

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“Determinación de marcadores biológicos de la  
ingesta de nitratos, nitritos, nitrosaminas, aminas  
heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos  
policíclicos”**

**“Determination of biomarkers of intake of nitrates,  
nitrites, nitrosamines, heterocyclic amines and  
polycyclic aromatic hydrocarbons”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**Marta González López**

**Julio, 2017**





Master en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



**PROFESOR TUTOR:**

Dr. D. Sonia González Solares (Universidad de Oviedo)

Dr. D. Miguel Gueimonde Fernández (IPLA-CSIC)

**CERTIFICA:**

Que D. **Marta González López** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 13 de Julio de 2017

D. Sonia González Solares

D. Miguel Gueimonde Fernández

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera darle las gracias a la Dra. Sonia González Solares que, junto con la Dra. Cristina Lasheras Mayo, me han enseñado todo lo que sé hoy día sobre la nutrición y han hecho de ésta una de las asignaturas más bonitas e interesantes de mi carrera como bióloga. También quisiera agradecer, en particular, a la Dra. Sonia González Solares toda la confianza que ha mostrado hacia mí como tutora tanto de mi Trabajo Fin de Grado como de mi Trabajo Fin de Master.

También quería agradecerle al Dr. Miguel Gueimonde, mi tutor de prácticas externas del Master y cotutor de mi Trabajo Fin de Master, su consideración en todo momento hacia mí, sus consejos y el haberme enseñado que el trabajo de investigación requiere de mucha disciplina, trabajo, constancia y paciencia.

Agradecer la oportunidad que me ha dado el Master de realizar las prácticas externas en el IPLA. La experiencia ha sido magnífica no sólo por todo lo que he aprendido allí en tan sólo dos meses, sino por el increíble trato que he recibido tanto por parte del Dr. Miguel Gueimonde Fernández, como de todas las personas que allí trabajaban, haciendo especial mención a Alicia y Lidia, dos chicas responsables y trabajadoras, siempre disponibles para echarme una mano en todo lo que podían y pendientes de mí. Sin olvidarme de mencionar a Begoña, por sus consejos de madre.

Gracias al coordinador del Master, el Dr. Manuel Rendueles de la Vega, por haberme tratado tan bien y por su gran disposición en todo momento.

Por último y no menos importante, gracias a mi familia y pareja por haber estado conmigo todos estos años (tanto de la carrera como del Master) llenos de agobio, estrés e inseguridades, pero al mismo tiempo de muchas alegrías. Me enseñasteis que el que trabaja duro y se esfuerza, finalmente recoge sus frutos y, aunque haya habido momentos en los que he pensado que todo esto me superaba, me habéis dado la fortaleza suficiente para conseguir alcanzar todas mis metas. Gracias papá y mamá por haberme hecho la mujer que soy hoy día.

# ÍNDICE

## RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Influencia de la dieta sobre la microbiota	4
1.2. Hipótesis	6
1.3. Objetivo	6
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES	7
2.1. Relación de nitratos, nitritos, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas en la dieta con el cáncer	7
2.1.1. Nitratos, nitritos y nitrosaminas	7
2.1.1.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo	12
2.1.1.2. Conclusión	13
2.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	13
2.1.2.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo	17
2.1.2.2. Conclusión	17
2.1.3. Aminas heterocíclicas	18
2.1.3.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo	24
2.1.3.2. Conclusión	24
2.2. Genotoxicidad/mutagenicidad en muestras fecales	25
2.3. Test de Ames para la detección de mutagenicidad en heces	28
3. METODOLOGÍA	30
3.1. Revisión bibliográfica	30

3.2	Experimento	30
3.2.1.	Bioensayo I	32
3.2.2.	Bioensayo II	34
3.3	Interpretación de los resultados	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.	LIMITACIONES	43
6.	CONCLUSIONES	43
	ABREVIATURAS	44
	REFERENCIAS	45

## RESUMEN

**Antecedentes.** Se han encontrado en la literatura evidencias sólidas sobre la asociación entre la ingesta de diversos compuestos (nitratos, nitritos, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas) derivados, principalmente, del consumo de carnes y el riesgo de desarrollar cáncer. Se sugiere que estos compuestos entran en contacto con la microbiota intestinal modulando su composición y dando lugar a compuestos potencialmente carcinogénicos. Un análisis de los niveles de toxicidad fecal podría emplearse como un biomarcador de la ingesta dietética de estos compuestos y, con ello, del riesgo de desarrollar cáncer.

**Objetivo.** Evaluar la aplicabilidad de un método que permita la detección del nivel de compuestos mutagénicos en heces.

**Métodos.** Se utilizó el Test de Ames para analizar la mutagenicidad en heces de 17 muestras fecales de personas institucionalizadas (5 hombres y 12 mujeres) >75 años y sin patologías diagnosticadas. Se realizaron dos bioensayos empleando el Kit Muta-ChromoPlate. El primer bioensayo se realizó con 8 muestras (3 hombres y 5 mujeres), mientras que para la realización del segundo bioensayo se contó con 9 muestras (2 hombres y 7 mujeres), todas ellas seleccionadas al contar con una cantidad suficiente de sobrenadante fecal.

**Resultados.** En el primer bioensayo realizado, los resultados obtenidos indican que las muestras analizadas presentan una gran cantidad de mutágenos ( $p = 0,001$ ). Sin embargo, el nivel de crecimiento bacteriano observado y la rapidez con la que éste se produjo sugirió que los resultados no eran producto de una desmesurada toxicidad fecal sino de la presencia de histidina en las muestras. Se realizó un segundo bioensayo con una dilución del 90% del sobrenadante fecal con el fin de inhibir el efecto de la histidina, sin éxito.

**Conclusión.** El Test de Ames no parece ser un buen método para la determinación de mutagenicidad fecal debido a que la presencia de histidina en las muestras puede dar lugar a resultados falsos positivos. Se necesita la puesta en marcha de más trabajos que permitan la detección de biomarcadores fecales de la ingesta de compuestos potencialmente carcinogénicos.

Palabras clave: *Dieta, Cáncer, Mutagenicidad fecal, Test de Ames, Biomarcadores.*

## ABSTRACT

**Background.** We have found in literature solid evidence of the association between the intake of various compounds (nitrates, nitrites, nitrosamines, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines) derived, mainly, from the consumption of meat, and the risk of developing cancer. It is suggested that these compounds come into contact with gut microbiota, modulating its composition and giving rise to potentially carcinogenic compounds. An analysis of faecal toxicity levels could be used as a biomarker of the dietary intake of these compounds and, hence, of the risk of developing cancer.

**Objective.** To evaluate the applicability of a method that allows the detection of the level of mutagenic compounds in faeces.

**Methods.** The Ames test was used to analyse the mutagenicity in the faeces of 17 faecal samples of institutionalised people (5 males and 12 females) over 75 years old and without diagnosed pathologies. Two bioassays were conducted using the Muta-ChromoPlate kit. The first bioassay was developed with 8 samples (3 males and 5 females), while for the development of the second bioassay we had 9 samples (2 males and 7 females), all of them selected because a sufficient amount of faecal supernatant was available.

**Results.** The results obtained in the first bioassay show that the samples analysed present a great amount of mutagens ( $p = 0.001$ ). However, the perceived level of bacterial growth and the rapidity with which this growth was produced suggested that the results were not the product of an excessive faecal toxicity, but of the presence of histidine in the samples. A second bioassay was conducted with a dilution of 90% of faecal supernatant in order to inhibit the effect of histidine, unsuccessfully.

**Conclusion.** The Ames test does not seem to be a proper method for the determination of faecal mutagenicity due to the fact that the presence of histidine in the samples can produce false-positive results. More works are needed that allow the detection of faecal biomarkers of the intake of potentially carcinogenic compounds.

Keywords: *Diet, Cancer, Faecal mutagenicity, Ames test, Biomarkers.*

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura I.</b> Imagen del Kit Muta-ChromoPlate para la realización del Test de Ames	31
<b>Figura II.</b> Ejemplo de posibles resultados obtenidos a través del Kit Muta-ChromoPlate	35
<b>Figura III.</b> Imagen de los resultados del bioensayo I tras las primeras 24 horas	38

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Resumen de los estudios revisados sobre nitratos, nitritos y nitrosaminas	11
<b>Tabla II.</b> Resumen de los estudios revisados sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos	16
<b>Tabla III.</b> Resumen de los estudios revisados sobre aminas heterocíclicas	23
<b>Tabla IV.</b> Resumen de las preparaciones del bioensayo I	33
<b>Tabla V.</b> Resumen de las preparaciones del bioensayo II	35
<b>Tabla VI.</b> Resultados del bioensayo I tras 24 horas	37
<b>Tabla VII.</b> Resultados del bioensayo I tras 5 días	39
<b>Tabla VIII.</b> Resultados del bioensayo II tras 5 días	40

## 1. INTRODUCCIÓN

La asociación entre cáncer y dieta ha sido ampliamente estudiada y argumentada. Ya en 1981, Doll y Peto, señalaban que hasta un 35% de las muertes por esta enfermedad podrían estar relacionadas con la dieta (Doll y Peto, 1981). Posteriormente, la World Cancer Research Fund en colaboración con el American Investigation of Cancer Research arrojaron datos coherentes con los mencionados por Doll y Peto, estimando que el 25-30% de los casos de cáncer eran atribuibles a la dieta (WCRF y AICR, 1997). Uno de los factores de riesgo para el desarrollo de cáncer a través de la dieta es la exposición a diversos compuestos que presentan capacidad carcinogénica. Algunas de las sustancias con mayor potencial carcinogénico son: los nitratos, los nitritos, las nitrosaminas (NA), las aminas heterocíclicas (AHC) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Jakszyn et al., 2004); compuestos sobre los que se centrará el siguiente trabajo.

Este tipo de compuestos, con capacidad mutagénica, tienen la particularidad de que, a pesar de estar presentes en diversos tipos de alimentos, no se encuentran de forma natural en los mismos, sino que pueden incorporarse (nitratos y nitritos) o formarse (nitrosaminas, AHC e HAP) durante el proceso de elaboración o preparación (Agudo y González, 2002; Galceran, 2001).

Los nitratos y los nitritos son sustancias que se utilizan, frecuentemente, como aditivos alimentarios en carnes procesadas para retrasar el deterioro microbiano y preservar su aspecto y su aroma (Song, Wu y Guan, 2015). Su uso es importante para proteger frente a la contaminación por *Clostridium botulinum* (AECOSAN, 2007). De igual manera, también pueden emplearse como aditivos en pescados, quesos y conservas, y estar presentes en productos fermentados como la cerveza (Flores-Balcázar, Rosales-Pérez, Caro-Sánchez, Gallardo-Alvarado y Gordillo-Bastidas, 2015). Además, también pueden estar presentes como contaminantes en el agua potable (Kilfoy et al., 2011). Las NA son compuestos carcinogénicos que pueden formarse a partir de los nitratos y los nitritos; siendo la N-nitrosopirrolidina (NPYR) y la N-nitrosodimetilamina (NMDA) las que más frecuentemente se encuentra en los alimentos (Jakszyn et al., 2006; Song, Wu y Guan, 2015). Las NA pueden formarse de dos modos diferentes: endógena y exógenamente. La formación endógena se produce a partir de precursores presentes en la dieta. Los nitritos pueden ingerirse de forma directa al encontrarse presentes en diferentes alimentos. A su vez, éstos pueden formarse a través

de la reducción de nitratos, consumidos en la dieta, por parte de los microorganismos de la saliva. Los nitritos, debido a las condiciones de pH del estómago, pueden oxidarse a agentes nitrosantes y reaccionar (reacción de nitrosación) con otros componentes dietéticos como aminas secundarias, formando NA (Antón y Lizaso, 2001; Ventanas, Martín, Estévez y Ruíz, 2004). La formación exógena tiene lugar en los propios alimentos de forma previa a su consumo. La presencia de nitratos y nitritos añadidos junto con la presencia intrínseca de compuestos aminados en ciertos alimentos (aminas derivadas de la acción microbiana y algunos aminoácidos), puede desembocar en una reacción que dé como resultado la formación de NA, sobre todo cuando se ha aplicado un tratamiento térmico (Antón y Lizaso, 2001; AECOSAN, 2007).

La propiedad química más relevante de las NA es su capacidad mutagénica, convirtiéndose en agentes alquilantes. Estos agentes tienen la capacidad de reaccionar con el ADN, alterando la configuración de sus bases, e iniciar un proceso de carcinogénesis. Para ello, es necesaria la activación metabólica de las NA, producida por las enzimas del citocromo P450 a partir de una  $\alpha$ -hidroxilación (Flores-Balcázar et al., 2015; Jakszyn, 2006).

Los HAP se forman en diferentes alimentos tras aplicar un tratamiento térmico para su cocinado (fritura, horneado, hacer a la parrilla, etc.), y en mayor cantidad cuando se aplica fuego de forma directa al alimento y/o se aplican procesos largos de cocinado. También se ha encontrado un importante contenido de HAP en alimentos a los que se les ha aplicado un proceso de ahumado o secado. Los HAP pueden formarse por pirolisis de la materia orgánica a altas temperaturas, por el contacto directo de gotas de lípidos con la fuente de calor (generando HAP que se adhieren a los alimentos), por el humo producido durante el cocinado o empleado para el ahumado (depositándose sobre los alimentos), o por la combustión incompleta del carbón o la madera (en barbacoas o parrillas) (Alomirah et al., 2011; Flores-Balcázar et al., 2015; Pérez-Morales, Morales y Haza, 2016). Los niveles máximos de HAP se han encontrado en alimentos ahumados y en carnes asadas a la parrilla (Pérez-Morales et al., 2016). De entre los diferentes tipos de HAP clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, el benzo(a)pireno (BaP) ha sido catalogado como carcinogénico para el ser humano (Moorthy, Chu y Carlin, 2015). En cuanto al mecanismo de acción de los HAP, éstos no producen directamente un daño sobre el ADN, sino que se precisa de la transformación de los mismos en metabolitos

carcinogénicos que se unirán al ADN, produciendo aductos. Así, las vías de activación metabólica de los HAP son las siguientes: (a) formación de epóxidos de dihidrodiol que requieren dos oxidaciones catalizadas por citocromo P450 y epóxido hidrolasa; (b) formación de fenoles a través de cationes radicales por oxidación de electrones, y (c) formación de o-quinonas a través de catecoles mediante la participación de aldo-ceto reductasas con formación de ROS (especies de oxígeno reactivo) (Moorthy et al., 2015).

Las AHC se pueden encontrar, principalmente, en alimentos proteicos, como las carnes, a los que se les ha aplicado un tratamiento térmico para su cocinado. Las AHC se pueden clasificar en dos grandes grupos, las carbolinas y los aminoimidazoazarenos. Las carbolinas, también denominadas aminas pirolíticas, se forman a temperaturas superiores a los 300°C, mientras que los aminoimidazoazarenos, también llamados aminas térmicas, se forman al aplicar temperaturas inferiores a los 300°C (Galceran, 2001). La formación de AHC durante el cocinado está influida, principalmente, por el tipo de carne, la temperatura y el método de cocción (Rohrmann, Zoller, Hermann y Linseisen, 2007; Turesky, 2007). Se ha observado que las AHC se empiezan a formar a los 100°C y que su formación aumenta con la temperatura. De esta manera, métodos de cocción como la fritura o el asado conducen a una mayor formación de AHC que hervir, hacer al vapor o estofar (Chiavarini, Bertarelli, Minelli y Fabiani, 2017; Galceran, 2001). Las AHC más abundantes encontradas en la dieta humana son la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx) y 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (DiMeIQx) (Sugimura, Wakabayashi, Nakagama y Nagao, 2004). Desde el punto de vista de su actividad mutagénica y, por tanto, de su potencial cancerígeno, se ha establecido que algunas AHC presentan un índice de mutagenicidad más de 1000 veces superior al del benzo(a)pireno, lo que pone de manifiesto su elevada toxicidad potencial (Chiavarini et al., 2017). Las AHC se forman a partir de precursores como la creatinina, creatina, hexosas, aminoácidos libres y algunos dipéptidos; presentes, principalmente, en el músculo (Chiavarini et al., 2017; Martín Calero, 2010). Las AHC actúan a través de la formación de aductos de ADN tras la activación metabólica catalizada por las enzimas citocromo P450 de la familia 1A (N-oxidación) seguida de O-esterificación por N-acetiltransferasas. De esta forma, se produce la disociación de los ésteres a iones nitrenio reactivos al ADN (Flores-Balcázar et al., 2015; Chiavarini et al., 2017).

Una vez detallado, de forma breve, el mecanismo de acción de los compuestos descritos, se puede observar cómo éstos necesitan ser activados metabólicamente para desarrollar su capacidad carcinogénica. Así, se forman metabolitos con capacidad de unirse de forma estable al ADN (aductos), pudiendo interferir en la normal replicación del material genético.

### **1.1. Influencia de la dieta sobre la microbiota**

Además de lo anteriormente mencionado, la dieta puede modificar o modular la composición de la microbiota intestinal (Tuan y Chen, 2016; Wu et al., 2011). En el intestino existen una gran variedad de géneros bacterianos; sin embargo, existen tres enterotipos, definidos en función del grupo de bacterias predominantes en cada uno de ellos: *Bacteroides*, *Prevotella* y *Ruminococcus*; siendo *Bacteroides* el enterotipo más abundante (Hernández y Bardesi, 2013). Dietas basadas en proteínas y grasas animales producen un incremento del enterotipo *Bacteroides*, mientras que dietas basadas en carbohidratos incrementan el enterotipo *Prevotella* (Clarke et al., 2012; Tuan y Chen, 2016; Wu et al., 2011). Se realizó un estudio comparativo en dos poblaciones con hábitos dietéticos claramente diferenciados y su efecto sobre la microbiota intestinal. Se observó cómo ambas poblaciones presentaban un ecosistema intestinal diferenciado y especializado en la degradación de las sustancias más comúnmente ingeridas (Shankar et al., 2017). Se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota intestinal determinadas por la ingesta dietética de AHC, fibra, calcio, grasas y vitaminas. Principalmente, un aumento de la ingesta de AHC y una disminución de la ingesta de vitamina D puede generar modificaciones en la microbiota intestinal de tal forma que todo ello podría contribuir al desarrollo de cáncer colorrectal (Mai, McCrary, Sinha y Gleit, 2009). A su vez, en una revisión de diferentes estudios se concluye que los hábitos dietéticos basados en un alto consumo de fibra, un bajo consumo de carne roja o procesada, así como consumos reducidos de alcohol producen diferencias en la composición y diversidad microbiana del huésped, de tal forma que todo ello se ha asociado con un menor riesgo de cáncer colorrectal (Tuan y Chen, 2016). Sin embargo, se ha sugerido que el ecosistema microbiano intestinal no solamente influye sobre el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, sino que también puede afectar el riesgo de desarrollar cáncer en los tejidos fuera del tracto gastrointestinal (Hullar, Burnett-Hartman y Lampe, 2014).

Se ha propuesto que esos cambios en la microbiota intestinal, influidos por la dieta, se relacionan con mayores o menores niveles de genotoxicidad fecal que, a su vez, se asocia con un mayor o menor riesgo de desarrollar cáncer (Federici et al., 2017). Como ya se ha mencionado, la dieta influye sobre la cantidad y tipos de bacterias presentes en el intestino, y el metabolismo microbiano intestinal de los compuestos dietéticos afecta a la producción de metabolitos protectores o nocivos. De esta manera, los metabolitos generados por el ecosistema microbiano intestinal pueden influir sobre el desarrollo de tumores a través de efectos genotóxicos directos sobre el ADN (Hullar et al., 2014). Por lo tanto, la interacción entre la ingesta dietética y las bacterias del intestino puede influir sobre el riesgo de desarrollar cáncer en los seres humanos.

Entender la interacción compleja y dinámica entre las exposiciones alimenticias y la microbiota intestinal puede ayudar a dilucidar los mecanismos de carcinogénesis y guiar futuras estrategias de prevención y tratamiento del cáncer.

Todo lo dicho pone de manifiesto cómo la dieta, y más concretamente los componentes presentes en la misma, pueden influir sobre el riesgo de desarrollar cáncer. En los últimos años se han llevado a cabo estudios que pretenden medir la toxicidad fecal a través del uso de diferentes pruebas con el fin de relacionarla con la ingesta dietética y con la probabilidad de desarrollar cáncer. Sin embargo, los estudios disponibles son aún escasos y es necesario establecer bioensayos sencillos que permitan establecer el potencial carcinogénico de la materia fecal debido a sus importantes implicaciones sobre la salud humana. Este aspecto guiará el experimento que se ha realizado en el presente trabajo.

## **1.2. Hipótesis**

La hipótesis que se plantea es que la ingesta dietética de diferentes compuestos con actividad carcinogénica está asociada a un incremento en la toxicidad fecal y, a su vez, puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer a través de diversas vías.

## **1.3. Objetivo**

El objetivo principal del estudio que se ha realizado es evaluar la aplicabilidad de un método que permita la detección del nivel de compuestos mutagénicos en heces para, así, en estudios posteriores poder correlacionar esta información con la ingesta dietética de estos compuestos. De esta manera, los resultados obtenidos podrán servir de base para correlacionar tal ingesta con el riesgo de desarrollar cáncer. Se podrá estimar, a su vez, si el método empleado puede ser útil a la hora de encontrar un biomarcador (mutagenicidad fecal) de la ingesta de compuestos con capacidad carcinogénica, debido a la importancia que esto supone para la salud humana. Se estudiará la mutagenicidad fecal ya que ésta es la mejor forma no invasiva de estudiar las exposiciones a los diversos compuestos mutagénicos presentes en la dieta como medio para el riesgo de desarrollar cáncer (Gratz, Wallace, El-Nezami, 2011).

## **2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y/O EXPERIMENTALES**

### **2.1. Relación de nitratos, nitritos, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y aminas heterocíclicas en la dieta con el cáncer**

A continuación, se realizará una revisión sobre diversos estudios que analizan la relación entre la ingesta de nitritos, nitratos, NA, HAP y ACH a través de la dieta y el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer. En los últimos años ha quedado ampliamente demostrada la asociación entre este tipo de compuestos y el cáncer en modelos animales, por lo que en este trabajo se pretenden analizar aquellos estudios llevados a cabo con población humana. Se exponen los resultados de los estudios en los que se hayan encontrado relaciones estadísticamente significativas entre la ingesta de estos compuestos y el riesgo de desarrollar cáncer. Se realizará una descripción de los estudios revisados, agrupándolos en función del tipo del cáncer al que se haya asociado la ingesta de estos compuestos, con el fin de extraer conclusiones destacables.

#### **2.1.1. Nitratos, nitritos y nitrosaminas**

De la literatura revisada, la mayoría de los trabajos que estudian el papel de los nitrosocompuestos sobre el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer, se refieren a cáncer colorrectal (Cross et al., 2010; DellaValle et al., 2014; Loh et al., 2011; Zhu et al., 2014). En primer lugar, se ha encontrado una asociación positiva y significativa entre la ingesta de nitratos ( $\geq 530$   $\mu\text{g}/1000$  Kcal) y nitritos ( $\geq 554$   $\mu\text{g}/1000$  Kcal) con la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer. (Cross et al., 2010). Se ha detectado que la principal NA asociada al desarrollo del cáncer colorrectal a través de la ingesta dietética es la NMDA (Loh et al., 2011; Zhu et al., 2014). Por otra parte, es destacable mencionar que la vitamina C y la vitamina E podrían tener un efecto protector frente al desarrollo de este tipo de cáncer derivado de la ingesta dietética de nitrosocompuestos. Así, se ha hallado que la ingesta de nitratos ( $\geq 142,5$  mg/día) aumenta el riesgo de cáncer colorrectal cuando está asociado a un consumo escaso de vitamina C ( $< 83,9$  mg/día) (DellaValle et al., 2014) y que la ingesta de NMDA ( $\geq 0,07$   $\mu\text{g}/\text{día}$ ) se asocia a un incremento del riesgo de padecer este tipo de cáncer cuando la ingesta de vitamina E es limitada (Zhu et al., 2014). En dos de los cuatro estudios analizados se pone de manifiesto como el principal factor de riesgo a partir del cual se produce una ingesta de nitrosocompuestos es el consumo cárnico (Cross et al., 2010; Zhu et al., 2014),

principalmente cuando se trata de carne roja (Cross et al., 2010). A su vez, el consumo de cerveza también podría estar implicado en el incremento del riesgo (Zhu et al., 2014).

Se han encontrado tres estudios que relacionan el consumo de nitrosocompuestos con la probabilidad de desarrollar cáncer en el tracto digestivo (Hernández-Ramírez et al., 2009; Keszei, Goldbohm, Schouten, Jakszyn y van den Brandt, 2013; Navarro Silvera et al., 2011). Se ha demostrado que el consumo total de nitratos ( $\geq 1,7$  mg/día) y nitritos ( $\geq 0,4$  mg/día) procedentes de fuentes de origen animal puede multiplicar por dos el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Hernández-Ramírez et al., 2009). Una mayor probabilidad de padecer cáncer esofágico y gástrico también ha sido atribuida al consumo de nitritos derivados de productos cárnicos (Navarro Silvera et al., 2011). A su vez, la NMDA ingerida ( $\geq 0,08$   $\mu$ g/día), principalmente, a través del consumo de carne procesada y de cerveza, se ha asociado positivamente con el riesgo de desarrollar cáncer escamoso esofágico en hombres (Keszei et al., 2013). El consumo diferencial en función del sexo (cantidad y porciones) a estos productos y, con ello, a la NMDA presente en los mismos, puede ser un factor explicativo de que solamente se haya asociado un incremento del riesgo en hombres. Por otra parte, los análisis estadísticos han reportado un efecto protector del consumo de verduras sobre el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Hernández-Ramírez et al., 2009; Navarro Silvera et al., 2011) y esofágico (Navarro Silvera et al., 2011).

El cáncer de vejiga se ha asociado significativamente a una ingesta elevada de nitratos ( $\geq 103$  mg/día) cuyo consumo principal se ha atribuido a la carne procesada, principalmente, de salchichas (Catsburg et al., 2014). En esta misma línea, se detectó que una ingesta de nitritos procedentes de carne procesada ( $\geq 0,29$  mg/1000 Kcal) también estaba asociada con la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer (Ferrucci et al., 2010).

La ingesta de nitratos puede llegar a afectar a la función tiroidea, ya que inhibe la absorción de yodo (Kilfoy et al., 2011; Ward et al., 2010), por lo que se ha relacionado con la probabilidad de desarrollar cáncer tiroideo. Se investigó si una ingesta frecuente de esta sustancia, a través del agua potable, podría asociarse con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, encontrándose una relación estadísticamente significativa entre el consumo frecuente y elevado de nitratos ( $\geq 17,5$  mg/día) y el riesgo de padecer cáncer de

tiroides (Ward et al., 2010). Resultados similares se han obtenido en otro estudio en el que se encontró una relación positiva y significativa entre la ingesta de nitratos ( $\geq 29,9$  mg/día) y el desarrollo del cáncer, pero solamente en los hombres; concretamente de cáncer de tiroides papilar y folicular (Kilfoy et al., 2011).

Por otra parte, se han encontrado dos estudios en los que se ha detectado una asociación entre la ingesta de nitrosocompuestos y la probabilidad de padecer cáncer ovárico. Se detectó un incremento significativo en el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer asociado a una ingesta dietética elevada de nitratos totales en la dieta ( $\geq 36,6$  mg/1000 Kcal) y de nitritos ( $\geq 0,14$  mg/1000 Kcal), principalmente, cuando estos procedían de alimentos de origen animal (Kilfoy et al., 2012). Un segundo estudio comparó la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer en función del agua potable consumida. Se encontró que el consumo de agua con alto contenido de nitratos ( $\geq 5$  mg/l) se asociaba positivamente a la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer en comparación con el consumo de agua con un menor contenido de los mismos. Este mismo estudio detectó que el riesgo aumentaba cuando existía un consumo elevado de nitritos ( $\geq 0,1 - 0,19$  mg/día) asociado a la ingesta de carnes procesadas (Inoue-Choi et al., 2015).

También se estudió la posible asociación entre la ingesta de nitrosocompuestos y la probabilidad de desarrollar cáncer renal. Los resultados obtenidos informan, por un lado, de que los nitritos procedentes del consumo de carnes procesadas ( $\geq 0,10$  g/1000 Kcal) podrían asociarse con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Por otro lado, de forma más concreta, también se ha encontrado una asociación con la probabilidad de desarrollar cáncer renal de células claras mediado por la ingesta de nitritos totales ( $\geq 0,62$  g/1000 Kcal) consumidos a través de la dieta (DellaValle et al., 2013).

Finalmente, un último estudio revisado expone resultados que relacionan el consumo cárnico con la probabilidad de desarrollar cáncer de mama. Los análisis estadísticos informan de que los nitritos procedentes de la carne procesada ( $\geq 0,5$  mg/1000 Kcal) podrían aumentar el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (Inoue-Choi, Sinha, Gierach y Ward, 2016).

A continuación, se expone una tabla en la que se resumen, brevemente, los resultados obtenidos en los estudios revisados.

AÑO DE PUBLICACIÓN	AUTOR	TAMAÑO MUESTRAL	TIEMPO DE INTERVENCIÓN	COMPUESTOS DIETÉTICOS RELACIONADOS CON EL CÁNCER	DOSIS	FUENTE	TIPO DE CÁNCER
2009	Hernández-Ramírez et al.	735	2 años	Nitratos Nitritos	$\geq 1,7$ mg/día $\geq 0,4$ mg/día	Carne s.e. <sup>a</sup>	Gástrico
2010	Cross et al.	300.948	1 año	Nitratos Nitritos	$\geq 530$ $\mu$ g/1000 Kcal $\geq 554$ $\mu$ g/1000 Kcal	Carne roja	Colorrectal
2010	Ferrucci et al.	300.933	1 año	Nitratos	$\geq 0,29$ mg/1000 Kcal	Carne procesada	Vejiga
2010	Ward et al.	21.977	n.d. <sup>b</sup>	Nitratos	$\geq 17,5$ mg/día	Agua potable	Tiroides
2011	Kilfoy et al.	490.194	1 año	Nitratos	$\geq 29,9$ mg/día (H) <sup>c</sup>	n.d. <sup>b</sup>	Tiroides
2011	Loh et al.	23.363	1 año	NMDA	$\geq 33,4$ ng/día	n.d. <sup>b</sup>	Colorrectal (recto)
2011	Navarro Silvera et al.	1.782	3-5 años	Nitritos	n.d. <sup>b</sup>	Carne s.e. <sup>a</sup>	Esofágico y gástrico
2012	Kilfoy et al.	151.316	1 año	Nitratos Nitritos	$\geq 36$ mg/1000 Kcal $\geq 0,14$ mg/1000 Kcal	Animal	Ovárico

2013	Keszei et al.	120.852	1 año	NMDA	$\geq 0,08 \mu\text{g/día (H)}^c$	Carne procesada Cerveza	Escamoso esofágico
2013	DellaValle et al.	491.841	1 año	Nitritos	$\geq 0,10 \text{ g/1000 Kcal}$	Carne procesada	Renal
2014	Catsburg et al.	3.246	2 años	Nitratos	$\geq 103 \text{ mg/día}$	Carne procesada	Vejiga
2014	Zhu et al.	4.241	1 año	NMDA	$\geq 0,07 \mu\text{g/día}$	Carne s.e. <sup>a</sup>	Colorrectal (recto)
				NMDA + escasa vitamina E	n.d. <sup>b</sup>		
2014	DellaValle et al.	73.118	1 año	Nitratos totales + escasa vitamina C	$\geq 142,5 \text{ mg/día}$ + $< 83,9 \text{ mg/día}$	n.d. <sup>b</sup>	Colorrectal
2015	Inoue-Choi et al.	28.555	1 año	Nitratos	$\geq 5 \text{ mg/l}$	Agua	Ovárico
				Nitritos	$\geq 0,1 - 0,19 \text{ mg/día}$	Carne procesada	
2016	Inoue-Choi et al.	193.742	1 año	Nitritos	$\geq 0,05 \text{ mg/1000 Kcal}$	Carne procesada	Mama

Tabla I. Resumen de los estudios revisados sobre nitratos, nitritos y nitrosaminas y su asociación con diversos tipos de cáncer. Elaboración propia.

<sup>a</sup>Sin especificar

<sup>b</sup>No disponible

<sup>c</sup>Hombres

### **2.1.1.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo**

#### ***Nitratos***

Se han encontrado datos similares que ponen de manifiesto que una ingesta dietética  $\geq 103$  mg/día (Catsburg et al., 2014) o  $\geq 142,5$  mg/día (DellaValle, 2014) de nitratos totales pueden incrementar el riesgo de cáncer. En cuanto a los niveles de estos compuestos que podrían incrementar el riesgo de desarrollar cáncer ingeridos a través de alimentos concretos, se ha encontrado una mayor disparidad, sobre todo con relación al consumo cárnico. Sin embargo, se podría estimar que consumos de carne diarios (roja y/o procesada) que impliquen una ingesta superior a unos 0,60 mg/día de nitratos (estimado para una dieta de 2500 Kcal) ya podría suponer un riesgo. Con relación al consumo de agua, ingestas de nitratos superiores a 5 mg por cada litro o superiores a 17,5 mg al día presentes en la misma, podrían suponer un riesgo (Inoue-Choi et al., 2015; Ward et al., 2010).

#### ***Nitritos***

Los estudios que han encontrado relaciones significativas para el consumo de nitritos y la probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer muestran como determinadas cantidades de estos compuestos ingeridas a través del consumo de carne roja o de carne procesada podrían incrementar el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Así, cantidades superiores a 0,12 mg/día (estimados para una dieta de 2500 Kcal y teniendo en cuenta el valor más asociado significativamente al riesgo de desarrollar cáncer) (Inoue-Choi et al., 2016) podría implicar un riesgo para la salud. Estos datos son coherentes con los expuestos en otros estudios analizados (Hernández-Ramírez et al., 2009; Inoue-Choi et al., 2015; Kilfoy et al., 2012).

#### ***Nitrosaminas (NMDA)***

En tres de los estudios analizados se estima el nivel de ingesta de NMDA que puede incrementar significativamente el riesgo de padecer cáncer (Keszei et al., 2013; Loh et al., 2011; Zhu et al., 2014). Los resultados obtenidos en todos estos estudios son consistentes y reflejan que ingestas diarias superiores a 0,08  $\mu\text{g}$ , 0,03  $\mu\text{g}$  y 0,07  $\mu\text{g}$ , respectivamente, pueden favorecer el desarrollo de cáncer colorrectal (Loh et al., 2011; Zhu et al., 2014) o esofágico (Keszei et al., 2013).

### **2.1.1.2. Conclusión**

Un total de 15 estudios, publicados entre el año 2009 y 2016, se han incluido en la revisión. Estos estudios cuentan con un tamaño muestral de entre 735 y 491.841 sujetos, lo que hace que sus resultados se puedan considerar representativos, y presentan un diseño metodológico, o bien caso-control, o bien de cohorte. Los resultados indican como un consumo de alimentos con nitritos, nitratos y/o NMDA (principalmente, presentes en carne roja o procesada) pueden incrementar el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer. También se alude a la presencia de altos niveles de estos compuestos en agua y cerveza (nitratos y NMDA, respectivamente), lo que un consumo frecuente y elevado podría contribuir al desarrollo de cáncer. En este sentido, se refleja que un consumo elevado de estos compuestos puede aumentar el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer: colorrectal, esofágico, gástrico, tiroideo, renal, ovárico, de vejiga o de mama; siendo el colorrectal el que más apoyo científico ha acumulado. Además, se pone de manifiesto como el resto de componentes de la dieta pueden influir sobre el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer, potenciándolo o reduciéndolo. En este sentido, se ha detectado como la ingesta diaria de vitaminas (vitamina C y E) (DellaValle et al., 2014; Zhu et al., 2014) o de verduras (Hernández-Ramírez et al., 2009; Navarro Silvera et al., 2011) podrían tener un efecto protector frente al desarrollo del cáncer derivado del consumo elevado de nitrosocompuestos en la dieta.

### **2.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos**

En cuanto a la acción de los HAP sobre la probabilidad de desarrollar cáncer, la mayor evidencia científica en humanos, aunque escasa, está referida al cáncer renal. En este sentido, se han encontrado dos estudios que relacionan de forma positiva y significativa la ingesta de BaP derivada del consumo de carne roja y carne roja procesada con la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer, principalmente, cuando el método de cocinado es a la parrilla o a la barbacoa (Daniel et al., 2011; Daniel et al., 2012). Concretamente, se ha sugerido que una ingesta  $\geq 4,3$  ng/día de este compuesto incrementaría la probabilidad de desarrollar cáncer del parénquima renal (Daniel et al., 2011). Otros resultados relacionan la ingesta de BaP con las Kcal consumidas, reflejando que el riesgo de desarrollar cáncer renal, y más concretamente de tipo papilar, se incrementaría con una ingesta  $\geq 1,5$  ng/1000 Kcal (Daniel et al., 2012).

Al igual que en los estudios anteriormente mencionados, también se obtuvieron asociaciones significativas que relacionan la ingesta de BaP derivado del consumo de carne roja y carne procesada con el cáncer, pero en este caso se relacionó con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Lam et al., 2009) y de próstata (Sinha et al., 2009). Se estimó que la dosis dietética de BaP a partir de la cual se incrementaría el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se encontraría en  $\geq 85,4$  ng/día para las mujeres y en  $\geq 89,4$  ng/día para los hombres. Llama la atención que para esos mismos rangos de ingesta se detectó un mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer para los sujetos no fumadores (OR = 1,6) que para los fumadores (OR = 1,3) (Lam et al., 2009). Con relación a la probabilidad de padecer cáncer prostático, la dosis a partir de la cual se incrementaría el riesgo se ha estimado en  $\geq 20,86$  ng/1000 Kcal (Sinha et al., 2009).

Se examinó la probabilidad de desarrollar cáncer de páncreas derivada de la ingesta de BaP. Se encontró una asociación positiva solamente en hombres, a partir de una ingesta  $> 52,10$  ng/día. Se ha sugerido una cierta predisposición genética asociada a la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer derivada del consumo de BaP, ya que para este mismo consumo ( $> 52,10$  ng/día) se observó un riesgo más de dos veces mayor para quienes presentaban el alelo NAT\*10 en su genotipo (Suzuki et al., 2008).

Otro estudio reflejó una asociación positiva y significativa entre la ingesta de BaP derivada de un elevado consumo de carne hecha a la parrilla y la probabilidad de desarrollar adenomas rectales. Se detectó que el riesgo se incrementaba con dosis de BaP  $\geq 2,7$  ng/día (Ferrucci et al., 2012).

Finalmente, se encontró un último estudio en donde se detectó que la ingesta de BaP procedente de la carne podría aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Se sugirió que cuando la ingesta de BaP se asociaba a un consumo de alcohol diario ( $> 28$  ml/día) el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer se incrementaba en más de tres veces (Ronco et al., 2011).

A continuación, se expone una tabla en la que se resumen, brevemente, los resultados obtenidos en los estudios revisados.

AÑO DE PUBLICACIÓN	AUTOR	TAMAÑO MUESTRAL	TIEMPO DE INTERVENCIÓN	COMPUESTOS DIETÉTICOS RELACIONADOS CON EL CÁNCER	DOSIS	FUENTE	TIPO DE CÁNCER
2008	Suzuki et al.	1.391	n.d. <sup>a</sup>	BaP BaP + NAT*10	>52,10 ng/día (H) <sup>b</sup>	Carne s.e. <sup>c</sup>	Páncreas
2009	Lam et al.	3.976	1 año	BaP	≥89,4 ng/día (H) <sup>b</sup> ≥85,4 ng/día (M) <sup>d</sup>	Carne roja y carne procesada	Pulmón
2009	Sinha et al.	175.343	1 año	BaP	≥20,86 ng/1000 Kcal	Carne roja y carne procesada	Próstata
2011	Daniel et al.	2.367	2 años	BaP	≥4,3 ng/día	Carne s.e. <sup>c</sup>	Renal (parénquima renal)
2011	Ronco et al.	1.098	1 año	BaP BaP + alcohol	n.d. <sup>a</sup>	Carne s.e. <sup>c</sup>	Mama
2012	Daniel et al.	302.162	1 año	BaP	≥1,5 ng/1000 Kcal	Carne roja Carne roja procesada	Renal

2012	Ferrucci et al.	17.072	1 año	BaP	$\geq 2,7$ ng/día	Carne s.e. <sup>c</sup>	Adenomas rectales
------	-----------------	--------	-------	-----	-------------------	-------------------------	-------------------

Tabla II. Resumen de los estudios revisados sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos y su asociación con diversos tipos de cáncer. Elaboración propia.

<sup>a</sup>No disponible

<sup>b</sup>Hombres

<sup>c</sup>Sin especificar

<sup>d</sup>Mujeres

### **2.1.2.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo**

En los estudios analizados en los que se muestra una asociación entre la ingesta de BaP derivado del consumo de carne cocinada, principalmente, a la parrilla o a la barbacoa y la probabilidad de desarrollar cáncer, se puede observar una bipolaridad en cuanto a los niveles que pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer. En primer lugar, algunos estudios han detectado cómo determinados niveles de este compuesto, a partir del consumo cárnico, se asociarían al riesgo de desarrollar cáncer renal (Daniel et al., 2011; Daniel et al., 2012) o adenomas rectales (Ferrucci et al., 2012). En este sentido, se ha encontrado que ingestas diarias superiores a 3,75 ng/día (Daniel et al., 2012) o superiores a 4,3 ng/día (Daniel et al., 2011) de BaP podrían incrementar el riesgo de desarrollar cáncer renal; como se puede observar ambos valores son similares y coherentes. Niveles  $\geq 2,7$  ng/día implicarían un aumento del riesgo de desarrollar adenomas rectales (Ferrucci et al., 2012). Por otra parte, diversos estudios han encontrado que es necesario una ingesta bastante mayor de este BaP a través del consumo de carne (Lam et al., 2009; Sinha et al., 2009; Suzuki et al., 2008). En estos estudios se refleja que se produce un incremento de padecer cáncer cuando los niveles de este compuesto ingerido a través del consumo cárnico supera 85,4 ng/día, 52,15 ng/día y 52,10 ng/día, respectivamente.

### **2.1.2.2. Conclusión**

Un total de 7 estudios se han incluido en la revisión. Éstos han sido publicados entre el año 2008 y 2012, cuentan con un tamaño muestral de entre 1.098 y 302.162 sujetos, lo que hace que sus resultados se puedan considerar representativos, y presentan un diseño metodológico, o bien caso-control, o bien de cohorte. Los resultados indican que un consumo elevado de carne roja o procesada cocinada a elevada temperatura (principalmente, a la parrilla o a la barbacoa) repercute, directamente, en la ingesta de BaP, que ha correlacionado significativa y positivamente con el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cánceres: renal, de páncreas, de pulmón, de próstata y de mama; así como adenomas rectales, que inicialmente no tienen un carácter maligno, pero existe riesgo de que lleguen a transformarse en cáncer. En dos de los estudios revisados se añade la particularidad de que el riesgo de desarrollar, por un lado, cáncer de páncreas, aumenta cuando los sujetos presentan en su genotipo el alelo NAT\*10 (Suzuki et al., 2008) y, por otro lado, cáncer de mama, aumenta cuando un consumo elevado de BaP se

acompaña, a su vez, de un consumo frecuente de bebidas alcohólicas (Ronco et al., 2011).

### **2.1.3. Aminas heterocíclicas**

De los diversos estudios revisados en donde se ha encontrado una asociación entre la ingesta dietética de AHC y el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer, el mayor número de los mismos se han referido al riesgo de desarrollar adenomas colorrectales o cáncer colorrectal. Se han encontrado un total de 7 estudios que han detectado una relación estadísticamente significativa entre el consumo de AHC y el riesgo de desarrollar este tipo de patologías, hallándose en 5 de ellos asociaciones con la probabilidad de desarrollar adenomas colorrectales, inicialmente carentes de malignidad, pero que, posteriormente, pueden transformarse en cáncer. Se ha detectado como la ingesta de PhIP derivado del consumo de carne roja y de carne procesada (Rohrmann, Hermann y Linseisen, 2009) y, principalmente, cocinada a la parrilla (Ferrucci et al., 2012) aumentan el riesgo de desarrollar adenomas colorrectales. Se sugiere que cantidades  $\geq 16,8$  ng/día (Rohrmann et al., 2009) incrementarían el riesgo de desarrollar esta patología. Sin embargo, Ferrucci et al. (2012) exponen que esta cantidad ha de ser  $\geq 36,2$  ng/día. A su vez, se ha propuesto que el incremento del riesgo de desarrollar adenomas colorrectales derivado de la ingesta de PhIP podría estar asociado a una predisposición genética determinada por la presencia de polimorfismos en CYP1B1 y en XPD (Ho et al., 2014). En ese mismo estudio se refleja que polimorfismos en XPD también estarían asociados con el incremento del riesgo de desarrollar adenomas colorrectales a través de ingestas  $>4,12$  ng/día de DiMeIQx (Ho et al., 2014). En otro estudio se han hallado asociaciones significativas con un aumento de la probabilidad de desarrollar adenomas colorrectales relacionado tanto con la ingesta de PhIP ( $>79,4$  ng/día), como con la ingesta de MeIQx ( $>12,3$  ng/día) y DiMeIQx ( $>0,83$  ng/día) procedentes de la ingesta de carne roja y procesada (Fu et al., 2014). Finalmente, el último estudio analizado que expone una asociación entre la ingesta de AHC, a través de la carne procesada, y el desarrollo de adenomas colorrectales, informa que el incremento del riesgo de desarrollar esta patología estaría determinado por un elevado consumo de AHC totales ( $\geq 36,4$  ng/día) y MeIQx ( $\geq 2,9$  ng/día), pero solamente en mujeres. Por otro lado, se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre la ingesta de MeIQx y DiMeIQx (Cross et al., 2010), así como de PhIP (Helmus et al., 2013) a través del consumo de carne roja y carne procesada y el riesgo de desarrollar

cáncer colorrectal. En este sentido, en el estudio llevado a cabo por Helmus et al. (2013) se compara la ingesta dietética de un grupo de sujetos con cáncer colorrectal con respecto a la de un grupo de sujetos sanos. Se observan diferencias en cuanto al consumo de MeIQx, DiMeIQx y PhIP procedentes del consumo de carne roja, siendo significativamente consumidos en cantidades más elevadas por los sujetos del grupo diagnosticados de este tipo de cáncer. Se refleja que la media de consumo de estos compuestos de los sujetos con cáncer colorrectal es de 72,2 ng/día de MeIQx, 4 ng/día de DiMeIQx y 93,3 ng/día de PhIP.

Por otro lado, una ingesta elevada de PhIP y MeIQx, principalmente derivada del consumo de carne roja y carne procesada, también ha correlacionado con la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón (Lam et al., 2009; Tasevska et al., 2009). Se sugiere que cantidades de PhIP  $\geq 49,8$  ng/día en hombres y  $\geq 36,4$  ng/día en mujeres y que cantidades de MeIQx  $\geq 11,9$  ng/día en hombres y  $\geq 9,1$  ng/día en mujeres se asociarían positiva y significativamente con el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (Lam et al., 2009).

Otros estudios revisados ponen de manifiesto que un elevado consumo de PhIP podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de vejiga (Ferrucci et al., 2010; Lin et al., 2012). Así, se propone que ingestas de este compuesto derivadas del consumo de carne roja de  $\geq 10,9$  ng/1000 Kcal (Ferrucci et al., 2010) suponen un incremento del riesgo de desarrollar este tipo de cáncer. Lin et al. (2012) reflejan que los niveles de este compuesto han de ser  $\geq 93,72$  ng/día para incrementar tal riesgo. Estos autores también reflejan, en su estudio, que ingestas  $\geq 5,69$  ng/día de MeIQx,  $\geq 0,79$  ng/día de DiMeIQx o que superen los  $\geq 120,32$  ng/día de AHC totales a partir del consumo de carne roja implicarían un riesgo aumentado de desarrollar este tipo de cáncer (Lin et al., 2012).

El riesgo de desarrollar cáncer de próstata se ha asociado de forma significativa al consumo de carne roja; sin embargo, solamente se ha encontrado relación con los niveles de PhIP ( $\geq 45$  ng/día) (Rohrmann et al., 2015) y DiMeIQx ( $\geq 0,32$  ng/1000 Kcal) (Major et al., 2012) ingeridos a través de la misma.

Por otra parte, se ha mostrado como la ingesta de MeIQx a través del consumo de carne roja ( $\geq 25$  ng/1000 Kcal) puede aumentar el riesgo de adenocarcinoma esofágico (Cross et al., 2011).

Finalmente, un último estudio revisado ha encontrado que el riesgo de padecer cáncer renal papilar puede incrementarse con ingestas superiores a 10,9 ng/1000 Kcal de PhIP, así como niveles superiores a 24,4 ng/1000 Kcal de MeIQx, en ambos casos cuando proceden de carne roja (Daniel et al., 2012).

A continuación, se expone una tabla en la que se resumen, brevemente, los resultados obtenidos en los estudios revisados.

AÑO DE PUBLICACIÓN	AUTOR	TAMAÑO MUESTRAL	TIEMPO DE INTERVENCIÓN	COMPUESTOS DIETÉTICOS RELACIONADOS CON EL CÁNCER	DOSIS	FUENTE	TIPO DE CÁNCER
2009	Lam et al.	3.976	1 año	PhIP	$\geq 49,8$ ng/día (H) <sup>a</sup> $\geq 36,4$ ng/día (M) <sup>b</sup>	Carne roja	Pulmón
				MeIQx	$\geq 11,9$ ng/día (H) <sup>a</sup> $\geq 9,1$ ng/día (M) <sup>b</sup>		
2009	Tasevska et al.	290.372	1 año	MeIQx	$>4,2$ ng/1000 Kcal (H) <sup>a</sup>	Carne roja y carne procesada	Pulmón
2009	Rohrmann et al.	25.540	1 año	PhIP	$\geq 16,8$ ng/día	Carne roja y carne procesada	Adenomas colorrectales
2010	Cross et al.	300.948	1 año	MeIQx	$\geq 10,3$ ng/1000 Kcal	Carne roja y carne procesada	Colorrectal (colon)
				DiMeIQx	$\geq 0,58$ ng/1000 Kcal		
2010	Ferrucci et al.	300.933	1 año	PhIP	$\geq 10,9$ ng/1000 Kcal	Carne roja	Vejiga
2011	Cross et al.	494.979	1 año	MeIQx	$\geq 25$ ng/1000 Kcal	Carne roja	Adenocarcinoma

								esofágico
2011	Fu et al.	6.307	1 año	PhIP MeIQx DiMeIQx	≥79,4 ng/día ≥13,3 ng/día ≥0,83 ng/día	Carne roja y carne procesada	Adenomas colorrectales	
2011	Major et al.	7.949	1 año	DiMeIQx	≥0,32 ng/1000 Kcal	Carne roja	Próstata	
2012	Daniel et al.	302.162	1 año	PhIP MeIQx	≥10,9 ng/1000 Kcal ≥24,4 ng/1000 Kcal	Carne roja	Renal	
2012	Ferrucci et al.	17.072	1 año	PhIP	≥36,2 ng/día	Carne s.e. <sup>c</sup>	Adenomas colorrectales	
2012	Lin et al.	1.762	1 año	AHC totales MeIQx DiMeIQx PhIP	≥120,32 ng/día ≥5,69 ng/día ≥0,79 ng/día ≥93,72 ng/día	Carne roja	Vejiga	
2013	Helmus et al.	2.707	1 año	PhIP MeIQx DiMeIQx	n.d. <sup>d</sup>	Carne roja	Colon	

2014	Ho et al.	342	1 año	PhIP + polimorfismos en CYP1B1 y en XPD DiMeIQx + polimorfismos en XPD	>232,61 ng/día >4,12 ng/día	Carne s.e. <sup>c</sup>	Adenomas colorrectales
2015	Rohrmann et al.	26.030	1 año	PhIP	≥45 ng/día	Carne roja	Próstata
2015	Budhathoky et al.	1.435	1 año	AHC totales MeIQx	≥36 ng/día (M) <sup>b</sup> ≥2,9 ng/día (M) <sup>b</sup>	Carne procesada	Adenomas colorrectales

Tabla III. Resumen de los estudios revisados sobre aminas heterocíclicas y su asociación con diversos tipos de cáncer. Elaboración propia.

<sup>a</sup>Hombres

<sup>b</sup>Mujeres

<sup>c</sup>Sin especificar

<sup>d</sup>No disponible

### **2.1.3.1. Análisis sobre los niveles de ingesta dietética de riesgo**

#### ***PhIP***

Un total de diez estudios han encontrado una asociación estadísticamente significativa con una ingesta de PhIP derivado de la carne y la probabilidad de desarrollar diferentes tipos de cáncer. La dosis más pequeña que incrementaría el riesgo de desarrollar la enfermedad se ha situado en 16,8 ng/día (Rohrman et al., 2009). Sin embargo, la mayor parte de los estudios analizados han encontrado que para que se incremente el riesgo de desarrollar cáncer asociado a la ingesta de este compuesto es necesario ingerir niveles mayores. En este sentido, se ha encontrado que los niveles de riesgo se encontrarían entre 27,5–79,4 ng/día (Daniel et al., 2012; Ferrucci et al., 2010; Ferrucci et al., 2012; Fu et al., 2014; Lam et al., 2009; Rohrman et al., 2015).

#### ***MeIQx***

En los resultados obtenidos en los diferentes estudios revisados se ha encontrado una gran disparidad en cuanto a los niveles de riesgo de este compuesto derivado, principalmente, del consumo de carne roja y carne procesada y el riesgo de desarrollar cáncer. Los niveles detectados como de riesgo oscilan entre 2,9 ng/día (Budhathoky et al., 2015) y 62,5 ng/día (Cross et al., 2011), por lo que a pesar de existir evidencias sólidas de que la ingesta de este compuesto puede incrementar el riesgo de desarrollar la enfermedad, no ocurre lo mismo para la dosis que incrementaría tal riesgo.

#### ***DiMeIQx***

Cinco estudios han hallado relación entre la ingesta de unos niveles determinados de DiMeIQx, derivados del consumo de carne roja y carne procesada, y la probabilidad de desarrollar cáncer. En tres de los cinco estudios se han detectado dosis de riesgo similares (Fu et al., 2011; Lin et al., 2012; Major et al., 2011), situándose en  $\geq 0,83$  ng/día,  $\geq 0,79$  ng/día y  $\geq 0,8$  ng/día, respectivamente. De esta manera, estos valores podrían tomarse como referencia a la hora de estimar los niveles de ingesta de este compuesto asociados a la probabilidad de desarrollar cáncer.

### **2.1.3.2. Conclusión**

Un total de 15 estudios publicados entre el año 2009 y 2015 han sido incluidos en esta revisión. Éstos cuentan con una muestra que oscila entre los 342 y 494.979 sujetos y presentan un diseño metodológico, o bien caso-control, o bien de cohorte. Excepto

uno de los estudios analizados (Ho et al., 2014), el resto cuentan con una muestra lo suficientemente grande como para estimar que los resultados son representativos. Los resultados indican que una ingesta elevada de AHC derivadas del consumo de carne, principalmente, carne roja (pero también carne procesada) cocinada a alta temperatura puede suponer un factor de riesgo para el desarrollo de diversos tipos de cáncer: colorrectal, gástrico, renal, de próstata, de pulmón, de vejiga; o para el desarrollo de adenomas colorrectales (con potencial canceroso). La asociación de la ingesta de AHC con el riesgo de desarrollar adenomas colorrectales o cáncer colorrectal es la que mayor evidencia científica ha acumulado. Por otra parte, con relación a las diferentes AHC analizadas de forma individual, son PhIP y MeIQx las que más comúnmente se asocian con la probabilidad de desarrollar algún tipo de cáncer (hallándose asociaciones estadísticamente significativas en diez y en nueve de los quince estudios revisados, respectivamente). Para DiMeIQx se han encontrado relaciones significativas con el riesgo de desarrollar cáncer en seis del total de estudios revisados. A su vez, en uno de los estudios revisados se pone de manifiesto una posible susceptibilidad genética, asociada a polimorfismos en CYP1B1 y en XPD, que potenciaría el papel de las AHC presentes en productos cárnicos cocinados a altas temperaturas para desarrollar, en este caso, adenomas colorrectales (Ho et al., 2014).

## **2.2. Genotoxicidad/mutagenicidad en muestras fecales**

A continuación, y debido a que la parte experimental de este TFM tiene como fin evaluar un método para determinar la mutagenicidad de muestras fecales para, en estudios posteriores, poder relacionarla con la ingesta de compuestos carcinogénicos a través de la dieta, se ha realizado una revisión de aquellos estudios, publicados no hace más de 10 años, que relacionan el grado de genotoxicidad/mutagenicidad fecal con la ingesta dietética.

En 2009 se llevó a cabo un estudio en el que se comparó los efectos producidos por una dieta basada en carne roja y una dieta basada en carne procesada, en sujetos institucionalizados, con respecto a seguir una dieta vegetariana, a través del análisis de muestras fecales. Se contó con 16 sujetos a los que se les suministró una dieta de carne roja (5 hombres y 11 mujeres) y con 12 sujetos a los que se les suministró una dieta de carne procesada (6 hombres y 6 mujeres). En ambos grupos se suministró una cantidad de carne idéntica por día (420 g. a hombres y 366 g. a mujeres). Se encontró una cantidad de nitrosocompuestos significativamente mayor en los sujetos que siguieron

dietas cárnicas (similares en dietas de carne roja y carne procesada) que en los sujetos vegetarianos; estos últimos mostraron bajos niveles de estos compuestos. Estos aspectos se han relacionado con el mayor o menor riesgo de padecer cáncer de colon (Joosen et al., 2009).

Un estudio publicado en el 2011 analizó los efectos de la dieta (asociada a la ingesta de AHC) sobre la mutagenicidad fecal y la genotoxicidad en células rectales y su posible relación con el cáncer colorrectal. Para ello, se llevó a cabo el Test de Ames por el método de incorporación en placa, para analizar la mutagenicidad, y el ensayo Cometa, para analizar la genotoxicidad de las células rectales. Se contó con una muestra de 16 sujetos voluntarios sanos (8 hombres y 8 mujeres) a los que se dividió en dos grupos (grupo A y grupo B) de 8 sujetos (4 hombres y 4 mujeres) en cada uno. A su vez, los sujetos de cada uno de los grupos (grupo A y B) fueron divididos en otros dos grupos de forma aleatoria (grupo A1 y A2; y grupo B1 y B2). Los sujetos del grupo A fueron asignados aleatoriamente (2 hombres y 2 mujeres), o bien a una dieta que contenía carne (de res o salchichas) cocinada a baja temperatura (100 °C) (grupo A1), o bien que contenía esa misma carne cocinada a alta temperatura (250 °C) (grupo A2), durante 2 semanas. A los sujetos del otro grupo se les asignó aleatoriamente a regímenes que contenían carne (de res o salchichas) cocinada a alta temperatura (250 °C) (grupo B1) o a una dieta que combinaba esa misma carne cocinada a alta temperatura (250 °C) con verduras crucíferas, tabletas de clorofila y yogur (tres inhibidores de la acción mutagénica) (grupo B2). Los sujetos que consumieron carne cocinada a baja temperatura presentaron niveles indetectables de mutagenicidad en heces, mientras que los sujetos que consumieron carne cocinada a alta temperatura presentaron elevados niveles de mutagenicidad en heces. La dieta combinada con inhibidores de la acción mutagénica disminuyó significativamente la mutagenicidad fecal y disminuyó, casi el doble, el daño del ADN en las células colorrectales diana de las AHC (Shaughnessy et al., 2011).

Un reciente estudio, publicado este mismo año, examinó la relación entre la ingesta dietética, la composición bacteriana intestinal y la genotoxicidad fecal. Se contó con 29 voluntarios sanos, de los cuales 12 seguían una dieta ovolactovegetariana (3 hombres y 9 mujeres), 10 seguían una dieta vegana (7 hombres y 3 mujeres) y 7 seguían una dieta omnívora (4 hombres y 3 mujeres); en todos los casos durante, al menos, un año. Se registró la ingesta dietética diaria (comidas y bebidas) de cada uno de los sujetos

durante 7 días. Se observaron algunas diferencias significativas entre los hábitos alimenticios y la composición bacteriana en cuanto a anaerobios totales, estafilococos y corinebacterias. La cantidad de anaerobios totales en ovolactovegetarianos fue significativamente menor en comparación con la de los veganos y omnívoros. De forma similar, los recuentos poblacionales de corinebacterias y estafilococos en el grupo de omnívoros fueron más altos que los de los otros grupos. Además, especialmente en los veganos, pero también en el grupo de ovolactovegetarianos, se encontraron mayores niveles de los enterotipos *Bacteroides* y *Prevotella* en comparación con los observados en los omnívoros. En cuanto a la genotoxicidad fecal, analizada a través del ensayo Cometa, la detectada en los sujetos ovolactovegetarianos fue significativamente menor que la de los omnívoros y veganos. Aunque tanto la dieta ovolactovegetariana como la vegana redujeron los niveles de genotoxicidad fecal en comparación con la dieta omnívora, solo la ovolactovegetariana demostró un impacto significativo. Este estudio muestra como los factores dietéticos influyen sobre el ecosistema intestinal, modulando, así, la genotoxicidad fecal. A su vez, en el estudio se pone de manifiesto como los hábitos dietéticos pueden suponer un factor de protección o riesgo frente a la aparición de enfermedades intestinales como, por ejemplo, el cáncer colorrectal (Federici et al., 2017).

En la revisión realizada solo se han encontrado tres estudios, publicados entre el año 2009 y 2017, que analicen la influencia de la dieta sobre la genotoxicidad/mutagenicidad fecal. Todos ellos cuentan con una muestra pequeña que se encuentra entre 16 y 29 sujetos. Dos de los estudios revisados se tratan de ensayos clínicos controlados aleatorizados, mientras que uno de ellos presenta un diseño cuasiexperimental. Los resultados observados en estos estudios ponen de manifiesto como la dieta influye sobre el ecosistema bacteriano intestinal y sobre la genotoxicidad/mutagenicidad fecal, asociándose estos aspectos con el riesgo de desarrollar cáncer, principalmente, colorrectal. Se observa cómo un consumo frecuente de carne (principalmente roja o procesada) repercute en los niveles de mutágenos presentes en las heces, sobre todo cuando ésta está cocinada a alta temperatura. A su vez, un consumo frecuente de verduras ayudaría a reducir los niveles de mutagenicidad fecal. Estos estudios ponen de manifiesto cómo los métodos de detección de genotoxicidad/mutagenicidad fecal pueden resultar de gran utilidad a la hora de encontrar biomarcadores (genotoxicidad y/o mutagenicidad) sobre la exposición de las

personas a los compuestos carcinogénicos de la dieta, reflejando un mayor o un menor riesgo individual de desarrollar diferentes enfermedades no heredables como, por ejemplo, el cáncer. Estos datos sirven como punto de partida para la realización del experimento que se ha llevado a cabo.

### **2.3. Test de Ames para la detección de mutagenicidad en heces**

Con el fin de poner a punto un método que permita determinar de forma rápida y sencilla, el grado de mutagenicidad presente en heces y correlacionar, posteriormente, esta información con la ingesta dietética, se evaluó la aplicabilidad del Kit Muta-ChromoPlate para este fin. El Kit Muta-ChromoPlate es un método ampliamente empleado para la detección de la actividad mutagénica y materiales mutagénicos en aguas, sedimentos, aire, químicos, componentes de alimentos, cosméticos y fluidos biológicos. El Kit se basa en la prueba de mutación reversa bacteriana más utilizada y validada, conocida como Test de Ames (Manual de instrucciones del Kit Muta-ChromoPlate). La prueba emplea una cepa mutante de *Salmonella typhimurium*, construida por ingeniería genética, que lleva mutación en el operón que codifica para la biosíntesis de histidina (Sandoval Villasana, 2008). Cuando estas bacterias se exponen a agentes mutagénicos bajo ciertas condiciones, se produce una mutación inversa de la auxotrofia del aminoácido histidina a prototrofia. Es decir, las bacterias pasan de necesitar un medio que contenga este aminoácido para crecer a poder sintetizarlo ellas mismas de manera intrínseca (Manual de instrucciones del Kit Muta-ChromoPlate). Por tanto, esta prueba es capaz de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura (*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN (Sandoval Villasana, 2008).

El Kit Muta-ChromoPlate se trata de una prueba de fluctuación, ya que se realiza completamente en cultivo líquido. Este tipo de prueba fue ideada por primera vez por Luria y Delbruck en 1943 y, posteriormente, fue modificada por Hubbard et al. en 1984; suponiendo un avance con respecto a la prueba de incorporación en placa o “agar-overlay”, usada tradicionalmente para llevar a cabo ensayos de mutación reversa bacteriana en placas de agar.

Las ventajas que presenta este Kit son las siguientes (Manual de instrucciones del Kit Muta-ChromoPlate):

- Presenta una elevada sensibilidad para la detección de bajos niveles de agentes mutagénicos.
- Se pueden obtener resultados positivos, posteriormente analizables, a partir de la reversión mutagénica a la prototrofia de una sola bacteria auxotrófica.
- La concentración del agente mutagénico permanece constante durante la fase de crecimiento auxotrófico. Esto es importante ya que hay determinados componentes que son mutagénicos solamente a determinadas concentraciones.
- Esta prueba solo es llevada a cabo en una única fase líquida. De esta manera, los componentes solubles del sistema de metabolización no difundirán y, por lo tanto, no se verá afectada la detección de ciertos compuestos.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Revisión bibliográfica**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos de estudios publicados desde el año 2007 hasta la actualidad en las bases de datos PubMed y Google Académico. Se han realizado búsquedas utilizando combinaciones de los siguientes términos: “nitrite”, “nitrate”, “nitrosamine”, “polycyclic aromatic hydrocarbons”, “heterocyclic amines”, “PAH”, “HCA”, “benzo (a) pyrene”, “PhIP”, “MeIQx”, “DiMeIQx”, “diet”, “intake”, “cáncer”, “genotoxicity”, “mutagenicity”, “fecal” y “fecal water”. La búsqueda se ha limitado a estudios llevados a cabo con seres humanos y con acceso libre. Se han encontrado un total de 784 artículos, de los cuáles 41 cumplían los criterios de inclusión comentados anteriormente con el fin de, por un lado, analizar la posible relación entre la ingesta de diferentes compuestos mutagénicos y el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer y, por otro lado, analizar el posible efecto de la ingesta de diversos compuestos mutagénicos sobre los niveles de genotoxicidad/mutagenicidad fecal.

En cuanto al diseño metodológico de los artículos encontrados, éstos se tratan, o bien de estudios de seguimiento de cohortes, o bien de estudios caso-control. Se han encontrado dos estudios experimentales controlados aleatorizados y un estudio cuasiexperimental. Algunos de los estudios de seguimiento de cohortes emplean los datos existentes de cohortes de pacientes en diferentes bases de datos a las que han tenido acceso.

#### **3.2. Experimento**

Se ha evaluado la aplicabilidad del Test de Ames para determinar el grado de mutagenicidad presente en las aguas fecales de una muestra de 17 ancianos (5 hombres y 12 mujeres) mayores de 75 años, institucionalizados. Como se ha indicado anteriormente, se trata de un bioensayo de fluctuación denominado Test de Ames (véase en apartado de consideraciones teóricas y/o experimentales).

Para la realización de este bioensayo se ha hecho uso del Kit Muta-ChromoPlate, que incluye: siete reactivos (una unidad de 22 ml de concentrado de sales de Davis-Mingoli, una unidad de 5 ml de D-glucosa, una unidad 2,5 ml de bromocresol púrpura, una unidad de 1,5 ml de D- Biotina, una unidad de 100 µl de L-Histidina, una unidad de 5 ml de medio de crecimiento y dos unidades de 120 ml de agua destilada estéril), la cepa liofilizada *Salmonella typhimurium* TA100, el mutágeno estándar NaN<sub>3</sub>,

microplacas estériles con tapas, botes reactivos de pipeta multicanal estériles, tubos Falcon de 50 ml estériles y bolsas con cremallera donde se introducirán las microplacas una vez realizada la prueba para que su contenido no se evapore. Es preciso mencionar que los reactivos han de mantenerse refrigerados a una temperatura de 4 °C, mientras que el estándar mutagénico y las bacterias liofilizadas han de mantenerse congeladas a una temperatura de -20°C.



Figura I. Kit MutaChromoPlate. Tomada de la Guía para el usuario del Kit Muta-ChromoPlate.

Tras la llegada de las muestras fecales, se pesaron, se diluyeron 1/10 (peso/volumen) en tampón PBS y se homogeneizaron en stomacker durante 3 minutos a velocidad máxima. Después se congelaron hasta su posterior procesamiento y análisis.

Antes de realizar el bioensayo, debido a que las muestras presentan sólidos en suspensión y microorganismos, se ha llevado a cabo la filtración de las mismas para la obtención de los sobrenadantes fecales (aguas fecales) a partir de los cuales se realizará la prueba. En primer lugar, los tubos Falcon con los homogenizados de las muestras fecales, que estaban congelados, se han dejado a temperatura ambiente para su descongelación y, así, poder proceder a su filtración. Una vez descongelados, se pesaron, ya que es necesario que los pesos de los tubos estén equilibrados para su posterior centrifugado, que se llevó a cabo a 4 °C y 11.500 rpm durante 10 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se extrajeron los sobrenadantes con una pipeta y se depositaron en unos nuevos tubos Falcon. A continuación, se llevó a cabo una segunda

centrifugación de los tubos que contenían los sobrenadantes fecales que se extrajeron tras la primera, en las mismas condiciones (a 4 °C y 11.500 rpm durante 10 minutos). Se procedió, de nuevo, a la extracción del sobrenadante resultante y su deposición en unos nuevos tubos. Por último, se ha llevado a cabo la filtración de estos sobrenadantes utilizando una jeringuilla de 1 ml y un filtro no estéril de 0,2 µm. Se ha requerido de un tiempo de 5 días para llevar a cabo el filtrado de las muestras debido a la dificultad que presentaban las mismas para atravesar el filtro, teniendo que filtrar de 150 en 150 µl y, en ocasiones, de 100 en 100 µl.

Para poder llevar a cabo el bioensayo ha sido preciso, por un lado, esterilizar agua Milli-Q en un autoclave y, por otro lado, rehidratar las bacterias liofilizadas la noche previa. Para llevar a cabo la rehidratación se ha transferido de forma aséptica el medio de crecimiento al vial de las bacterias, mezclándose, y una vez hecho esto se procedió a su incubación a 37°C durante la noche. Justo antes de llevar a cabo el bioensayo se comprobó que había turbidez en el vial bacteriano, aspecto que demuestra la existencia de crecimiento bacteriano.

El bioensayo se ha realizado en dos ocasiones siguiendo el protocolo del Kit básico Muta-ChromoPlate. A continuación, se describe el procedimiento llevado a cabo para realizar ambos bioensayos.

### **3.2.1. Bioensayo I**

Para la realización del primer bioensayo se ha contado con 8 muestras (3 hombres y 5 mujeres). Éstas se seleccionaron teniendo en cuenta que había una cantidad de sobrenadante fecal suficiente para realizar la prueba.

En primer lugar, se ha llevado a cabo una dilución del 56% en agua Milli-Q estéril del sobrenadante fecal. Para ello, se han añadido con una pipeta serológica 5 ml de agua Milli-Q estéril en cada uno de los tubos Falcon rotulados con el número de la muestra correspondiente. A continuación, se añaden 4 ml de cada uno de los sobrenadantes fecales previamente agitados en un vórtex.

Posteriormente, se ha procedido a preparar el Mix de reacción en un tubo Falcon de 50 ml. Primero, se han mezclado 10,81 ml del concentrado de sales Davis-Mingoli, 2,375 ml de D-glucosa, 1,19 ml de Bromocresol púrpura, 595 µl de D-Biotina y 30 µl L-Histidina. Una vez preparada la mezcla, se agitó con un vórtex. Después, se ha introducido en 11 tubos Falcon (8 para las muestras, 1 para el control positivo, 1 para el

control negativo y 1 para el control de mutagénesis espontánea o “Background”) una preparación de:

- 1,25 ml de Mix de reacción, 8,75 ml de la dilución del sobrenadante fecal y 2,5 µl de *Salmonella typhimurium*; para los 8 tubos de las muestras.
- 1,25 ml de Mix de reacción, 8,65 ml de agua Milli-Q estéril, 0,1 ml del estándar mutagénico y 2,5 µl de *Salmonella typhimurium*; para el tubo del control positivo.
- 1,25 ml del Mix de reacción y 8,75 ml del agua Milli-Q estéril; para el tubo del control negativo.
- 1,25 ml del Mix de reacción, 8,75 ml del agua Milli-Q estéril y 2,5 µl de *Salmonella typhimurium*; para el tubo del control de mutagénesis espontánea o “Background”.

<b>Control positivo</b>	<b>Control negativo</b>	<b>Background</b>	<b>Mezcla con sobrenadante</b>
1,25 ml Mix + 8,65 ml Agua Milli-Q estéril + 2,5 µl Bacteria + 0,1 ml Mutágeno (NaN <sub>3</sub> )	1,25 ml Mix + 8,75 ml Agua Milli-Q	1,25 ml Mix + 8,75 ml Agua Milli-Q estéril + 2,5 µl Bacteria	1,25 ml Mix + 8,75 ml Sobrenadante fecal diluido + 2,5 µl Bacteria

Tabla IV. Resumen de las preparaciones del bioensayo I. Elaboración propia.

Seguidamente, se vierte el contenido de cada uno de los tubos que contiene el material a ensayar (mezcla) en un recipiente de reactivo de pipeta multicanal estéril, excepto el del control negativo que se deja en el tubo. A continuación, se alicuotan 200 µl de cada una de las mezclas en 48 pocillos de una microplaca estéril que consta de 96, utilizando una pipeta multicanal. De esta manera, por cada mezcla se usa la mitad de la microplaca, requiriéndose, así, del uso de 5 de ellas. Tras esto, se cubren las placas con

una tapa y se sellan en bolsas de plástico herméticas estériles para evitar la evaporación de su contenido y, finalmente, se dejan incubando a 37 °C durante 5 días para la observación de resultados.

### **3.2.2. Bioensayo II**

El segundo bioensayo se ha llevado a cabo con 9 muestras (2 hombres y 7 mujeres). Éstas se seleccionaron teniendo en cuenta que había una cantidad de sobrenadante fecal suficiente para realizar la prueba.

En este bioensayo se realizó una dilución del sobrenadante fecal del 90%. Se han preparado 11 tubos Falcon y se han rotulado adecuadamente (9 para las muestras, 1 para el control negativo y 1 para el control de mutagénesis espontánea “Background”). No ha sido necesario preparar de nuevo un control positivo, ya que éste nos sirvió para conocer si el Kit que estábamos usando funcionaba adecuadamente, y tras haber realizado el primer bioensayo se pudo comprobar que así era. A continuación, se añadió a cada tubo 7,75 ml de agua Milli-Q estéril. Posteriormente, se preparó el Mix de reacción en un tubo Falcon de 50 ml utilizando los mismos reactivos y cantidades que para la realización del bioensayo I. Luego, se añadieron 1,25 ml del Mix a cada uno de los tubos Falcon que ya contenían los 7,75 ml de agua Milli-Q estéril. A continuación, se añadió a cada uno de los tubos, exceptuando el del control negativo y el de mutagénesis espontánea, 1 ml del sobrenadante fecal. A los tubos de control negativo y mutagénesis espontánea se les añadió 1 ml más de agua Milli-Q estéril. Por lo tanto, las mezclas preparadas fueron las siguientes:

- 1,25 ml de Mix de reacción, 7,75 ml de agua Milli-Q estéril, 1 ml de sobrenadante fecal y 2,5 µl de *Salmonella typhimurium*; para los 9 tubos de las muestras.
  
- 1,25 ml de Mix de reacción y 8,75 ml de agua Milli-Q estéril; para el tubo del control negativo.
  
- 1,25 ml de Mix de reacción, 8,75 ml de agua Milli-Q y 2,5 µl de *Salmonella typhimurium*; para el tubo de mutagénesis espontánea o “Background”.

Control negativo	Background	Mezcla con sobrenadante
1,25 ml Mix + 8,75 ml Agua Milli-Q	1,25 ml Mix + 8,75 ml Agua Milli-Q estéril + 2,5 µl Bacteria	1,25 ml Mix + 1 ml Sobrenadante fecal + 7,75 ml Agua Milli-Q estéril + 2,5 µl Bacteria

Tabla V. Resumen de las preparaciones del bioensayo II. Elaboración propia.

En este bioensayo, la dilución del sobrenadante fecal es mayor que en la del bioensayo I, siendo ésta del 90% frente al 56% del bioensayo anterior. Tras la preparación de las distintas mezclas se sigue exactamente el mismo procedimiento que en el bioensayo I.

### 3.3. Interpretación de los resultados

Las placas se puntúan visualmente. Los pocillos amarillos y parcialmente amarillos se puntúan como positivos (existe crecimiento de *Salmonella typhimurium*), mientras que los pocillos morados o púrpura se puntúan como negativos (no existe crecimiento de *Salmonella typhimurium*).

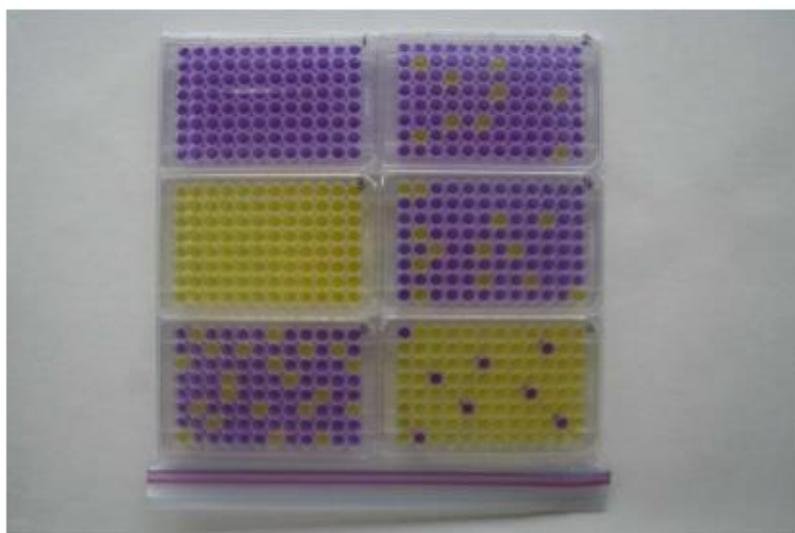


Figura II. Ejemplo de posibles resultados obtenidos a través del Kit Muta-ChromoPlate. Tomada de la Guía para el usuario del Kit Muta-ChromoPlate.

Para que este bioensayo sea viable, en el control de mutagénesis espontánea no han de virar de color púrpura a color amarillo más de 15 pocillos de los 48. En el control positivo ha de haber 25 o más pocillos de color amarillo.

Para analizar los resultados obtenidos en el bioensayo se emplea una tabla presente en el manual del Kit Muta-ChromoPlate en la que se refleja la significación estadística de las diferencias encontradas entre el número de pocillos positivos en la placa del control de mutagénesis espontánea y en las placas que contienen las mezclas con las muestras fecales. Estas diferencias serán las que permitirán determinar el grado de mutagenicidad.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en el bioensayo I en relación a las muestras analizadas y al control de mutagénesis espontánea, ya que las diferencias entre ambos permitirán determinar la significación sobre el nivel de mutagenicidad de las muestras fecales (Tabla VI). Se muestran los resultados obtenidos tras 24 horas.

MUESTRAS	CRECIMIENTO
Mutagenicidad espontánea	0/48
Muestra 1	48/48
Muestra 2	48/48
Muestra 3	48/48
Muestra 4	48/48
Muestra 5	48/48
Muestra 6	48/48
Muestra 7	48/48
Muestra 8	48/48

Tabla VI. Resultados en el bioensayo I tras 24 horas. Elaboración propia.

Estos resultados pueden observarse en la foto que se refleja a continuación. En ella se observa lo ocurrido en los pocillos con las muestras, con el control de mutagénesis espontánea y con el control positivo tras las primeras 24 horas.



Figura III. Resultados del bioensayo I tras 24 horas. Elaboración propia.

Aunque las lecturas finales deben hacerse tras 5 días, se puede observar que tan sólo 24 horas después de haber llevado a cabo el bioensayo, los 48 pocillos de todas las placas que contenían la mezcla con el sobrenadante fecal (con nuestra muestra) viraron del color púrpura al color amarillo. Los 48 pocillos del control positivo y del control de mutagénesis espontánea permanecían de color púrpura.

A continuación, se pueden observar los resultados obtenidos tras los 5 días de realización del bioensayo.

MUESTRAS	CRECIMIENTO
Mutagenicidad espontánea	15/48
Muestra 1	48/48
Muestra 2	48/48
Muestra 3	48/48
Muestra 4	48/48
Muestra 5	48/48

Muestra 6	48/48
Muestra 7	48/48
Muestra 8	48/48

Tabla VII. Resultados en el bioensayo I tras 5 días. Elaboración propia.

Los resultados obtenidos tras los 5 días en el control negativo, en el control positivo (no especificados en la tabla) y en el control de mutagénesis espontánea permitieron determinar la validez de la prueba. El tubo de ensayo del control negativo no viró a color amarillo, 48/48 pocillos del control positivo viraron de púrpura a amarillo, y 15/48 pocillos del control de mutagénesis espontánea viraron a color amarillo. Estos resultados indican la validez del funcionamiento del Kit.

Los resultados obtenidos tras los 5 días, y acudiendo a la tabla de interpretación de resultados presente en el manual del Kit, indican que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,001$ ) para el número de pocillos positivos de las mezclas con sobrenadante fecal con respecto al número de pocillos positivos del control de mutagénesis espontánea. Así, se podría determinar que en las muestras existe una gran cantidad de mutágenos. Sin embargo, el hecho de que todos los pocillos de las muestras hubieran virado de color antes que el propio control positivo y tan sólo pasadas 24 horas de la realización del bioensayo, nos hizo plantearnos dos hipótesis: (1) el sobrenadante fecal filtrado no es estéril o (2) los propios sobrenadantes fecales contienen el aminoácido histidina, siendo éste el causante de este crecimiento bacteriano tan elevado. Se descartó la posibilidad de que los resultados fueran consecuencia de la presencia de mutágenos en las muestras debido a que el nivel de crecimiento bacteriano observado y la rapidez con la que éste se produjo, implicaría una toxicidad fecal desorbitada y fuera de lo normal.

Para probar la primera de las hipótesis planteadas, se prepararon dos tubos con 4 ml de control negativo cada uno a los que se les inoculó sobrenadante fecal al 5% (200  $\mu$ l) y al 10% (400  $\mu$ l), respectivamente. Se dejaron incubando a 37 °C y, tras 24 horas, se pudo comprobar que el color de los tubos no viró al color amarillo, lo que demuestra que no existe crecimiento bacteriano de ningún tipo. Por tanto, se descartó la hipótesis de que nuestros sobrenadantes fecales pudiesen estar contaminados.

Por todo ello, la hipótesis más plausible a la hora de explicar lo ocurrido sería la de que los sobrenadantes fecales contienen el aminoácido histidina. Por ello, se ha llevado a cabo un segundo bioensayo, anteriormente descrito, en el cual se ha realizado una mayor dilución de los sobrenadantes (90%) con el fin de inhibir el efecto de la histidina y poder llegar a obtener, así, algún resultado destacable. Tras la observación de los pocillos de las muestras después de 24 horas, se detectó crecimiento total en dos de las nueve muestras (muestras 3 y 8). Los resultados obtenidos, observados al quinto día después de haber realizado el bioensayo, se presentan a continuación.

<b>MUESTRAS</b>	<b>CRECIMIENTO</b>
Mutagenicidad espontánea	7/48
Muestra 1	48/48
Muestra 2	48/48
Muestra 3	48/48
Muestra 4	48/48
Muestra 5	23/48
Muestra 6	48/48
Muestra 7	19/48
Muestra 8	48/48
Muestra 9	22/48

Tabla VIII. Resultados en el bioensayo II tras 5 días. Elaboración propia.

Se observa crecimiento total (48/48 pocillos) en seis de las nueve mezclas que contienen el sobrenadante fecal. En las tres muestras restantes (muestras 5, 7 y 9) se observa crecimiento en 23, 19 y 22 de 48 pocillos, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,001$ )

para el número de pocillos positivos de las mezclas con sobrenadante fecal con respecto al número de pocillos positivos del control de mutagénesis espontánea. Se podría determinar, por tanto, que en las muestras existe una gran cantidad de mutágenos. Sin embargo, y teniendo en cuenta la hipótesis planteada para explicar los resultados obtenidos en el bioensayo I, podemos determinar que, aunque hayamos diluido hasta un 90% el sobrenadante fecal, no conseguimos inhibir el efecto de la histidina y los resultados pueden explicarse por su acción.

El elevado crecimiento bacteriano (*Salmonella typhimurium*) observado en las mezclas con sobrenadante fecal y la rapidez con la que éste se ha producido, hacen pensar que los resultados sean atribuibles a la presencia de histidina y no a una sobredimensionada toxicidad fecal, y más tratándose de muestras de sujetos mayores de 75 años. Esto es coherente con el planteamiento de que la histidina puede causar resultados falsos positivos en pruebas para determinar mutagenicidad fecal en heces (Silverman, Turnell, Youngs y Keighley, 1989). Por ello, en relación al objetivo planteado a la hora de llevar a cabo este estudio, es decir, evaluar la aplicabilidad del Test de Ames (fluctuación) para la detección del nivel de compuestos mutagénicos en heces, no se ha podido determinar que esta prueba sea válida para la determinación de biomarcadores fecales de la exposición del ser humano a diversos compuestos carcinogénicos provenientes de la dieta, debido a la aceptación de la hipótesis que implica la presencia de histidina en las muestras analizadas.

Sin embargo, otros estudios revisados (Federici et al., 2017; Joosen et al., 2009; Shaughnessy et al., 2011) ponen de manifiesto cómo los hábitos dietéticos repercuten directamente sobre la mutagenicidad y la genotoxicidad fecal, aumentándolas o disminuyéndolas. A pesar de que Shaughnessy et al. (2011) han podido detectar mutagenicidad en muestras fecales y relacionarla con la ingesta dietética, los resultados que hemos obtenido ponen de manifiesto que la presencia de histidina puede influir sobre los resultados, por lo que, desde nuestro punto de vista, parece coherente pensar que el ensayo Cometa (para analizar genotoxicidad fecal) sería el más conveniente para detectar los efectos de estos compuestos (ingeridos a través de la dieta) en muestras fecales. No obstante, la escasa evidencia científica hace necesario llevar a cabo más estudios en esta línea. En este caso, no hemos podido determinar que el Test de Ames sea un método de elección a la hora de determinar la mutagenicidad fecal.

En la literatura revisada se pueden observar evidencias sólidas que apoyan la hipótesis planteada en el presente trabajo referida a que la ingesta dietética de diferentes compuestos con actividad carcinogénica está asociada a un incremento en la toxicidad fecal y, a su vez, puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer a través de diversas vías. Se ha mostrado como la dieta y, con ello, los compuestos presentes en la misma (principalmente en la carne roja y en la carne procesada) pueden incrementar el riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer. De esta manera, es necesario seguir trabajando en futuros estudios que permitan determinar biomarcadores de la ingesta dietética de compuestos potencialmente carcinogénicos.

## **5. LIMITACIONES**

El Test de Ames no ha servido como método de detección de mutagenicidad en muestras fecales debido a que la presencia de histidina en las muestras puede dar lugar a falsos positivos, tal y como ha sucedido en el experimento que se ha llevado a cabo.

## **6. CONCLUSIONES**

- 1) No se ha podido validar el Test de Ames (realizado empleando el Kit Muta-ChromoPlate) como metodología para detectar biomarcadores fecales (mutagenicidad fecal) de exposición a compuestos mutagénicos ingeridos a través de la dieta.
- 2) La histidina puede dar lugar a resultados falsos positivos en el Test de Ames.
- 3) Los datos parecen indicar que el ensayo Cometa es la prueba más adecuada para determinar la toxicidad en muestras fecales.
- 4) Los estudios que evalúan la toxicidad fecal son escasos. Sería necesario llevar a cabo más estudios que permitan establecer una metodología fiable para determinar la toxicidad en muestras fecales de forma rápida y sencilla.

## ABREVIATURAS

AHC	Aminas heterocíclicas
BaP	Benzo(a)pireno
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina
g	Gramos
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Kcal	Kilocalorías
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina
mg	Miligramos
NA	Nitrosaminas
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
n.d.	No disponible
ng	Nanogramos
NMDA	N-nitrosodimetilamina
NPYR	N-nitrosopirrolidina
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina
ROS	Especies de oxígeno reactivo
s.e.	Sin especificar
μg	Microgramos

## REFERENCIAS

- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (2007). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura. Recuperado de: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/NITROSAMINAS\\_P.CARNICOS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/NITROSAMINAS_P.CARNICOS.pdf).
- Agudo, A. y González, C. A. (2002). Potenciales cancerígenos de la dieta y riesgo de cáncer. *Medicina Clínica*, 119(15), 579-89.
- Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghoul, S., Sawaya, W., Ahmed, N. y Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22, 2028-2035.
- Antón, A. y Lizaso, J. (2001). Nitratos, nitritos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Recuperado de: [http://www.proyectorpandora.es/wp-content/uploads/Bibliografia/13181019\\_nitritos\\_nitratos.pdf](http://www.proyectorpandora.es/wp-content/uploads/Bibliografia/13181019_nitritos_nitratos.pdf).
- Budhathoki, S., Iwasaki, M., Yamaji, T., Sasazuki, S., Takachi, R., Sakamoto, H., Yoshida, T. y Tsugane, S. (2015). Dietary Heterocyclic Amine Intake, NAT2 Genetic Polymorphism, and Colorectal Adenoma Risk: The Colorectal Adenoma Study in Tokyo. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 24(3), 613-620.
- Catsburg, C. E., Gago-Dominguez, M., Yuan, J., Castela, J. E., Cortessis, V. K., Pike, M. C. y Stern, M. C. (2014). Dietary sources of N-nitroso compounds and bladder cancer risk: Findings from the Los Angeles bladder cancer study. *International Journal of Cancer*, 134, 125-135.
- Chiavarini, M., Bertarelli, G., Minelli, L., y Fabiani, R. (2017). Dietary Intake of Meat Cooking-Related Mutagens (HCAs) and Risk of Colorectal Adenoma and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 9(5), 514-536.

- Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W. y Cotte, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes*, 3(3), 186-202.
- Cross, A. J., Ferrucci, L. M., Risch, A., Graubard, B. I., Ward, M. H., Park, Y., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., y Sinha, R. (2009). A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Research*, 70(6), 2406-2414.
- Cross, A. J., Freedman, N. D., Ren, J., Ward, M. H., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., Sinha, R. y Abnet, C. C. (2011). Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(3), 432-442.
- Daniel, C. R., Cross, A. J., Graubard, B. I., Park, Y., Ward, M. H., Rothman, N., Hollenbeck, A. R., Chow, W. y Sinha, R. (2012). Large prospective investigation of meat intake, related mutagens, and risk of renal cell carcinoma. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95, 155-162.
- Daniel, C. R., Schwartz, K. L., Colt, J. S., Dong, L. M., Ruterbusch, J. J., Purduel, M. P., Cross, A. J., Rothman, N., Davis, F. G., Wacholder, S., Graubard, B. I., Chow, W. H. y Sinha, R. (2011). Meat-cooking mutagens and risk of renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 105, 1096-1104.
- DellaValle, C. T., Daniel, C. R., Kilfoy, B. A., Hollenbeck, A. R., Cross, A. J., Sinha, R. y Ward, M. H. (2013). Dietary intake of nitrate and nitrite and risk of renal cell carcinoma in the NIH-AARP Diet and Health Study. *British Journal of Cancer*, 108, 205-212.
- DellaValle, C. T., Xiao, Q., Yang, G., Shu, X. O., Kilfoy, B. A., Zheng, W., Li, H. L., Ji, B., Rothman, N., Chow, W., Gao, Y. y Ward, M. H. (2014). Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer*, 134(12), 2917-2926.
- Doll, R. y Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66, 1191-1308.

- Federici, E., Prete, R., Lazzi, C., Pellegrini, N., Moretti, M., Corsetti A. y Cenci, G. (2017). Bacterial Composition, Genotoxicity, and Cytotoxicity of Fecal Samples from Individuals Consuming Omnivorous or Vegetarian Diets. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00300.
- Ferrucci, L. M., Sinha, R., Huang, W., Berndt, S. I., Katki, H. A., Schoen, R. E., Hayes, R. B. y Cross, A. J. (2012). Meat consumption and the risk of incident distal colon and rectal adenoma. *British Journal of Cancer*, 106, 608-616.
- Ferrucci, L. M., Sinha, R., Ward, M. H., Graubard, B. I., Hollenbeck, A. R., Kilfoy, B. A., Schatzkin, A., Michaud, D. S. y Cross, A. J. (2010). Meat and components of meat and the risk of bladder cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer*, 116(18), 4345-4353.
- Flores-Balcázar, C., Rosales-Pérez, S., Caro-Sánchez, C. H. S., Gallardo-Alvarado, L. y Gordillo-Bastidas, D. (2015). *iMedPub Journals*, 11(1:4). doi: 10.3823/1237.
- Fu, Z., Shrubsole, M. J., Smalley, W. E., Wu, H., Chen, Z., Shyr, Y., Ness, R. M. y Zheng, W. (2011). Association of meat intake and meat-derived mutagen exposure with the risk of colorectal polyps by histologic type. *Cancer Prevention Research*, 4(10), 1686-1697.
- Galceran, M. T. (2001). Aminas heterocíclicas en alimentos cocinados. *En V Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de: [http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista\\_marzo\\_02/VCongreso\\_publicaciones/Conferencias/Aminas.pdf](http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_marzo_02/VCongreso_publicaciones/Conferencias/Aminas.pdf).
- Gratz, S. W., Wallace, R. J. y El-Nezami, H. S. (2011). Recent perspectives on the relations between fecal mutagenicity, genotoxicity, and diet. *Frontiers in Pharmacology*, 2. doi: 10.3389/fphar.2011.00004.
- Helmus, D. S., Thompson, C. L., Zelenskiy, S., Tucker, T. C. y Li, L. (2013). Red meat-derived heterocyclic amines increase risk of colon cancer: a population-based case-control study. *Nutrition and Cancer*, 65(8), 1141-1150.
- Hernández, M. y Bardesi, P. (2013). El microbioma humano: tres enterotipos y un sistema complejo. *Reduca. Serie Congresos Alumnos*, 4(10), 30-35.

- Hernández-Ramírez, R. U., Galván-Portillo, M. V., Ward, M. H., Agudo, A., González, C. A., Oñate-Ocaña, L. F., Herrera-Goepfert, R., Palma-Coca, O. y López-Carrillo, L. (2008). Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *International Journal of Cancer*, 125(6), 1424-1430.
- Ho, V., Peacock, S., Massey, T. E., Ashbury, J. E., Vanner, S. J. y King, W. D. (2014). Meat-derived carcinogens, genetic susceptibility and colorectal adenoma risk. *Genes and Nutrition*, 9, 430-442.
- Hullar, M. A., Burnett-Hartman, A. N. y Lampe, J. W. (2014). Gut Microbes, Diet, and Cancer. *Cancer Treatment and Research*, 159, 377-399.
- Inoue-Choi, M., Jones, R. R., Anderson, K. E., Cantor, K. P., Cerhan, J. R., Krasner, S., Robien, K., Weyer, P. J. y Ward, M. H. (2015). Nitrate and nitrite ingestion and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in Iowa. *International Journal of Cancer*, 137(1), 173-182.
- Inoue-Choi, M., Sinha, R., Gierach, G. L. y Ward, M. H. (2016). Red and processed meat, nitrite, and heme iron intakes and postmenopausal breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *International Journal of Cancer*, 138(7), 1609-1618.
- Jakszyn, P. (2006). *Nitrosaminas y riesgo de cáncer gástrico* (Tesis Doctoral). Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Pompeu Fabra.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Berenguer, A., Ibáñez, R., Amiano, P., Pera, G., Ardanaz, E., Barricarte, A., Chirlaque, M. D., Dorronsoro, M., Larrañaga, N., Martínez, C., Navarro, C., Quirós, J. R., Sánchez, M. J., Tormo, M. J. y González, C. A. (2006). Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition*, 9(6), 785-791.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Ibáñez, R., García-Closas, R., Pera, G., Amiano, P. y González, C. A. (2004). Development of a Food Database of Nitrosamines, Heterocyclic Amines, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Nutrition*, 134(8), 2011-2014.

- Joosen, A., Kuhnle, G., Aspinall, S., Barrow, T., Lecommandeur, E., Azqueta, A., Collins, A. y Bingham, S. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage (2009). *Carcinogenesis*, 30(8), 1402-1407.
- Keszei, A. P., Goldbohm, R. A., Schouten, L. J., Jakszyn, P. y van den Brandt, P. A. (2013). Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 135-146.
- Kilfoy, B. A., Ward, M. H., Gierach, G. L., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. R., Sinha, R. y Cross, A. J. (2012). Epithelial ovarian cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP Diet and Health Study. *European Journal of Cancer Prevention*, 21(1), 65-72.
- Kilfoy, B. A., Zhang, Y., Park, Y., Holford, T. R., Schatzkin, A., Hollenbeck, A. y Ward, M. H. (2011). Dietary nitrate and nitrite and the risk of thyroid cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *International Journal of Cancer*, 129(1), 160-172.
- Lam, T. K., Cross, A. J., Consonni, D., Randi, G., Bagnardi, V., Bertazzi, P. A., Caporaso, N. E., Sinha, R., Subar, A. F. y Landi, M. T. (2009). Intakes of red meat, processed meat, and meat-mutagens increase lung cancer risk. *Cancer research*, 69(3), 932-939.
- Lin, J., Forman, M. R., Wang, J., Grossman, H. B., Chen, M., Dinney, C. P., Hawk, E. T. y Wu, X. (2012). Intake of red meat and heterocyclic amines, metabolic pathway genes and bladder cancer risk. *International Journal of Cancer*, 131(8), 1892-1903.
- Loh, Y. H., Jakszyn P., Luben, R. N., Mulligan, A. A., Mitrou, P. N. y Khaw, K. (2011). N-nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)–Norfolk Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 1053-1061.

- Mai, V., McCrary, Q. M., Sinha, R. y Glei, M. (2009). Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers. *Nutrition journal*, 8. doi: 10.1186/1475-2891-8-49.
- Major, J. M., Cross, A. J., Watters, J. L., Hollenbeck, A. R., Graubard, B. I. y Sinha, R. (2011). Patterns of meat intake and risk of prostate cancer among African-Americans in a large prospective cohort of men. *Cancer Causes and Control*, 22(12), 1691–1698.
- Martín Calero, A. (2010). *Desarrollo y optimización de nuevos métodos para el análisis de aminas heterocíclicas* (Tesis Doctoral). Departamento de Ciencias y Tecnologías. Universidad de La Laguna.
- Moorthy, B., Chu, C. y Carlin, D. J. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicological Sciences*, 145(1), 5-15.
- Navarro Silvera, S. A., Mayne, S. T., Risch, H. A., Gammon, M. D., Vaughan, T., Chow, W., Dubin, J. A., Dubrow, R., Schoenberg, J., Stanford, J. L., West, A. B., Rotterdam, H. y Blot, W. J. (2011). Principal component analysis of dietary and lifestyle patterns in relation to risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Annals of Epidemiology*, 21(7), 543-550.
- Pérez-Morales, G., Morales, P. y Haza, I. (2016). Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(1), 1-15.
- Rohrmann, S., Hermann, S. y Linseisen, J. (2009). Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1418-1424.
- Rohrmann, S., Nimptsch, K., Sinha, R., Willett, W. C., Giovannucci, E. L., Platz, E. A. y Wu, K. (2015). Intake of meat mutagens and risk of prostate cancer in a cohort of U.S. health professionals. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 24(10), 1557-1563.

- Rohrmann, S., Zoller, D., Hermann, S. y Linseisen, J. (2007). Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. *British Journal of Nutrition*, 98(6), 1112-1115.
- Ronco, A. L., De Stefani, E., Correa, P., Deneo-Pellegrini, H., Boffetta, P., Acosta, G. y Mendilaharsu, M. (2011). Dietary Benzo[a]pyrene, Alcohol Drinking, and Risk of Breast Cancer: a Case-control Study in Uruguay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, 1463-1467.
- Sandoval Villasana, A. M. (2008). Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames. En P. Ramírez y A. Mendoza (Eds.) *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Shankar, V., Gouda, M., Moncivaiz, J., Gordon, A., Reo, N. V., Hussein, L. y Paliy, O. (2017). Differences in Gut Metabolites and Microbial Composition and Functions between Egyptian and U.S. Children Are Consistent with Their Diets. *mSystems*, 2(1). doi: 10.1128/mSystems.00169-16.
- Shaughnessy, D. T., Gangarosa, L. M., Schliebe, B., Umbach, D. M., Xu, Z., MacIntosh, B., Knize, M. G., Matthews, P. P., Swank, A. E., Sandler, R. S., DeMarini, D. M. y Taylor, J. A. (2011). Inhibition of Fried Meat-Induced Colorectal DNA Damage and Altered Systemic Genotoxicity in Humans by Crucifera, Chlorophyllin, and Yogurt. *Plos one*, 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018707.
- Silverman, S. H., Turnell, D. C., Youngs D. J. y Keighley, M. R. (1986). What is the role of histidine in studies of faecal mutagenicity? *Mutation research*, 173(2), 99-104.
- Sinha, R., Park, Y., Graubard, B. I., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A., Schatzkin, A. y Cross, A. J. (2009). Meat and Meat-related Compounds and Risk of Prostate Cancer in a Large Prospective Cohort Study in the United States. *American Journal of Epidemiology*, 170(9), 1165-1177.

- Song, P., Wu, L. y Guan, W. (2015). Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients*, 7(12), 9872-9895.
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H. y Nagao M. (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95(4), 290-299.
- Suzuki, H., Morris, J. S., Li, Y., Doll, M. A., Hein, D. W., Liu, J., Jiao, L., Hassan, M. M., Day, R. S., Bondy, M. L., Abbruzzese, J. L. y Li, D. (2008). Interaction of the cytochrome P4501A2, SULT1A1 and NAT gene polymorphisms with smoking and dietary mutagen intake in modification of the risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 29(6), 1184-1191.
- Tasevska, N., Sinha, R., Kipnis, V., Subar, A. F., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A. R., Caporaso, N. E., Schatzkin, A. y Cross, A. J. (2009). A prospective study of meat, cooking methods, meat mutagens, heme iron, and lung cancer risks. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1884-1894.
- Tuan, J. y Chen, Y. X. (2016). Dietary and Lifestyle Factors Associated with Colorectal Cancer Risk and Interactions with Microbiota: Fiber, Red or Processed Meat and Alcoholic Drinks. *Gastrointestinal Tumors*, 3(1), 17-24.
- Turesky, R. J. (2007). Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters*, 168(3), 219-227.
- Ventanas, S., Martín, D., Estévez, M. y Ruíz, J. (2004). Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos I. *Eurocarne*, 129. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/283510186\\_Nitratos\\_nitritos\\_y\\_nitrosaminas\\_en\\_productos\\_carnicos\\_I](https://www.researchgate.net/publication/283510186_Nitratos_nitritos_y_nitrosaminas_en_productos_carnicos_I).
- Ward, M. H., Kilfoy, B. A., Weyer, P. J., Anderson, K. E., Folsom, A. R. y Cerhan, J. R. (2010). Nitrate Intake and the Risk of Thyroid Cancer and Thyroid Disease. *Epidemiology*, 21(3), 389-395.
- World Cancer Research Fund y American Investigation of Cancer Research (1997). *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Menasha, USA: BANTA Book Group.

Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., ... y Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, *334*, 105-108.

Zhu, Y., Wang, P. P., Zhao, J., Green, R., Sun, Z., Roebathan, B., Squires, J., Buehler, S., Dicks, E., Zhao, J., Cotterchio, M., Campbell, P. T., Jain, M., Parfrey, P. S. y Mclaughlin, J. R. (2014). Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *British Journal of Nutrition*, *111*(6), 1109-1117.