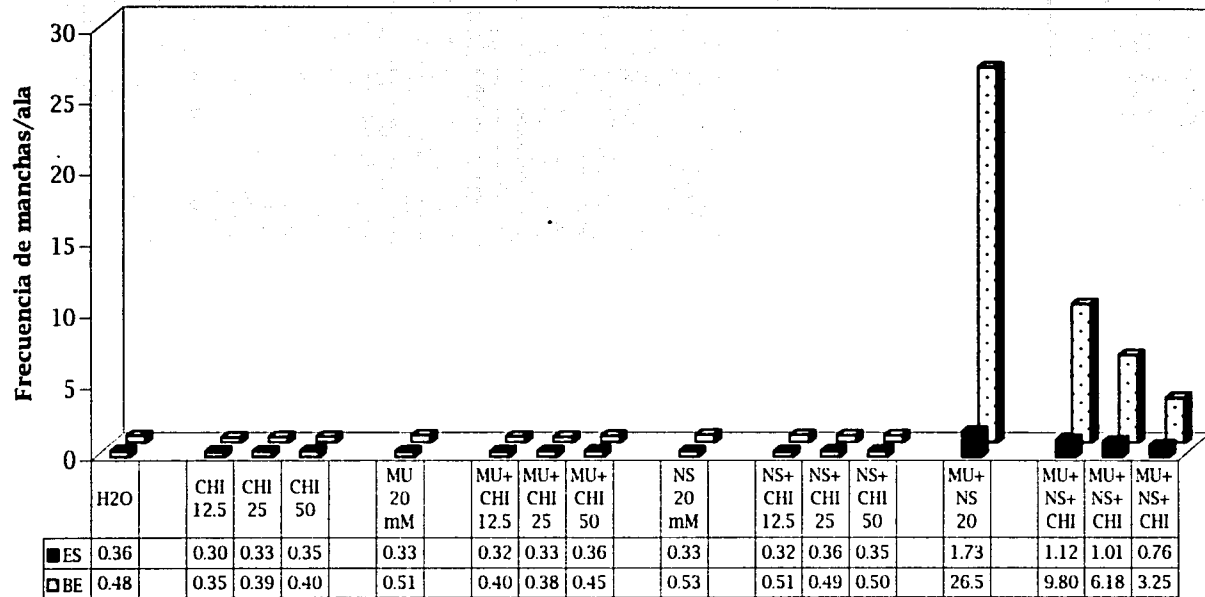


Figura 4.1. Frecuencia de manchas totales por ala obtenidas con el homogeneizado de la chilaca en ambas cruces de *Drosophila melanogaster*.

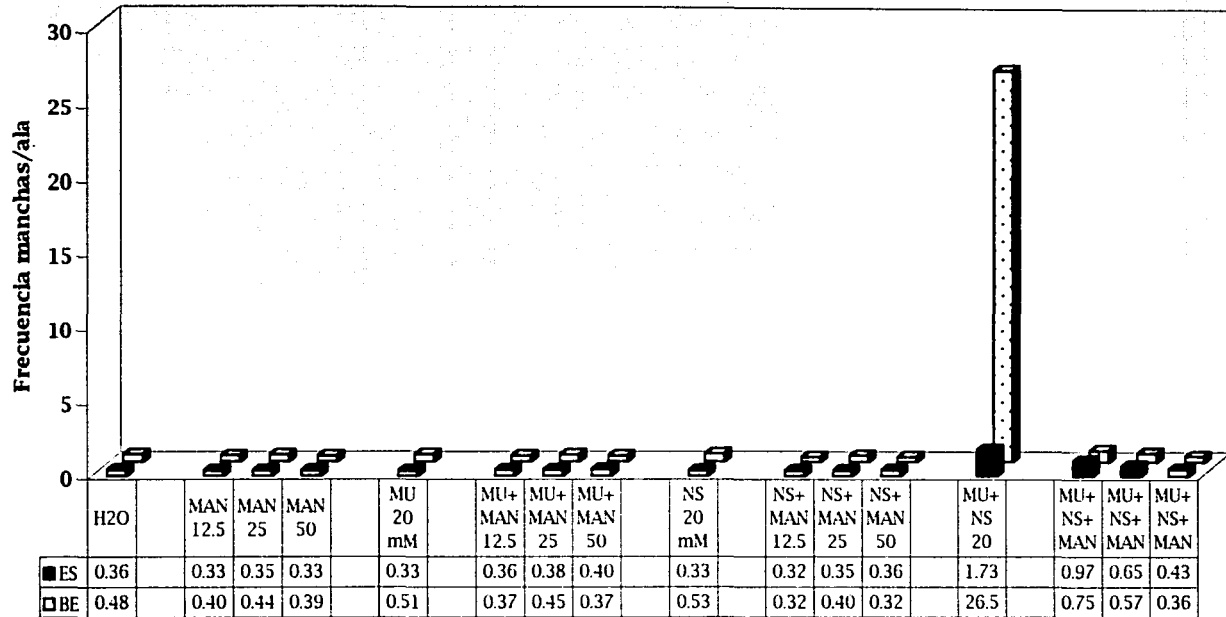


Figura 4.2. Frecuencia de manchas totales por ala obtenidas con el homogeneizado del chile manzano en ambas cruces de *Drosophila melanogaster*.

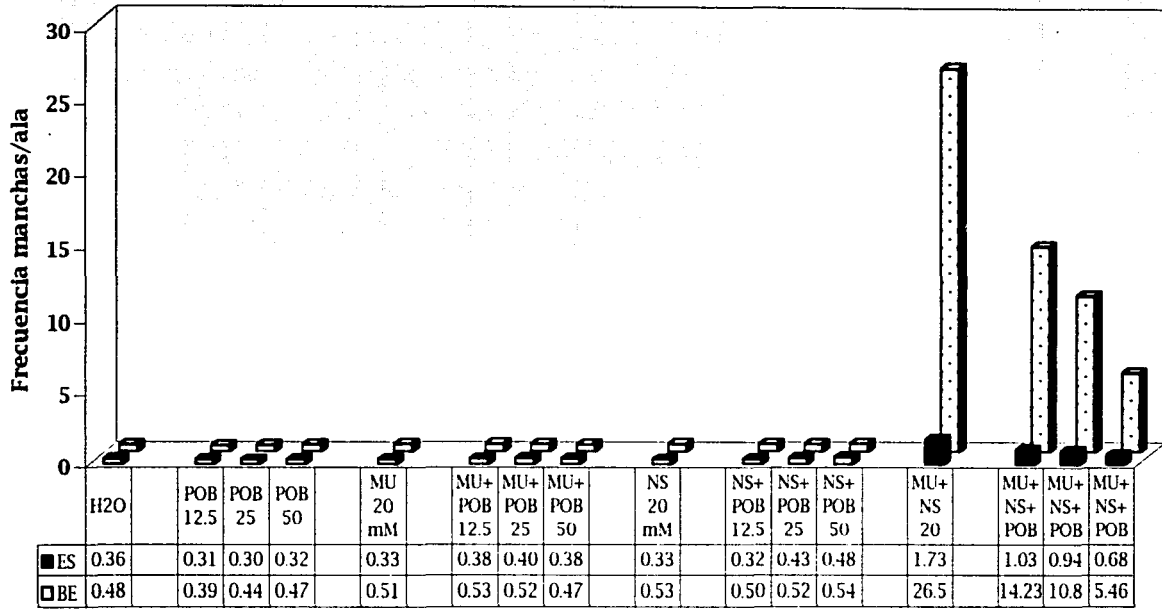


Figura 4.3. Frecuencia de manchas totales por ala obtenidas con el homogeneizado de chile poblano en ambas cruces de *Drosophila melanogaster*.

### 4.3. REACCIÓN DE NITROSACIÓN *IN VITRO*

#### 4.3.1. Espectros de absorción de los precursores MU y NS

Los espectros de MU y NS se encontraron en el rango de UV, en donde el pico de máxima absorción de la metil urea se detectó a 193 nm con una absorbencia (A) de 2.79. Para el nitrito de sodio se observó un pico a 209 nm con una A=1.90. Entre 800 y 250 nm ninguna de las dos sustancias presentaron absorbencias a longitudes de onda mayores a 250 nm (Figura 4.4).

#### 4.3.2. Espectro de absorción de la mezcla MU+NS

Después de mezclar a los compuestos se pudo observar un espectro distinto al de sus componentes individuales, apareciendo un pico a los 391 nm con una absorbencia de 0.37. Este pico podría deberse a la formación de la MNU (Figura 4.4).

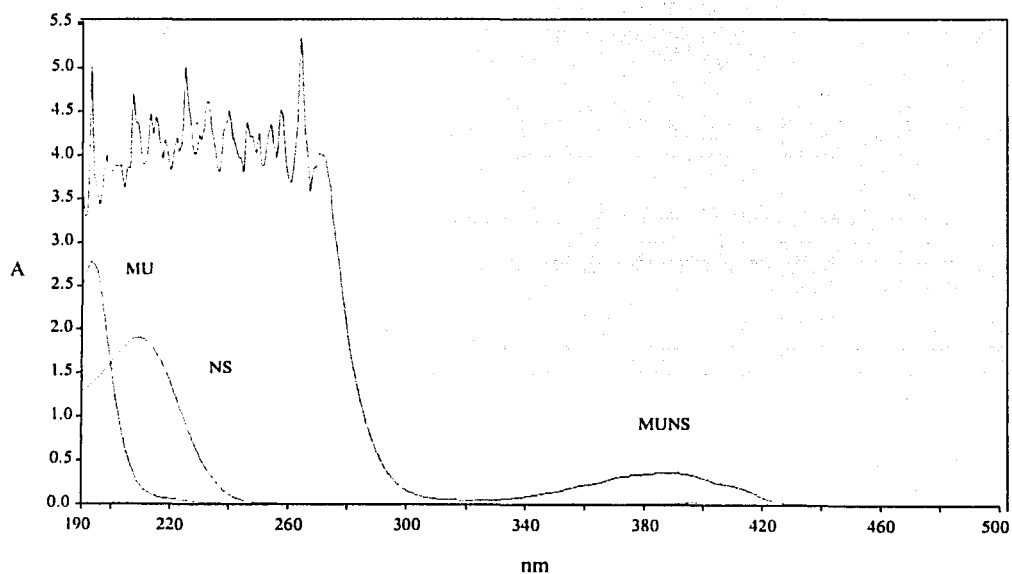
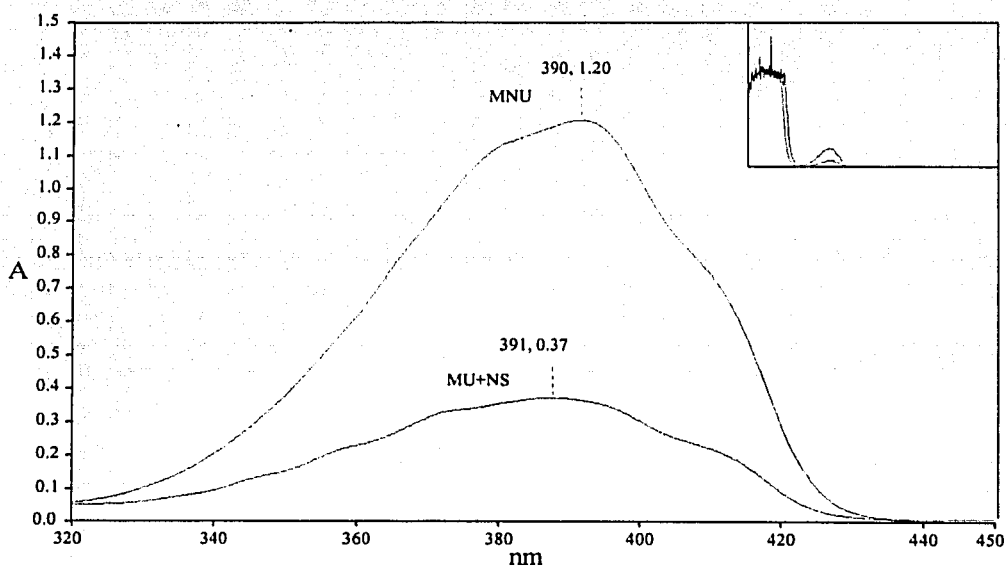


Figura 4.4. Espectros de absorción de los componentes de la mezcla MU+NS  
MU (20 $\mu$ M)  $\lambda$ =193, A=2.79; NS (20 $\mu$ M)  $\lambda$ =209, A=1.90; MU+NS  $\lambda$ =391, A=0.37

### 4.3.3. Espectro de absorción de la MNU y su comparación con la mezcla

Este espectro mostró un pico a los 390 nm con una  $A=1.20$ . En la Figura 4.5 se puede observar que no hubo diferencia entre los picos de la MNU y de la mezcla MU+NS. Durante toda la lectura espectrofotométrica (800-200 nm, esquina superior derecha de la gráfica) el patrón de los espectros es prácticamente el mismo. Entre los 800 a 440 nm no se detectan cambios en la absorción de los compuestos, posterior a este punto, poco a poco se empiezan a incrementar las absorbancias hasta llegar a las máximas de 0.37 para MU+NS y 1.20 para MNU en una  $\lambda=390$ . Después de los 300 nm, éstas se disparan arriba de 6.0 unidades en una serie de picos difíciles de definir debido a la compactación entre ellos. Estas absorbancias, entre los 300 y 200 nm pudieron deberse a la presencia de los precursores. Estos resultados confirman que el pico de la mezcla observado a los 391 nm corresponde a la formación de la MNU.



**Figura 4.5. Espectros de absorción entre 450-320 nm de la MNU y MU+NS**  
MNU (20mM) pico =390 nm,  $A=1.20$ ; MU+NS 1:1 (20mM) pico=391 nm,  $A=0.37$ .  
En la esquina superior derecha se puede apreciar el espectro completo (800-200 nm).

#### 4.3.4. Porcentaje del producto final de la reacción de nitrosación

A través de la curva patrón de MNU se pudo determinar el porcentaje del producto final de la reacción MU+NS. Tomando en cuenta que el pico de la MNU (391 nm) presenta una  $A=1.2$  que representaría el 100 % de producto, se determinó el porcentaje de producción de MNU después de la incubación de la mezcla por 60 min. El resultado mostró que la cantidad total del mutágeno generado a partir de la mezcla MU+NS fue de 17.99 %.

#### 4.3.5. Cinética de la reacción de nitrosación

Los espectros de absorción resultantes de las lecturas cada 15 min de la mezcla MU+NS se muestran en la Figura 4.6 en donde se observan las curvas a los tiempos  $t_0=0$ ,  $t_1=15$ ,  $t_2=30$ ,  $t_3=45$ ,  $t_4=60$ , y  $t_5=75$  min.

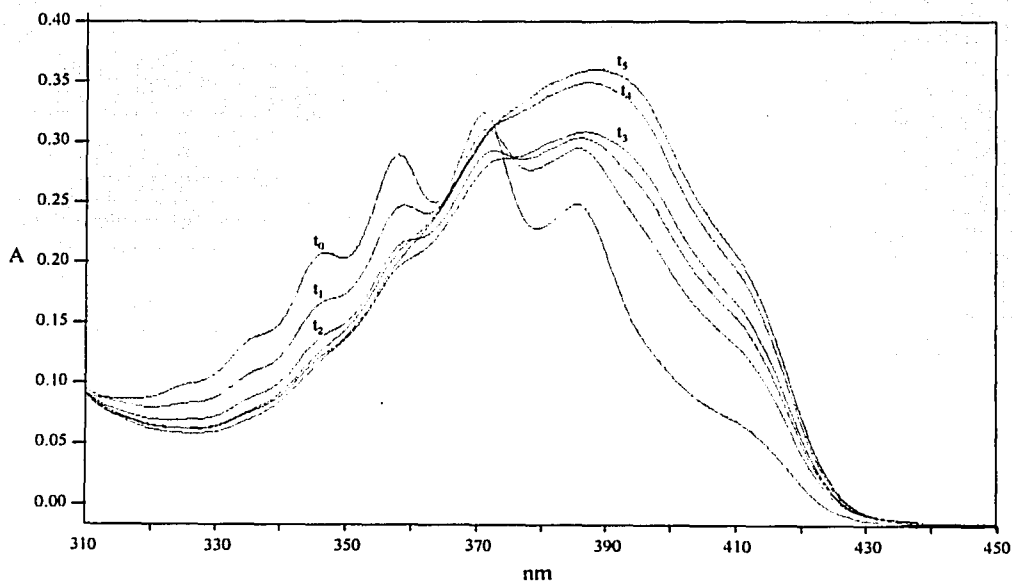


Figura 4.6. Formación de la metilnitrosourea a partir de sus precursores  $t_0=0$ ,  $t_1=15$ ,  $t_2=30$ ,  $t_3=45$ ,  $t_4=60$ , y  $t_5=75$  min.

Se continuaron registrando las lecturas de la mezcla cada 15 min hasta las 2 h al cabo de las cuales se hicieron los registros cada 60 min hasta 6 h. Finalmente se hizo una última lectura 24 h después de la incubación inicial (Tabla IV 10).

**Tabla IV.10. Absorbencias a los distintos tiempos de incubación de la mezcla**

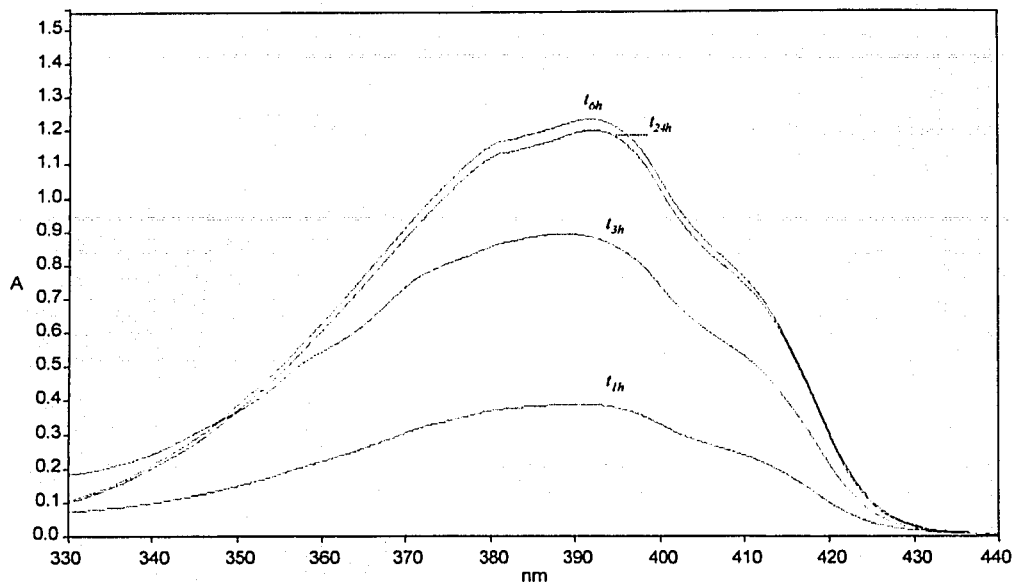
Tiempo (hrs)	A $\lambda=390$ nm
1	0.37
2	0.88
3	0.89
4	0.90
5	0.90
6	1.23
24	1.19

La lectura de los espectros a las 2, 3, 4 y 5 h no presentó cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en sus absorbencias. La Figura 4.7 muestra los espectros a los tiempos 1, 3, 6 y 24 h. Tomando en consideración las absorbencias de estos espectros, se realizó la evaluación del porcentaje total de formación de la MNU a partir de sus precursores. Los resultados se muestran en la Tabla IV.11.

**Tabla IV.11. Porcentaje de MNU formado en distintos tiempos**

Minutos	Absorbencias $\lambda=390$	% MNU formado
0	0.18	0
15	0.25	6.17
30	0.34	15.04
45	0.37	17.99
60	0.38	18.99
180	0.88	68.87
360	1.23	102.36
1440	1.19	98.96





**Figura 4.7. Espectros de absorción (440-330 nm) de la mezcla MU+NS de 1 hr a 24 hrs de incubación**  
 $t_{1h} = 1$ ,  $t_{3h} = 3$ ,  $t_{6h} = 6$  y  $t_{24h} = 24$  hrs.

Estos resultados muestran que el 100 % de formación de la MNU a partir de la mezcla se dio a las 6 h, siendo este el punto en donde la reacción llega al equilibrio (Figura 4.8). Esta Figura presenta con claridad la cinética de la formación de la MNU a partir de sus precursores. También se puede observar que la producción de MNU tiene un crecimiento exponencial siendo la primera hora la que nota la mayor variedad de cambios en sus espectros (Figura 4.6) y por consecuencia en su producción.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

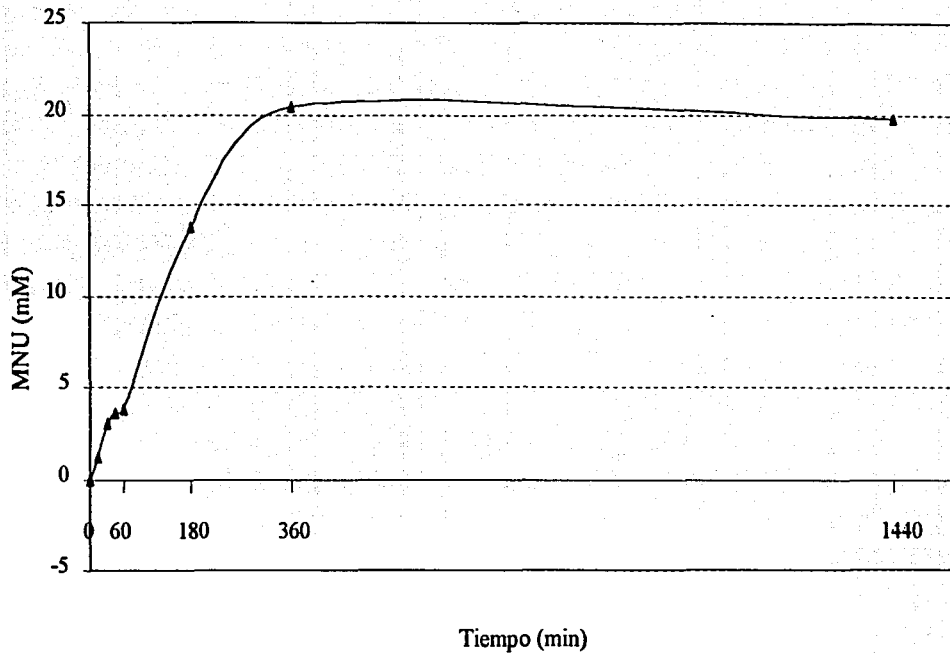


Figura 4.8. Cinética de la producción de MNU a partir de sus precursores

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4.4. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DEL ASC Y CLO CON LA MEZCLA MU+NS

##### 4.4.1. Ácido ascórbico

a) ASC + (MU+NS). Se realizaron incubaciones simultáneas de los precursores las concentraciones de ASC (0.49, 0.83, 0.97, 1.11, 1.66, 1.95, 2.22, 3.32 y 4.44 mM) que se obtuvieron de los análisis por titulación realizados con los chiles (Tabla IV.1 columna 5). El análisis estadístico evidenció que las diferencias en absorbancias entre los espectros fueron significativas ( $p < 0.005$ ) con respecto al testigo de MU+NS. La Figura 4.9 muestra los espectros resultantes a las concentraciones de 1.11, 2.22 y 4.44 mM de ASC (espectros *b*, *c* y *d* respectivamente) en donde se observa que a medida que aumentan estas concentraciones, la absorbancia de la MNU disminuye.

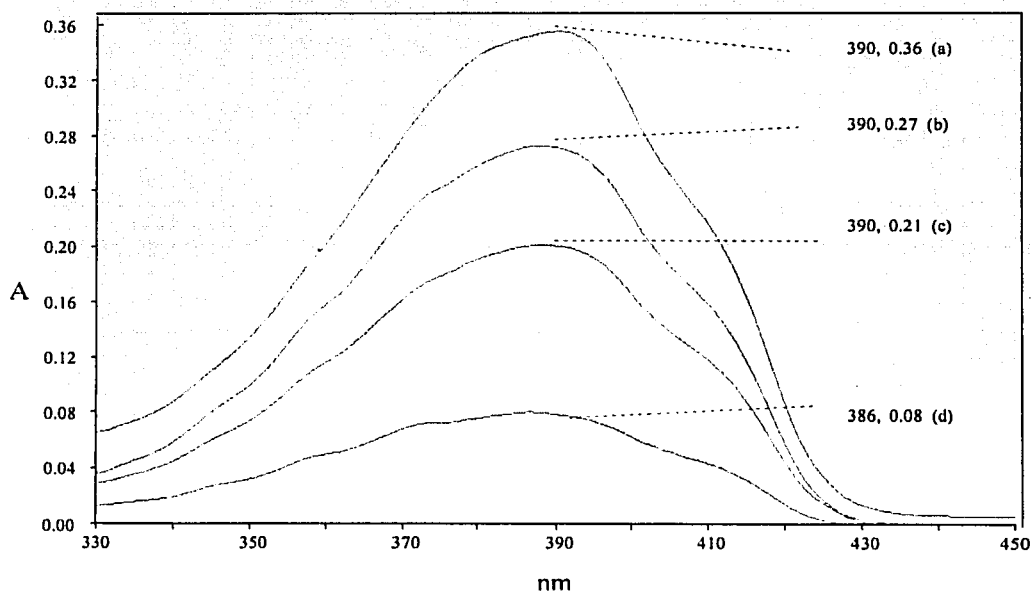
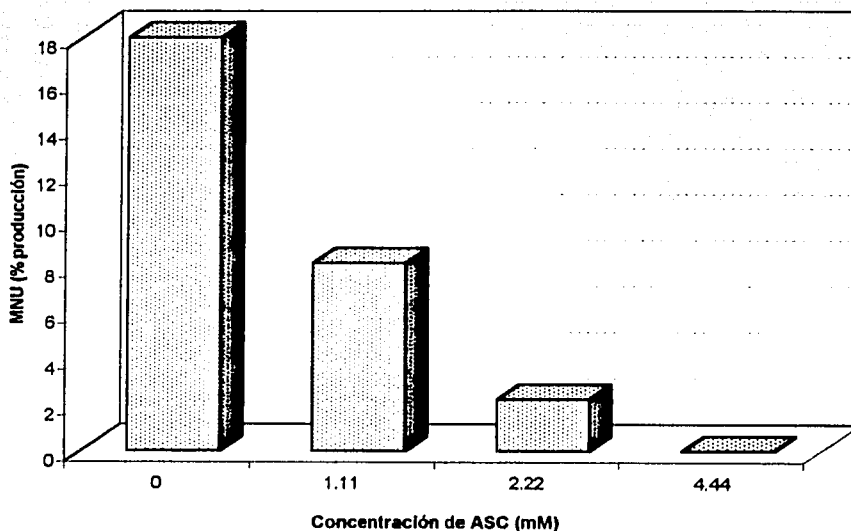


Figura 4.9. Espectro de absorción de la incubación simultánea del ASC+(MU+NS)  
(a) MU+NS 20 mM; (b-d) (MU+NS)+diferentes concentraciones (mM) de ASC;  
(b) 1.11; (c) 2.22 y (d) 4.44

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Estos resultados indicaron que las concentraciones de ASC en los chiles fueron efectivas para disminuir la producción de la MNU. Esta disminución puede ser interpretada como efectos de descomposición o de degradación de la MNU por el ASC.

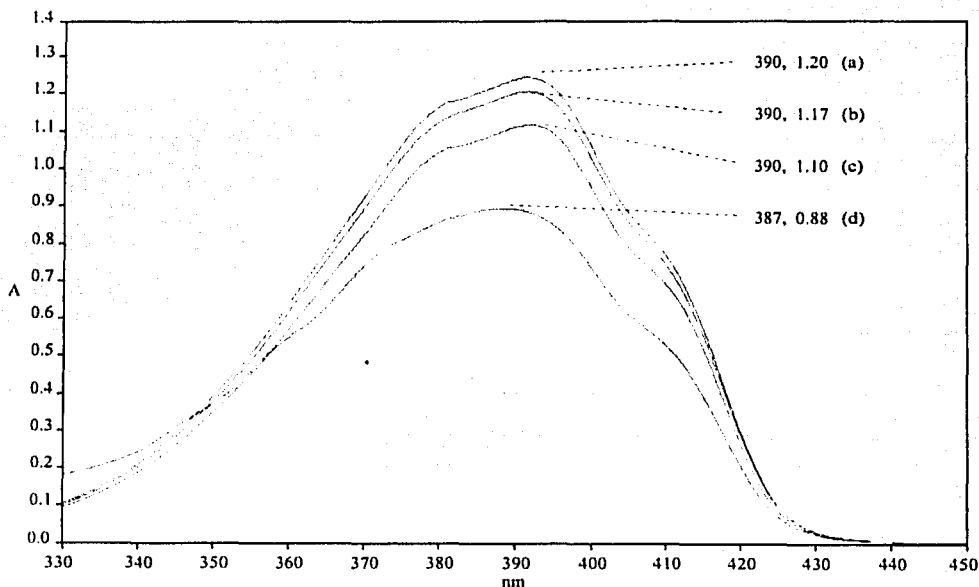
En la Figura 4.10 se observa una clara relación dosis respuesta del ASC sobre la producción de MNU a partir de sus precursores.



**Figura 4.10. Inhibición del ácido ascórbico sobre la producción de la MNU a partir de sus precursores**

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

ASC + MNU. Las lecturas de los espectros después de añadir las diferentes concentraciones de ácido ascórbico del inciso anterior, disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en una relación dosis-respuesta, las absorbencia del pico 390 del testigo MNU (Figura 4.11). Este resultado sugiere que el ASC está degradando a la MNU en sus precursores ya que a lo largo del espectro no se observó la presencia de otro pico que propusiera la formación de otro compuesto distinto al ASC y MNU.



**Figura 4.11. Espectros de absorción de la combinación MNU+ASC**  
(a) MNU; (b-d) MNU + diferentes concentraciones (mM) de ASC.  
(b) 1.11; (c) 2.22 y (d) 4.44

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A diferencia del tratamiento anterior en donde el ASC mostró clara relación dosis-respuesta sobre la inhibición de la producción de MNU, en este tratamiento se observa la disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de 2.22 y 4.44 mM de ASC. Estas diferencias representan el 80 % y 60 % de inducción con respecto a la de MNU pura (Figura 4.12).

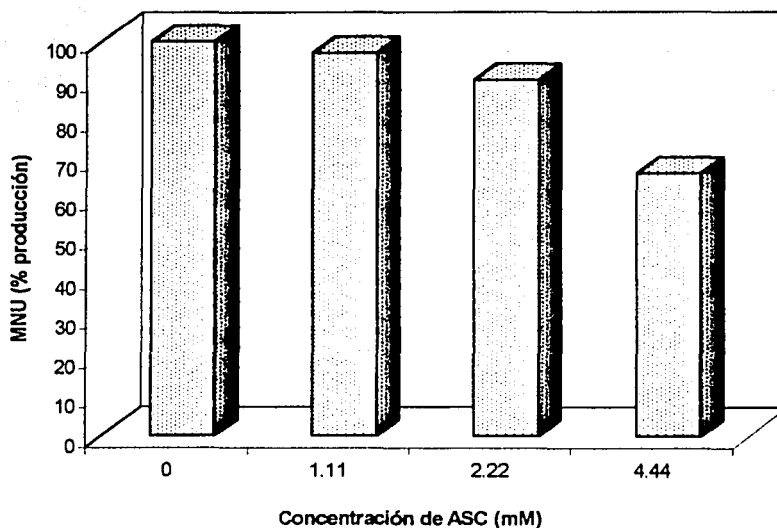
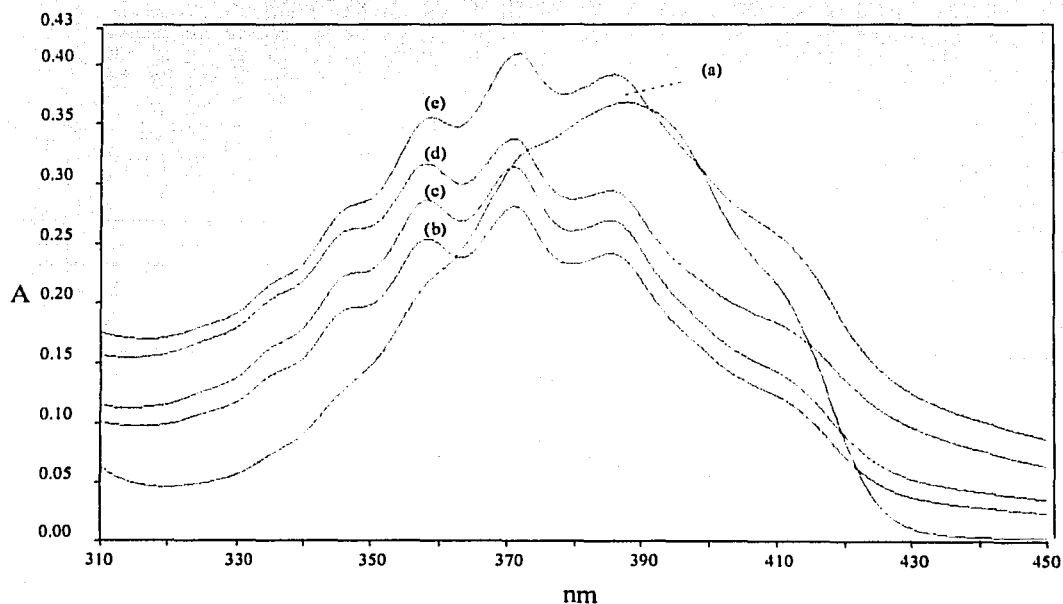


Figura 4.12. Inhibición del ácido ascórbico sobre el producto total de la MNU pura.

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

#### 4.4.2. Clorofilina

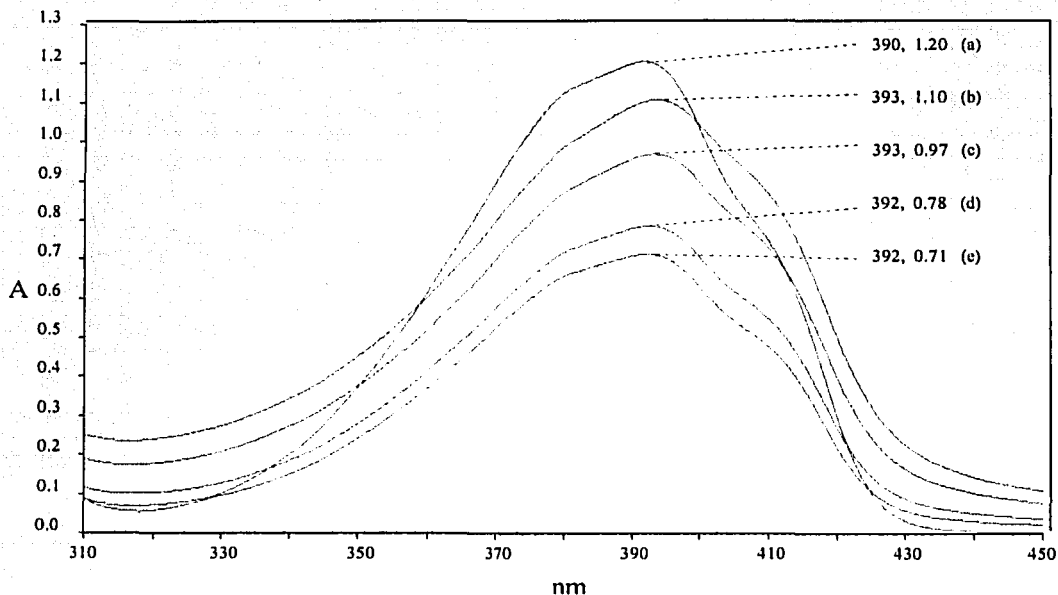
a) CLO + (MU+NS). Este tratamiento al igual que los anteriores se realizó con las concentraciones de clorofilina que se determinaron en los chiles (Tabla IV.3). Se llevaron al cabo un total de nueve co-incubaciones, de las cuales cuatro concentraciones 4.13, 8.26, 11.88 y 22.56 mM de CLO se muestran como representativas de este experimento en la Figura 4.13. En esta gráfica se observa el testigo de la mezcla MU+NS (espectro *a*) y los análisis de las incubaciones simultáneas (espectros *b*, *c*, *d* y *e*) que muestran tres picos bien definidos a los 350, 373 y 390 nm. Como se puede notar, los espectros resultantes de estas combinaciones son muy parecidos a los que presentan  $t_0$  y  $t_1$  de la Figura 4.6, lo que indica el posible mecanismo de acción de la clorofilina sobre la reacción de nitrosación, que será discutido más adelante.



**Fig. 4.13. Espectro de absorción del tratamiento simultáneo de (MU+NS) con clorofilina**

(b) MU+NS (20mM); (b-e) MU+NS y diferentes concentraciones (mM) de CLO  
(b) 4.13; (c) 8.26; (d) 11.88 y (e) 22.56

b) **CLO + MNU**. Los espectros de esta combinación se muestran en la Figura 4.14 en donde se observa que la absorbencia del pico 390 de la MNU va disminuyendo proporcionalmente a las diferentes concentraciones de CLO. Estos resultados indican que la clorofilina está degradando a la MNU en sus precursores originales.



**Figura 4.14. Espectro de absorción de la CLO y la MNU**

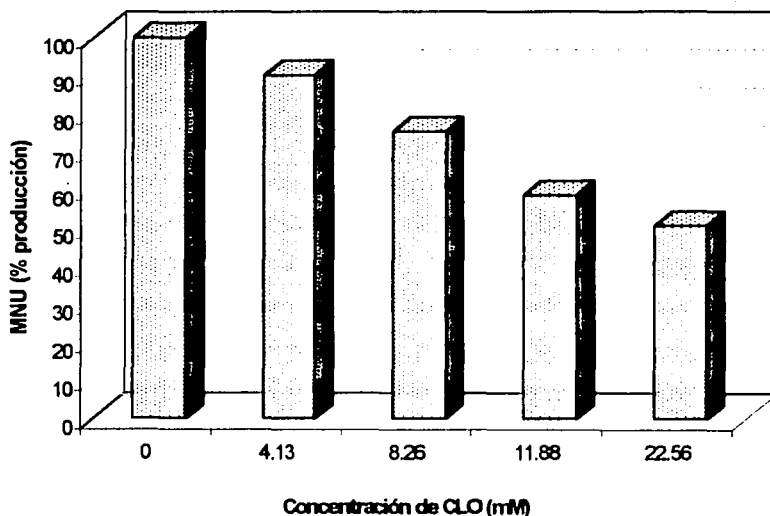
(b) MNU (20mM); (b-e) MNU mas las diferentes [producción]ndo] (mM)de CLO (b) 4.13; (c) 8.26; (d) 11.88 y (e) 22.56

TESIS CON  
FALLA DE CERO



A diferencia de los análisis *in vitro* de la incubación simultánea CLO+(MU+NS), se pudo observar que la CLO no sólo está interfiriendo en la formación de la MNU sino que además la está descomponiendo en sus precursores al igual que lo hace el ASC.

La Figura 4.15 muestra los porcentajes de producción total de la MNU en presencia de la clorofilina.



**Figura 4.15. Inhibición de la clorofilina sobre el producto total de la MNU**

TESIS CON  
FALLA DE CENCEN

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. DETERMINACIÓN DEL ASC, CAP y CLO.

Los criterios para seleccionar a los chiles poblano, chilaca y manzano fueron el consumo general en nuestro país y su alto contenido en sustancias antimutagénicas que incluyen flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides (González de Mejía *et al.* 1998, Matsufuji *et al.* 1998) así como las vitaminas A, C y E (Osuna-García *et al.* 1998, Howard *et al.* 2000).

Las cantidades de vitamina C y capsaicina indicadas en este trabajo están dentro del rango obtenido por otros investigadores que han reportado desde 52.8 mg/100 g hasta 242.5 mg/100 g de Vit.C (Suntornsuk *et al.* 2002) y entre 0.0018 a 510 µg/g de peso seco para la capsaicina (Reilly *et al.* 2001a). En este trabajo se reportó como µg equivalentes de capsaicina ya que el método utilizado para su determinación no discriminó entre los 5 análogos químicos que comprenden a los capsaicinoides que son capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Sin embargo, está bien establecido que el análogo más potente y abundante en los chiles (y consecuentemente en los extractos) es la capsaicina (Reilly *et al.* 2001b). Las mismas unidades (µg eq) se utilizaron para la clorofilina, ya que como sal de sodio-cobre derivada de la clorofila, incluye a los tipos a y b de la misma. La clorofilina como miembro del grupo de las porfirinas contiene un ión metal quelado al centro de la molécula, que le confiere una mayor estabilidad química (Hayatsu *et al.* 1993), razón por la cual fue utilizada para su cuantificación y los análisis *in vitro*.

Todos estos componentes además de muchos otros, varían de acuerdo con la temporada de siembra, tipo y grado de maduración del chile (González de Mejía *et al.* 1998). Los tres tipos de chile utilizados en este trabajo se analizaron "frescos" y en un estado intermedio entre la etapa joven y la de maduración. Este periodo intermedio se caracteriza por la presencia de grandes cantidades de clorofilas más que de otros pigmentos. La etapa previa a la deshidratación de los

chiles es la que presenta mayor cantidad de Vit.C, así como de carotenos, xantofilas y percisinas (Cordell y Araujo 1993).

## 5.2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 5.2.1. Genotoxicidad de la mezcla MU+NS

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se pudo determinar que los tratamientos simples (MU, NS, CHI, MZN y POB) y de combinaciones simples (MU+CHI ó MZN ó POB y NS+CHI ó MZN ó POB) no ejercieron efecto tóxico o genotóxico sobre las larvas de los organismos en ninguna de las cruas. Sin embargo la combinación entre la MU y NS resultó muy genotóxica con un incremento en la FMT de 5 y 55 veces para las cruas ES y BE, respectivamente. De acuerdo con algunos investigadores, el metabolito resultante de la nitrosación intragástrica de esta combinación es la MNU, una alquilnitrosamina mutagénica (Guzmán-Rincón *et al.* 1998, Sen *et al.* 2001). La formación de la nitrosamina se llevó al cabo bajo las condiciones ácidas del tracto gastrointestinal de las larvas cuando ambos precursores estuvieron presentes. Probablemente el nitrito se protonó rápidamente a ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) y dos de sus moléculas formaron al trióxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), el cual como especie nitrosante reaccionó con la amida desprotonada para constituir la nitrosamida.

Los primeros reportes que evidenciaron la formación de la MNU a partir de la nitrosación de precursores fueron hechos por Mirvish (1971) y Mirvish *et al.* (1982). Recientemente se ha reportando la formación de MNU a partir de precursores presentes en la dieta (Deng *et al.* 1998, 1999, Sen *et al.* 2000, 2001) y su relación directa con la incidencia al cáncer gástrico (Deng *et al.* 1999).

Probablemente la mutagenicidad de la MNU observada en las larvas se debió a la capacidad de esta nitrosamida de alquilar sitios específicos en las bases del DNA. En un estudio realizado en *D. melanogaster* se determinó la genotoxicidad de la NDMA y NDEA a través de la prueba SMART y por radioinmuno-ensayo se detectaron los aductos  $O^6$ -MedGuo,  $O^6$ -EtdGuo y  $O^6$ -EtTh provocados por estas alquilnitrosaminas. Los resultados mostraron que la presencia de los aductos

estaba directamente relacionada con la genotoxicidad de los mutágenos (Goto *et al.* 1999).

Aunque es sabido que en la metilación del DNA el sitio *N*-7 de la guanina es el principal blanco, la *N*-7 alquilguanina por si sola no altera el apareamiento de bases (Singer 1996), sin embargo, algunos autores sugieren que la formación de este aducto puede facilitar la recombinación cromosómica en *Drosophila* (Rodríguez-Arnaiz *et al.* 1996). Cabe mencionar que el daño a las células somáticas también pudo haberse ocasionado por otros mecanismos independientes a la formación de alquil-aductos (Hecht 1999).

Debido a que la respuesta genotóxica fue mayor en la cruce BE, es evidente la importancia del citocromo P450 en estos resultados. Es conocido el hecho de que la habilidad de los CNO para alquilar macromoléculas celulares depende de gran manera de la actividad de este sistema. En este sentido, existen estudios que han probado tanto la actividad enzimática como la especificidad al sustrato de algunas enzimas microsómicas del P450 y su relación con la genotoxicidad provocada por algunos compuestos nitroso. Estos estudios mostraron, en hepatocitos de ratas que fueron pretratadas con fenobarbital (FB), un incremento en la actividad de la PR O-depentilasa (actividad catalizada por la enzima CYP2B1), este incremento fue asociado con el aumento del efecto alquilante de la NDPA y NDBA sobre el DNA, RNA y proteínas. Sin embargo, la inducción de esta enzima no contribuyó a la alquilación de las macromoléculas por la NDMA. Por otro lado, la inducción de la enzima CYP2E1, cuyo efecto se observó en el aumento de la actividad catalítica de la p-nitrofenol (pNP) hidroxilasa, incrementó significativamente la alquilación del DNA y RNA provocado por la NDMA y NDPA. Los estudios de inhibición utilizando orfenadrine (OP) y dietildiocarbamato (DDC), los cuales son específicos para las enzimas CYP2B1 y CYP2E1, respectivamente, indicaron que la CYP2B1 no estuvo involucrada en la activación metabólica del NDMA y que la CYP2E1 no fue la responsable de la activación de la NDBA. Estos resultados demostraron que la especificidad al sustrato de las enzimas CYP2B1 y CYP2E1 juega un papel importante en la bioactivación de nitrosodialquilaminas sugiriendo que múltiples mecanismos pueden estar

involucrados en la carcinogenesis inducida por nitrosodialquilaminas (Maliakal *et al.* 2002).

Los insectos presenta enzimas del citocromo P450 relacionadas filogenéticamente por sus secuencias aminoácidas a las familias CYP4 y CYP3 de vertebrados, el principal grupo metabolizador de drogas, por lo que es muy probable que en *Drosophila* estas enzimas actúen de manera similar en la bioactivación de nitrosoalquilaminas (Amichot *et al.* 1998, Tijet *et al.* 2001).

El efecto genotóxico de la mezcla MU+NS indujo todos los tipos de manchas, aunque las manchas chicas fueron las predominantes. El tamaño de mancha depende del tiempo de la inducción del evento genético en las células blanco, por lo tanto, las manchas con 1 ó 2 células mutantes representan clones que surgieron tarde en el desarrollo de la larva. Los resultados implican que el carcinógeno ejerció su efecto genotóxico continuo durante el tiempo del tratamiento. Aunque el evento genético que originó a este tipo de mancha no se pueda identificar solamente con el fenotipo de la mutación, si se saben cuales son los eventos que podrían haber participado en su formación. Las manchas gemelas, que también se incrementaron significativamente, representan exclusivamente entrecruzamiento mitótico entre el centrómero y *flr*<sup>2</sup> por lo que la MNU indujo también recombinación mitótica.

La genotoxicidad de la MNU fue demostrada en este trabajo y concuerda con los resultados reportados con SMART-ala para otras nitrosaminas como la NDMA, NDEA, NDBA, NMOR, NPIP y NPYR (Graf *et al.* 1983, 1984, 1989, Negishi *et al.* 1991, Goto *et al.* 1999), en donde la frecuencia de mutaciones por ala fue más alta para la cruz de bioactivación elevada.

### **5.2.2. Efecto de los homogeneizados de chile sobre la mezcla MU+NS**

En el presente trabajo, los extractos de chile disminuyeron significativamente la frecuencia de mutaciones provocadas por la mezcla MU+NS, esto concuerda con estudios previos en los que se ha reportado en diferentes sistemas, que extractos de chile disminuyeron o inhibieron los efectos mutagénicos tanto de compuestos

nitroso como de otros mutágenos (Helser *et al.* 1992, Espinosa-Aguirre *et al.* 1993, González de Mejía *et al.* 1998, Ikken *et al.* 1999, Ramírez-Victoria *et al.* 2001, El Hamss *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos mostraron que el chile MZN inhibió hasta en 99 % la mutagenicidad de la MU+NS. En concordancia se observó que fue este extracto el que presentó la mayor cantidad de Vit.C (104.4 mg/100 g). Probablemente este fue uno de los factores que contribuyeron a la modulación del daño provocado por el producto final de la mezcla. Si se considera al ASC como uno de los principales antimutágenos activos en los homogeneizados, está actuando a concentraciones menores a las probadas para ASC puro, del que se ha reportado que 17 mM (Graf *et al.* 1998) y 285 mM (Guzmán-Rincón comunicación verbal) inhibieron la reacción de nitrosación en *Drosophila*.

Asimismo, si la clorofilina (clorofilas) y la capsaicina (capsaicinoides) fueron compuestos que actuaron disminuyendo la genotoxicidad de la mezcla MU+NS, estas moléculas probablemente ejercieron su efecto a través de tres vías principales: (a) modulando la actividad enzimática del mutágeno, (b) bloqueando la interacción de los intermediarios reactivos con el DNA y (c) actuando como antioxidantes (Miller *et al.* 1993, Negishi *et al.* 1994, Rosa *et al.* 2002). Por ejemplo, en microsomas de criceto dorado, la capsaicina inhibió el metabolismo de la NNK afectando las reacciones de reducción, N-oxidación y  $\alpha$ -hidroxilación del mutágeno, sugiriendo que esta molécula inhibió las isoenzimas de las familias CYP1A y CYP2B del citocromo P450 (Miller *et al.* 1993).

Independientemente a la acción de estas moléculas, se ha determinado que los chiles contienen además cantidades importantes de otros antioxidantes como  $\beta$ -caroteno, licopenos, luteína, capsantina y  $\beta$ -criptoxantina, cuyas funciones están asociadas a la disminución del daño causado al DNA evitando la peroxidación de la membrana lipídica o inhibiendo la transformación maligna en estudios *in vitro*, sugiriendo que frutos con alto contenido de estas sustancias proveen un mecanismo para prevenir el daño oxidante *in vivo*, y por lo tanto la carcinogenesis (Hursting *et al.* 1999).

Existe una teoría que menciona que la combinación de antioxidantes provee una mayor capacidad protectora en contra de la genotoxicidad de mutágenos que la que ofrecen sus actividades individuales (Bast *et al.* 1998). Esta teoría es apoyada por los estudios epidemiológicos que han demostrado que la interacción compleja de múltiples antioxidantes presentes en verduras y frutas contribuyen a disminuir los efectos negativos de mutágenos y carcinógenos con una mayor eficacia a las de un simple compuesto (Giovannucci 1999, Zhang *et al.* 1999).

Estos resultados sugieren que la capacidad de inhibición de los extractos de Chile se pudo deber a la acción sinérgica del ASC, CLO y CAP, así como de otros componentes antioxidantes como los polifenoles y de otras moléculas antimutagénicas que son abundantes en frutas y verduras.

### 5.3. REACCIÓN DE NITROSACIÓN *IN VITRO*

De acuerdo con el aumento de absorción que se observó alrededor de 390 nm en los espectros de absorción de la MNU y de la mezcla MU+NS, así como de la cinética de formación de ésta última, se pudo determinar que el metabolito final de la reacción fue la MNU. Este resultado se apoya en los obtenidos por otros investigadores que han determinado directa e indirectamente la formación de la MNU a partir de sus precursores (Mirvish *et al.* 1982, Guzmán-Rincón *et al.* 1998, Sen *et al.* 2001).

De acuerdo con los resultados obtenidos con la curva patrón de la MNU, se observa que el porcentaje de producción de la MNU en una hora, es relativamente bajo, 18 % con respecto a la MNU pura. Sin embargo, estas proporciones son efectivas para inducir los efectos genotóxicos que se observaron en los ensayos biológicos.

Ya que la MNU es una de las nitrosamidas a la que los seres humanos están expuestos con regularidad a través de vías endógenas o exógenas, uno de los puntos de interés al realizar este trabajo de tesis era el valorar en un sistema eucarioto *in vivo* la capacidad de algunos precursores para generar este

compuesto alquilnitroso. Sin embargo, es de reconocer que las condiciones utilizadas para llevar al cabo esta reacción tanto *in vitro* como *in vivo* no reflejaron las condiciones gástricas reales que ocurren en el estómago humano. Primero, la concentración de nitrito utilizada fue mayor a las encontradas en condiciones normales o aún en condiciones inusuales (gastritis atrófica, anemia perniciosa, consumo de alimentos ricos en nitritos, entre otras). En condiciones normales, la concentración de nitrito en el jugo gástrico de humanos es muy baja y usualmente se encuentra en el rango entre 0.3 a 7.6 ppm (4.3  $\mu$ M a 0.11 mM). Estas cantidades pueden elevarse hasta 9 a 32 ppm (0.13 a 0.46 mM) (Pignatelli *et al.* 1993). Segundo, el fluido gástrico contiene diferentes tipos de ácidos e ingredientes orgánicos e inorgánicos los cuales son catalíticos para la nitrosación y pueden modificar la respuesta genotóxica de la reacción (Sen *et al.* 2001).

Aunque las condiciones en las que se llevó al cabo la reacción de nitrosación no fueron parecidas a las presentadas en humanos, el sistema *Drosophila*-SMART fue buen indicador de los eventos genéticos y de las respuestas antimutagénicas de lo que probablemente esté sucediendo en condiciones normales en el estómago de los seres humanos.

## 5.4. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

### 5.4.1. Ácido ascórbico

El ASC demostró inhibir efectivamente a la MNU generada a partir de sus precursores (Figura 4.10) y a la MNU pura (Figura 4.12). En ambos casos se observó la disminución del porcentaje total de MNU que se obtuvo en el testigo positivo. Esta reducción fue más evidente cuando el ASC fue incubado simultáneamente con la mezcla, lo que sugiere que esta molécula no solo actuó degradando a la MNU ya formada, sino que muy probablemente tuvo un efecto directo sobre la reacción de nitrosación evitando la interacción de sus precursores para inducir el producto final. Esta inhibición se llevó al cabo con mayor eficiencia cuando la relación ASC/nitrito se presentó en una razón molar de 4:1.



Las vías por las cuales el ASC inhibe a los CNO están bien definidas (Mirvish 1997, Griffiths y Lunec 2001) y de acuerdo con los resultados obtenidos en estos análisis *in vitro*, uno de los probables mecanismos de acción sobre la reacción de nitrosación fue la competencia por el nitrito. Este supuesto se basa en la capacidad química que tiene el ASC de reaccionar con el nitrito (más rápido de lo que lo hace la amina), lo que provoca la reducción del nitrito a óxido nítrico (NO) el cual no es un agente nitrosante directo. Posteriormente se transforma así mismo en ácido deshidroascórbico el cual compite por la amina o amida por el nitrito. Este mecanismo es particularmente efectivo en un ambiente acuoso con pH de 2-4 en donde la urea no es efectiva para capturar al nitrito, ya que necesita de un ambiente más ácido (pH 1). Cabe mencionar que en este trabajo el pH fue un factor que estuvo bajo control constante y su rango se mantuvo entre pH 2-3.

Para evitar la oxidación del ASC en los experimentos de coincubación, se cubrió la boca de los matraces con globos inflados con gas nitrógeno, por lo que la reacción se llevó al cabo en un sistema gas-acuoso. En este medio, los óxidos de nitrógeno que se formaron a partir de la oxidación del NO durante la fase gaseosa pueden reentrar a la solución y regenerar una parte del nitrito original. Por consiguiente la cantidad de ASC que se requiere para reducir al nitrito en soluciones gas-acuosas son menores a las soluciones acuosas realizadas en matraces abiertos (Mirvish 1994). Probablemente esta fue una de las características que influyó en el resultado de los porcentajes de inhibición de la MNU entre la coincubación y la interacción ASC+MNU (que no necesitó incubación) la cual se llevó al cabo en un sistema acuoso abierto. Sin embargo, el mecanismo de competencia por el nitrito actúa de igual manera en ambos sistemas. Este fue también el modo de acción propuesto por otros investigadores que observaron que el ASC inhibió la nitrosación *in vitro* de la NMOR, NDMA, NPIP y de otros CNO (Mirvish 1994, Vermer *et al.* 1999).

Otro de los posibles mecanismos del ASC es a través de la captura de radicales libres, reduciéndolos a especies no radicales rompiendo así, la cadena de reacciones involucradas en la carcinogénesis (especialmente en la promoción). Esto explica por qué el ASC reduce la carcinogénesis producida por compuestos

nitrosos preformados. Probablemente esta fue la acción del ASC sobre la MNU pura (Mirvish 1997).

#### 5.4.2. Clorofilina

Los resultados con esta molécula evidenciaron la interferencia en la formación del producto final de la reacción. La Figura 4.13 muestra que los espectros de la incubación simultánea de los tres compuestos son muy parecidos a los que presenta  $t_0$ ,  $t_1$  y  $t_2$  de la Figura 4.6 (obtención de la MNU a partir de sus precursores), sugiriendo que la CLO está bloqueando la producción de la MNU. Las evidencias se basan en el hecho de que al  $t_0$  se pueden observar distintos picos que corresponderían a los intermediarios de la reacción. Conforme la mezcla se sigue incubando estos picos van desapareciendo hasta llegar a ser uno solo a 391 nm, que es el característico de la MNU. En el caso de la coincubación con CLO (Figura 4.11), estos picos no desaparecieron durante el tiempo de incubación de los compuestos (1 h), indicando la interferencia de la CLO en la obtención de la MNU.

La CLO no solo interfirió durante la reacción para evitar o retardar la generación de la MNU a partir de sus precursores, sino que también degradó al mutágeno puro, como se mostró en la Figura 4.14, en donde la disminución de las absorbencias de los grupos experimentales es un indicador del decremento del porcentaje total de MNU. Este es un mecanismo que también se ha observado con otro tipo de mutágenos como el benzo[a]pireno (B[a]P) en donde opera interceptando moléculas y acelerando la degradación del metabolito intermedio activo (Tachino *et al.* 1994).

Existen pocos estudios sobre la capacidad de inhibición de la CLO sobre compuestos nitroso y la mayoría de ellos sugiere como mecanismo de acción la modulación de la actividad metabólica de los compuestos (Romert *et al.* 1992, Negishi *et al.* 1994), mecanismo plausible que pudo actuar durante los ensayos biológicos. Otros investigadores proponen la formación de complejos (Dashwood *et al.* 1996, Hayashi *et al.* 1999). Este mecanismo es poco probable que se lleve a cabo con los CNO, ya que una de las condiciones para el acomplejamiento es que

los mutágenos a probar tengan un tipo de estructura planar que sea compatible con la que presenta la clorofilina. En los espectros realizados durante este trabajo no se observó la aparición de picos nuevos que sugirieran la presencia de un compuesto distinto al de sus componentes originales, lo cual coincide con la premisa de que la formación de un complejo entre los mutágenos es poco probable.

De acuerdo con los resultados *in vitro* se sugiere que los posibles mecanismos de acción de la CLO sean la intercepción de moléculas y la captura de radicales libres. Éste último mecanismo fue demostrado en el bioensayo SMART, en donde la CLO disminuyó la FMT producidas por la radiación y en células somáticas del ala de *D. melanogaster* (Zimmering *et al.* 1990).

Es interesante el hecho de que tanto el ASC como la CLO en sus incubaciones simultáneas con la mezcla mostraron un efecto de inhibición de la nitrosación. Estos análisis *in vitro* serían el equivalente a los pretratamientos administrados en los ensayos biológicos. Estos resultados ofrecen una evidencia más de que el seleccionar el protocolo adecuado al momento de realizar un análisis antimutagénico es de suma importancia para evidenciar el efecto de inhibición genotóxica de los compuestos a probar.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la capacidad de inhibición que tienen algunos componentes de la dieta mexicana, como lo es el chile, sobre el efecto mutagénico provocado por compuestos a los que los seres humanos estamos directa o indirectamente expuestos. Además de evidenciar que el sistema *Drosophila*-SMART es una buena herramienta para la determinación de la genotoxicidad y antimutagenicidad de compuestos sintéticos o naturales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6. CONCLUSIONES

1. Los precursores de la reacción de nitrosación MU y NS no ejercieron efecto genotóxico a las larvas de los organismos tratados.
2. Se evidenció la actividad genotóxica de la mezcla MU+NS en larvas de las cruza estándar y de bioactivación elevada de *D. melanogaster*.
3. La respuesta genotóxica fue más efectiva en la crusa con niveles elevados de las enzimas del citocromo P450, evidenciando la importancia de este sistema en la inducción de compuestos nitroso.
4. Los extractos de los chiles CHI, MZN y POB a las dosis utilizadas no fueron tóxicos o genotóxicos a las larvas de los organismos.
5. Las combinaciones sencillas de MU ó NS con los extractos de los tres chiles no mostraron respuesta genotóxica en los ensayos *in vivo*.
6. Las combinaciones dobles de la mezcla (MU+NS) con los extractos de chile mostraron disminución significativa de las mutaciones provocadas por la mezcla sola. Siendo más evidente en la crusa de bioactivación elevada.
7. El extracto de chile manzano presentó la mayor respuesta inhibidora hacia la genotoxicidad producida por la mezcla.
8. La determinación de ASC, CAP y CLO en los extractos de chile mostraron una relación: ASC: manzano>poblano>chilaca; CAP: poblano>chilaca>manzano y CLO: chilaca>poblano>manzano.
9. Los ensayos *in vitro* mostraron que el producto final de la mezcla MU+NS fue la N-nitrosometilurea.
10. El ácido ascórbico y la clorofilina evidenciaron una inhibición en la producción de MNU a partir de sus precursores.
11. Los posibles mecanismos de acción del ASC y CLO sobre la reacción de nitrosación son: (a) captura de radicales libres, (b) intercepción de moléculas y (c) reducción y competencia por el nitrito.
12. El bioensayo *Drosophila*-SMART demostró ser efectivo para evidenciar la respuesta genotóxica de alquilnitrosaminas y la respuesta antimutagénica de compuestos naturales presentes en la dieta.

## 7. REFERENCIAS

- Adams M.D., Celniker S.E. y Holt R.A. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Alaoui-Jamali M.A., Rossignol G. y Castonguay A. (1991) Protective effects of vitamin A against the genotoxicity of NNK, a nicotine-derived N-nitrosamine. *Carcinogenesis* 12:379-384.
- Allay E., Veigl M. y Gerson S.L. (1999) Mice over-expressing human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase selectively reduce O<sup>6</sup> methylguanine mediated carcinogenic mutations to threshold levels after N-methyl-N-nitrosourea. *Oncogene* 18:3783-3787.
- Amichot M., Brun A., Cuany A., De Souza G., Le Mouel T., Bride J.M., Babault M., Salaun J.P., Rahmani R. y Berge J.B. (1998) Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121:311-319.
- Andersen J.F., Utermohlen, J.G. y Feyereisen R. (1993) Expression of house fly CYP6A1 and NADPH cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide metabolizing P450 system. *Biochemistry*, 33:2171-2177.
- Archer M.C. (1989) Metabolism of nitroso compounds. En: *Mechanism of Action of N-nitroso Compounds*. Oxford University Press, Oxford, Vol. 8, pp. 241-250.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990) Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemistry, Vol. II, pp. 1048-1049.
- Bailey G.S., Scanlan R.A., Selivonchick D.P. y Williams E.E. (1991) Food Toxicology. En: *Encyclopedia of Human Biology Vol. 3*, R. Dulbecco (Ed.), Academic Press, New York, pp. 312-317.
- Balansky R. (1992) Effects of sodium selenite and caffeine on mutagenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine and aflatoxin B<sub>1</sub> in *S. typhimurium*. *Mutat. Res.* 269:307-317.
- Bartsch H. y Spiegelhalder B. (1996) Environmental exposure to N-nitroso compounds (NOC) and precursor: an overview. *Eur J. Cancer Prev.* 5:11-17
- Bast A., Haenen G.R., Berg R. y Berg H. (1998) Antioxidant effects of carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68:399-403.

- Bochert G., Platzek T., Kahm U. y Neubert D. (1991) Embryotoxicity induced by alkylating agents: DNA adduct formation induced by MNU in mouse embryos. Arch. Toxicol. 65(5): 390-395.
- Brockman H.E., Stack H.F. y Waters M.D. (1992) Antimutagenicity profiles of some natural substances. Mutat. Res. 267:157-172.
- Carmella S.G., Borukhova A., Desai D. y Hecht S.S. (1997) Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite. Carcinogenesis 18:587-592.
- Chroust K., Jowett T., Farid-Wajidi M.F., Huang J.Y., Ryskova M., Wolf R. y Holoubek I. (2001) Activation or detoxification of mutagenic and carcinogenic compounds in transgenic *Drosophila* expressing human glutathione S-transferase. Mutat. Res. 498:169-179.
- Cordell G.A. y Araujo O.E. (1993) Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. Ann. Pharmacol. 27:330-336.
- Danielson P.B., MacIntyre R.J. y Fogleman J.C. (1997) Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. Proc. Nat. Acad. Sci. 94:10979-10802.
- Dashwood R., Yamane S. y Larsen R. (1996) Study of the forces stabilizing complexes between chlorophylls and heterocyclic amine mutagens. Environ. Mol. Mutagen. 27:211-218.
- De Flora S. (1998) Mechanism of inhibitor of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 402: 151-158.
- De Flora S., Bagnasco M. y Vainio H. (1999) Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issue. Mutagenesis 14:153-172.
- Delgado-Rodríguez A., Ortiz-Marttelo R., Villalobos-Pietrini R., Gómez-Arroyo S. y Graf U. (1995) Genotoxic activity of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutat. Res. 341:235-247.
- Demaut G. y Seils P. (1997) Mutagenesis induced by nitrosocompounds. Cancer Surv. 431:22-26.
- Deng D., Li T., Ma H., Wang R., Gu L. y Zhou J. (1998) Characterization of N-(Nitrosomethyl)urea in nitrosated fermented fish products. J. Agric. Food Chem. 46:202-205.

- Deng D., Yang S., Li T. y Xin H. (1999) Separation and identification of N-nitrosomethylurea in fish sauce from high risk area of stomach cancer. Chem Abs. 31:366-369.
- Dixit R. y Gold B. (1986) Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:8039-8043.
- Dombrowski S.M., Krishnan R., Witte M., Maitra S., Diesing C., Waters L.C. y Ganguly R. (1998) Constitutive and barbital-induced expression of the *Cyp6a1* allele of a high producer strain of CYP6A2 in the genetic background of a low producer strain. Gene 221:69-77.
- El Hamss R., Idaomar M., Alonso-Moraga A. y Muñoz-Serrano A. (2003) Antimutagenic properties of bell and black peppers. Food Chem. Toxicol. 41:41-47.
- Espinosa-Aguirre J.J., Reyes R.E., Rubio J., Ostrosky-Wegman P. y Martínez G. (1993) Mutagenic activity of urban air samples and its modulation by chili extracts. Mutat. Res. 303:55-61.
- Frei H. y Würgler F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. Mutat. Res. 203:297-308.
- Frei H. y Würgler F.E. (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. Mutat. Res. 308:57-63.
- Frölich A. y Würgler F.E. (1989) New tester strains with improve bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. Mutat. Res. 216:179-187.
- Frosina G. (2000) Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. Eur. J. Biochem. 267:2135-2149.
- Gichner T. y Veleminsky J. (1988) Inhibitors of N-nitroso compounds-induced mutagenicity. Mutat. Res. 195:21-43.
- Giovannucci E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. J. Natl. Cancer Inst. 91:317-331.
- González de Mejía E., Quintanar-Hernández J.A. y Loarca-Piña G. (1998) Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. Mutat. Res. 416:11-19.
- Goto Y., Matsuda T., Ito k., Huh N. Thomale J. Rajewsky M.F., Hayatsu H. y Negishi T. (1999) Mutagenicities of N-nitrosodiethylamine and N-

nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutat. Res.* 425:125-134.

Graf U., Juon H., Katz A.J. Frei H.J. y Würgler F.E. (1983) A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120:233-239.

Graf U., Würgler F.E., Katz H., Frei H., Juon H., Hall B.B. y Kale P.G. (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environm. Mutagen.* 6:153-188.

Graf U., Frei H., Kägi A., Katz A.J. y Wurgler F.E. (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222:359-373.

Graf U., Abraham S.K. Guzmán-Rincón J. y Würgler F.E. (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 402:203-209.

Griffiths H.R. y Lunec C. (2001) Ascorbic acid in the 21st century- more than a simple antioxidant. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10:173-182.

Guzmán-Rincón J. y Graf U. (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. F.M. Butterworth, L.D. Corkum y J. Guzmán-Rincón (Eds.) Plenum Press, New York, pp. 169-172.

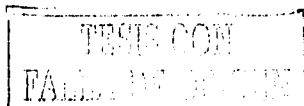
Guzmán-Rincón J., Espinosa J. y Graf U. (1998) Analysis of *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 412:69-81.

Guzmán-Rincón J., Ramírez-Victoria P. y Bribiesca L. (2000) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila* used for biomonitoring of environmental Pollutans. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. F.M. Butterworth, A. Gunatilaka y M.E. Gonshebbatt (Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 221-237.

Hayashi T., Schimerlik M. y Bailey G. (1999) Mechanisms of chlorophyllin anticarcinogenesis: dose-responsive inhibition of aflatoxin uptake and biodistribution following oral co-administration in rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 158:132-140.

Hayatsu H., Negishi T., Arimoto S. y Hayatsu T. (1993) Porphyrins as potential inhibitors against exposure to crcinogens and mutagens. *Mutat. Res.* 290:79-85.

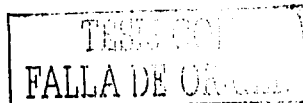
Hayatsu H y Negishi K. (1998) The 5th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis. *Mutat. Res.* 402:1-5.





- Hecht S.S. (1999) DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat. Res.* 424:127-142.
- Hecht S.S. (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Met. Rev.* 32:395-311.
- Helser M.A., Hotchkiss J.S. y Roe D.A. (1992) Influence of fruit and vegetable juices on the endogenous formation of N-nitrosoproline and N-nitrosothiazolidine-4-carboxylic acid in humans on controlled diets. *Carcinogenesis* 13:2277-2280.
- Hill M.J. (1996). Factors controlling endogenous N-nitrosation. *Eur. J. Can. Prev.* 5:71-74.
- Hirohata T. y Kono S. (1997) Diet/nutrition and stomach cancer in Japan. *Int. J. Cancer* 10:34-36.
- Hovinen J. y Fishbein J.C. (1992) Rate constants for the decomposition of a simple alkanediazoate at physiological pH. *J. Am. Chem. Soc.* 114:366-367.
- Howard L.R., Talcott S.T., Brenes C.H., y Villalon B. (2000) Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *J. Agric. Food Chem.* 48:1713-1720.
- Huang Q., Lawson T.A., Chung F.L. y Mirvish S.S. (1993) Inhibitory effect of phenylethyl and phenylhexyl isothiocyanate on metabolism of and DNA alkylation by N-nitrosomethylamylamine in the rat. *Carcinogenesis* 14:749-754.
- Hursting S.D., Slaga T.J. Fischer S.M., DiGiovani J. y Phang J.M. (1999) Mechanism-based cancer prevention approach: Targets, examples, and the use of transgenic mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:215-225.
- Idaomar M., El-Hamss R., Bakkali F., Mezzoug N., Zhiri A., Baudoux D., Muñoz-Serrano A., Liemas V. y Alonso Moraga A. (2002) Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing sport test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 513:61-68.
- Ikken Y., Morales P., Martinez A., Marin M.L., Haza A.I. y Cambero M.I. (1999) antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *J. Agric. Food Chem.* 47:3257-3264.
- Inoue T., Ohta Y., Sadaie Y. y Kada T. (1981) Effect of cobalt chloride on spontaneous mutation induction in a *Bacillus subtilis* mutator strain. *Mutat. Res.* 91:41-45.

- Kalinina L.M., Agabeili R.A., Svistunova G.L. y Iskenderova I.M. (1985) Comparative evaluation of the antimutagenic effect of  $\alpha$ -tocopherol and reduced glutathione. Ser. Biol. Nat. 1:76-81.
- Karekar V., Joshi S. y Shinde S.L. (2000) Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. Mutat. Res. 468:183-194.
- Katz A.J. y Foley T.A. (1993) Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. Environ. Mol. Mutagen. 22:54-58.
- Kaya B., Yanikoglu A. y Marcos R. (1999) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing-spot test. Terat. Car. Mutagen. 19:305-312.
- Kelly J.D., Shah D., Chen F.X., Wurdemann R. y Gold B. (1998) Quantitative and qualitative analysis of *N*-methyl-*N*-nitrosourea. Chem. Res. Toxicol. 11: 1481-1486.
- Kirsch M., Korth H.G., Sustmann R. y de Groot H. (2000) Carbon dioxide but not bicarbonate inhibits *N*-nitrosation of secondary amines. Evidence for amine carbamates as protecting entities. Chem. Res. Toxicol. 13:451-461.
- Kiuchi H., Inoue T., Kada T., Makino O., Shibata T. y Ando T. (1984) Effect of an antimutagenic metal compound on *E. coli* recA protein in vitro. Mutat. Res. 130:367-368.
- Koropatnick K.J. y Stich H.F. (1980) The modifying effect of sodium ascorbate on DNA damage and repair after *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine treatment in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 92:292-298.
- Kuo M.L., Lee K.C. y Lin J.K. (1992) Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. Mutat. Res. 270:87-95.
- Layton D.W., Bogen K.T., Knize M.G., Hatch F.T., Johnson V.M. y Felton J.S. (1995) Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: and analysis and implications for research. Carcinogenesis 16:39-52.
- Li D. (2001) Molecular epidemiology of pancreatic cancer. Cancer J. 7: 259-265.
- Lindsley D.L. y Zimm G.G. (Eds.) (1992) *The Genome of Drosophila Melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Love J.M. y Gudas L.J. (1994) Vitamin A, differentiation and cancer. Current Op. Cell. Biol. 6:825-831.



- Maliakal P.P., Coville P.F. y Wanwinolrul S. (2002) Decreased hepatic drug metabolizing enzyme activity in rats with nitrosamine-induction tumours. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* 19:13-27.
- Matsufuji H., Nakamura H., Chino M., y Takeda M. (1998) Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46:3468-3472.
- Miller C.H., Zhang Z., Hamilton S.M. y Teel R.W. (1993) Effects of capsaicin on liver microsomal metabolisms of the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 75:45-52.
- Mirvish S.S. (1971) Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans, and alkylguanidies: possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 46:1183-1193.
- Mirvish S.S., Cairnes D. A., Hermes N. H. y Raha C.R. (1982) Creatinine: a food component that is nitrosated-denitrosated to yield methylurea. *J. Agric. Food Chem.* 30:824-828.
- Mirvish S.S., Huang Q., Chen S.C., Birt D.F., Clark G.W.B., Hinder R.A., Smyrk T.C. y DeMeester T.R. (1993) Metabolism of carcinogenic nitrosamines by rat and human esophagus and induction of esophageal adenocarcinoma in rats. *Endoscopy* 25:627-631.
- Mirvish S.S. (1994) Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as a factor in the negative correlation between vitamin C consumption and the incidence of certain cancers. *Cancer Res.* 54:1948s-1951s.
- Mirvish S.S. (1995). Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 93:17-48.
- Mirvish S.S., Grandjean A.C., Chen S.C., Gallagher J., Maynard T., Jones L., Rosinsky S., Nie G., Tuatoo H., Payne S., Hinman C. y Ruby E.C. (1995) Time of dosing with ascorbic acid and nitrate, chewing gum and tobacco, and other factors affecting N-nitrosoproline formation in healthy adults taking proline with a standard meal. *Cancer Epidem. Biomark. Prev.* 4:775-782.
- Mirvish S.S. (1997). Effect of nitrate in drinking water and vitamin C on *in vivo* nitrosamine formation and cancer induction. En: *Nitrite as a Food Additive: State of the Science, Chapter 5:Relative Exposure and physiology*. A Ceres Forum [Georgetown University Center for Food and Nutrition Policy], Washington, D.C. pp. 33-44.

Mochizuki M., Anjo T. y Okada M. (1980) Isolation and characterization of *N*-alkyl-*N*-(hydroxymethyl) nitrosamines from *N*-alkyl-*N*-(hydroperoxymethyl) nitrosamines by deoxygenation. *Tetrahedron Lett.* 21:3696-3699.

Morse M.A., Reinhardt J.C., Amin S.G., Hecht S.S., Stoner G.D. y Chung F.L. (1990) Effect of dietary aromatic isothiocyanates fed subsequent to the administration of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone on lung tumorigenicity in mice. *Cancer Lett.* 49:225-230.

Morse M.A., Eklind K.I., Hecht S.S., Jordan K.G., Choi C.I., Desai D.H., Amin S.G. y Chung F.L. (1991) Structure-activity relationship for inhibition of 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone lung tumorigenesis by arylalkyl isothiocyanates in A/J mice. *Cancer Res.* 51:1846-1850.

Negishi T. y Hayatsu H. (1982) A sensitive assay of mutagenic activity of *N*-nitrosamines and its use for inhibition of modulators of the mutagenicity. IARC Scientific Publications No. 54, International Agency for Research on Cancer, Lyon pp. 685-664.

Negishi T., Shiotani T., Fujikawa I. y Hayatsu H. (1991) The genotoxicities of *N*-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damage detected by the DNA-repair test. *Mutat. Res.* 252:119-128.

Negishi T., Nakano H., Kitamura A., Itome C., Shiotani T. y Hayatsu H. (1994) Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in *Drosophila*. *Cancer Lett.* 83:157-164.

Odin A.P. (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386:39-67.

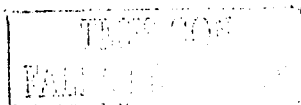
Ohshima H. y Bartsch H. (1981) Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring *N*-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res.* 41:3658-3662.

Osuna-García J.A., Wall M.M. y Waddell C.A. (1998) Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new Mexican-type Chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 46:5093-5096.

Palli D., Saieva C., Coppi C., del Giudice G., Magagnotti C., Nesi G., Orsi F. y Airoldi L. (2001) *O*<sup>6</sup>-alkylguanines, dietary *N*-nitroso compounds, and their precursors in gastric cancer. *Nutr. Cancer* 39:42-49.

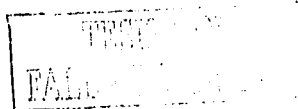
Parkin M., Pisani P. y Ferlay J. (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 49:33-64.

Pignatelli B., Malaveille C., Rogatko A., Hautefeuille A., Thuillier P., Muñoz N., Moulinier B., Berger F., De Montclos H., Lambert R., Correa P., Ruiz B., Sobala



- G.M., Schorah C.J., Axon A.T.R. y Bartsch H. (1993) Mutagens, N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesions of the stomach. *Eur. J. Cancer* 29A:2031-2039.
- Rahden-Staron I. (2002) The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinagenic activity in the wing-spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 518:205-213.
- Rajwesky M.F., Engelbergs J., Thomale J. y Schweer T. (2000) DNA repair: counteragent in mutagenesis and carcinogenesis-accomplice in cancer therapy resistance. *Mutat. Res.* 462:101-105.
- Ramel C. y Magnusson J. (1992) Modulation of genotoxicity in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 267:221-227.
- Ramírez-Victoria P., Guzmán-Rincón J., Espinosa-Aguirre J.J. y Murillo-Romero S. (2001) Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum spp.*) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat. Res.* 496:39-45.
- Rasimas J.J., Pegg A.E. y Fried M.G. (2003) DNA binding mechanism of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Effects of protein and DNA alkylation on complex stability. *J. Biol. Chem.* In press.
- Reilly C.A., Crouch D.J. y Yost G.S. (2001a) Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products. *J. Forensic Sci.* 46:502-509.
- Reilly C.A., Crouch D.J., Yost G.S. y Fatah A.A. (2001b) Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A.* 912:259-267.
- Rizki M., Amrani S., Creus A., Xamena N. y Marcos R. (2001) Antigenotoxic properties of selenium: studies in the wing-spot test in *Drosophila*. *Environ. Mol. Mutagen.* 37:70-75.
- Rodríguez-Arnaiz R. y Aranda J.H. (1994) Activity of aromatic amines in the eye: w/w<sup>+</sup> somatic assay of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 24:75-79.
- Rodríguez-Arnaiz R., Orozco S.P., Gaytan O.J.C. y Graf U. (1996) Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 351:133-145.

- Rodríguez-Arnaiz R. (1998) Biotransformation of several structurally related 2B compounds to reactive metabolites in the somatic *w-w'* assay of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 31:390-401.
- Robichova S. y Slamenova D. (2002) Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Lett.* 182:11-18.
- Romert L., Curvall M. y Jenssen D. (1992) Chlorophyllin is both a positive and negative modifier of mutagenicity. *Mutagenesis* 7:349-355.
- Rosa A., Deiana M., Casu V., Paccagnini S., Appendino G., Ballero M. y Dessi M.A. (2002) Antioxidant activity of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.* 50:7396-7401.
- Saner C., Weibe B., Würigler F.E. y Sengstag C. (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* 27:46-58.
- Sen N.P., Seaman S.W., Baddoo P.A., Burgess C. y Weber D. (2000) An investigation on the possible formation of N-nitroso-N-methylurea by nitrosation of creatinine in model systems and in cured meats at gastric pH. *J. Agric. Food Chem.* 48:5088-5096.
- Sen N.P., Seaman S.W., Baddoo P.A., Burgess C. y Weber D. (2001) Formation of N-nitroso-N-methylurea in various samples of smoked/dried fish, fish sauce, sea foods, and ethnic fermented/pickled vegetables following incubation with nitrite under acidic conditions. *J. Agri. Food Chem.* 49:2096-2103.
- Seow A., Yuan J.M., Sun C.L., Van den Ver D., Lee H.P. y Yu M.C. (2002) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. *Carcinogenesis* 23:2055-2061.
- Shelby P.B. y Olson W.H. (1981) Method and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat. Res.* 83:403-418.
- Sherman P.W. y Flaxman S.S. (2001) Protecting ourselves from food. *Am. Scientist.* 89:142-151.
- Shiraki K., Lu H., Ishamara Y., Kashiwabara S., Uesaka T., Datoh O. y Watanabe H. (2002) Effects of weaning by surrogate mothers (ACI) on tumor development in SD rat treated with methylnitrosourea (MNU) and/or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Hiroshima J. Med. Sci.* 51:75-79.
- Shuker D.E.G. y Bartsch H. (1994) DNA adducts of nitrosamines, En: *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, K. Hemminki, A. Dipple,



D.E.G. Shuker, F.F. Kadlubar, D. Segerbäck y H. Bartsch (Eds.), IARC Scientific Publications No. 125, Lyon. pp. 213-218.

Shuller H.M., Castonguay A., Orloff M. y Rossignol G. (1991) Modulation of the uptake and metabolism of NNK by nicotine in hamster lung. *Cancer Res.* 51:2009-2014.

Sidorov R.A., Ugnivenko E.G., Khovanova E.M. y Belinsky G.A. (2001) Induction of tumor clones in *Drosophila melanogaster wts/+* heterozygotes with chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 498:181-191.

Singer B. y Essigmann J.M. (1991) Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective. *Carcinogenesis* 12:949-455.

Singer B. (1996) DNA damage: chemistry, repair, and mutagenic potential. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 23:2-13.

Slamenova D., Chalupa I., Robichova S., Gabelova A., Farkasova T., Hrusovska L., Bacova G., Sebova L., Eckl P., Bresgen N., Zeithem P., Schenider P., Wsolova L., Barancokova M., Kazimirova A., Navarova J. y Bezek S. (2002) Effect of dietary intake of vitamin A or E on the level of DNA damage, chromosomal aberrations, and micronuclei induced in freshly isolated rat hepatocytes by different carcinogens. *Nutr. Cancer* 42:117-124.

Soden P. y Lucas S. (1998) Inhibitory effect of vitamin C and some antioxidant in *S. typhimurium*. *Cancer Surv.* 68:19-23.

Souliotis V.L., Henneman J.R., Reed C.D., Chhabra S.K., Diwan B.A., Anderson L.H. y Kyrtopoulos S.A. (2002) DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis. *Mutat. Res.* 20:75-87.

Spiegelhalder B., Preussmann R. y Hartung M. (1984) Biological monitoring in metal working industry. En: *N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*. IARC Scientific Publications No. 57. International Agency for Research on Cancer, Lyon. pp 943-946.

Stavric B. (1994) Antimutagenesis and anticarcinogenesis in foods. *Food Chem. Toxicol.* 37:79-90.

Stoner G.D., Morrissey D.T., Heur Y.H., Daniel E.M., Galati A.J. y Wagner S.A. (1991) Inhibitory effects of phenethyl isothiocyanate on N-nitrosobenzylmethylamine carcinogenesis in the rat esophagus. *Cancer Res.* 51:2063-2068.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Suntornsuk L., Gritsanapun W., Nilkamhank S y Paochom A. (2002) Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *J. Pharm Biomed. Anal.* 28:849-855.
- Surjan A., Kocsis S., Csik M., Pinter A, Török C., Börzsönyi M. y Szabad J. (1985) Analysis of the genotoxic activity of four N-nitroso compounds by the *Drosophila* mosaic test. *Mutat. Res.* 144:177-181.
- Tachino N., Guo D., Dashwood W.M., Yamane S., Larsen R. y Dashwood R (1994) Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition of molecular complex formation and segregation of the ultimate carcinogen. *Mutat. Res.* 308:191-203.
- Tanaka K., Hayatsu T., Negishi T. y Hayatsu H. (1994) Inhibition of N-nitrosation of secondary amines in vitro by tea extracts and catechins. *Mutat Res.* 12:91-98.
- Tanaka T., Makita H., Kawabata K., Mori H. Kakumoto M., Satoh K., Hara A., Sumida T., Fukutani K., Tanaka T. y Ogawa H. (1997) Modulation of N-methyl-N-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumourigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination. *Carcinogenesis* 18:761-769.
- Teplitzky S.R., Kiefer T.L., Cheng Q., Dwivedi P.D., Moroz K., Myers L., Anderson M.B., Collins A., Dai J., Yuan L., Spriggs L.L., Blask D.E. y Hill S.M. (2001). Chemoprevention of NMU-induced rat mammary carcinoma with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. *Cancer Lett.* 168:155-163.
- Tijet N., Helvig C. y Feyereisen R. (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262:189-198.
- Tuteja N., Singh M.B., Misra M.K., Bhalla, P.L. y Tuteja R. (2001) Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36:337-397.
- van Poppel G. y van den Berg H. (1997). Vitamins and cancer. *Cancer Lett.* 114:195-202.
- Vermeer I.T.M., Moonen E.J.C., Dallinga J.W., Kleinjas J.C.S. y van Maanen J.M.S. (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutat. Res.* 428:353-361.
- von Pressentin M.M., Chen M. y Guttenplan J.B. (2001) Mutagenesis induced by 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanona y N-nitrosornnicotine in lacZ



upper aerodigestive tissue and liver and inhibition by green tea. *Carcinogenesis* 22:203-206.

Wattenberg L.W. (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res.* 45:1-8.

Webster R.P., Gawde M.D. y Bhattacharya R.K. (1996) Effect of different vitamin A status on carcinogen-induced DNA damage in repair enzymes in rats. *In Vivo* 10:113-118.

Wu Y.N., Wang H.Z., Li J.S. y Han C. (1993) The inhibitory effect of Chinese tea and its polyphenols on in vitro and in vivo N-nitrosation. *Biomed. Environ. Sci.* 6:237-258.

Würgler F.E. y Graf U. (1990) Genotoxicity assays with somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Rev. Latinoamer. Genet. Vol. Extra.* 181-196.

Xu G.P., Song P.J. y Reed P.I. (1993) Effects of fruit juices, processed vegetable juice, orange peel and green tea on endogenous formation of N-nitrosoproline in subjects from a high-risk area for gastric cancer in Moping County, China. *Eur. J. Cancer Prev.* 2:327-335.

Yang C.S. y Smith T.J. (1996) Mechanism of nitrosamine bioactivation and carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 387:385-394.

Zhang S., Hunter D.J., Forman M.R., Rosner B.A., Speizer F.E., Colditz G.A., Manson J.E., Hankinson S.E. y Willett W.C. (1999) Dietary carotenoids and vitamin A, C, and E, and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:547-556.

Zimmering S., Olvera O., Hernández M.E., Cruces M.P., Arceo C. y Pimentel E. (1990) Evidence for a radioprotective effect of chlorophyllin in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 245:47-49.

Zolfigol M.A., Zebarjadian M.H., Chehardoli G., Keypour H., Salehzadeh S. y Shamsipur M. (2001) N-nitrosation of secondary amines with [NO<sup>+</sup> Crown H (NO) (3)-2]. *J. Org. Chem.* 66:3619-3620.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum* spp.) and its possible interference with the nitrosation process

Patricia Ramirez-Victoria<sup>a,\*</sup>, Judith Guzman-Rincon<sup>b</sup>,  
J.J. Espinosa-Aguirre<sup>c</sup>, Susana Murillo-Romero<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

<sup>b</sup> Dept. Biología, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México City, México

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Received 23 October 2000; received in revised form 27 February 2001; accepted 28 February 2001

### Abstract

It is known that the poblano green pepper, a significant component in the Mexican diet, contains certain natural compounds such as chlorophyll,  $\beta$ -carotene, and vitamins, which have antimutagenic and/or anticarcinogenic properties. Using the somatic mutation and recombination test in wing cells of *Drosophila melanogaster*, an extract of the poblano pepper (*Capsicum* spp.) was evaluated to determine its antimutagenic effect against the nitrosation process, simulating the process occurring in the human stomach caused by known food additives. Larvae of 72 h old *D. melanogaster* of standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were exposed in a simultaneous, chronic treatment with the juice expressed from the crushed, whole, fresh pepper fruit, plus the mixture of 20 mM methyl urea (MU) and sodium nitrite (SN), mixed with the animals' food. Three doses of pepper juice (12.5, 25, and 50%) were used. The background mutation rate given as spots per wing was 0.36 and 0.48 for ST and HB, respectively. Mutation frequencies produced by the MU and SN mixture was 1.73 (ST) and 26.46 (HB) mutations per wing. The poblano juice decreased the above rates between 40 and 80%, respectively. The experiments suggest that some compounds present in the green pepper may cause this antimutagenic effect by interfering with the nitrosation process. The role of the extract and one of its components, such as vitamin C, in the nitrosation process will be discussed. © 2001 Published by Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Antimutagenicity; Green pepper; Endogenous nitrosation; *Drosophila melanogaster*; SMART

### 1. Introduction

Green pepper, (*Capsicum* spp.) is one of the main spices and food additives consumed in Latin-American countries, with an average intake per capita of about

40 g/day [1]. Studies of dietary components, including pepper, suggest a direct relationship between their consumption and the decrease of certain types of diseases, including cancer [1–4]. In recent years, more attention has been dedicated to explore compounds in foods with anti-mutagenic and anti-carcinogenic potential, and they are found in almost all categories of foods, fruits and vegetables being the main source [3].

Also, dietary habits are regarded as possible causative factors in the development of a considerable

\* Corresponding author. Present address: Institute for River Research International, 920 Ironwood Dr., Suite 344, Rochester, MI 48307, USA. Tel.: +1-248-650-9144; fax: +1-248-650-9144. E-mail address: prvirri@ees.eesc.com (P. Ramirez-Victoria).

proportion of human cancer [5]. Nitrite, one of the most widely used food additives, produces *N*-nitrosamines, a large group of chemical carcinogens, in meat products, fish, cheese and tobacco smoke, among others [6,7]. These *N*-nitrosamines are chemically stable under physiological conditions, and require metabolic activation by microsomal mixed-function oxidases to reactive intermediates [8,9]. The first step in their metabolism is the  $\alpha$ -hydroxylation to produce  $\alpha$ -hydroxynitrosamines. These metabolites decompose spontaneously to give, successively, monoalkylnitrosamines, alkyldiazohydroxides and nitrogen-separated ion pairs [10,11]. Alkyldiazohydroxides can alkylate nucleophiles directly or after loss of water to give diazoalkanes, the most reactive metabolites [12,13]. Some of these species alkylate DNA bases, especially at the N-7 and O-6 of guanine and the O-4 of thymine.  $O^6$ -alkylguanines pair with thymine rather than cytosine producing G:C→A:T mutations that are thought to initiate carcinogenesis [14].

Recognition of inhibitors of nitrosation is relevant for the primary prevention of cancer, and the development of suitable animal models to complete this assignment is important. Previously mammalian and bacteria systems have been employed for these investigations. But a more sophisticated system was needed. Graf et al. [15] and Guzmán-Rincón et al. [16] chose such a system, the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*, to demonstrate in vivo nitrosation. Two strains of animals with suppressed and constitutively high levels of cytochrome P450 enzymes and a genetic system to detect a wide variety of genetic mutations were employed. The SMART assay is based on induced loss of heterozygosity, which may occur through various mechanisms, such as mitotic recombination, mutation, deletion, chromosome loss and non-disjunction [17]. SMART is a sensitive in vivo method capable of detecting a vast array of mutagens and promutagens belonging to a great variety of chemical classes [18]. It is also well suited to determine the antimutagenic properties of natural compounds [19–22]. In the present study, we applied the test with its standard and high bioactivation *Drosophila*'s crosses to study the modulating action of a natural food, the poblano (Mexican common name) pepper, on the nitrosation genotoxic effect.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemical compounds and media

Methyl urea (MU, CAS 598–50–5) and sodium nitrite (SN, CAS 7632–00–0) purchased from Sigma, were dissolved in distilled water and mixed into the culture media of instant, mashed potato (Maggi®) obtained from a local supermarket.

### 2.2. Preparation of the pepper extract and determination of vitamin C in green pepper

Fresh, green, poblano peppers (*Capsicum* spp.) purchased locally, were washed, sliced, and processed by an ordinary juice extractor. The juice was stored in plastic containers in an ultra-low freezer ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) until use. Vitamin C in the extract was determined by the AOAC 2,6-dichloroindophenol (DCP) titration method [23].

### 2.3. *Drosophila* stocks, crosses and genetic markers

Three *Drosophila* stocks of the somatic mutation and recombination test (SMART) were used: (1) *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>P</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*; (2) *mwh/mwh*, and (3) *ORR/ORR;flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>P</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*. Virgin females from the stock 1 were mated with stock 2 (*mwh*) males, and called the standard cross (ST); and virgin females from the stock 3 were also mated with stock 2 males, called the high bioactivation cross (HB). This strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line, which is characterized by a constitutively high level of cytochrome P450 not present in the ST cross [24]. The progeny in both crosses will consist of trans-heterozygous larvae for the markers *flr<sup>3</sup>* (*flare<sup>3</sup>*) and *mwh* (*multiple wing hairs*); both markers are recessive and are located in the left arm of the third chromosome at 38.8 and 0.03 map units, respectively. These two markers modify the phenotype of the trichomes in the wing. Wing cells expressing the *mwh* marker produce multiple trichomes (>2), in contrast to one in the wild type. The *flr<sup>3</sup>* marker produces a trichome with irregular morphology. Detailed information on all the genetic markers is given by Lindsley and Zimm [25]. All the stocks were maintained at constant temperature  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and 60% humidity.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 2.4. Experimental procedures

Eggs from the two crosses were collected for 8 h in culture bottles containing a solid agar base (5% w/v agar-agar in water). Then, 48 h later the larvae were floated off with tap water, blotted dry and placed in equal batches of 70–80 animals each, into vials containing 0.7 g of mashed potato hydrated with 5 ml of the test solution. The MU and SN were used at only one concentration, 20 mM. Poblano pepper extract (PPE) was used at three concentrations, 12.5; 25; and 50 % by volume. Negative controls included distilled water, MU or SN alone and with the above concentrations of PPE. The larvae fed on this medium until pupation. Adult flies that emerged from the pupal stage were collected and stored in 70% ethanol; the wings were removed and mounted in Faure's solution and scored under 400× magnification for the presence of regions or spots of mutant (*flr* or *mwh*) trichomes [17,26]. Two types of spots are observed: (1) single spots, either *mwh* or *flr*<sup>3</sup>, which are due to various types of mutational events as well as mitotic recombination, and (2) twin spots, consisting of adjacent *mwh* and *flr*<sup>3</sup> subclones, which originate exclusively from mitotic recombination [27].

#### 2.5. Data analysis and statistics

Classification of spots was done on the basis of small spots (1–2 wing cells), large spots (>2 cells), twin spots (both genotypes) and total spots. The chi square test for proportions was used for statistical evaluation of the data [28]. Test responses were classified into three categories: (1) positive (p), a strong response was found; (2) inconclusive (i), no acceptance at the same time of two mutually exclusive hypotheses; and (3) negative (n), no effects under the conditions of the test [29].

### 3. Results and discussion

The antimutagenic effect of poblano pepper extract (PPE) was studied in a genotoxicity SMART assay where the animals fed on media containing mixtures of the extract and nitrosation precursors, methyl urea (MU) and sodium nitrite (SN). Table 1 summarizes the results.

The background levels of spontaneous mutation for the ST and HB crosses were 0.36 and 0.48 frequency of total spots (FTS) per wing, respectively. Similar results were obtained with MU, NS, PPE, MU + PPE, and SN + PPE, demonstrating that none of the compounds tested alone or in a simple mixture have a positive genotoxic response.

Analysis of the MU and SN mixture in the ST cross, showed an FTS of 1.73, a five-fold increase of total spots compared with above control groups, giving a positive genotoxic response according to the statistic analysis. When simultaneous treatment with MU and SN plus PPE was performed, the genotoxic effect was reduced in a dose-dependent manner with the following FTS, 1.03, 0.94, and 0.68 from the lower to the higher concentration of PPE (Table 1, part A). Data obtained with the HB cross, showed a dramatically positive genotoxic effect with an FTS of 26.46, the increment of total mutations was 57-fold greater than the H<sub>2</sub>O control. Treatments performed with the mixture of MU and SN together with PPE, produced the following FTS: 14.23, 10.80, and 5.46 from the lower to the higher concentrations (Table 1, part B).

Fig. 1 compares the frequency of total spots per wing obtained with a control group (H<sub>2</sub>O), the mixture (MU + SN) and the co-treatments with the three different doses of PPE in the ST and HB crosses. The more PPE is present in the diet the fewer MU + SN induced mutations. The inhibition's percentage in each one of the PPE doses in ST cross were 40, 47 and 60% from the lower to the higher doses respectively. HB cross, yielded an inhibitory effect of 36, 52 and 76% with the addition of 12.5, 25 and 50% PPE, respectively.

This dose-response relationship, suggests a receptor type of mechanism as opposed to an all or none mechanism. Presumably, methyl nitrosourea binds to DNA and causes mutations [12–14]. But it is not clear yet where that PPE acts: at the in vivo nitrosation reaction (i.e. formation of methyl nitrosourea) or at the DNA binding step. But because the dose-dependent effect takes place in both, the ST and HB crosses, it is possible that the antimutagenic effect occurs before metabolic activation. In any case, the dynamics of this hypothesis needs further study.

The MU + SN treatment, showed a significant increase in mutations over controls in both crosses. This



Table 1

Summary of results obtained in the *Drosophila* wing spot test after exposure with MU, SN and three concentrations of PPE

Compound	No. wings (N)	Spots per wing (number of spots) <sup>a</sup>				Spot with <i>mwh</i> clone (n)	<i>mwh</i> clones per wing (n/N)
		Small single spot (1-2 cells) (m = 2.0)	Large single spots (>2 cells) (m = 5.0)	Twin spots (m = 5.0)	Total spots (m = 2.0)		
<b>(A) Standard cross</b>							
H <sub>2</sub> O	120	0.32 (38)	0.04 (5)	0.00 (0)	0.36 (43)	43	0.36
PPE 12.5%	120	0.30 (36) n	0.00 (0) n	0.01 (1) i	0.31 (37) n	36	0.30
PPE 25%	120	0.26 (31) n	0.03 (3) n	0.02 (2) i	0.30 (36) n	36	0.30
PPE 50%	120	0.27 (32) n	0.06 (7) n	0.00 (0) i	0.32 (39) n	39	0.33
MU 20 mM	120	0.29 (35) n	0.03 (4) n	0.01 (1) i	0.33 (40) n	40	0.33
MU + PPE 12.5%	120	0.37 (44) n	0.02 (2) n	0.00 (0) i	0.38 (46) n	46	0.38
MU + PPE 25%	120	0.28 (33) n	0.09 (11) i	0.03 (4) i	0.40 (48) n	48	0.40
MU + PPE 50%	120	0.35 (42) n	0.02 (2) n	0.02 (2) i	0.38 (46) n	46	0.38
SN 20 mM	120	0.32 (38) n	0.02 (2) n	0.00 (0) i	0.33 (40) n	40	0.33
SN + PPE 12.5%	120	0.25 (30) n	0.06 (7) n	0.01 (1) i	0.32 (38) n	38	0.32
SN + PPE 25%	120	0.33 (40) n	0.08 (9) i	0.03 (3) i	0.43 (52) n	52	0.43
SN + PPE 50%	120	0.41 (49) n	0.06 (7) n	0.02 (2) i	0.48 (58) n	58	0.48
(MU + SN) 20 mM	120	1.33 (160) p	0.31 (37) p	0.09 (11) p	1.73 (208) p	206	1.72
(MU + SN) + PPE 12.5%	120	0.95 (114) p	0.03 (4) n	0.05 (6) p	1.03 (124) p	124	1.03
(MU + SN) + PPE 25%	120	0.84 (101) p	0.08 (9) i	0.03 (3) i	0.94 (113) p	110	0.92
(MU + SN) + PPE 50%	120	0.62 (75) p	0.03 (4) n	0.03 (3) i	0.68 (82) p	82	0.68
<b>(B) High bioactivation cross</b>							
H <sub>2</sub> O	120	0.43 (52)	0.04 (5)	0.01 (1)	0.48 (58)	56	0.47
PPE 12.5%	120	0.36 (43) n	0.03 (3) n	0.01 (1) i	0.39 (47) n	46	0.38
PPE 25%	120	0.37 (45) n	0.05 (6) n	0.02 (2) i	0.44 (53) n	50	0.42
PPE 50%	120	0.43 (51) n	0.03 (4) n	0.01 (1) i	0.47 (56) n	56	0.47
MU 20 mM	120	0.43 (51) n	0.08 (9) i	0.01 (1) i	0.51 (61) n	60	0.50
MU + PPE 12.5%	120	0.49 (59) n	0.03 (3) n	0.02 (2) i	0.53 (64) n	64	0.53
MU + PPE 25%	120	0.45 (54) n	0.07 (8) i	0.00 (0) i	0.52 (62) n	62	0.52
MU + PPE 50%	120	0.43 (51) n	0.03 (3) n	0.03 (3) i	0.47 (57) n	57	0.48
SN 20 mM	120	0.46 (55) n	0.04 (5) n	0.03 (4) i	0.53 (64) n	64	0.53
SN + PPE 12.5%	120	0.45 (54) n	0.03 (4) n	0.02 (2) i	0.50 (60) n	60	0.50
SN + PPE 25%	120	0.52 (62) n	0.01 (1) n	0.00 (0) i	0.52 (63) n	63	0.53
SN + PPE 50%	120	0.51 (61) n	0.02 (2) n	0.02 (2) i	0.54 (65) n	65	0.54
(MU + SN) 20 mM	120	19.57 (2348) p	3.79 (455) p	3.10 (372) p	26.46 (3175) p	2449	20.41
(MU + SN) + PPE 12.5%	120	10.74 (1289) p	2.37 (285) p	1.12 (134) p	14.23 (1708) p	1570	13.08
(MU + SN) + PPE 25%	120	8.13 (976) p	1.83 (219) p	0.84 (101) p	10.80 (1296) p	1166	9.72
(MU + SN) + PPE 50%	120	3.67 (441) p	1.27 (152) p	0.52 (62) p	5.46 (655) p	583	4.86

<sup>a</sup> Statistical diagnoses according to Frei and Würglter [7] for comparisons with corresponding controls: p, positive; n, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor.

TESTES  
 PALMIRA  
 1999

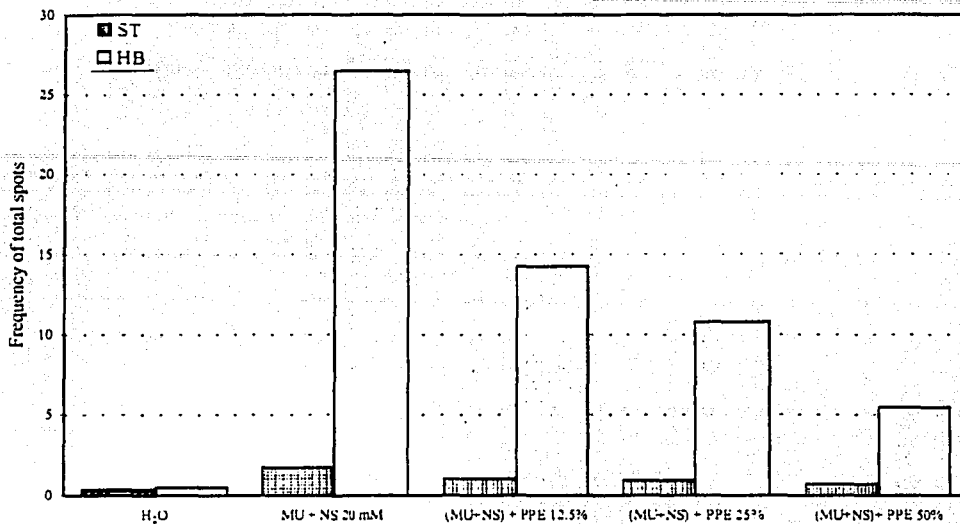


Fig. 1. Comparison of antimutagenic effects of different concentrations of pepper extract on the nitrosation cocktail in two crosses of *D. melanogaster*.

mixture resulted in a higher genotoxic response compared to those caused by the MU and SN compounds singly. Previous work suggests that the in vivo nitrosation process occurs somewhere in the digestive tract of larvae of *D. melanogaster* in a similar way to that in the mammalian stomach [16]. This genotoxic effect was much more evident when the HB cross was used. It is well known that nitrosamines require metabolic activation by the cytochrome system, to give  $\alpha$ -hydroxynitrosamines and finally the diazonium ion, the most reactive metabolite [30,31]. A number of cytochrome P450 genes belonging to families 4 and 9 have been cloned from *D. melanogaster*. Hence, it can be speculated that the CYP4 family in insects has the same role as the CYP2 family in vertebrates, the main enzyme which metabolized nitroso compounds [32,33]. Saner et al. [24] determined high levels of CYP6A2 in larvae of the HB in comparison to the ST cross, suggesting that the metabolism of promutagens can be related with the high expression of these enzymes. Thus, the high mutation rate in the HB cross suggests that the product of MU + SN produced by

in vivo nitrosation has become metabolized to more highly genotoxic metabolites.

The antimutagenic activity of the poblano pepper extract may be caused by vitamin C because vitamin C reduces the damage caused by nitroso compounds [34–36]. Perhaps ascorbic acid destroys free radicals, thereby helping to inhibit their role in cancer promotion [35] or ascorbic acid at pH 4–6 reduces nitrite to NO, which cannot directly form *N*-nitroso compounds. Thus, perhaps vitamin C inhibits nitrosamine formation simply because it uses up nitrite [37]. Alternatively, ascorbic acid as an antioxidant, might prevent oxidative metabolism of the test compound via the cytochrome P450 system, inhibiting the production of electrophilic metabolites [21].

If ascorbic acid is one of the antimutagenic ingredients in the PPE, it is active at a very low concentration. Our results indicate that the content of vitamin C in the extract was 85 mg of vitamin C 100 g fresh pepper. Thus, its concentration in the 50% PPE is 1.75 mM; 0.87 mM in 25% and 0.43 mM in 12.5%. These amounts are far lower than commercial

preparations tested by Graf et al. [15] who reported that 17 mM of vitamin C was able to inhibit the nitrosation in *Drosophila*, and those reported by Olvera et al. [22] of 25-100 mM, to reduce the damage caused by  $\gamma$ -rays and chromium.

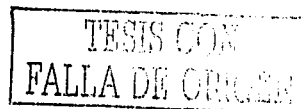
Deciding which compound is the most important antimutagen may be difficult, because the pepper extract is a complex mixture of many other possible antimutagens. Thus, the antimutagenic activity of a complex mixture may not depend only on the action of one its components, but for the interaction of all of them. Moreover, antimutagenic activity may be dependent on experimental conditions such as route or time of exposure relative to mutagen exposure. Also, the determination of a protective mechanism can be difficult due to several antimutagens are known or suspected to act through more than one means [38].

#### Acknowledgements

We are grateful for Dr. Julieta Rubio from Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM for her help and facilities in the determination of vitamin C, and to Dr. Frank Butterworth from the Institute for River Research International, for his valuable comments. The authors are also grateful for support from the following institutions: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México and the Institute for River Research International. Gratitude is also extended for the following grant: CONACYT 130029.

#### References

- [1] E. González de Mejía, J.A. Quintanar-Hernández, G. Loarca-Piña, Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes, *Mutat. Res.* 416 (1988) 11-19.
- [2] X. Calver, C. Carod, E. Gene, Peppers at treatment for *Helicobacter pylori* infection, *Am. J. Gastroenterol.* 95 (2000) 820-821.
- [3] B. Stavric, Antimutagens and anticarcinogens in food, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 79-90.
- [4] G. Bronzetti, C. Della Croce, P. Aretini, R. Fiorio, Antimutagenesis and anticancer effects, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 15 (1996) 59-64.
- [5] R. Doll, R. Peto, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Nat. Cancer Inst.* 66 (1981) 1191-1308.
- [6] R. Montesano, H. Bartsch, Mutagenic and carcinogenic *N*-nitroso compounds: possible environmental hazards, *Mutat. Res.* 32 (1976) 179-228.
- [7] M.H. Silla Santos, Biogenic amines: their importance in foods, *Int. J. Food Microbiol.* 29 (1996) 213-231.
- [8] H. Bartsch, H. Oshima, B. Pignatelli, S. Calmels, Human exposure to endogenous *N*-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder, in: D. Forman, D. Shuker (Eds.), *Cancer Surveys, Advances and Prospects in: Clinical, Epidemiological and Laboratory Oncology*, Vol. 8, Oxford University Press, UK, 1989, pp. 335-362.
- [9] H. Bartsch, R. Montesano, Relevance of nitrosamines to human cancer, *Carcinogenesis* 5 (1984) 1381-1393.
- [10] S. Preston-Martin, P. Correa, Epidemiological evidence for the role of nitroso compounds in human cancer, *Cancer Surv.* 8 (1989) 459-473.
- [11] H. Bartsch, B. Spiegelhalder, Environmental exposure to *N*-nitroso compounds (NNOC) and precursors: and overview, *Eur. J. Cancer Prev.* 5S1 (1996) 11-17.
- [12] M.C. Archer, Mechanisms of action of *N*-nitroso compounds, in: D. Forman, D. Shuker (Eds.), *Cancer Surveys, Advances and Prospects in: Clinical, Epidemiological and Laboratory Oncology*, Vol. 8, Oxford University Press, UK, 1989, pp. 241-250.
- [13] C.D. Leaf, J.S. Wishnok, S.T. Tannenbaum, Mechanisms of endogenous nitrosation, in: D. Forman, D. Shuker (Eds.), *Cancer Surveys, Advances and Prospects in Clinical, Epidemiological and Laboratory Oncology*, Vol. 8, Oxford University Press, UK, 1989, pp. 323-334.
- [14] S.S. Mirvish, Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC, *Cancer Lett.* 93 (1995) 14-48.
- [15] U. Graf, S.K. Abraham, J. Guzmán-Rincón, F.E. Würgler, Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 402 (1998) 203-209.
- [16] J. Guzmán-Rincón, J. Espinosa, U. Graf, Analysis of the in vivo nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 412 (1998) 69-81.
- [17] U. Graf, F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 153-188.
- [18] F.E. Würgler, E.W. Vogel, In vivo mutagenicity testing using cells of *Drosophila melanogaster*, in: F.J. De Serres (Ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Vol. 10, Plenum Press, New York, 1986, pp. 1-72.
- [19] T. Negishi, S. Arimoto, C. Nishizaki, H. Hayatsu, Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), *Mutat. Res.* 10 (1989) 145-149.
- [20] S. Arimoto, S. Fukuoaka, C. Itome, H. Nakano, H. Rai, H. Hayatsu, Binding of polycyclic planar mutagens to chlorophyllin resulting in inhibition of the mutagenic activity, *Mutat. Res.* 287 (1993) 293-305.



- [21] R.I. Goncharova, T.D. Kuzhir, A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 214 (1989) 257-265.
- [22] O. Olvera, S. Zimmering, C. Arceo, J. Guzmán, M.E. de la Rosa, Evidence for the protective effect of ascorbic acid (Vitamin C) in treatment with  $\gamma$ -rays and chromium(IV) ( $\text{CrO}_3$ ) in somatic cells of *Drosophila*, *Mutation Res.* 346 (1995) 19-21.
- [23] K.S. Rymal, Portable micromethod for quantitative determination of Vitamin C in fruit and vegetables juices, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 3 (1983) 810-813.
- [24] C. Saner, B. Weibel, F.E. Würgler, C. Sengstag, Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 46-58.
- [25] D.L. Lindsley, G.G. Zimm (Eds.), *The genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, CA, 1992.
- [26] U. Graf, Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Experientia* 51 (1995) 168-173.
- [27] J. Guzman-Rincon, P. Ramirez-Victoria, L. Benitez, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila* used for biomonitoring of environmental pollutants, in: F.M. Butterworth, M.E. Gonssebat, A. Gunatilaka (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Vol. 2, Plenum Press, New York, 2000, pp. 221-237.
- [28] H. Frei, F.E. Würgler, Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 334 (1995) 247-258.
- [29] H. Frei, F.E. Würgler, Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutat. Res.* 203 (1988) 297-308.
- [30] S.S. Hecht, A. Castonguay, A. Riverson, B. Mu, D Hoffmann, Tobacco-specific nitrosamines: carcinogenicity, metabolism, and possible role in human cancer, *J. Environ. Sci. Health* 1 (1983) 1-54.
- [31] S.G. Carmella, A. Borukhova, D. Desai, S.S. Hecht, Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite, *Carcinogenesis* 18 (1997) 587-592.
- [32] B. Dunkov, R. Rodríguez-Arnaiz, B. Pittendrigh, R. French-Constant, R. Feyereisen, Cytochrome P450 gene cluster in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Gen. Genet.* 251 (1996) 290-297.
- [33] C.S. Yang, J.S.H. Yoo, H. Ishizaki, J. Hong, Cytochrome P-450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation, *Drug Metab. Rev.* 22 (1990) 147-159.
- [34] S.S. Mirvish, Inhibition by Vitamins C and E of in vivo nitrosation and Vitamin C occurrence in the stomach, *Eur. J. Cancer Prev.* 5 (1996) 131-136.
- [35] S.S. Mirvish, Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compounds formation as a factor in the negative correlation between Vitamin C consumption and the incidence of certain cancers, *Cancer Res.* 54 (1994) 1948S-1951S.
- [36] S.S. Mirvish, A.C. Grandjean, K.J. Reimers, B.J. Connelly, S.C. Chen, C.R. Morris, X. Wang, J. Haorah, E.R. Lyden, Effect of ascorbic acid dose taken with a meal on nitrosoproline excretion in subjects ingesting nitrate and proline, *Nutr. Cancer.* 31 (1998) 106-110.
- [37] S. Mirvish, Effect of nitrate in drinking water and Vitamin C on in vivo formation and cancer induction, in: *Nitrite as a Food Additive: State of the Science*. A Ceres Forum organized by Georgetown University's Center for Food and Nutrition Policy, Washington, DC, 1997, pp. 33-44.
- [38] M.D. Waters, A.L. Brady, H.F. Stack, H.E. Brockman, Antimutagenicity profiles for some model compounds, *Mutat. Res.* 238 (1990) 57-85.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN