Excmo. Sr. Director,
Excmos. Sres. Académicos,
Señoras y señores:

La enfermedad cancerosa se caracteriza por su gran diversidad afectando a numerosos tejidos y órganos, con preferencia sobre el tubo digestivo y glándulas de secreción anejas (hígado, páncreas, glándulas salivares), la mama y el útero en la mujer, la próstata en el hombre, el pulmón, vejiga, órganos hematopoyéticos, etc.

La pregunta planteada, desde hace largo tiempo, es si determinados componentes de los alimentos pueden estar implicados en la aparición de un proceso canceroso.

La respuesta que en el momento actual se puede extraer de estudios experimentales en animales y de datos epidemiológicos, es que efectivamente compuestos presentes en los alimentos pueden ser causa, pero no la única, en la aparición de un cáncer, ya que hay que considerar también en el caso de los humanos, factores concomitantes como: la raza, la edad, modos de vida, agentes externos, resistencia inmunitaria del individuo, y la cada vez más clara, características genéticas individuales.

Lo que resulta evidente al consultar la bibliografía es la coincidencia de responsabilizar a factores alimenticios la génesis de, al menos, un tercio de los cánceres totales, figurando con una cifra similar el otro gran responsable, el tabaco.

Mecanismos de la carcinogénesis.

La carcinogénesis es un proceso múltiple que origina un daño genético y epigenético en células susceptibles, las cuales adquieren la facultad de poder realizar un crecimiento selectivo,

sobre la base de una expansión clonal. Se llega a ello como consecuencia de la activación de proto-oncogenes y la consecuente inactivación de genes supresores de tumores.

Los proto-oncogenes se encuentran normalmente en las células y su activación a oncogenes lleva consigo la desregularización del crecimiento celular, lo que aumenta la probabilidad de una transformación neoplásica.

A los agentes responsables de dichas transformaciones genéticas y epigenéticas los reconocemos como carcinógenos, cuya acción genotóxica puede ser puesta de manifiesto por la consiguiente acción mutágena, o por translocaciones cromosomales, intercambio de cromátidas, etc.

El proceso de cancerogénesis por agentes genotóxicos está pues en una alteración del genoma humano, es decir en una alteración del ADN previa formación de aductos carcinógeno-ADN, y cuya identificación es la base de modernas técnicas analíticas, que permitirán seguir los procesos con reconocimiento efectivo de los agentes carcinógenos responsables.

Con ser indispensable la activación de un proto-oncogen por un carcinógeno para que se inicie el proceso de cancerogénesis, no es menos importante y decisiva la pérdida funcional de los genes supresores de tumores, también denominados anti-oncogenes. Se destaca entre ellos el p53, por ser el gen supresor que sufre el mayor número de mutaciones en la génesis de tumores en humanos. El consiguiente análisis de las citadas mutaciones está proporcionando importantísima información sobre la etiología de los diversos tumores y sobre la función de las regiones específicas del gen p53. Tal es así, que para el cáncer de colon, cerebral o linfomas se sugiere un proceso mutacional endógeno, mientras que para el cáncer de pulmón, el de mama, o el hepático, la correspondiente mutación debe tener su origen en fuentes exógenas de mutágenos.

Se espera mucho de estos estudios, ya que las diferencias en el espectro mutacional en el gen p53, pueden ser un fiel reflejo de las contribuciones etiológicas de factores endógenos y exógenos en la carcinogénesis humana. Un ejemplo ilustrativo sería que el espectro mutacional del gen p53 para el cáncer de pulmón en trabajadores de las minas de uranio, es diferente del encontrado en el cáncer del pulmón de individuos fumadores.

El papel que se asigna al gen p53, y que por tanto se pierde al sufrir una mutación, es el siguiente: si el DNA del proto-oncogen es dañado por un agente mutágeno, se produce un aumento en la actividad del gen p53, lo que permite paralizar el proceso de replicación celular con objeto de que los sistemas reparadores puedan tener un tiempo extra para eliminar la porción de DNA dañada, que será sustituida tras un proceso que se conoce como de **síntesis no programada de DNA**, para distinguirla de la síntesis de DNA en los procesos de división celular. Con ello queda restaurada la normalidad del genoma celular, evitando la proliferación por clonación de las células transformadas iniciadoras de la tumoración.

Hay estudios que nos hablan de que en el cuerpo humano, tantas como diez mil células sufren a diario transformaciones que exigen reparación. No es pues de extrañar que al gen p53 normal se le haya bautizado como el **guardián del genoma** o también, por su forma de actuación, como el **policía molecular** (1).

En el más importante sistema reparador intervienen, secuencialmente, un conjunto de enzimas con acciones específicas: las endonucleasas y exonucleasas, cuya misión sería la de cortar y separar los nucleótidos de la cadena de DNA dañados por su unión con el cancerígeno; la DNA polimerasa, que sintetiza la secuencia de nucleótidos que ha sido eliminada, y finalmente la DNA ligasa que fija la secuencia del nucleótido a la cadena de DNA, que queda así reparada.

Lo sorprendente de este p53 **guardián del genoma** es que hay trabajos experimentales que parecen demostrar que su papel no se limita al efecto supresor antes apuntado, sino que es pieza fundamental también en el proceso conocido como *apoptosis*, que algunos, no sin cierta controversia, le denominan **muerte celular programada**.Si avanzamos que hay evidencias de que la estimulación de la *apoptosis* puede ser usada clínicamente para conseguir la regresión de las tumoraciones, nos daremos cuenta de que estamos ante una línea de investigación preferente, realmente prometedora.

El concepto de *apoptosis* fue introducido por Kerr, Wyllie y Currie (2) para definir un tipo de muerte celular, diferenciada de la producida por acciones tóxicas que conducen a necrosis celulares. La muerte celular por *apoptosis* se desarrolla tras una serie de cambios característicos en la célula, en donde se aprecia que el citoplasma y la cromatina (el complejo de DNA y proteínas nucleares) se condensan; las membranas desarrollan unas protuberancias, fraccionándose la célula para ser fagocitada.

El término *apoptosis* deriva del griego y su significado real es el hecho representativo de una flor perdiendo sus pétalos o un árbol perdiendo sus hojas.

Un dato importante que pone de manifiesto la singularidad del proceso, es que las proteínas de las membranas celulares llevan a cabo reacciones de entrecruzamiento para dotar a éstas de una mayor rigidez y estabilidad, consiguiéndose con ello que los constituyentes intracelulares no sean liberados al espacio extracelular, con lo que se está previniendo la iniciación y desarrollo de una respuesta inflamatoria. Lo contrario ocurre en la necrosis celular por daño tóxico, en donde la lisis de las membranas, con salida de contenido intracelular, instaura una respuesta inflamatoria con todas sus consecuencias.

Hay confirmación experimental (3) de que el gen supresor p53 induce *apoptosis* en células de leucemia mieloide, pero que pierde esta propiedad si es alterado por algún agente mutágeno. De aquí que, de modo general, todo agente químico mutágeno para el p53, puede ser responsable de inducir la enfermedad o de que progrese en forma atenuada (4).

Hasta aquí nos hemos venido refiriendo a los procesos en que intervienen productos cancerígenos que actúan por acción genotóxica, con alteraciones del ADN del genoma celular. Pero está tomando cuerpo, cada vez más firmemente, gracias a los hallazgos experimentales, que la carcinogénesis puede ser consecuencia también de la actuación de carcinógenos sin acción directa genotóxica, es decir que sólo por vía indirecta puede provocar, en algunos casos, alteraciones del ADN. De aquí que cuando estas sustancias se someten a las pruebas analíticas al uso, se comprueba que no tienen acción mutágena ni citotóxica.

Entre estas sustancias cabe destacar aquellas que forman un grupo que tienen en común provocar, a nivel celular, la proliferación de los peroxisomas. Se incluyen, por ejemplo, medicamentos hipolipemiantes, herbicidas, plastificantes, e incluso las propias características de la dieta, como puede ser una con alto contenido en grasas (5). Estos dos últimos ejemplos justifican su inclusión en el tema que tratamos.

La experiencia muestra que cuando sustancias de este tipo se administran de forma continuada a los animales de experimentación, ratas y ratones, su acción se manifiesta preferentemente en el hígado, con un dramático incremento de su tamaño, a la vez que se observa la proliferación de los peroxisomas en las membranas celulares, y tras una hipertrofia e hiperplasia hepática manifiesta, se genera finalmente un carcinoma hepatocelular.

Para tratar de conocer el mecanismo de acción de los citados compuestos, recordemos que los peroxisomas son simples orgánulos unidos a las membranas y que están presentes en casi todas las células eucarióticas. En las células de los mamíferos su tamaño es de 0,1 a 1,5 µm, y su número varía según el tipo de célula y de su estado fisiológico como hemos visto, siendo particularmente abundante en el hígado y en el riñón. La membrana del peroxisoma tiene unas proteínas específicas, recubriendo a una matriz con más de 40 enzimas diferentes, con misiones anabólicas (biosíntesis de ácidos biliares, por ejemplo) o catabólicas (β-oxidación de ácidos grasos de cadenas largas) (6).

En este último proceso se basan Reddy y Lalwani (7) para proponer la hipótesis del *stress* oxidativo, que intenta explicar el mecanismo por el cual los proliferadores de peroxisomas causan cáncer. Ellos argumentan que el incremento de la β-oxidación de los ácidos grasos por los peroxisomas, lleva consigo un incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno, quien sería el responsable indirecto de la alteración del ADN con las consecuencias consiguientes (8).

En el trabajo de Green (9) se nos habla también del posible mecanismo de acción de otros carcinógenos químicos no-genotóxicos, a través de su capacidad de unión a determinados receptores intracelulares. Tales receptores son proteínas intracelulares que enlazan a sus ligandos con gran afinidad y especificidad, caracterizándose, además, por su capacidad de enlace con el ADN, activando genes específicos.

Por tanto, la supuesta unión de los carcinógenos químicos a receptores nucleares podrá influir en la expresión de determinados genes, con la consiguiente respuesta de crecimiento y diferenciación celular, o lo que es lo mismo una progresión de la tumorogénesis. La estimulación contínua, o en cantidad inadecuada, de los citados receptores por dichos carcinógenos, simulando la presencia de los

verdaderos ligandos específicos, puede conducir al desarrollo de un cáncer.

Es importante señalar que así como para los cancerígenos genotóxicos se considera que no existe un mínimo de concentración, por debajo del cual no se produce transformación y desarrollo celular, para los no genotóxicos debe haber un umbral de concentración que sature los receptores, y ponga en marcha el proceso.

No podemos terminar esta reseña de los mecanismos de la carcinogénesis, sin hacer una breve mención de la relación entre la acción mitógena de algunos carcinógenos no genotóxicos y la promoción de una formación tumoral (10) (11). Los genetistas consideran de antiguo que el momento en que se produce la división celular, es crítico para un posible proceso de mutagénesis. Al aceptar lo anterior, no cabe duda pues, que si la mutagénesis es importante para la cancerogénesis, también lo será la mitogénesis. Los trabajos de Cunningham y colaboradores (12) parecen confirmar lo anterior, al encontrar que dos compuestos isómeros, ambos mutagénicos, sólo uno de ellos es carcinogénico, precisamente el que tiene acción mitógena, propiedad que no presenta el otro isómero.

Si pensamos que son numerosas las sustancias mitógenas, como las lectinas, que están presentes en los alimentos, nos daremos cuenta que al tema hay que prestarle la atención que merece.

Papel de los alimentos en la carcinogénesis

En los alimentos que ingerimos vamos a encontrar compuestos en los que se puede demostrar, por los análisis correspondientes, que son capaces de provocar mutaciones en genes, comportándose como cancerígenos genotóxicos. Igualmente encontraremos cancerígenos del tipo de los no-genotóxicos, de los denominados

proliferadores de peroxisomas, o aquellos otros que se unen con gran efectividad a receptores celulares.

Dichas sustancias se pueden encontrar en estado natural como tales cancerígenos en el alimento que se trate, o en forma de lo que se denomina un pro-carcinógeno, que requerirá una activación previa que lo convierta en producto cancerígeno.

Los mecanismos de activación pueden ser muy variados, siendo el principal de todos el que se produce vía metabolismo, con intervención de las enzimas que constituyen la gran familia de los citocromos P-450. No deja de ser paradójico que siendo esta familia de citocromos la responsable de la destoxificación de los xenobióticos, puedan en determinadas circunstancias originar compuestos intermedios con acción mutágena y cancerígena. El proceso metabólico está perfectamente establecido, y en él los productos sufren una primera biotrasnformación que los convierten en los denominados metabolitos en fase I, compuestos más polares, de mayor solubilidad, para favorecer su eliminación. A este proceso le sigue otro de conjugación, con formación de los metabolitos en fase II, en el que intervienen enzimas del tipo de las epóxido-hidrolasas, UDP-glucuronil transferasas, glutation S-transferasa, etc.

Tanto en los metabolitos en fase I, como en los en fase II vamos a encontrar compuestos capaces de inducir mutagénesis. Por eso, si antes comentábamos lo paradójico de que la misma familia de citocromos P-450 pueda contribuir a la eliminación de un xenobiótico carcinógeno o bien convertir a su vez, un compuesto no carcinogénico en carcinogénico, podemos encontrarnos en un alimento vegetal con el caso paradójico de contener algunos componentes con efecto de inductores enzimáticos o, por el contrario, inhibidores enzimáticos. En el primero de los casos, si las enzimas que se ven inducidas son precisamente las encargadas por la vía metabólica de transformar y facilitar la eliminación de un agente mutágeno, se estaría en presencia de un alimento con

características protectoras frente al proceso de cancerogénesis. Por el contrario, si la activación enzimática facilita la transformación de un pro-carcinógeno en carcinógeno, también por vía metabólica, la acción del alimento lejos de ser protectora, se transformaría en facilitadora del proceso cancerígeno.

El mismo razonamiento, pero a la inversa, se podría establecer para aquellos componentes que puedan actuar como inhibidores enzimáticos, que en un caso estarían impidiendo la biotransformación y eliminación de un cancerígeno, mientras que en el caso contrario impediría la activación de un pro-carcinógeno en carcinógeno.

Este razonamiento debe ser tenido muy en cuenta, a la hora de establecer los componentes de una dieta con reputación de protectores, como puede ser el bien famoso *broccoli* u otras especies del género *Brassica*, si no se ha estudiado con anterioridad, y en profundidad, la presencia de los citados componentes inductores o inhibidores enzimáticos.

Para darnos una idea de la complejidad que tienen los estudios metabólicos, bastará con dedicar un breve comentario a la que hemos denominado superfamilia de citocromos P-450.

En el organismo humano se han reconocido hasta 23 diferentes enzimas que se agrupan en familias y subfamilias, definidas sobre la base de sus respectivas secuencias de aminoácidos. En líneas generales, y con muy pocas excepciones, la secuencia proteica de los P-450 de una misma familia coinciden en más de un 40%, y para los miembros de una subfamilia la coincidencia en la secuencia de sus aminoácidos es superior al 55%, pudiendo ser caracterizados, además, por sus substratos específicos, lo que nos permitirá también su cuantificación.

Para facilitar su identificación, en la bibliografía se les designa con una raíz *CYP* seguida por un número, que representa

la familia, y por una letra que corresponderá a la subfamilia, con un número final que identificará a cada uno de los citocromos.

En la Tabla I, pueden verse los distintos componentes, con sus símbolos genéticos y su localización en el organismo humano.

TABLA I.- CLASIFICACIÓN DE CITOCROMOS P-450 EN HUMANOS

Familia	Símbolo genético	Tejidos
I	CYP1A1	varios
	CYP1A2	hígado
II	CYP2A6	hígado
	CYP2A7	hígado
	CYP2B6	hígado
	CYP2B7	pulmón
	CYP2C8	hígado-intestino
	CYP2C9	hígado-intestino
	CYP2C10	---
	CYP2C17	hígado
	CYP2C18	hígado
	CYP2C19	hígado
	CYP2D6	hígado-intestino-riñón
	CYP2D7	---
	CYP2D8	---
	CYP2E1	hígado intestino-leucocitos
	CYP2F1	pulmón
III	CYP3A3	hígado
	CYP3A4	hígado-tracto gastrointestinal
	CYP3A5	hígado-placenta
	CYP3A7	hígado (fetal)
IV	CYP4A9	---
	CYP4B1	pulmón

Como ejemplo ilustrativo podemos citar que el CYP1A2 es el responsable de la activación de numerosos pre-mutágenos y pre-carcinógenos, entre los que se incluyen la aflatoxina B_1, que contamina determinados alimentos, y numerosas arilaminas heterocíclicas que también pueden encontrarse en los alimentos (13). En la tabla I, ya hemos visto que el CYP1A2 se encuentra en el hígado, y los análisis correspondientes en muestras de tejido hepático han puesto de manifiesto variaciones interindividuales en la expresión del citado citocromo, aunque en ningún caso se ha encontrado carencia del mismo. Con ello queremos decir que la existencia de este polimorfismo en los individuos, nos va a permitir explicar las diferentes susceptibilidades individuales para determinados xenobióticos, así como poder establecer, mediante estos tipos de análisis, los riesgos personales.

Aún cuando insistiremos más adelante en ello, está demostrado que hay diferencias significativas entre las familias de los citocromos P-450 en el organismo humano y en los de los animales de experimentación. De ahí la dificultad de establecer correlaciones entre los resultados analíticos de actividad cancerígena de determinados compuestos en experiencias con animales, y su correspondencia en los humanos. Sobre todo cuando se tiene la certeza de que los procesos metabólicos en animales conducen a metabolitos de fase I y II, diferentes a los humanos.

Hasta ahora nos hemos venido refiriendo a compuestos mutágenos y cancerígenos que pueden estar presentes de forma natural, en determinados componentes de los alimentos, pero existe un segundo grupo de estos compuestos que se van a producir durante el proceso de cocinado al que se someten los componentes de la dieta. Tales son los casos bien conocidos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, reputados carcinógenos que se encuentran en las carnes a la brasa, o las aminas aromáticas detectables en pescados asados. El cocinado de alimentos ricos en proteínas puede dar origen también a la formación de dos tipos de compuestos altamente mutagénicos, los aminoimidazoazaarenos (AIA) cuando la temperatura del proceso está alrededor de los 100° C, y los

pirolizados de aminoácidos que requieren condiciones más drásticas de calentamiento (14). Los (AIA) requieren como precursores para su formación la presencia de aminoácidos, carbohidratos y creatinina.

Finalmente, no pueden dejar de citarse dentro de este grupo los productos de condensación de azúcares y aminoácidos, resultantes de la conocida reacción de Maillard y responsables de determinados aromas en los productos cocinados y de su pigmentación (15). Con estos compuestos hay también experiencias que parecen demostrar en algunos de ellos el efecto contrario de protector antimutagénico (16).

En la actualidad, con un consumo tan elevado de alimentos preparados, tenemos que fijarnos obligatoriamente en los aditivos alimentarios, y concretamente, en los colorantes. Existe la creencia de que los colorantes naturales son más seguros que los colorantes sintéticos, basada en que el uso tradicional de aquellos es prueba evidente de su inocuidad. Sin embargo, esta creencia no puede mantenerse de manera absoluta ya que tenemos el caso del colorante comercializado que procede de las raíces de *Rubia tinctorum*, en el que se han encontrado, entre otros, diversos compuestos antraquinónicos con actividad mutagénica bien manifiesta (17). Los resultados de los trabajos orientados con este fin, aconsejan examinar con suma atención las autorizaciones de uso de estos colorantes.

Otro problema que preocupa muy seriamente, especialmente por las dificultades de su estudio, es la presencia no deseada en los alimentos de compuestos que han dado en denominarse como **emigrantes**, debido que son sustancia que pasan a los alimentos desde los envases o recipientes que los contienen, fenómeno que ocurrirá cuando el alimento o cualquier bebida, se pone en contacto con una superficie sólida. El más antiguo conocido es el cloruro de vinilo monómero, que pasa a los alimentos contenidos en recipientes plásticos de cloruro de polivinilo, y está confirmado como un agente carcinogénico para los humanos.

Podemos sólo vislumbrar la magnitud del problema, si nos fijamos en que en la manufactura del material plástico que constituyen los envases intervienen uno o más monómeros, solventes y catalizadores de la polimerización, amén de sustancias modificadoras de las características finales del material plástico. Si además tenemos en cuenta que la eficiencia en la polimerización no es del 100%, y que la polimerización misma está constituida por cadenas de reacciones, el producto final contendrá todo un espectro de polímeros de diferentes masas moleculares, desde simples monómeros hasta polímeros de alto peso molecular, así como residuos de otros productos procedentes de reacciones secundarias colaterales, y de los materiales auxiliares utilizados. Aún cuando sucesivas etapas de purificación pueden eliminar la mayoría de los contaminantes, no cabe duda que inevitablemente añadirán otros nuevos.

La Comunidad Económica Europea, aconsejada por el Comité Científico para los Alimentos ha preparado, en un esfuerzo digno de elogio, una lista de todos los **emigrantes** concebibles, clasificados por tipos (monómeros, biopolímeros, aditivos, promotores de polimeralización, etc.) que alcanza a unos diez mil compuestos, con objeto de abordar su estudio toxicológico. Ingente tarea que requerirá de cuantiosos medios para su realización.

De entre esos miles de posibles microcontaminantes me permito destacar a los derivados del ácido ftálico, utilizados en la industria de manufactura de materiales plásticos, como aditivos para modificar sus características y hacerlos más flexibles. Pues bien, dichos derivados del ácido ftálico forman parte de los compuestos cancerígenos no-genotóxicos, que se caracterizaban por ser proliferadores de los peroxisomas. De ahí que se haya hecho prioritario el estudio de sus características de emigración por los riesgos que entraña.

Otro capítulo nada desdeñable es la comprobación, por las técnicas tradicionales, de la presencia de poderosos agentes mutágenos en las aguas de bebida sometidas a cloración. El más importante de ellos, entre los hasta ahora identificados, es la

clorohidroxifuranona[3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona] corrientemente representada como MX, y que tiene su origen en la reacción del cloro con las subunidades fenólicas presentes en macromoléculas del tipo de la lignina y sustancias húmicas.

La actividad mutágena de estos compuestos no sólo está demostrada por su positividad en la prueba de Ames de la *Salmonella*, sino que también se han podido identificar y aislar aductos MX--ácidos nucleicos. Luego su acción genotóxica es evidente en este caso.

Parece impensable poder disponer de agua sin clorar para el abastecimiento de las poblaciones, por los riesgos sanitarios de toda índole que ello supondría, lo que hace que a la hora de valorar el riesgo-beneficio, habrá que contar como inevitable la presencia de estos agentes mutágenos en nuestra alimentación diaria.

Al describir los mecanismos de la cancerogénesis hemos citado el papel que podrían estar desempeñando las sustancias estimuladoras de las mitosis celulares, por el riesgo que el propio proceso de división celular tiene en la aparición de mutaciones espontáneas o provocadas. De entre esas sustancias destacábamos a las lectinas, tan abundantes en productos vegetales (judías, lentejas, guisantes, patatas, etc.) como en productos animales.

Lo que caracteriza a las lectinas, es su capacidad para aglutinar hematíes humanos y animales con determinada especificidad de grupo en muchos casos, pero también hay que destacar que muchas de ellas presentan además la propiedad de ser sustancias mitógenas, estimuladoras de las mitosis celulares.

Por su naturaleza química, proteínas o glicoproteínas, está comprobado que tras el calentamiento de dichos alimentos durante el proceso de cocinado, y en virtud de la consiguiente desnaturalización, desaparece en parte, o totalmente, la actividad aglutinante para los hematíes. Lo que está por demostrar es si la pérdida de

actividad aglutinante de hematíes va pareja con la pérdida de la actividad mitogénica. Pero aún hay más, ya que nos vamos a encontrar con lectinas de determinados alimentos que se ingieren en su estado natural, sin ser sometidos a cocinado previo, por lo que no cabe pensar en procesos de desnaturalización al someterlos a temperaturas más o menos elevadas. Ese es el caso, por ejemplo, de las lectinas presentes en la seta *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, un ingrediente de platos sin cocinar, por otra parte muy ricos en proteínas (18, 19).

La investigación en este campo está abierta y alguien debería abordarla.

Técnicas analíticas en la investigación de agentes mutágenos y cancerígenos.-

Agentes mutágenos.

Ninguna persona medianamente informada pone ya en duda que la asignación como agente mutágeno o cancerígeno, de una sustancia dada, sólo tendrá validez si está avalada por los resultados de la aplicación de unas técnicas analíticas de contrastada fiabilidad.

Este es el caso que vamos a encontrar, si se pretende demostrar la posible acción mutágena de cualquier compuesto presente en los alimentos.

Dispondremos de numerosas técnicas, en muchos casos con eficacia probada durante años, de gran sensibilidad y, lo que es muy importante, reproducibles.

No es el momento de hacer un estudio seriado y crítico de todas las técnicas analíticas que se pueden encontrar en la bibliografía, pero si es interesante hacer un breve resumen de las más importantes, sistematizándola en lo posible.

Un primer grupo de técnicas son aquellas en que se investigan **mutaciones cromosómicas**, con lo que se pone en evidencia las propiedades clastógenas del compuesto estudiado. Son técnicas de las denominadas "*in vivo*", en las que se observa la aparición de aberraciones cromosómicas en células sanguíneas o germinales de mamíferos.

Tres variantes podemos citar: en la primera, a los animales de experimentación (ratas o ratones) se les administra dos dosis del compuesto en 48 horas, para a continuación a las 51 horas inyectarle colchicina, lo que permitirá observar células en metafase, indispensable para el estudio de cromosomas, al sacrificar el animal tres horas después, y hacer exámenes microscópicos de la médula ósea extraída del fémur. La técnica requiere de una gran experiencia para interpretar las aberraciones cromosómicas que pueden observarse y que están tipificadas por los especialistas con diagramas y símbolos representativos de las mismas. En la segunda variante, las anomalías cromosómicas se observarán a nivel de las espermatogonias, en animales tratados simultáneamente con el producto problema y la colchicina, a los que se sacrifica para el estudio 24 o 48 horas después de la administración del compuesto.

La tercera variante es la conocida por la prueba de los **micronúcleos**, o corpúsculos de Howell-Jolly, en los eritrocitos policromatófilos. Está basada en el hecho de que en el proceso de formación de los hematíes desde los pro-eritroblastos, y justamente al momento de la mitosis, las sustancias mutágenas pueden provocar la rotura de un cromosoma, cuyos fragmentos en el momento de la anafase no emigran a los polos, como lo hacen los cromosomas que se integran en los núcleos de las células hijas. Los eritrocitos policromatófilos expulsan sus núcleos unas horas después de su última mitosis. Los fragmentos cromosómicos permanecerán en el hematíe y aparecerán en el examen microscópico, tras su tinción, como pequeños núcleos en número, por lo general, no superior a dos.

Se trata de una técnica muy utilizada, que no requiere la alta especialización de las anteriores, ya que la observación de estos micronúcleos en los hematíes que carecen de núcleo es de más fácil interpretación. A grandes rasgos, el protocolo experimental consiste en administrar a los animales, por vía oral o intraperitoneal, dos dosis del producto problema, con intervalo de 24 horas. Seis horas después de la segunda adminitración se sacrifica al animal, se extrae la médula ósea del fémur que se suspende en suero, preparando con dicha suspensión muestras microscópicas para su observación previa tinción. El porcentaje de células con micronúcleos, marcará la acción mutágena del compuesto.

Un segundo grupo de técnicas está constituído por aquellas que nos ponen de manifiesto **mutaciones en los genes de bacterias procariotas**, es decir, en aquellas cuyo ADN se encuentra libre en el citoplasma, lo que constituye un ejemplo típico de la toxicología alternativa, al reemplazar animales de experimentación por cultivos bacterianos.

Aquí también se puede hablar de dos principales variantes; en la primera de ellas se investiga el proceso de mutación directa, como puede ser, por ejemplo, la aparición de resitencia a la estreptomicina, en cepas de *Escherichia coli* inicialmente sensibles a ella, como consecuencia de la mutación producida por la sustancia problema.

En la segunda variante se investiga el proceso de mutación reversa, por el cual, una cepa bacteriana que ha sufrido una mutación previa, perfectamente programada, recupera precisamente por el agente mutágeno analizado, las características propias de la cepa bacteriana no mutada. En este caso se utilizan cepas bacterianas auxótrofas, es decir que necesitan de la presencia de un determinado compuesto en el medio de cultivo para poder crecer, y que pierden esta exigencia al sufrir una mutación, convirtiéndose en protótrofas, lo que significa que no necesitarán de aquel compuesto para poder desarrollarse en el medio de cultivo.

Este es el caso de la prueba más utilizada, que no puede faltar en cualquier trabajo experimental de búsqueda de agentes mutágenos, y que se conoce como **test de Ames**. En dicha prueba se recurre a unas cepas de *Salmonella typhimurium* portadoras de una mutación, que las hace ser histidina-negativas, o lo que es lo mismo, que como consecuencia de la mutación no pueden generar una de las enzimas necesarias para la síntesis de dicho aminoácido, indispensable en la formación de las proteínas bacterianas. En consecuencia, dichas cepas no podrán proliferar en un medio de cultivo carente de la histidina.

La presencia de un agente mutágeno puede producir la mutación reversa, lo que significará que la bacteria podrá sintetizar la histidina y proliferar en el medio de cultivo carente de ella.

Es indispensable, a la hora de valorar los resultados, tener la seguridad de que el compuesto problema es permeable a la membrana bacteriana, así como duplicar los ensayos sometiendo previamente el producto que se analiza, a una posible activación metabólica en presencia del conjunto de los citocromos P-450, necesaria para que se manifieste su posible acción mutágena. Se trata de homogeneizados de hígado de rata, que fueron previamente tratadas por inductores enzimáticos. Estos productos pueden ser adquiridos listos para su uso, lo mismo que las cepas de *Salmonella*.

Como ya hemos indicado el **test de Ames** es de aplicación general, al poderse disponer de los resultados en un tiempo relativamente corto, con un coste aceptable, y por poder utilizar cepas bacterianas de diferente sensibilidad y selectividad para los compuestos químicos más diversos.

En un tercer grupo de técnicas se investigan **las alteraciones primarias del ADN**, es decir que se tratará de demostrar la unión directa del mutágeno con el ADN, cuya transformación requerirá la puesta en marcha de los sistemas reparadores celulares.

Se pueden seleccionar tres variantes, en la primera de las cuales se dispone de dos cepas de *Bacillus subtilis* una de ellas poseedora del conjunto de enzimas que forman el sistema reparador, y la otra carente de dicho sistema reparador. Un producto mutágeno en el cultivo de la cepa de *B. subtilis* reparadoras positivas, no impedirá la proliferación de los mismos, precisamente porque toda alteración primaria del ADN, podrá ser reparada y restaurada la normalidad celular. Por el contrario, el mismo compuesto mutágeno con la cepa *B. subtilis* reparadores negativos, no permitirá la proliferación celular, ya que la alteración del ADN será permanente al carecer de los sistemas reparadores.

Con este fundamento, y utilizando electrodos de oxígeno polarográfico en los medios de cultivo, se puede seguir cuantitativamente el consumo de oxígeno, reflejo de la actividad celular. Un sistema de este tipo se ha incorporado en ese conjunto de técnicas instrumentales avanzadas que constituyen los *biosensores con electrodos bacterianos*, de alta sensibilidad y selectividad.

La segunda variante de la técnica, es la que se conoce como de **intercambio de cromátidas hermanas** y que responde a un fenómeno que se produce de forma espontánea en todas las células de mamíferos, pero que en presencia de un agente mutágeno la proporción de células en las que puede verse el citado intercambio de cromátidas, aumenta considerablemente.

La forma en que podrá ser observado el proceso y cuantificado consiste en la incorporación en la molécula de ADN, justamente en el momento de su síntesis, de un marcador que permitirá la diferenciación de las dos cromátidas del cromosoma. Inicialmente este marcador fue la timidina tritiada, que presentaba el inconveniente de que la propia radiación del isótopo, inducía los intercambios de cromátidas y hacía la técnica poco sensible.

En el momento actual la técnica ha ganado en seguridad, al utilizar como marcador la 5-bromodesoxiuridina (BrdU) precisamente por su analogía estructural con la timina. Tanto *in vivo* como

en cultivos celulares, después de dos procesos de replicación, la timina del ADN de una de las cromátidas será sustituida por la BrdU, lo que se pondrá de manifiesto porque las propiedades tintoriales del cromosoma se habrán modificado.

Concretamente, la acción mutágena sobre el hombre de un determinado compuesto, se investigará recolectando linfocitos de sangre periférica para someterlos a cultivo, incorporando como agente estimulador de las mitosis a las lectinas de los *Phaseolus*. Un aumento en la tasa normal de los linfocitos en que pueda observarse el intercambio de las cromátidas, será indicador de positividad en la acción mutágena.

La tercera variante se conoce bajo la denominación de **síntesis no programada de ADN**, que será medida por la incorporación de timidina tritiada en el ADN de células que no se encuentren en fase de replicación. El fundamento está en el ya citado proceso de reparación celular, según el cual y en virtud de la alteración del ADN por el compuesto mutágeno, será sutituida dicha porción alterada por una nueva cadena de ADN previamente sintetizada, que habrá incorporado la timidina marcada. Medidas radioquímicas en dichas células nos permitirán conocer la positividad del proceso de reparación y la estimación cuantitativa del mismo.

La seguridad de la técnica se conseguirá teniendo la certeza de que no se ha producido replicación celular, ya que en este caso la síntesis de ADN con la timidina tritiada, y su incorporación a las células hijas, no correspondería al proceso de reparación fundamento de la técnica. Por eso, según el tipo de células utilizadas en el análisis, podrá ser obligado incorporar al cultivo un inhibidor de la replicación del tipo de la hidroxiurea.

La gran ventaja de esta técnica es que permite utilizar precisamente aquellas células que se sospecha puedan ser blanco preferente de la acción mutágena del compuesto de estudio. Así por

ejemplo, se utilizaron células intestinales, hepáticas, fibroblastos, linfocitos, timocitos, etc.

Agentes cancerígenos.

La investigación del posible poder cancerígeno de un compuesto dado se ha venido haciendo, de acuerdo con los protocolos internacionalmente admitidos, por técnicas *in vivo* mediante la utilización de dos especies animales, convenientemente elegidas para conseguir que las rutas metabólicas a que se verá sometido el producto problema en los citados animales, se aproxime lo más posible a la que tendrá en la especie humana. Con ello se busca poder extrapolar, con la mayor aproximación posible, los resultados analíticos obtenidos en los animales de experimentación, a los que cabe esperar en humanos.

Con objeto de disponer de los criterios necesarios para hacer una valoración de los resultados, conviene recordar los aspectos más característicos de la técnica.

En los ensayos de rutina se emplean lotes de ratones, ratas o *hamster*, en número de cincuenta de cada sexo, y por cada dosis del producto. Igualmente se utilizarán otros dos lotes testigos de ambos sexos que permitirán valorar la aparición de tumores espontáneos, a efectos estadísticos.

La duración del estudio, se aconseja que sea de 24 meses en el caso de las ratas o de 18 meses en el caso de ratones y *hamster*. Estos tiempos se pueden prolongar hasta el momento en que la supervivencia de los lotes testigos sea de sólo el 20%.

En lo que se refiere a la dosis del producto que se administrará a cada lote de animales, se establecen tres niveles, aunque el más significativo de todos es el que corresponde a la denominada **dosis máxima tolerada**. Con ello se significa que debe provocar un efecto tóxico mínimo en el animal.

Las citadas dosis se administrarán por lo general a diario durante todo el tiempo del ensayo. Igualmente, el régimen alimenticio del animal será uniforme y con libre acceso a la comida.

Para establecer los resultados analíticos, se procederá a efectuar una autopsia completa de cada uno de los animales muertos durante el transcurso de la prueba, y de todos los supervivientes sacrificados al término de la experiencia.

El examen visual se complementa con tomas de muestras, para su examen microscópico, de todos los tejidos y órganos enumerados en los protocolos oficiales. Todo ello permitirá establecer como resultado del ensayo lo siguiente: a) número de animales en los que se desarrollaron tumores; b) número total de tumores; c) número de tumores que afectan a un tejido determinado; d) número total de tumores diagnosticados como malignos; e) período de latencia antes de la aparición de los tumores, etc.

Otros datos complementarios de análisis hematológicos y bioquímicos, serán muy útiles para la interpretación de los resultados, y cuya evolución final será establecida tras un riguroso tratamiento estadístico de todos los datos recogidos.

Nos encontramos pues, que toda sustancia que dé resultado positivo por la técnica citada, será reconocida como carcinógena para los animales de experimentación y considerada, por lo general, como carcinógena para el hombre.

Esta última conclusión, tantos años admitida, está siendo cada vez más criticada por los especialistas en la materia, que quieren ver grandes dificultades a la hora de interpretar los resultados analíticos.

La primera objeción a la técnica deriva de los propios animales de experimentación y de la dieta a que se someten. Respecto a los animales, la técnica recomienda usar roedores de una especie y cepa determinada, al objeto de reproducir resultados y

posibles comparaciones entre los ensayos de laboratorios diferentes. Sin embargo está comprobado experimentalmente que en la crianza de estas cepas de animales se produce variabilidad genética, lo que lleva consigo alteración del peso medio, incremento en la incidencia de la aparición de tumores espontáneos, y una disminución sustancial en el tiempo de supervivencia.

En lo que se refiere a la dieta, la técnica nos indica la uniformidad en la misma, con libre acceso del animal, lo que se conoce como alimentación *ad libitum*. También aquí hay experiencia según la cual, si los animales se someten a una dieta restringida en calorías, la variabilidad en los resultados puede ser sorprendente. Por lo general, con dieta restringida los animales aparecerán más pequeños pero de apariencia más saludable que la de los alimentados *ad libitum*, siempre más obesos. Por otra parte, la longevidad de los roedores con dieta restringida es variable, dependiendo de la cepa que se trate, pero en todo caso será del 20 al 50 por ciento superior a la de los mismos animales alimentados *ad libitum*.

Las circunstancias anteriores condicionan, al parecer con bastante fundamento, el que la aparición de tumores espontáneos en animales alimentados *ad libitum* sea tres veces superior a la de aquellos con dieta restringida, lo que hace que se considere al propio alimento como un verdadero cancerígeno. Ello originaría el que la investigación de la posible acción carcinogénica de un compuesto dado estaría perturbada por la propia dieta.

No cabe duda que estos hechos, en especial el papel de la dieta restringida en calorías, está demandando estudios experimentales profundos, dada la importancia del tema y las implicaciones de todo orden que lleva consigo la asignación de un compuesto como carcinógeno. En ese sentido están encaminados los trabajos de Allaben y colaboradores (20) que comprueban cómo la acción cancerígena de productos tan conocidos (dietilnitrosamina, benzo [α] pireno, metilcolantreno, etc.) era mucho más reducida en animales con dieta restringida que en los alimentados *ad libitum*.

Con ser importantes las objeciones anteriores, no lo es menos aquella que se refiere a la dosis del producto problema que se le administra a los animales, concretamente la que hemos denominado **dosis máxima tolerada** (DMT). Se postula que experimentando con productos químicos que no sean mutágenos, al administrarlos diariamente a la DMT a roedores, originan la aparición de un exceso de tumores, sobre los espontáneos de los lotes control, normalmente en el período final de la vida del animal.

Una explicación razonable para estos hechos (21) es la de que los ensayos con DMT del producto problema, pueden estar originando la muerte de determinadas células del organismo de forma crónica, con la consecuencia obligada del reemplazamiento celular poniéndose en marcha los procesos de proliferación celular. Y es aquí, precisamente en las mitosis, donde se incrementa la oportunidad de producir mutaciones en los genes, con la consiguiente posibilidad de transformación de la célula en cancerosa.

Tal vez, lo que puede ser más concluyente sobre la controversia planteada relativa a la seguridad de la técnica de identificación de carcinógenos, lo podamos leer en un artículo editorial publicado en *Science* (Vol. 249. 21-IX-1990) por Philip H. Abelson: *La prueba en roedores a la DMT, que marca como carcinógenos para los humanos a determinados productos químicos componentes de plantas, es engañosa,* y también, *las pruebas de carcinógenos que usan roedores, son anticuadas reliquias de la ignorancia de décadas pasadas.*

Frente a tan rotundas afirmaciones de descalificación de la técnica hay también opiniones de investigadores, que representan a los máximos organismos mundiales de control para carcinógenos, según los cuales no existe actualmente ninguna otra técnica sustitutiva. Por otra parte, el cambiar la DMT por otras inferiores, DMT/2 o incluso DMT/10, como ha sido propuesto por algunos, (*Science*, 1993. Vol. 361. pag. 389) no puede ser admitido bajo ningún concepto.

Una vez establecidas las circunstancias que rodean a las determinaciones del poder carcinogénico de un compuesto, estamos en condiciones de presentar algunos ejemplos de las investigaciones sobre la presencia de carcinógenos genotóxicos, en los componentes de nuestra dieta.

Así tenemos que en el perejil y en la chirivia se encuentra el 8-metoxipsoraleno; en la col, coliflor y coles de Bruselas el componente encontrado es la sinigrina, que tras su metabolización se convierte en isotiocianato de alilo, el verdadero carcinógeno que también lo encontraremos en la mostaza. En las naranjas y en el mango es el D-limoneno, mientras que en la zanahoria, apio, berenjenas, patatas, lechuga y en frutas como, manzanas, cerezas, uvas, peras y ciruelas, el componente incriminado es el ácido cafeico.

Un precursor del ácido cafeico, el ácido neoclorogénico, se encuentra en proporciones variables en el *broccoli* (brécol), coles de Bruselas, col, manzanas, albaricoques, cerezas, melocotones, peras y ciruelas.

Hemos dejado para el final de estos ejemplos, que en ningún momento ha pretendido ser exhaustivo, el caso del café, por tratarse quizás del componente de nuestra dieta al que estamos expuesto crónicamente.

Se considera que una taza de café contiene más de 1.000 compuestos químicos diferentes (21) de los cuales en sólo 26 han sido realizadas las pruebas de carcinogenicidad, resultando positiva para 19 de ellos, lo que viene a significar que al menos 10 mg de carcinógenos positivos en pruebas con roedores, será ingerido por cada taza de café bebido. Esta cifra la multiplicará cada uno por el número de tazas de café que acostumbre a tomar diariamente.

Los componentes del café identificados como carcinógenos son los siguientes: acetaldehido, benzaldehido, benceno, benzofurano, benzo (α) pireno, ácido cafeico, catecol, 1,2,5,6-dibenzoantrace-

no, etanol, etilbenceno, formaldehido, furano, furfurol, peróxido de hidrógeno, hidroxiquinona, limoneno, 2-amino-3,4 dimetil-imidazol [4,5-f] quinolina (MeIQ), estireno y tolueno.

Resultado dudoso ha dado la cafeína, y negativo fueron los otros estudiados, acroleína, bifenilo, eugenol, ácido nicotínico, fenol y piperidina.

Este del café podría ser un ejemplo típico de la aparición del carcinógeno durante el proceso de elaboración de los componentes de una dieta, ya que en el grano de café verde se encuentran cantidades sustanciales de aminoácidos y carbohidratos los cuales, ya hemos apuntado, actuarán como precursores de la formación de nuevos compuestos mutágenos y cancerígenos, principalmente durante la tostación. Así se forman por ejemplo, el furfurol, el benzo (α) pireno y el MeIQ.

Hay que insistir una vez más en lo aventurado que resulta el trasladar los resultados experimentales en animales a lo previsible en humanos, y muy especialmente en lo de asignar como carcinógeno a un determinado compuesto, por las consecuencia de toda índole, sanitarias, económicas, etc. que ello lleva consigo.

De aquí del café podemos tomar ejemplo de ello, si nos fijamos en uno de los componentes designado como carcinógeno, el d-limoneno, que también por cierto ya hemos apuntado que se encuentra en la naranja y el mango, cuya asignación como carcinógeno en humanos puede no tener relevancia, ya que los trabajos experimentales demuestran (22) que la acción carcinogénica de dicho compuesto se manifiesta únicamente en el riñón de las ratas macho, y que necesita de la presencia de una determinada proteína urinaria para poder ejercer su acción. Como quiera que dicha proteína no es excretada por el hombre, la asignación del d-limoneno como carcinógeno debe ser replanteada.

Nuevas perspectivas analíticas

Ante las dificultades que presenta el método de los roedores para la investigación de carcinógenos, alto coste y larga duración principalmente, no es de extrañar que los analistas busquen alternativas no sólo para obviar las dificultades apuntadas, sino también para aumentar la seguridad en las determinaciones.

Lo primero que se estudió fue la posible concordancia entre las bien contrastadas pruebas de mutagénesis, con la de carcinogénesis con roedores. Se emplearon 73 compuestos (23) comprobados por el Instituto Nacional del Cancer (U.S.A.) como carcinógenos, estudiando su positividad frente a cuatro diferentes técnicas de determinación de acción mutágena.

El resultado fue que una sola de las técnicas, el **test de Ames** con **Salmonella**, presentó un 60% de concordancia con la prueba de los roedores, y que la utilización de las otras tres técnicas de mutagénesis no aumentaban el valor predictivo de las mismas respecto al poder carcinogénico de los compuestos estudiados.

Lo que llamaba la atención de estos resultados era ése 40% de compuestos, carcinógenos para roedores, y que resultaban negativos en los ensayos de mutagénesis. Muchos de ellos encontrarían hoy su explicación en los procesos de carcinogénesis no genotóxicos, de los proliferadores de peroxisomas, o de unión a receptores celulares.

Trabajos similares al citado los encontramos en la bibliografía orientados con el mismo fin, habiéndose asignado a las diferentes pruebas de mutagénesis unos índices de, seguridad, especificidad y valor predictivo, para identificar compuestos carcinogénicos, que en ningún caso llega al 100%. Ello quiere decir que el método de los roedores no puede ser sustituído por las técnicas de mutagénesis.

Como ya se puso de manifiesto, una de las causas de inseguridad en el método de los roedores, era la propia cepa del animal. Pues bien, la posibilidad actual de manipular genéticamente a los animales, obteniendo cepas carentes de determinados genes, o incorporando genes extraños (animales transgénicos), ha permitido que se pueda disponer de especies de ratones capaces de contribuir de forma decisiva a la eliminación de los inconvenientes que la técnica clásica venía presentando.

Dos son las especies de ratones patentadas y comercializadas por **BENPHARM International**, de los cuales se afirma que permiten acelerar las pruebas de carcinogenicidad de un compuesto, con lo que se gana en tiempo y en coste total del análisis.

El primero de ellos es el *TSG-P53*, en el que está inactivada la función del gen supresor p53, en uno o en ambos p53 alelos.

Si recordamos lo indicado a propósito de la carcinogénesis, sobre el papel que desempeñan los genes supresores, nos será fácil entender que la utilización de estos animales conferirá mayor seguridad a las pruebas reduciendo considerablemente el tiempo de las mismas como asimismo, el número de animales por lote necesarios para obtener resultados estadísticamente significativos.

El otro ratón es el *PIM*, un transgénico con una copia extra del oncogen humano **pim-1** en su genoma, y que se caracteriza por desarrollar linfomas de células T en respuesta a un carcinógeno, y en un tiempo significativamente menor que lo podría hacer un ratón normal.

A título anecdótico, es interesante hacer un breve comentario de la controversia planteada tras la aparición de estos ratones como una herramienta analítica más, a disposición de los experimentadores en el campo de la cancerogénesis.

A la presentación en la Oficina Europea de Patentes, para asegurar su registro correspondiente, siguió una protesta formal de todos los grupos que en Europa están relacionados con la defensa de los animales, amparándose en el artículo 53a de la Convención Europea de Patentes, que determina la prohibición de conceder una patente si el objeto de la misma es para fines inmorales. Se entiende que la inmoralidad a que se refieren estos grupos no corresponde al experimento en sí, sino al beneficio económico obtenido, potenciado cuando el producto está protegido por una patente, del padecimiento de un animal cuyo destino es la muerte por enfermedad cancerosa.

La Oficina Europea de Patentes rechazó dichas alegaciones argumentando que el beneficio que podemos esperar en la lucha contra el cáncer, tanto en prevención como en su terapéutica, compensa con creces el sufrimiento a que pueden verse sometidos los ratones patentados al trabajar con ellos.

Otro colectivo que también manifestó su protesta con contundencia, fueron los investigadores en el campo de la cancerología, que han valorado tan positivamente ésta nueva herramienta para sus investigaciones, y que tantas esperanzas despierta. La protesta vino al comprobar que GenPharm situó el precio de cada ratón entre 80 y 150 dólares (*Science* Vol. 260. 2 abril 1993. pág. 23), y con la prohibición de su apareamiento y crianza. Ello significa que el laboratorio debe pagar por cada uno de los ratones que utiliza en sus experimentos, y dado que en estos ensayos hay que utilizar lotes de animales de ambos sexos, es fácil comprender que se eleve a miles de dólares el coste de los animales por experiencia. Es evidente que la protesta está más que justificada, pues lo prohibitivo del coste impide realizar experiencias bien diseñadas y fundamentadas.

La protesta generalizada ha obligado a GemPharm a modificar las condicionès de comercialización de los ratones, consintiendo la cría de los animales en el propio laboratorio, mediante un canon anual de 1000 dólares, a los que hay que añadir el coste de la compra de las parejas reproductoras. Condiciones más llevaderas, que no impiden el que se piense en la injusticia que representa el freno, a causa de una patente, de investigaciones en campos tan preferentes como éste, por su trascendencia sanitaria y social.

Biomarcadores.

Los datos epidemiológicos clásicos han sido fuente de identificación de carcinógenos, gracias a la astucia de excelentes clínicos que han sabido asociar la aparición de "epidemias" de cáncer, con la particular exposición de dichos individuos a unos determinados compuestos.

Estas técnicas, sin embargo, adolecen de falta de sensibilidad, por lo que se tienen puestas grandes esperanzas en el desarrollo de la denominada **epidemiología molecular**, ya que por ella sería posible identificar el riesgo de aparición de la enfermedad cancerosa, mucho antes de que el cáncer se desarrolle.

Con la epidemiología molecular lo que se busca es dilucidar las relaciones entre la exposición a un determinado producto, y el conjunto de los procesos que ocurren dentro del organismo y a nivel molecular, que ya han sido estudiados en la carcinogénesis. Ello nos va a permitir establecer técnicas analíticas para identificar y cuantificar determinados **biomarcadores** representativos de las diferentes etapas del proceso de cancerogénesis, y que puedan suministrarnos datos significativos y relevantes, para los otros estados del proceso.

El más importante biomarcador de la mutagénesis y cancerogénesis en el momento actual, es el que se forma de la unión covalente de los carcinógenos o mutágenos, con macromolé-

culas como DNA, RNA y proteínas, con formación de los aductos correspondientes.

Un sólo dato puede ser suficiente para poner de manifiesto la indudable superioridad de la identificación y cuantificación analítica de estos aductos, sobre la propia identificación del carcinógeno, o sus metabolitos, en los fluidos corporales. En este último caso, los procesos de aclaramiento no permitirán poder establecer el riesgo a que se ha estado expuesto, más que en el corto período de tiempo que el organismo humano emplea para su eliminación, por lo general horas. Sin embargo, la mayor estabilidad de los aductos DNA-carcinógenos, permitirá su estudio hasta meses después de haber estado expuesto a dicho producto, tiempo que dependerá de la eficacia de los procesos de reparación del genoma, al que ya hemos hecho referencia. Para los aductos carcinógenos-proteínas, su persistencia en el organismo será la que corresponda a la propia vida de la proteína.

La mayor dificultad que se va a encontrar en los análisis de estos biomarcadores, proviene de la imposibilidad de acceder directamente a los tejidos afectados para su toma de muestra, por lo que para establecer la validez de la técnica se ha recurrido a veces a muestras de tejidos procedentes de autopsias, así como de tejidos placentarios o cuando ello es posible, de biopsias experimentales. Como ejemplos en los que la toma de muestra presenta menores dificultades, los tenemos en las células de la cavidad bucal, en células pulmonares procedentes de lavados bronquiales, en la sangre identificando aductos DNA-carcinógeno en linfocitos, o los aductos DNA-hemoglobina, y en la orina, los aductos DNA-carcinógenos en las células exfoliativas de vejiga, y los excretados como consecuencia de los propios procesos de reparación del genoma.

Para el análisis de estos aductos DNA-carcinógenos, o proteínas-carcinógenos, se requiere la utilización de técnicas instrumentales de sensibilidad extremada y una metodología muy sofisticada, que podemos sistematizar en los tres grupos siguientes:

técnicas de inmunoanálisis, técnicas de fluorescencia, y técnicas de marcaje con ^{32}P. En todas ellas podemos encontrar ventajas o inconvenientes, según el problema analítico planteado, y su garantía de aplicabilidad viene dada por la alta sensibilidad que puede alcanzarse, ya que los límites de detectabilidad están en 1 aducto DNA-carcinógeno por cada 10^6-10^{10} nucleótidos normales en la cadena de DNA.

De las técnicas de inmunoanálisis encontramos numerosos ejemplos en la bibliografía que utilizan el radioinmunoanálisis (RIA), así como técnicas de enzima inmunoanálisis tipo ELISA o variantes. La sensibilidad para estas técnicas suele estar en 1 aducto por 10^8 nucleótidos, requiriéndose para el análisis de 25 a 50 µg de DNA problema. El principal inconveniente, que es común para todas las técnicas de inmunoanálisis, lo vamos a tener en las reacciones cruzadas del reactivo principal de la técnica, el anticuerpo, con otros compuestos diferentes del antígeno para el que fue preparado, lo que puede dar origen a falsas positividades. Un ejemplo lo tenemos en el anticuerpo preparado contra el aducto 7β,8α-dihidroxi-9α,10α epoxi-7,8,9,10 tetrahidrobenzo (α) pireno-DNA, que presenta reactividad cruzada con otros aductos de hidrocarburos aromáticos policíclicos-DNA, entre los que se incluyen criseno y benzo(α)-antraceno (24).

La otra gran limitación para estos tipos de análisis la encontramos en la obligada necesidad de preparar el correspondiente anticuerpo, por cada nuevo aducto que se desee investigar.

Como ejemplo ilustrativo de estas técnicas, comentaremos los trabajos encaminados a determinar los aductos DNA-hidrocarburos aromáticos policíclicos (DNA - HAP) potentes carcinógenos, precisamente en células hemáticas de la serie blanca, como método sustitutivo de su detección en las células de los tejidos donde selectivamente se fija el carcinógeno, y que servirá por consiguiente, como un biomarcador de la exposición a dichos compuestos (25).

Aunque son muy numerosas las fuentes de producción de los citados hidrocarburos aromáticos policíclicos, que contribuyen a la contaminación ambiental, nosotros nos referiremos exclusivamente a los que ingerimos con nuestros alimentos, concretamente con las carnes a la parrilla o a la brasa.

El trabajo se planteó con individuos sanos (33 a 39 años) no fumadores (para evitar al menos esa fuente de exposición), que se sometieron a una dieta libre de carnes asadas durante un mes. En ese intervalo de tiempo se tomaban tres muestras de sangre (40 ml cada una) al objeto de establecer para cada individuo la línea base de DNA-HAP. A continuación durante una semana se incorporaba a su dieta diariamente carne a la brasa (280 g). Se realizaron nuevas tomas de sangre los días 1, 2, 5, 8, 12, 24 y 31. Durante las tres semanas siguientes, los participantes en el ensayo estuvieron privados de carnes a la brasa en su dieta. Para el estudio analítico se separaban los leucocitos de los que se extraía el DNA, investigándose en el mismo la presencia de los aductos DNA-HAP por una técnica de ELISA, con fosfato de 4-metilumbeliferona como sustrato enzimático fluorescente. El límite más bajo de detección por esta técnica era de 0.04 fentomoles de aducto, por cada µg de DNA.

En los resultados se apreciaba una cierta variabilidad interindividual, pues junto a los que se le incrementaba por tres o por seis su nivel de línea base de aductos DNA-HAP durante la semana del consumo de la carne, había otros que no mostraban modificación alguna. En aquellos en los que aumentaban, podía observarse que retornaban a la línea base entre 1 y 4 días después de haber cesado la ingesta de carnes.

Los autores dicen que la técnica puede servir como biomarcador de exposición a estos cancerígenos, así como ser demostrativa del diferente comportamiento individual frente a los riesgos de exposición, consecuencia de las características que afectan a la absorción del cancerígeno, su metabolización, excreción, formación de aductos, mecanismos de reparación, etc.

Respecto a las técnicas de fluorescencia, se aprovecha la circunstancia de que determinados carcinógenos presentan una fluorescencia intrínseca que permanece tras su unión con DNA o proteínas, lo que nos va a permitir la dosificación directa de tales aductos. Tal es el caso de la aflatoxina B_1 que contamina determinados alimentos, como consecuencia de la presencia en los mismo de ciertas especies de *Aspergillus*, o los ya citados HAP. Por ser la técnica menos sensible requerirá una mayor concentración de los aductos que para el caso de los inmunoanálisis, así como poder disponer de al menos 100 µg de DNA.

Los resultados pueden mejorase al utilizar la técnica de espectroscopía de fluorescencia sincrónica, en la que los espectros se generan por un barrido simultáneo de longitudes de onda de excitación y de fluorescencia, a una diferencia fija de longitudes de onda. La sensibilidad que se alcanza es de 3 a 10 aductos por 10^8 nucleótidos, aunque la presencia de otros fluoróforos entre los componentes del tejido analizado, puede originar errores importantes por solapamientos de los espectros de fluorescencia.

Las medidas fluorescentes pueden mejorase aún más, mediante la técnica de excitación por laser, trabajando a muy bajas temperaturas, 4,2 K, lo que origina un gran estrechamiento de la banda de fluorescencia. La sensiblidad es de 1 aducto por 10^6 nucleótidos, pero es susceptible de ser aumentada.

A propósito de esta técnica, podemos saber cómo gracias a su utilización se puede avanzar en el complejo campo de la carcinogénesis química. Efectivamente, hay pruebas evidentes de que un carcinógeno dado puede generar una mezcla heterogénea de aductos. Ello es debido, en primer lugar, a que al ser en muchos casos los metabolitos los resposables del daño tóxico, las rutas metabólicas pueden conducir a una gran variedad de aductos; además, un metabolito dado puede enlazarse a diferentes bases en la cadena del DNA, o a diferentes centros nucleofílicos de una base, creando con ello otros tantos nuevos aductos. Y esto que por si sólo explicaría la existencia de esa gran variedad de aductos no es todo,

ya que si nos fijamos en los isómeros posibles de los HAP y, por consiguiente, en las variaciones individuales sobre la distribución de metabolitos estereoisómeros, nos damos cuenta que existirán uniones estereoespecíficas de estos metabolitos al DNA del genoma.

Esta compleja heterogeneidad de aductos hace que la identificación de los tipos de lesiones químicas del genoma, responsable de la acción cancerígena, se convierta en un problema de tremenda dificultad para abordar su resolución. En esta dirección podemos destacar apuntan los trabajos de Marsch y colaboradores (26) quienes utilizan la fluorescencia inducida por laser (LIF) a temperaturas de 4.2 K y 77 K, con la previa separación de los aductos por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Según los resultados, los autores consideran a este acoplamiento de técnicas PAGE-LIF, como una herramienta muy poderosa para avanzar en el estudio de la carcinogénesis química.

Nos queda por comentar, como tercera alternativa en la investigación de aductos DNA-carcinógenos, la denominada como **post-marcaje con ^{32}P**. Se puede pensar en el momento actual que, en líneas generales, esta técnica se presenta superior a las anteriores, que como hemos visto tenían limitadas sus posiblidades de aplicación, ya que en el caso de los inmunoanálisis la preparación de los anticuerpos requiere el aislamiento previo del aducto, o lo que es lo mismo la preparación de anticuerpos específicos para cada aducto, y que por su parte las medidas de fluorescencia veían limitado su campo de aplicación a los aductos fluorescentes.

La superioridad que aludimos para la técnica del post-marcaje con ^{32}P, la podemos sintetizar en los siguientes puntos: a) su sensibilidad se sitúa en el intervalo de 1 aducto por 10^7 a 10^{10} nucleótidos, b) puede operar con 1 a 10 µg de DNA, y c) que no es químicamente específica lo que, teóricamente, permite la determinación de cualquier tipo de aducto, siempre que puedan ser separados por vía cromatográfica.

Este último punto es de indudable interés cuando se está estudiando la existencia de posibles carcinógenos en mezclas muy complejas, como pueden ser los componentes de un determinado alimento o de una dieta completa. La técnica nos permite demostrar la formación de los aductos y, a partir de ahí, aislar e identificar las sustancias responsables.

De manera esquemática podemos distinguir en la técnica hasta seis etapas con finalidades específicas.

1ª etapa.- Preparación de la muestra problema de DNA, libre de proteínas y RNA. Ello es esencial para el resultado del análisis.

2ª etapa.- Fraccionamiento hidrolítico del DNA hasta el nivel de 3'-nucleósido monofosfato, mediante el uso de una mezcla de nucleasas micrococales y fosfodiesterasa. Este tipo de hidrólisis enzimática no afecta al rendimiento en la separación de los aductos.

3ª etapa.- Obtención de una muestra enriquecida en los aductos presentes. Varios métodos se han propuesto, siendo los dos más usados el de la extracción con butanol y el del tratamiento enzimático con nucleasas P_1 o S_1.

En la extracción con butanol, el proceso de partición frente a una fase acuosa, permitirá que los aductos de compuestos aromáticos o hidrofóbicos se concentren en la fase orgánica, al contrario de los nucleósidos normales, que se concentran en la fase acuosa.

En el tratamiento enzimático con nucleasas P_1 o S_1, lo que se aprovecha es la actividad fosfatásica de estas enzimas, que hidrolizarán a los 3'-nucleósidos monofosfatos normales a sus correspondientes nucleósidos, mientras que los aductos de los nucleótidos son resistentes a dicha acción hidrolítica.De esta forma, en la posterior etapa de marcaje con ^{32}P, sólo serán susceptibles al mismo los aductos, y no los nucleósidos.

Por lo que respecta a los rendimientos, una doble extracción con butanol permite recuperar aproximadamente hasta el 95% de los aductos extraíbles. Por su parte la técnica enzimática, puede originar pérdidas de relativa importancia por hidrólisis de aductos lábiles.

4ª etapa.- Marcaje con ^{32}P. Consiste en la transferencia enzimática de ^{32}P a los aductos de la muestra desde el [γ-^{32}P]ATP, a la posición 5′ del nucleótido, catalizada por la polinucleotidokinasa, con lo que se forma un 3′,5′ bifosfato nucleótido.

Funtamental en esta etapa es la presencia de la adecuada polinucleótidokinasa, que cataliza la reacción, y de un exceso de [γ-^{32}P]ATP, para que la técnica pueda hacerse cuantitativa.

5ª etapa.- Separación y visualización de los aductos marcados. Se utiliza tanto la cromatografía en capa delgada de alta resolución (HP-TLC) como la HPLC.

En la HP-TLC, se utiliza un sistema de un derivado de celulosa para metodología de cambio iónico, con desarrollos múltiples en direcciones perpendiculares y con eluyentes diferentes, que tienen por objeto el desplazamiento hacia los bordes de la placa, tanto del [γ-^{32}P]ATP que existía en exceso en la muestra, como de los nucleótidos normales y otros contaminantes. El recorte de los bordes de la placa permitirá realizar el proceso de visualización sin contaminación de fondo, ya que dicho proceso se lleva a cabo por autorradiografía que es, con mucho, el medio más sensible para la detección de los aductos marcados. Tan sólo de 2 a 4 cuentas por minuto pueden ser detectadas usando una exposición de 72 horas con películas Kodak XAR-5, gracias a la alta actividad específica del emisor β [γ ^{32}P] ATP.

6ª etapa.- Determinación cuantitativa de los aductos marcados. Como continuación de la autorradiografía, los aductos separados en la placa cromatográfica se pueden cuantificar individual-

mente por medida de la radiactividad, bien directamente sobre la propia placa, o tras la elución correspondiente.

Con ello se completa esta breve descripción de la técnica, cuyos detalles pueden ser consultados en el trabajo de Beach y Gupta (27).

Las encuestas de alimentación

Otra forma de establecer cualquier tipo de relación entre la alimentación y la enfermedad cancerosa, es a través de los trabajos en los que la parte fundamental del mismo no es otra que la recogida de datos sobre los hábitos alimenticios de un conjunto de personas diagnosticadas con algún tipo de cáncer, y compararlos con los que corresponden a controles sanos de características similares en cuanto a edad, sexo, residencia habitual, trabajo, fumador o no fumador, etc.

De esta confrontación de datos se pretende establecer los alimentos que constituyen factores de riesgo, es decir, que predisponen a la enfermedad cancerosa y, en algunos casos, especular sobre las que se podrían denominar dietas protectoras frente a dicha enfermedad.

Lo primero que se debe hacer al plantearse un trabajo de este tipo, es elaborar el cuestionario de preguntas sobre los alimentos que se han ingerido de forma retrospectiva, que puede ser de meses o años atrás, añadiendo a ser posible frecuencia y cantidad, así como forma de cocinado.

La validez de los resultados no sólo dependerá del correcto planteamiento de la encuesta, sino también de la fiabilidad en las respuestas de los encuestados. No es de extrañar pues, que se levanten voces críticas sobre el empleo de fondos públicos o privados en el desarrollo de trabajos de este tipo, en tantos casos repetitivos, como pueden ser, por ejemplo, los que toman como

base obtener la mayor información posible sobre la influencia del contenido en grasa de la dieta y el desarrollo del cáncer de mama.

En este sentido puede servir de referencia el trabajo realizado por un grupo de investigadores del Hospital de mujeres de Boston (*Journal of the American Medical Association* (1992) 240, 2037-2044) según el cual, no se ha encontrado ninguna correlación entre la ingestión de grasa en la dieta y el cáncer de mama, tras el estudio continuado durante ocho años, con un grupo de mujeres que totalizan 89.494, con edades comprendidas entre 34 y 59 años. A la misma conclusión se llega en otros trabajos en el que participaron 35.000 mujeres en uno, y 5.000 en otro.

Estos resultados, tan concluyentes al parecer, no han sido impedimento para que el *US National Institut of Health (NIH)* tenga en proyecto iniciar un nuevo estudio con 40.000 mujeres, la mitad de las cuales designadas al azar, que no consumirán más del 20% de su dieta calórica en grasas, todo ello con el mismo fin de establecer cualquier tipo de relación entre la dieta y el cáncer de mama. El presupuesto para el estudio es de 10.000.000 (diez millones) de dólares USA, lo que hace que se pregunten (*Nature*, 1992, vol. 359, pág. 760) por qué el NIH insiste en gastar esa cantidad de dinero en un estudio cuya hipótesis parece ser tan falta de consistencia, cuando hay tanta necesidad de fondos para trabajos de verdadera relevancia en estos mismos campos.

Sin pretender otra cosa que dar una información restringida sobre el desarrollo de los trabajos últimamente realizados, presentamos sistematizados los más significativos.

Cáncer de pulmón.

Candelora y cols. (28) estudian la dieta de 124 mujeres no fumadoras, con carcinoma de pulmón confirmados histológicamente, frente a 263 controles normales. Sus conclusiones fueron: un consumo alto de verduras disminuye el riesgo de padecer la enfermedad, sin poder distinguir el tipo de alimento vegetal de

mayor eficacia; la ingestión de carotenos totales tenía efecto protector, sin que fuese posible llegar a la misma conclusión si se consideraba por separado el β-caroteno; la ingesta de retinol no tenía ninguna significación.

Forman y cols. (29) estudian a 183 mineros del estaño diagnosticados con cáncer de pulmón frente a otros 183 controles sanos de ocupación y edades semejantes (45 a 79 años). Las entrevistas se realizaron dentro de los tres meses siguientes al diagnóstico, con un cuestionario de frecuencia para 27 alimentos, que incluía 11 variedades de frutas y productos vegetales ricos en vitamina A o carotenoides. La conclusión fue que la ingestión reducida de productos vegetales amarillos y verdes, constituía un factor de riesgo, confirmado estadísticamente, con mención especialmente significativa para la ingestión reducida de tomates.

Goodman y cols. (30) estudian a 463 hombres y 212 mujeres, con cáncer de pulmón confirmado histológicamente. En las entrevistas se obtiene información sobre dieta cuantitativa desde un año anterior al diagnóstico, buscando el efecto de la dieta en la supervivencia del paciente. Los resultados sorprenden, ya que establecen que el consumo de verduras disminuía el riesgo de contraer la enfermedad entre las mujeres, pero no así en los hombres; y que lo mismo ocurría con la ingestión de frutas.

Por otra parte, un incremento en el consumo de tomates y naranjas entre los hombres, y de *broccoli* y tomate (más dudoso) entre las mujeres, parecían ser factores favorables para mejorar la supervivencia de los pacientes.

El trabajo de Wynder y cols. (31) tiene de interesante los datos comparativos de la incidencia del cáncer de pulmón en los Estados Unidos y el Japón. Los incrementos de mortalidad entre 1950 y 1985, fueron iguales en ambos países, aunque en valor absoluto eran bastante más bajos en el Japón, que tenía 38,2 muertes por 100.000 habitantes frente a las 72,2 por 100.000 en USA, todo ello en 1985.

La proporción de hombres fumadores es mayor en Japón que en USA desde el año 1955, con la particularidad de que los japoneses comienzan a fumar a edad más adulta, pero fuman una mayor cantidad de cigarrillos al día.

Respecto a los datos del consumo de grasa en la dieta, observaron que, expresado en porcentaje de calorías, en el año 1950 representaba el 40% para los hombres de USA frente a sólo el 7,9% de los japoneses, cifras que para 1985 se convertían en 43,5% y 24,5% respectivamente.

Como conclusión señalan, que se puede establecer una relación lineal entre la mortalidad por cáncer pulmonar y el consumo de grasa en la dieta. Por otra parte, establecen la hipótesis de que los hábitos dietéticos pueden modular los efectos carcinogénicos del tabaco.

Cáncer de colon

Iscovich y cols. (32) hacen su estudio con 110 pacientes diagnosticados entre 1985 y 1986, en los diez mayores hospitales de la región de La Plata en Argentina, tomando como controles dos individuos sanos de la vecindad de cada paciente, equiparables en edad y sexo. Las entrevistas personales recogían información sobre la frecuencia del consumo de 140 alimentos durante el período de 5 años a 6 meses anterior a la entrevista. Los resultados destacables son los siguientes: la disminución del riesgo está asociada al consumo de carnes de aves, pescados y mariscos, productos vegetales de todos los tipos, con la protección más marcada para a) *broccoli*, coles, coliflores, lechugas, b) zanahorias, cereales, calabaza y c) ajos, cebollas y pimientos.

Por el contrario, el aumento del riesgo viene asociado con el incremento en el consumo de huevos, particularmente huevos fritos, que es más marcado en las mujeres, tal vez por mecanismos hormonales. Lo curioso es que dicha conclusión está en franco desacuerdo con los datos de un trabajo efectuado en Italia (33) en

el que no se encuentra ninguna relación entre el consumo de huevos y el cáncer de colon.

La ingestión de productos derivados de la leche, especialmente el queso, lo consideran también factor de riesgo.

Finalmente, lo que los autores destacan con el mayor interés, es que según sus datos no se confirma lo apuntado por otros autores, sobre incorporar como factor de riesgo la ingestión de carnes rojas, de las que los argentinos son grandes consumidores (250 a 350 g por persona y día, según la Junta Nacional de la Carne en 1987).

Peters y cols. (34) estudian la dieta de 746 enfermos de cáncer de colon en Los Angeles County (California, USA) y otros 746 controles sanos, comprobando que un incremento significativo de riesgo está asociado al consumo total de calorías, y que la ingestión de calcio disminuye el riesgo también significativamente. Para el hombre las calorías consumidas en forma de grasa total y alcohol, eran las principales responsables del incremento de riesgo, mientras que en las mujeres no se encontró ningún elemento especialmente responsable.

No encontraron ningún efecto significativo para la sacarosa, la fibra, verduras, β-caroteno ni otras vitaminas o ningún otro nutriente o micronutriente.

Lo más significativo fue el efecto protector que se le podía asignar individualmente al yogur.

Cáncer de mama

Además de los estudios ya apuntados anteriormente para este tipo de cáncer, podemos citar concretamente los de Kushi y cols. (35) quienes estudian la asociación del cáncer de mama y la dieta de 34.388 mujeres post-menopáusicas de Iowa (USA).

Los hábitos alimenticios fueron obtenidos mediante un cuestionario sobre la frecuencia del consumo de alimentos, enviado por correo en enero de 1986. Al 31 de diciembre de 1989 había registrado 459 casos de cáncer de mama en las mujeres encuestadas.

Las conclusiones del trabajo fueron que la asociación entre la grasa ingerida y el cáncer de mama era muy débil o nula, pero que eran necesarios posteriores trabajos no sólo para clarificar dicha posible asociación, sino también para conocer el impacto de los diferentes métodos analíticos que se usan en la investigación de las asociaciones dieta-enfermedad.

Cáncer de estómago

Sánchez Díez y cols. (36) estudian 109 casos en la provincia de León y 123 controles, estableciendo como factores de riesgo el consumo de alimentos ahumados y el no incluir en su dieta a las frutas frescas, ambos estadísticamente significativos. Por otra parte el no consumir vegetales frescos aparecía también como factor de riesgo pero, en este caso, no era estadísticamente significativo.

Tuyus y cols. (37) hacen su estudio en Bélgica contrastando la mortalidad por cáncer gástrico. A la asignación por estos mismos autores de la sal como factor de riesgo, añaden ahora que también lo es el consumo de harinas y productos derivados, incluido el pan blanco, así como el azúcar. Por su parte, el consumo de la mayoría de alimentos vegetales, crudos o cocinados, y de frutas frescas, aparecían como protectores. En lo que se refiere a las grasas de procedencia diversa, no apareció ningún efecto claro, aunque para los aceites con un cociente alto P/S se podía apreciar una disminución en el riesgo.

Melanomas

La rápida progresión en las tasas de incremento y mortalidad por melanomas, ha originado el que se desarrollen campañas a

nivel internacional, por las que se aconseja al público en general que debe protegerse de las radiaciones solares.

Sin embargo, las bases de estas campañas se han visto criticadas por los que sostienen la teoría de que la vitamina D, que precisamente se genera en la piel por la acción de las radiaciones ultravioletas, inhibe el desarrollo del melanoma.

Para mediar en esta controversia Weinstock y cols. (38) estudian la ingestión de vitamina D, mediante un cuestionario de la frecuencia del consumo de determinados alimentos, en 165 pacientes con melanoma y 209 controles sanos. En dicho estudio se valora también la incidencia del consumo de leches con suplementos de vitamina D.

La conclusión de su trabajo es que no existe evidencia alguna, que induzca a pensar que la ingestión de vitamina D protege contra el melanoma, por lo que debe instarse a las autoridades sanitarias para que insistan en su campaña de prevención frente a las radiaciones solares, sin la protección debida.

Nuevas orientaciones en las encuestas de alimentación

En esa pequeña muestra que hemos comentado representativa de aquellos trabajos que tratan de establecer relaciones, bien sea de riesgo o de protección, entre las dietas y el cáncer, hemos podido ver que los datos de las encuestas se referían a los alimentos ingeridos en el pasado, con los evidentes riesgos por la inseguridad que lleva consigo dicho tipo de toma de datos.

Es por ello que los estudios actuales van en la dirección de obtener datos de lo que se ingiere en el día a día por los encuestados y, transcurridos unos años, establecer los resultados.

Este es el caso del estudio iniciado a finales de 1991 por los epidemiólogos europeos, coordinados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de Lyon (Francia) que tiene el

propósito de ser la mayor investigación del mundo hasta ahora realizada sobre la relación dieta cáncer. En el proyecto que se desarrollará en cinco años, intervienen siete países europeos, y se pretende que se incluyan no menos de 250.000 personas. Los gastos de estudio en cada país serán soportados por cada uno de ellos, y los que correspondan a la coordinación estarán a cargo de la Comisión correspondiente de la Comunidad Económica Europea.

Según los datos conocidos (*Science*, 254, 1448-49, 1991) en el proyecto están participando Italia, con 12.000 mujeres de los alrededores de Milán y Francia, con 98.500 profesores de todos los 95 Departamentos regionales. Posteriormente se han incorporado Inglaterra y España, y para finales de 1993 se esperaba la total integración en el proyecto de Alemania, Grecia y Holanda.

Por lo que respecta a España, son las autoridades sanitarias de diversas Comunidades Autónomas, Asturias, Andalucía (Granada), Murcia, Navarra y el País Vasco, las que se han interesado en el proyecto aportando sus fondos propios, que se complementan con los procedentes del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). Cuentan con un Comité de expertos en nutrición y en la primera fase, se ha elaborado un programa informático para el tratamiento de los datos que deberán solicitar los encuestadores, los cuales han sido instruidos previamente y se les ha provisto de ordenadores personales portátiles.

El colectivo de personas con los que se ha iniciado el trabajo procede del cuerpo de donantes de sangre, inscritos en los bancos de sangre de algunos hospitales. Las cualidades personales de los donantes hace pensar en una buena colaboración al proyecto, y además facilita la recogida de muestras de sangre para ser almacenadas en recipientes frigoríficos de congelación, adecuados al caso. Los datos que corresponden a los días finales del mes de agosto de 1993, nos indican que las encuestas realizadas ascendían a 8.962 personas, estando previsto intentar llegar a las 50.000 cuando el trabajo esté completo.

El propósito del almacenamiento de las muestras de sangre no es otro, que el de poder disponer de ellas en el momento adecuado, a la hora de investigar la presencia en las mismas de aquellos biomarcadores que puedan descubrirse y para los cuales se haya desarrollado la correspondiente técnica analítica de seguridad contrastada; campo este que hemos visto es muy prometedor. Ello será de especial importancia en el caso de aquellas personas a las que durante el desarrollo del proyecto le sea diagnosticado algún proceso canceroso.

Si todo marcha correctamente y el tratamiento informático y estadístico de los datos no se demora en demasía, se espera que para dentro de ocho años se podrán tener ya respuestas sobre qué alimentos se pueden considerar realmente factores de riesgo, y cuales son protectores.

Nadie puede poner en duda el interés del proyecto desde el punto de vista sanitario, pero es evidente una vez más que la validez de sus conclusiones dependerá del correcto desarrollo del mismo, y desde ese punto de vista considero, personalmente, que las dificultades de interpretación de los datos podrán ser muy serias.

La dificultad más importante, insisto a mi entender, es la de qué valor puede tener conocer la frecuencia en la ingestión de determinados alimentos, si no conocemos la composición de los mismos. Se podrá decir que existen tablas con la composición de determinados alimentos, publicados en distintos países, pero bastaría comparar los datos de alimentos iguales para comprobar las marcadas diferencias que pueden observarse.

Se hace pues necesario iniciar cuanto antes, un proyecto coordinado para conocer la composición de los alimentos, estableciendo unas normas rígidas para la toma de muestras, condiciones de almacenamiento y técnicas analíticas que deben seguirse. Deben realizarse estudios paralelos para conocer las modificaciones que pueden sufrir los distintos componentes, tras el proceso de

cocinado, o tras la manipulación a la que puedan ser sometidos para su comercialización.

Sólo así, conociendo lo que realmente ingerimos, y muy especialmente ciertos componentes minoritarios de importancia relevante, podremos llegar a conclusiones realmente válidas y no volver a repetir esas afirmaciones globales sobre frutas en general o sobre productos vegetales, verdes o amarillos, como factores de protección. Lo que hoy debemos contestar es qué componente de esas frutas o vegetales son los responsables del efecto protector, o cuales otros son los responsables del efecto mutágeno-cancerígeno.

Otro aspecto del trabajo que merece un comentario, es el relativo al colectivo de personas a las que se hace el seguimiento de sus dietas, pues aún considerando muy acertada la incorporación del grupo de donantes de sangre -a los que en este momento hago patente mi admiración por su altruismo ayudando con su sangre a restaurar la salud de su prójimo- creo que se podría incrementar el número de participantes, y con ello mejorar los resultados, involucrando en el proyecto al personal sanitario, médicos, farmacéuticos, veterinarios, ATS y demás personal auxiliar, que al vivir más de cerca la enfermedad cancerosa, el cumplimiento de las encuestas, con sus correspondientes formularios, sería óptimo.

Pienso especialmente en los profesionales de la farmacia, que tantas muestras han dado de su sensibilidad con los problemas de la nutrición humana, participando activamente en cuantas campañas han desarrollado las autoridades sanitarias con dicho fin. Los miles de profesionales con su dispersión geográfica, dietas tan diferentes según la región española, su residencia rural y urbana, su arco de edades, que puede sobrepasar con mucho a las que por normas sanitarias vamos a encontrar en los donantes de sangre, son algunas ventajas que, desde el punto de vista de los resultados finales, serían de gran valor. Para la incorporación a un trabajo de este tipo, se está siempre a tiempo, y tengo la esperanza de que estas palabras hayan sido recogidas por quienes, dentro de nuestra profesión, tienen capacidad para poner en marcha la idea.

Finalmente nos queda por comentar lo relativo a las tomas de sangre para su conservación y estudio futuro de posibles biomarcadores. En este caso creo que, independientemente de las muestras conservadas, se podrían hacer análisis inmediatos, tanto en sangre como en orina, de los aductos DNA-carcinógeno o proteínas-carcinógeno, por las técnicas que hemos citado con anterioridad y que podrían constituir unos avances de resultados de lo más valioso, ya que serían la base de nuevos estudios, más profundos, sobre sustancias concretas.

En definitiva, confiemos en que este magno proyecto no se vea interrumpido, sino que por el contrario se perfeccione y amplíe sus horizontes en los años por venir.

Quimioprevención y alimentos protectores

El término de quimioprevención abarca el conjunto de estudios tendentes a determinar la capacidad de una determinada sustancia para evitar el desarrollo tumoral en el organismo humano, en virtud de su posible actuación sobre cualquiera de las fases de dicho desarrollo.

Se trata pues de unas líneas de investigación de las denominadas "calientes", y buena prueba de ello es que sólo el Instituto Nacional del Cáncer de USA subvenciona más de 40 ensayos clínicos, en los que se utilizarán unas 20 sustancias diferentes en un conjunto de personas que esperan alcanzarán las 77.000. Se estudiarán en los tipos de cáncer de mayor índice de mortalidad, pulmón, mama y colon, además de los de piel, cerebro y garganta.

Estas sustancias, a las que se les supone poseer capacidades quimiopreventivas, deberán ser ingeridas por el conjunto de personas que forman parte del ensayo clínico, durante muchos años, de aquí la importancia que tiene establecer con certeza la completa inocuidad del producto, y la ausencia de efectos secundarios para los individuos sanos del conjunto.

Independientemente de los alimentos a los que luego nos referiremos, algunos de los productos químicos objeto de los ensayos son: retinoides, β-caroteno, carbonato cálcico y lactato cálcico, α-tocoferol , ibuprofeno, tamoxifeno, y el menos conocido difluoro-metilornitina.

En lo que se refiere a los alimentos, la dificultad para estudios similares es bien manifiesta, especialmente por la complejidad de sus componentes. De aquí que pueda parecer una utopía el llegar a disponer de un *alimento milagroso* capaz de detener el desarrollo de la enfermedad cancerosa.

El punto de partida, sin embargo, está en la evidencia que se obtiene al estudiar los resultados de los estudios que relacionan dieta y enfermedad cancerosa, de algunos de los cuales ya hemos hecho referencia. Pues bien, de dicho estudio se desprende como evidencia epidemiológica el efecto protector de la ingestión de frutas y verduras frente al desarrollo del cáncer.

Hay un trabajo de Block y cols. (39) en el que se hace una revisión crítica de los estudios publicados sobre dieta, resultando que de 156 en 128 aparecía un efecto protector de frutas y verduras, frente a cánceres diversos, resultados que eran estadísticamente significativos.

El desglose de cifras según el tipo de cáncer, nos muestra que para el cáncer de pulmón el efecto protector aparecía en 24 de 25 estudios; para el cáncer de esófago, cavidad bucal y laringe, eran 28 de 29; para el cáncer de estómago y páncreas, eran, 26 de 30. Menor evidencia aparecía en los estudios sobre el cáncer de colon y de vegija, al ser sólo 23 de 38, mientras que en los de cáncer de próstata la discrepancia con respecto a los anteriores es bien patente, pues de 14 estudios, en solo 4 se manifiesta el efecto protector de frutas y verduras, e incluso en otros 2 se concluye que son perjudiciales.

Ante cifras como las anteriores, no es de extrañar que las autoridades sanitarias en determinados países y en sus campañas de medicina preventiva, aconsejen a la población el consumo diario de cinco tomas de frutas y verduras.

Esto con ser importante, no es suficiente bajo el enfoque de la quimioprevención, de ahí que los esfuerzos se encaminen hacia la identificación de aquellos componentes de las frutas y verduras responsables de los efectos protectores, estableciendo las posibles hipótesis de sus mecanismos de acción.

Los alimentos en los que se han iniciado los trabajos, son aquellos con mayor reputación de ejercer efecto protector y que forman parte del conocimiento general. Tal es el caso del ya famoso *broccoli*, uno de cuyos componentes, un compuesto organosulfurado, apunta como responsable a través de su mecanismo de inducción de enzimas metabólicas, lo que permitirá la eliminación de los agentes cancerígenos en nuestro organismo.

Otros ejemplos los tenemos en diversas especies del género *Allium*, que incluyan el *A. sativum* L., el ajo, *A. cepa* L., cebolla, y el *A. victorialis* L.. Todos ellos contienen compuestos organosulfurados con actividad anticarcinogénica en pruebas con animales de experimentación.

Es de todo punto de vista necesario cuando se pretende realizar un estudio clínico de quimioprevención, el tener la certeza absoluta de que la cohorte de individuos que seguirán el proceso, ingiere el producto que se trate y en las dosis previstas en el protocolo experimental. Si esta premisa no se cumple, los resultados nunca podrán ser aceptados.

Es por esto que al tratar de iniciar un estudio de quimioprevención con el ajo, lo primero en lo que se ha interesado el Instituto Nacional del Cáncer (USA) es el establecer un contrato de trabajo con Weinberg y cols. (40) con el fin de que se proceda al análisis de los componentes de los extractos de ajo, poniendo especial atención

en la búsqueda de aquel componente que pueda servir de marcador para conocer el cumplimiento de su ingestión por parte de los integrantes del grupo, marcador que podrá ser determinado en las muestras de sangre de los mismos. En el trabajo se cita que han identificado y cuantificado nueve diferentes compuestos organosulfurados, requiriendo la técnica analítica de una extracción previa con solventes, y el empleo del acoplamiento de cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masas.

Los compuestos identificados fueron: metil disulfuro, metil trisulfuro, sulfuro de alilo, disulfuro de alilo, trisulfuro de alilo, alil-metil sulfuro, alil-metil disulfuro, alil-metil trisulfuro y etil-2-propenosulfinato. Señalan como dato importante, la inestabilidad de los citados compuestos en los extractos, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de establecer las condiciones que deben cumplirse en los estudio de dietas.

Con similar fin, y también por Weinberg y cols. (41) se estudian los componentes de un extracto de raiz de regaliz, con propiedades anticarcinogenéticas. En este caso, la técnica analítica requiere un proceso de hidrólisis, extracción con solventes y cromatografía líquida - espectrometría de masas, o cromatografía en fase gaseosa - espectrometría de masas.

Se identificaron dos isoflavonoides, formononetina e isoliquiritigenina, y un triterpenoide, el 18β-ácido glicirretínico. Por su concentración, relativamente alta, pueden ser usados como marcadores en el cumplimiento de su ingestión con la dieta.

Otro ejemplo interesante lo constituye el ensayo clínico con una bebida de concentrados vegetales, originalmente desarrollada por la Universidad de Arkansas y ahora en manos del Instituto Nacional del Cáncer (USA). Su composición es la siguiente: jugo concentrado de apio (10%), jugo concentrado de zanahoria (15%) mezcla de especias (35%) y jugo de tomate (40%).

La técnica analítica utilizada en este caso por Weinberg (42) requirió del empleo de la cromatografía en fase gaseosa, acoplada a un espectrómetro de masas. La utilización subsiguiente de un equipo de RMN, facilitó la identificación de los compuestos separados, que fueron los siguiente: 5-metoxipsoraleno, 8-metoxipsoraleno, 5,8-dimetoxipsoraleno, butylidene phthalide, 3-n-butylphtalide, β-cariofileno y α-humuleno.

Desgraciadamente la concentración de estos compuestos es del orden de los nanogramos, lo que hace imposible su utilización como marcadores para controlar el cumplimiento de la ingestión de la citada bebida con la dieta.

Con estos ejemplos he querido destacar cómo a la hora de planificar unos ensayos clínicos incorporando a la dieta determinados alimentos o productos de ellos derivados, lo primero que se investiga es la composición de los mismos, y seleccionar después aquellos compuestos que puedan servir como marcadores que nos aseguren el cumplimiento de su ingestión por la cohorte de individuos incorporados al ensayo clínico. Y hemos visto que para lograrlo, los investigadores han hecho uso de las más sofisticadas técnicas instrumentales analíticas que, como siempre, son "la punta de lanza", la que abre caminos en toda investigación seria, y por eso no podía estar ausente al tratar de estudiar la relación entre la alimentación y el cáncer.

Epílogo

Me gustaría que como visión final de cuanto hemos hablado no quedase en el ánimo de los presentes la más mínima sensación de angustia, al relacionar la alimentación en su parte negativa de la presencia de carcinógenos o pro-carcinógenos, sino que por el contrario dirijan su pensamiento hacia la parte positiva, la de los alimentos protectores, con sus componentes antioxidantes, sus *secuestradores* de radicales libres, sus inductores enzimáticos de desintoxicación, etc.

Lo que es evidente, es que si podemos disponer de los medios necesarios para identificar en los alimentos aquellos componentes capaces de alterar nuestro genoma, a través de mecanismos cuyos pasos sean detectables, se estará en las mejores condiciones para combatir sus efectos, estableciendo los medios necesarios con ese fin.

Espero pues no haber contribuido a ese terror por los tóxicos ambientales que se apodera de grandes núcleos de población, y que se pone de manifiesto en un libro de reciente publicación de E.M. Whelan (*Toxic Terror: The Truth Behind the Cancer Scares. Ed. Prometheus Books*.- Buffalo NY. 1993) con predicciones realmente pesimistas sobre el futuro de la salud humana, con especial incidencia en la enfermedad cancerosa.

Lo que no se puede ocultar es que la posibilidad de que determinados componentes de nuestra alimentación activen alguno de los casi cien oncogenes hasta ahora identificados, es una realidad. Pero ya hemos visto que el Creador no nos dejó indefensos, sino que fuimos dotados de unos Angeles de la Guarda particulares, en forma de esos genes supresores guardianes del genona, con los que colaboran los sistemas reparadores enzimáticos del ADN, que nos mantienen en buen estado de salud. En esa confianza vivimos.

Evitemos pues la ingestión reiterada de aquellos alimentos calificados científicamente como de riesgo, para no sobrepasar la capacidad supresora-reparadora de nuestro organismo, y disfrutemos con moderación de la buena comida y de la buena bebida, mientras Dios nos dé salud para ello, y si es en el seno de la familia o en compañía de buenos amigos, mejor que mejor.

BIBLIOGRAFÍA

(1) LANE, D.P. (1992) *Nature* 358: 15-16.
(2) KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972) *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
(3) YONISH-ROUACH, E. Y OTROS (1991) *Nature* 352: 345.
(4) BRUSCH, W., OBERHAMMER, F., SCHULTE-HERMANN, R. (1992) *TIPS* 13: 245-251.
(5) LOCK, E.A., MITCHELL, A.M., ELCOMBE, C.R. (1989) *Annu. Rev. Pharm.* 29: 145-163.
(6) VAN DEN BOSCH, H. Y OTROS (1992) *A. Rev. Biochem.* 61: 157-197.
(7) REDDY, J.K., LALWANI, N.D. (1983) *Crit. Rev. Toxicol.* 12: 1-58.
(8) KASAI, H., OKADI, Y., NISHIMURA, S., RAO, M.S., REDDY, J.K. (1989) *Cancer Res.* 49: 2603-2605.
(9) GREEN, S. (1992) *TIPS* 13: 251-255.
(10) WEINSTEIN, J.B. (1991) *Science* 251: 387-388.
(11) AMES, B.N., GOLD, L.S. (1991) *Science* 252: 902.
(12) CUNNINGHAM, M.L.,(1990) *Science* 250: 1645.
(13) GUENGERICH, F.P., SCHIMADA, T. (1991) *Chem. Res. Toxicol.* 4: 391-407.
(14) TADA, M., SAEKI, H., OIKAWA, A. (1983) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56: 1450-1454.
(15) NAMIKI, M. (1988) *Adv. Food Res.* 32: 115-184.
(16) GOW-CHIN YEN, JEN-DAN, L. (1992) *J. Agricul. Food Chem.* 40: 1034-1037.
(17) KAWASAKI, Y., GODA, Y., YOSHIHIRA, K. (1992) *Chem. Pharm. Bull.* 40(6): 1504-1509.
(18) CHANG, S.T. (1980) *Bioscience* 30, 399-401.
(19) ORTIZ, R., SÁNCHEZ, R., PÁEZ, A., MONTAÑO, L.F., ZENTENO, E. (1992) *J. Agric. Food Chem.* 40: 1375-1378.
(20) ALLABEN, W.T. (1990) *Korean J. Toxicol.* 6: 167.
(21) GOLD, L.S., STONE, T.H., STERN, B.R., MANLEY, N. B., AMES, B.N. (1992) *Science* 258: 261-265.
(22) DIETRICH, D.R., SWENBERG, J.A. (1991) *Cancer Res.* 51: 3512.
(23) TENNANT, R.W. (1987) *Science* 236: 933.
(24) SANTAELLA, R.M. (1988) *Mutat. Res.* 205: 271-282.
(25) STRICKLAND, P.T., ROTHMAN, N., BASER, M.E. Y POIRIER, M.C. en "**Immunoassays for trace chemical Analysis.** American Chemical Society. 1991. Washington DC.
(26) MARSCH, G.A., JANKOWIACK, R., FARHAT, J.H., SMALL, G.J. (1992) *Anal. Chem.* 64: 3038-3044.
(27) BEACH, A.C., GUPTA, R.C. (1992) *Carcinogénesis* Vol. 13 nº 7, 1053-1074.
(28) CANDELORA, E.C., STOCKWELL, H.G., ARMSTRONG, A.W., PINKHAM, P.A. (1992) *Nutr-Cancer* 17/3: 263-270.
(29) FORMAN, M.R., YAO, S.X., GRAUBARD, B.I., QIAO, Y.Z., MCADAMS, M., MAO, B.L., TAYLOR, P.R. (1992) *Int. J. Epidemiol.* 21(3): 437-441.
(30) GOODMAN, M.T., KOLONEL, L.N., WILKENS, L.R., YOSHIZAWA, C.N., LE-MARCHAND, L., HAUKIN, J.H. (1992) *Eur. J. Cancer* 28(2-3): 495-501.

(31) WYNDER,, E.L., TAIOLI, E., FUJITA, Y. (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* 83(5): 418-423.
(32) ISCOVICH, J.M., L'ABBE, K.A., CASTELLETO, R., CALZONA, A., BERNEDO,A., CHOPITA, N.A., YMELNITZSKY, A.C., KALDOR, J. (1992) *Inst. J. Cancer* 51(6): 851-857.
(33) LA VECCHIA, C., NEGRI, E., DECARLI, A., D'ABANZO, B., GALLOTTI, L., GENTILE, H., FRANCESCHI, S. (1988) *Int. J. Cancer* 41: 492-498.
(34) PETERS, B.K., PIKE, M.C., GARABRANT, D., MACK, T.M. (1992) *Cancer Causes Control* 3(5):457-473.
(35) KUSHI, L.H., SELLERS, T.A., POTTER, J.D., NELSON, C.L., MUNGER, R.G., KAYE, S.A., FOLSOM, A.R. (1992) *J. Natl. Cancer Inst.* 84(14): 1092-1099.
(36) SÁNCHEZ DÍEZ, A., HERNÁNDEZ MEJIA, R., CUETO ESPINAR, A. (1992) *Eur. J. Epidemiol.* 8(2): 233-237.
(37) TUYNS, A.J., KAAKS, R., HAELTERMAN, M., RIBOLI, E. (1992) *Int. J. Cancer* 51(1): 1-6.
(38) WEINSTOCK, M.A., STAMPFER, M.J., LEW, R.A., WILLETT, W.C., SOLER, A.J. (1992) *J. Insvest. Dermatol.* 98(5): 809-811.
(39) BLOCK, G., PATTERSON, B., SUBAR, A. (1992) *Nutr. Cancer* 18: 1-29.
(40) WEINBERG, D.S., MAMIER, M.L, RICHARDSON, M.D., HAIBACH, F.G. (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41: 37-41.
(41) WEINBERG, D.S., MANIER, M.L., RICHARDSON, M.D., HAIBACH, F.G. (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41: 42-47.
(42) WEINBERG, D.S., MANIER, M.L., RICHARDSON, M.D., HAIBACH, F.G. (1993) *J. Agric. Food Chem.* 41: 48-51.