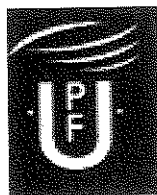


Tesis Doctoral

**“Nitrosaminas y riesgo de
cáncer gástrico”**

**Paula Jakszyn
Instituto Catalán de Oncología**

2006



Departamento de Ciencia Experimentales y de la Salud
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Vida
Universidad Pompeu Fabra

“Nitrosaminas y riesgo de cáncer gástrico”

Memoria presentada por Paula Jakszyn para optar por el título de Doctor por la Universidad Pompeu Fabra. Trabajo realizado bajo la dirección de los Dres. Carlos Alberto González Svatetz y Antonio Agudo Trigueros en el Servicio de Epidemiología y Registro del Cáncer del Instituto Catalán de Oncología y la tutoría del Dr. Jordi Sunyer Deu de la Universidad Pompeu Fabra.

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Vida, bienio 2003-2005

Firma del Director de Tesis
Dr. Carlos A. González Svatetz

Firma del Director de Tesis
Dr. Antonio Agudo Trigueros

Firma del Tutor de Tesis
Dr. Jordi Sunyer Deu

Firma de la doctoranda
Paula Jakszyn

A mi familia

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas que dedicaron parte de su tiempo a aportar comentarios, ideas, sugerencias y a veces tan sólo su compañía, tanto aquí como en la distancia para que este trabajo fuera llevado a cabo.

A mis directores de Tesis: al Dr. Carlos Alberto González, por haberme dado la oportunidad de formar parte del Estudio EPIC y por su confianza y al Dr. Antonio Agudo, por hacer de su despacho un sitio siempre abierto a la discusión y por mostrarme que siempre hay una manera mejor de hacer las cosas.

A los compañeros y ex compañeros del EPIC Barcelona: Michelle, Toni B, Eli L, Guillem, Laia, Raquel, y Reina por su constante y desinteresada ayuda y por que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Sheila Bingham por haberme transmitido y enseñado tanto durante mi breve estancia en Cambridge.

Al Doctor Jordi Sunyer por contribuir a mi participación en este proyecto.

A mis amigos y compañeros del Master de Salud Pública: Olatz, Jorge, Ana, Miquel, Vladi, Maica, Francesc y Estela por tantas horas de debate y amistad.

A mis amigos y compañeros del SERC: en especial a Mireia, Yolanda, Rebecca, Eli G, Cris, Meri, Gina, Michelle, Pitus, por los almuerzos, las charlas y la ayuda de cada día.

A los miembros del EPIC España, en especial a Pilar Amiano, porque gracias al trabajo de tantos años esta Tesis pudo realizarse.

A las personas que conocí al inicio de mi carrera profesional, en especial a Alice, Laura y Alejandra porque todo lo que compartimos y lo que aprendí de ellas me acompaña cada día.

A los participantes de este estudio, ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Y finalmente a Carlos y a nuestro futuro bebé por su amor y por darme la energía necesaria para transitar y crecer durante todos estos años tan lejos de casa

Presentación de la Tesis

“Ciencia es aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

Ortega y Gasset

Esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de publicaciones bajo la normativa de la Comisión de Doctorado del Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, de la UPF (Junio, 2001). De los 5 artículos que se presentan, 3 son trabajos originales que se desprenden del proyecto **EPIC** (European Prospective investigation into Cancer and Nutrition) y del **EURGAST**. En ellos se incluyen resultados en relación al consumo de carnes y nitrosaminas y su relación con el cáncer gástrico. El estudio EPIC está coordinado por la International Agency for Research on Cancer (IARC,WHO) y se inició en el año 1992 en 10 países europeos con el objetivo de analizar el efecto de varios factores ambientales, como la dieta, en el riesgo de cáncer. En el año 2000 se inició el Estudio EURGAST (financiado por el 5º Programa Marco de la UE) con el objetivo principal de analizar la contribución de factores genéticos y ambientales sobre el riesgo de cáncer gástrico. De los otros dos artículos, uno presenta una tabla de composición de alimentos sobre sustancias cancerígenas desarrollada para estimar los niveles de exposición dietética en la población, y el otro es un artículo de revisión de la evidencia existente sobre exposición a nitrosaminas y alimentos fuente de las mismas y su relación con el cáncer gástrico.

Este trabajo fue realizado en el Servicio de Epidemiología y Registro del Cáncer del Instituto Catalán de Oncología. Mi participación en el proyecto comenzó en el año 2002 con una beca predoctoral concedida por Fundación Privada ICO-IDIBELL.

Resumen	1
Introducción	
1. Cáncer Gástrico	5
i. Patología , clínica y diagnóstico	5
ii. Tratamiento y pronóstico	6
iii. Incidencia y mortalidad	7
iv. Etiología	10
– Proceso de carcinogenesis	10
– Factores de riesgo	12
2. Nitrosaminas	
i. Estructura y características	18
ii. Vías de exposición	19
– Exposición Exógena	20
– Exposición Endógena	
Mecanismos y sitios de formación	22
– Nitratos y Nitritos	23
– ATNC (Apparent total Nitrosocompounds)	24
iii. Inhibidores formación de la formación endógena	25
iv. Mecanismos de acción , carcinogenicidad	27
3. Nitrosaminas y cáncer gástrico: evidencia epidemiológica	29
Justificación	31
Objetivos	34
Metodología	
i. Estudio EPIC	36
ii. Estudio EURGAST	39
iii. Exposición a NDMA y nitritos	40
iv. Exposición a nitrosaminas endógenas (ENOC)	40
v. Análisis de datos	41
Resultados	
i. Presentación de resultados	43
ii. Resumen Artículo 1	44
Jakszyn P. World J Gastr 2006 (en prensa)	
iii. Resumen Artículo 2	52
Jakszyn P. J Nutr 2004	
iv. Resumen Artículo 3	57
Jakszyn P. Pub Health Nutr 2006 (en prensa)	
v. Resumen Artículo 4	65
González CA. J Natl Can Inst 2006	
vi. Resumen Artículo 5	76
Jakszyn P. Carcinogenesis 2006	

Discusión

i. Exposición dietética	83
– Niveles de exposición	83
– Fuentes alimentarias	84
– Factores relacionados	85
ii. Carnes como factor de riesgo para CG	86
iii. Nitrosaminas como factor de riesgo para CG	87
iv. Limitaciones	89
v. Implicaciones para la Salud Pública	91
vi. Nuevas líneas de investigación	95

Conclusiones	98
---------------------	-----------

Bibliografía	101
---------------------	------------

Resumen

Antecedentes y objetivos

Los seres humanos estamos expuestos a las Nitrosaminas (NA) a través de la dieta, el tabaco y otras fuentes ambientales, así como por vía endógena, que puede representar entre un 45 -75 % de la exposición total. Estudios previos señalan una relación dosis respuesta entre consumo de carnes rojas y NA endógenas, que podría explicar la relación de las carnes con algunos tumores gastrointestinales. Hay evidencias sólidas de que varias NA son cancerígenas en múltiples especies animales, sin embargo su efecto sobre los humanos no ha sido probado. Por otra parte, son pocos los estudios prospectivos y con metodología apropiada que evaluaron dicho efecto. La incidencia de cáncer gástrico a disminuido en los últimos 30 años, sin embargo es la cuarta causa de cáncer y la segunda en mortalidad por cáncer a nivel mundial. Dada la relevancia del tumor y la plausibilidad biológica de su relación con la exposición a NA, nos planteamos por un lado evaluar la evidencia disponible sobre la relación entre NA y CG y por el otro analizar el efecto de las NA (endógenas y exógenas) y sus alimentos fuente sobre el riesgo de cáncer gástrico en la población Europea.

Metodología

El estudio estuvo formado por 521.457 individuos provenientes del estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) provenientes de 23 centros de 10 países europeos. Los individuos fueron reclutados durante 1992-1994 de los cuales se obtuvo información detallada sobre dieta y otras variables sociodemográficas mediante cuestionarios administrados por entrevistadoras. En una sub-muestra de casos y controles, se analizaron anticuerpos anti-*helicobacter pylori* (*Hp*) y

vitamina C plasmática constituyendo así un caso-control anidado dentro de la cohorte. Fueron identificados mediante registros de cáncer y hospitalarios 330 casos incidentes de adenocarcinoma gástrico luego de 6.6 años de seguimiento. Para evaluar los niveles de exposición a NDMA (Nitrosodimetilamina), la principal NA de la dieta fue elaborada una tabla de composición de sustancias potencialmente cancerígenas. Con el objetivo de predecir los niveles de formación endógena fue creado un índice (ENOC) que estuvo basado en datos publicados previamente.

Resultados

La evidencia proveniente de los estudios caso-control señala un efecto de NA y alimentos fuente de las mismas, sin embargo la proveniente de estudios de cohorte es escasa. No encontramos estudios que hayan evaluado la contribución de las NA endógenas. Los niveles de exposición dietética a NA son relativamente bajos y comparables con los reportados en la literatura. Las principales fuentes alimentarias fueron embutidos, carnes procesadas y cerveza. Observamos un efecto significativo de carne total, roja y procesada, restringida al CG distal. Dicho efecto fue mayor en los individuos infectados con Hp. Cuando analizamos el efecto de la NDMA sobre el riesgo de CG y según localización tumoral, no encontramos ningún tipo de asociación. Por el contrario, el riesgo de CG en la región distal se incremento a medida que aumentan los niveles de exposición a NA endógenas. Como ocurrió con las carnes, el efecto fue mayor en individuos infectados con Hp. Por otra parte, se observo una interacción estadísticamente significativa ($p = 0.01$) entre NA endógenas y vitamina C plasmática (un reconocido inhibidor de la formación de NA). En los individuos con bajos niveles de vitamina C plasmática el efecto de las NA fue tres veces mayor.

Conclusiones

Observamos un efecto de las carnes rojas y procesadas sobre el riesgo de CG en la región distal, principalmente en individuos infectados con Hp. No se observó ningún efecto de las NA exógenas sobre el CG. Observamos un efecto de las NA endógenas sobre el riesgo de cáncer en la región distal del estómago, que fue mayor en individuos infectados y con bajos niveles plasmáticos de vitamina C. Nuestros resultados sugieren una interacción entre estos tres factores en el proceso de carcinogénesis gástrica

Introducción

1. Cáncer Gástrico

i. Patología, clínica y diagnóstico

La mayoría de las lesiones malignas de estómago son de origen epitelial y pueden ser clasificadas como adenocarcinomas (90%) (Stadtlander and Waterbor, 1999). Otros tipos menos frecuentes son el linfoma (4%) y los leiomas, mientras que el rhabdomyosarcoma, y los tumores carcinoides ocurren con muy baja frecuencia. A pesar de la variedad de neoplasias que pueden afectar al estómago, hablaremos de cáncer gástrico (CG) para referirnos específicamente al adenocarcinoma gástrico.

Existen numerosas clasificaciones morfológicas del CG. La más utilizada, por sus implicaciones epidemiológicas y clínicas es la que propuso Lauren en 1965 (Lauren, 1965). En dicha clasificación se incluyen dos categorías: la intestinal y la difusa. El **tipo intestinal** es glandular y produce lesiones que son frecuentemente ulcerativas. Es más frecuente en hombres y en personas mayores, es predominante en áreas donde el CG es epidémico, y presenta generalmente un período precanceroso prolongado (Harrison, 2004). Este tipo de tumor representa un 70 % de los casos de GC en poblaciones de alto riesgo (Henson et al, 2004). El **tipo difuso** está caracterizado por nidos de células sin estructura glandular, que desplazan lateralmente a las células sanas. Ocurre principalmente en personas jóvenes y tiene peor pronóstico (Rodes y Guardia, 2004).

Desde un punto de vista anatómico, se utiliza la distinción de cardias (parte proximal) y no cardias o distal para referirse al resto del estómago. Esta consideración anatómica es de interés, ya que como se comentará posteriormente estos tumores presentan variaciones en incidencia que hacen pensar en etiologías diferentes. Si consideramos datos de población caucásica los tumores de cardias representan entre el 16-37%, con tendencia creciente, mientras que el distal representan un 35-47% con una tendencia decreciente (Wu et al, 2006). Hay un porcentaje importante de los adenocarcinomas que no se pueden clasificar en ninguno de estos subtipos.

Los síntomas del CG son muy variables, inespecíficos y de aparición tardía. Uno de los principales problemas de esta neoplasia es el retraso del diagnóstico. Los síntomas más comunes son dolor abdominal (50-55%), disfagia (12-38%) náuseas (16-26%) y pérdida

de peso (40%) (Harrison, 2004). Cuando el tumor se ha diseminado, los signos clínicos incluyen hepatomegalia, ictericia, ascitis y adenopatías supraclaviculares (ganglios de Wirchow) (Rodes y Guardia, 2004). En aquellos pacientes en los que se sospecha un tumor gástrico el exámen fundamental es la endoscopia digestiva alta. Hasta el momento, no existen marcadores moleculares de utilidad clínica para el screening o el diagnóstico de CG.

ii. Tratamiento y pronóstico

La cirugía es el único método efectivo en el tratamiento primario del CG. Se ha demostrado la eficacia de la quimioterapia para prolongar la supervivencia en el CG, sobre todo cuando la enfermedad está limitada al abdomen y el paciente tiene síntomas mínimos (Harrison, 2004). Algunos estudios sugieren que el adenocarcinoma gástrico es una neoplasia radiosensible. El factor limitante de este tratamiento es la baja tolerancia del estómago y los órganos vecinos. En la actualidad, los esfuerzos se dirigen al tratamiento multidisciplinario de estas neoplasias con la combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia (Rodes y Guardia, 2005).

El pronóstico a largo plazo de los pacientes con CG es relativamente malo. A pesar de mejoras en el manejo pre y post operatorios las tasas de supervivencia son bastante bajas (Rodes y Guardia, 2004). La tasa global de supervivencia a 5 años en Europa es del 21 %. Sin embargo, se observan grandes diferencias entre los países. Países como Austria, Alemania, España, Francia e Italia tienen las tasas más altas (27-30%), mientras que UK, Escocia y Dinamarca las más bajas (12-15 %) (Faivre et al, 1998). Los datos de supervivencia a 5 años en población americana muestran cierta similitud con las tasas Europeas (19.4 %) (Gatta et al, 2000).

iii. Incidencia y Mortalidad

Las tasas mundiales de incidencia de CG varían entre 4-15 veces (Figura 1). Las zonas de más alta riesgo son Japón, China, Europa del este, Portugal y algunos países de Latinoamérica como Colombia y Chile. Por el contrario, la incidencia más baja se observa en países como USA, India, Filipinas, la mayoría de los países de Europa occidental, África y Australia. Las tasas muestran patrones similares entre hombres y mujeres, pero estas últimas son un 50% menores (Plumier et al, 2004). Casi el 60 % de los casos de CG se producen en países en vías de desarrollo (Stewart and Kleihues, 2003). Dentro de Europa destacan por sus elevadas tasas Portugal y Finlandia y por su baja incidencia Francia e Irlanda (Figura 2). España tiene una incidencia intermedia con respecto al resto de los países europeos con una tasa anual ajustada por edad de 15.7 por 100.000 habitantes (Globocan, 2002).

A pesar de las amplias variaciones mundiales descritas, los datos sobre tendencias muestran similares patrones entre los países (figura 3). El CG que continúa disminuyendo, pero aún así es el cuarto más frecuente en incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer (Parkin, 2004). En el año 2002 se estimaron mundialmente 876 000 casos nuevos. En ese mismo año en España se diagnosticaron 8207 casos (Globocan, 2002).

A pesar del marcado descenso global en la incidencia de CG, la evolución de las tasas para las localizaciones en cardias y distal son totalmente opuestas. La incidencia del cáncer de cardias se ha mantenido estable o en algunos casos ha crecido sostenidamente (Botterwerck et al 2000) en Europa y Estados Unidos durante los últimos 30 años. Por el contrario, la incidencia del CG de la porción distal ha declinado considerablemente en el mismo período (Devesa et al, 1998; Parkin, 2004). Paralelamente se observó un incremento en la incidencia de adenocarcinomas de esófago, por lo que se piensa que podrían compartir ciertos factores de riesgo con el cáncer de cardias.

En cuanto a la mortalidad, las tendencias actuales muestran un significativo descenso de las tasas en la mayoría de los países de Europa occidental. Las más bajas se encuentran en Suecia con una tasa de mortalidad ajustada por edad (TMAE) de 6.21, mientras que las más elevadas se observan en Portugal (TMAE 25.42) (Levi, , 2004). España se encuentra en una posición intermedia (TMAE 13.97). En el año 2002, murieron aproximadamente

por CG 647000 personas en todo el mundo. (Parkin, 2004). Durante los años '90, la disminución en la mortalidad por CG fue el principal determinante de la disminución en mortalidad por cáncer en los países de la Unión Europea (Levi et al, 2002). Las razones que podrían explicar este descenso global no son del todo claras, pero las evidencias apuntan a un mejor patrón alimentario y al uso de la refrigeración que ha permitido reducir la utilización de la sal y el ahumado para conservar los alimentos, así como el control de la infección por Hp y la reducción del hábito tabáquico, sobretodo en hombres (Tredaniel et al, 1997).

Figura 1. Incidencia de cáncer gástrico a nivel mundial

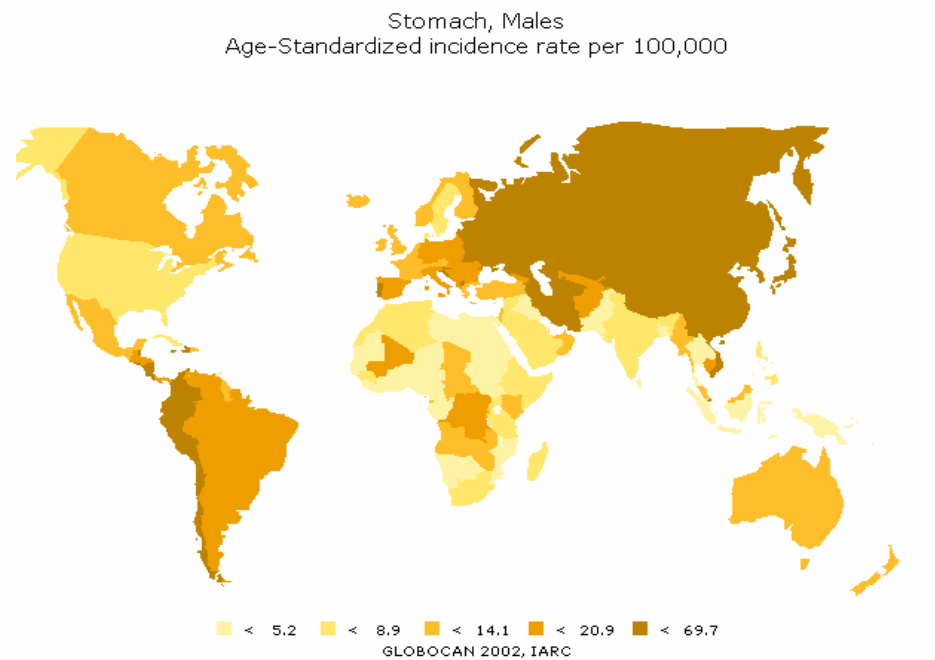


Figura 2. Incidencia de cáncer gástrico en Europa (Hombres, Globocan, 2002)

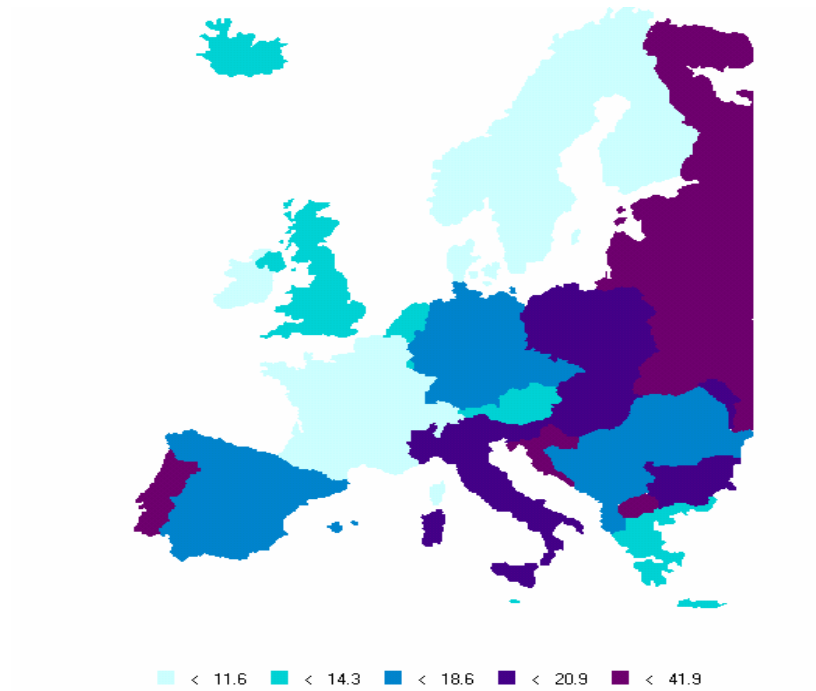
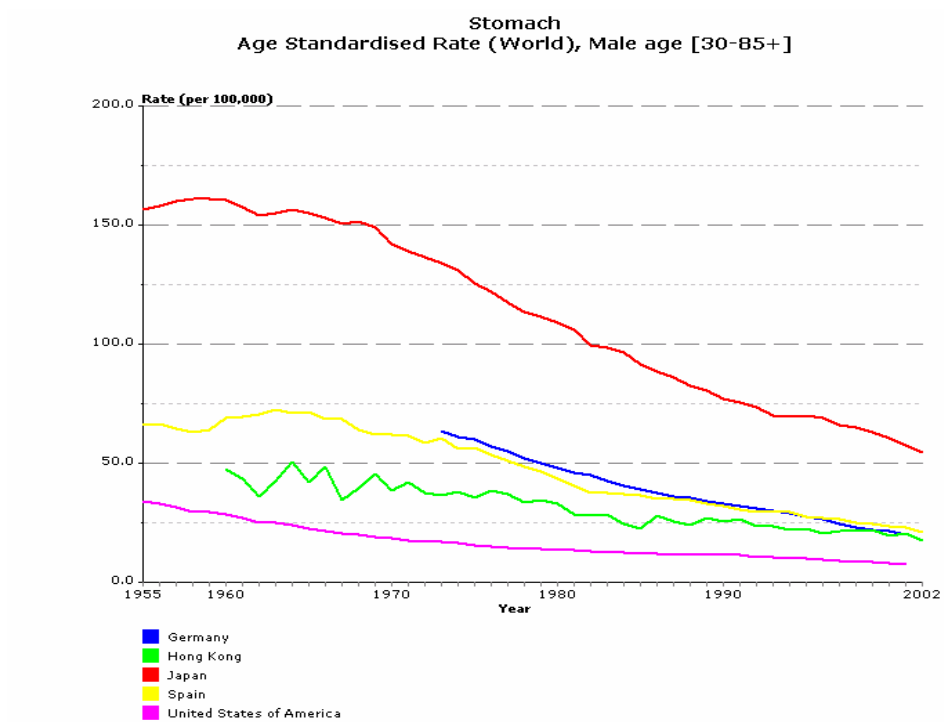


Figura 3. Tendencias (Globocan , 2002)



iv. Etiología

- **Proceso de carcinogénesis**
-

El CG es el resultado de un largo proceso, en el que interactúan diversos factores en diferentes etapas. El proceso se inicia generalmente con una inflamación localizada en el antro, producida por el *Helicobacter pylori* (Hp), que progresa a una gastritis crónica atrófica multifocal en el cuerpo, seguida de metaplasia intestinal y displasia y finalmente el carcinoma (Correa, 1992). Cuando la infección en el antro cursa con alta acidez, por alta secreción de ácido clorhídrico, evolucionaría a una gastritis crónica difusa antral con alto riesgo de desarrollar luego una úlcera péptica duodenal, mientras que el camino a carcinoma cursa con baja acidez y gran pérdida glandular de la mucosa epitelial (Figura 4) (Correa, 1988;1992).

Algunos autores proponen una adaptación del mismo hacia un modelo más dinámico al que denominan “modelo en espiral” (“spiral model”) (Standlander and Waterblood, 1999). Dicho modelo muestra como cada factor de riesgo puede comprimir el espiral, mientras que la disminución en la duración y/o intensidad de la exposición o la interacción con factores protectores puede enlentecer el proceso (Figura 5). Como se observa en los dos modelos propuestos los factores dietéticos pueden actuar en todos los pasos, pero sobretodo en el paso de gastritis atrófica a metaplasia intestinal. En particular, las nitrosaminas (NA) podrían tener un importante rol a este nivel, y como será comentado posteriormente su formación depende entre otras cosas del pH del medio y de la interacción con la vitamina C.

La susceptibilidad genética individual juega un importante papel en diferentes procesos que son de importancia para el desarrollo del CG. Diferentes mutaciones pueden afectar ciertos procesos relacionados con: 1) Protección de la mucosa frente a la infección por Hp y otros carcinógenos 2) Respuesta inflamatoria e inmunológica: afectando el grado de severidad y desarrollo de la infección por Hp, especialmente por la acción de citoquinas que reducen la producción de ácido clorhídrico por parte de las células de la mucosa gástrica 3) Metabolismo de carcinógenos: activación y detoxificación de carcinógenos y protección frente al estrés oxidativo 4) Reparación del DNA frente a mutagénesis causada por formación de aductos con metabolitos reactivos de los carcinógenos 5) Proliferación celular (González et al, 2002).

Figura 4. Modelo de carcinogénesis gástrica (Correa, 1988)

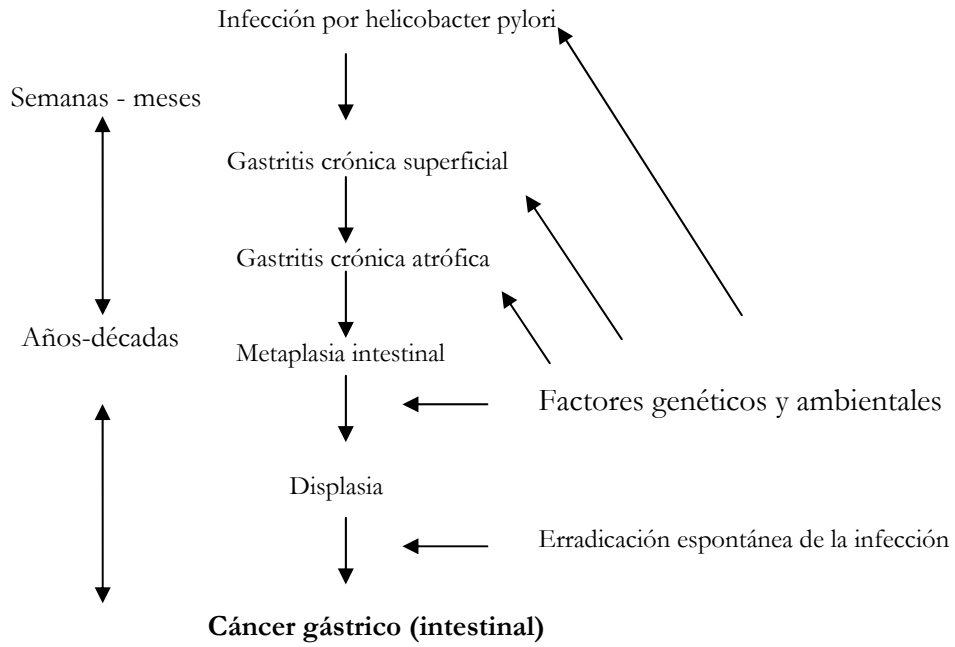
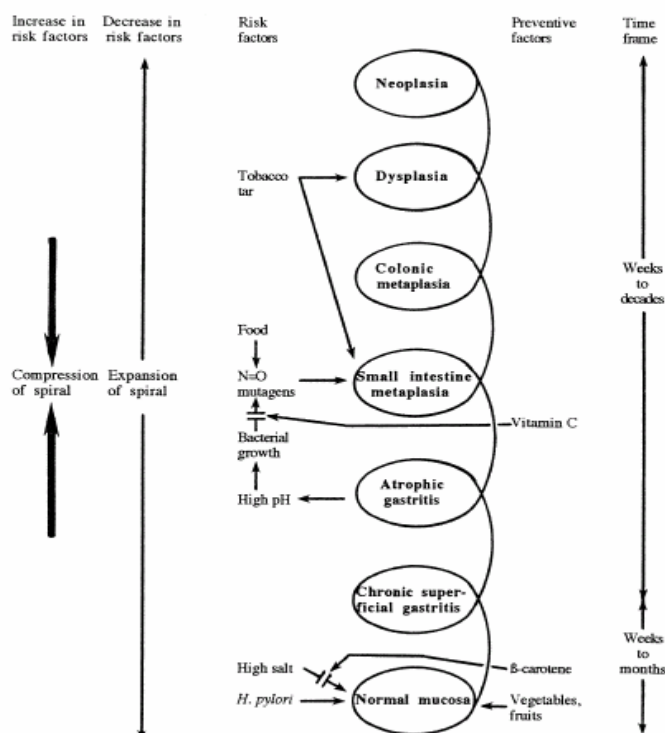


Figura 5. Modelo de carcinogénesis propuesto por Standlander and Waterbor (1999)



- Factores de riesgo

Helicobacter pylori

El Hp es una bacteria gram negativa, microaerofílica, espiroidea, que coloniza primariamente la mucosa gástrica. Fue descubierta en el año 1982 por Warren y Marshall (Warren and Marshall, 1983). La evidencia que relaciona la infección por Hp como causa de CG en humanos fue considerada como **suficiente**¹ por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en 1994. Un meta-análisis publicado en el año 2001 (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001) encontró una OR para la asociación entre Hp y CG de 2.36 (IC 95 % 1.98-2.81). Cuando la asociación fue estudiada por localización tumoral se observó que la infección por Hp no está asociada a los tumores de cardias (OR 1.00 IC 0.7-1.4), mientras que para los tumores distales fue de 2.97 (IC 95 % 2.34-3.77).

¹ Suficiente: La evidencia de una relación causal es definitiva ² Probable: la evidencia es fuerte aunque no definitiva

³ Insuficiente: no hay evidencia suficiente para concluir (WCRE, 1997)

La prevalencia de infección por Hp es de 76 % en países subdesarrollados y 58 % en los desarrollados (Parkin, 2004). Es una infección muy frecuente que se adquiere en las primeras décadas de la vida y sin tratamiento específico puede persistir de por vida ocasionando inflamación aguda y crónica del epitelio gástrico (Feldman, 2001). Datos en población española describen una prevalencia del 50-55 % que se incrementa con la edad (Rafols et al, 2000; Baena-Diez et al, 2002). El incremento de la prevalencia asociado a la edad es principalmente debido a un “efecto cohorte” y no a una adquisición tardía de la infección. Su prevalencia es mayor en individuos con bajo nivel socioeconómico, y que viven en malas condiciones sanitarias (Webb et al, 1994).

Los patrones de infección presentan cierta similitud geográfica con los de CG, ya que el CG es más frecuente en las zonas donde las tasas de infección son más altas. Una excepción es el caso de África (denominado “Enigma Africano”) donde la tasa de infección es muy alta (> 75%), y los casos de CG son poco frecuentes (Holcombe, 1992). En cualquier caso, no se conocen las razones pero solo el 1 % de los pacientes infectados desarrollan el tumor (Parkin, 2004). Es probable que la infección por Hp produzca un ambiente propicio para el daño de la mucosa y que dependa de la interacción con otros factores ambientales y/o genéticos que unas personas progresen a CG y otras no.

Se ha postulado que el control de la infección por Hp previene la progresión de lesiones preneoplásicas a carcinoma gástrico. Aunque algunos modelos experimentales muestran resultados positivos de la erradicación del Hp como medida preventiva para el CG (Shimizu et al, 2000, Tatematsu et al, 2005), sin embargo su efecto beneficioso en estudios epidemiológicos es controvertido (Correa et al, 2000; Forbers et al, 1996). Además, los resultados provenientes de un estudio randomizado realizado en un área de alto riesgo de CG en China, han mostrado que el tratamiento erradicador no reduce en forma significativa el riesgo de CG (Wong et al, 2004)

Factores dietéticos y del estilo de vida

Vegetales y Frutas

En el año 1997 la WCRF (World Cancer Research Foundation, 1997) sugirió que hay evidencia **suficiente**¹ de que la ingesta elevada de vegetales y frutas reduciría el riesgo de CG. Dos meta-análisis publicados posteriormente (Norat and Riboli, 2002; IARC, 2003) muestran que el efecto es más fuerte para frutas que vegetales. Un meta-análisis publicado recientemente que solo incluyó estudios de cohorte encontró un efecto protector significativo de frutas pero no de vegetales (Lunet et al, 2005). Ninguno de los estudios tuvo en cuenta el efecto de la infección por Hp. En el mismo año fueron publicados los resultados del estudio EPIC en el cual se observó un efecto protector de las frutas cítricas para los tumores de cardias y de ciertos tipos de vegetales para los tumores de tipo intestinal (González et al, 2005).

Alcohol

Según el report de la WCRF es **probable**² que el consumo elevado de alcohol no este asociado con el CG (WCRF, 1997). A pesar de que la evidencia sustenta que no habría relación con GC, varios estudios sugieren que el alcohol podría incrementar el riesgo de cáncer de cardias (Wu-Williams et al; 1990, Palli et al, 1992, González, 1994a). Por el contrario, estudios más recientes no encuentran ninguna asociación (Lagergren, 2000; Lindbland, 2005).

Tabaco

La relación causal entre tabaco y CG ha sido controvertida en los últimos 20 años. En el año 2002 ha sido clasificado finalmente como cancerígeno para el estómago por la IARC (IARC, 2002). El tabaco contiene cantidades importantes de nitrosaminas (NA), aminos heterocíclicas (AH) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre otras muchas sustancias, algunas de cuales han sido clasificadas por la IARC como cancerígenos para el ser humano.

¹ Suficiente: La evidencia de una relación causal es definitiva ² Probable: la evidencia es fuerte aunque no definitiva

³ Insuficiente: no hay evidencia suficiente para concluir (WCRF, 1997)

Estudios recientes muestran que el riesgo de CG se incrementa con la intensidad y la duración del hábito tabáquico y que los efectos son más fuertes en cardias. Este estudio concluye que el 20% de casos de GC en países europeos participantes del EPIC (European Prospective investigation into Cancer and Nutrition) podrían atribuirse al tabaco (González, 2003).

Alimentos salados / sal

Se considera **probable**² que el riesgo de CG se incremente con un consumo elevado de alimentos conservados (salazón) y con la ingesta de sal. La ingesta de sal y alimentos salados conlleva a la irritación de la mucosa gástrica produciéndose un aumento de la respuesta inflamatoria, aumento de la síntesis de ADN y proliferación celular (Charnley and Tannenbaun, 1985; Ames and Gold, 1990). Estos cambios proliferativos podrían acentuar el efecto de los cancerígenos de la dieta sobre la mucosa gástrica. Por otra parte, se considera **suficiente**¹ la evidencia de que el uso de refrigeración ha permitido reducir el riesgo de CG por contribuir a la disminución de la utilización de sal y métodos de conservación como el ahumado como medida para prolongar el consumo de ciertos alimentos como la carnes y pescados (van der Brant et al, 2003).

Carnes curadas y nitrosaminas

Según la WCRF es **insuficiente**³ la evidencia para considerar a las nitrosaminas (NA) o alimentos fuente de las mismas como factores de riesgo para el desarrollo de CG. Sin embargo, investigaciones en animales tienen resultados concluyentes por lo cual se considera a estas sustancias como potentes carcinógenos en múltiples especies animales (Bogovski and Bogovski, 1981) .Como será comentado en detalle en el apartado siguiente, analizar la exposición a dichas sustancias tiene bastantes dificultades y en muchos casos los estudios realizados tienen importantes limitaciones que podrían tener implicancia en la falta de efecto reportado.

¹ Suficiente: La evidencia de una relación causal es definitiva ² Probable: la evidencia es fuerte aunque no definitiva ³ Insuficiente: no hay evidencia suficiente para concluir (WCRF, 1997)

Carnes rojas

La evidencia de que la carne como tal, es decir, independientemente de su método de cocción o conservación, es un factor de riesgo para el CG fue considerada como **insuficiente**³. El concepto insuficiente se refiere a que son pocos los estudios que evaluaron dicha asociación, por lo que serían necesarios más estudios prospectivos para obtener resultados concluyentes. Por otro lado, estudios posteriores sugieren que las carnes rojas frescas podrían ser sustrato para la formación endógena de NA (Bingham, 1996), y esto no estaría en relación con ningún método de cocción y / o conservación. Estos estudios ponen de manifiesto la importancia de estudiar el efecto del consumo de carnes sobre el desarrollo de cáncer.

Susceptibilidad genética

La gran variabilidad en las tasas incidencia de CG a nivel mundial ha sido asociadas con variante alélicas de diferentes genes (polimorfismos) que están presentes en una parte significativa de la población normal.

Los factores de susceptibilidad genética involucrados en el proceso de carcinogénesis gástrica incluyen polimorfismos de genes que codifican para proteínas de la mucosa gástrica (mucinas y péptidos “*trefoil factor*” (*TFF*)) esenciales para la protección del epitelio, de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (interleuquinas) y de genes metabólicos, entre otros. A partir del año 2000 se publicaron estudios sobre la influencia de genes relacionados con respuesta inflamatoria y su interacción con el Hp. Aunque la mayoría de los estudios hasta la fecha indicarían una interacción entre las variantes que aumentan la producción de interleuquinas y el Hp (El Omar 2000, Perez-Perez and Israel 2005), no hay suficientes estudios prospectivos que evalúen si el efecto es diferente según el tumor sea intestinal o difuso.

¹ Suficiente: La evidencia de una relación causal es definitiva ² Probable: la evidencia es fuerte aunque no definitiva ³ Insuficiente: no hay evidencia suficiente para concluir (WCRF, 1997)

En relación a los polimorfismos de genes metabólicos que intervienen en la detoxificación y / activación de cancerígenos presentes principalmente en el tabaco (NA, AH e HAP), hay algunos que podrían estar asociados el CG. Resultados provenientes del EURGAST muestran una asociación entre CYP1A1, CYP1A2, EPHX1 y GSTT1 (Agudo, datos no publicados), mientras que no se encontró asociación con CYP2E1, GSTM1, NAT1, NAT2 (Agudo et al, 2006).

2. Nitrosaminas

i. Estructura y características

Los Nitrosocompuestos (NOC) fueron identificados por primera vez en 1863 por Geuther (Geuther, 1863), y en 1937 se describieron efectos tóxicos en humanos (Freund, 1937). En 1961, Ridd señaló que los NOC podrían formarse a partir de la reacción de un agente nitrosante con una amina o amida secundaria. Dependiendo si la unión se realiza con una amina o amida, estas sustancias pueden ser clasificadas como N-Nitrosaminas (NA) o N-nitrosamidas (Ridd, 1961).

Dado que las nitrosaminas son las más estudiadas y las que se encuentran más extensamente en los alimentos a partir de ahora nos centraremos en este grupo de sustancias. Estas sustancias comparten una estructura general (Figura 6), aunque se han identificado varios tipos de NA (Figura 7). De ellas algunas han sido clasificadas como cancerígenas en experimentación animal: la N-Nitrosodimetilamina (NDMA), la N-Nitrosodietilamina (NDEA), y la N-Nitrosopiperidina (NPYR) y la Nitrosoetilamina (NEMA); mientras que la N-Nitrosoprolina (NPRO) no se considera con potencial carcinogénico (IARC, 1994).

Figura 6. Estructura general de las nitrosaminas

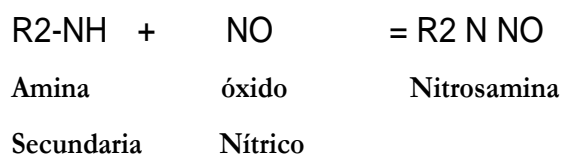
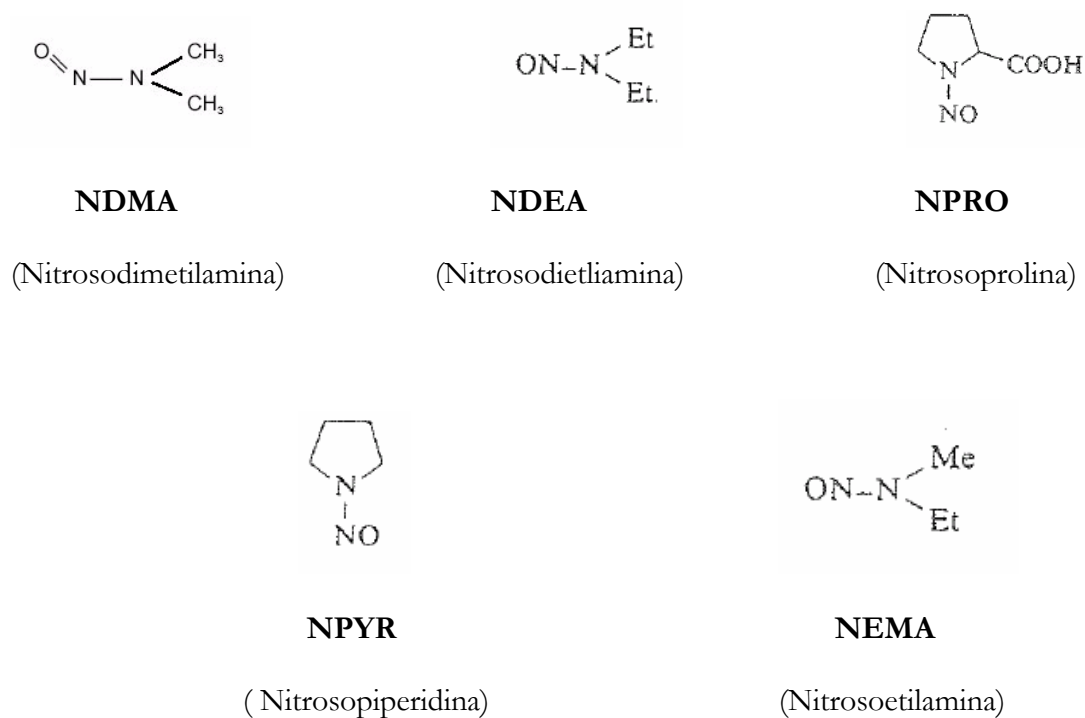


Figura 7. Estructura química de las principales nitrosaminas



ii. Vías de exposición

El nivel de exposición individual a las nitrosaminas depende de la dieta, el estilo de vida y ocupación de un individuo. La exposición puede darse por vía **exógena**, a través de la ingesta de NA preformadas que están presentes en los alimentos, el consumo de tabaco y/o la exposición laboral o por vía **endógena**, donde las NA son sintetizadas en el cuerpo a partir de precursores provenientes de la dieta (Figura 8).

- Exposición exógena

Ocupacional

Se han descrito niveles elevados de NA en las industrias del cuero, el caucho y el metal (Fajen et al, 1979; Spiegelhalter and Preussman, 1983). Los materiales utilizados para su vulcanización pueden desintegrarse liberando aminas secundarias que luego reaccionan con agentes nitrosantes en el ambiente para formar NA (Spiegelhalter and Preussman 1983). Numerosos estudios han demostrado un aumento de la incidencia de tumores de vejiga en los trabajadores de dicha industria (Kogevinas, 1998). Sin embargo, si analizamos la evidencia en relación a CG, solo un estudio de cohortes de expuestos ocupacionales observó un incremento del riesgo aunque no fue significativo (OR: 1.2 IC 95 % 0.5-2.5) (Straif, 2000).

Tabaco

Se han descrito más de 4800 componentes químicos en el tabaco (Hoffmann, 2001), 81 de los cuales han sido clasificados como cancerígenos para el ser humano (IARC, 1994). El humo del tabaco contiene óxidos de nitrógeno que pueden reaccionar con agentes presentes en la nicotina y formar NA específicas del tabaco (4- (methilnitrosamina)-1- (3-piridil)-1-butanona) (NNK) y la NNN (nitrosornicotina). Un individuo que fuma un promedio de 20 cigarrillos al día está expuesto a un rango de 16-86 ug/día de NA (Preussman, 1984). Las NA específicas del tabaco son potentes cancerígenos en roedores y probablemente explicarían parte del efecto del tabaco en el cáncer de pulmón, vejiga y estómago (Hecht and Trushin, 1988; Preston-Martin, 1987).

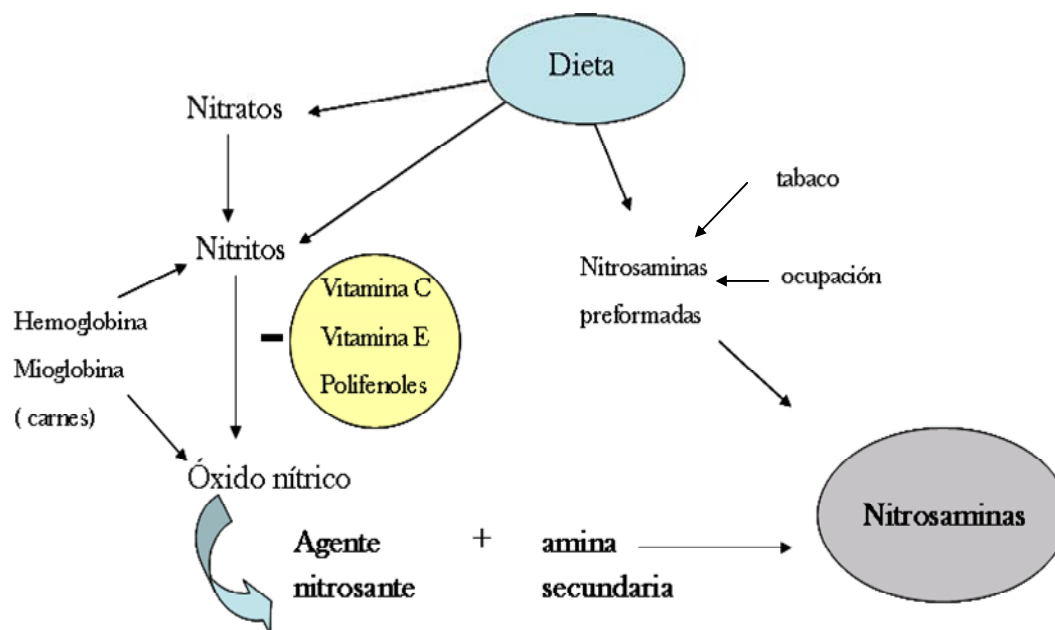
Dieta

Estimaciones sobre exposición muestran que el aporte de NA preformadas a través de la dieta representa un 72 %, seguido de la exposición ocupacional (25%), tabaco (2%) y otras fuentes 1 %. Datos de población americana muestran niveles de exposición total a NA en la población general es de 1.10 mmol/ día aproximadamente (US Assembly of Sciences, 1981), aunque hay variaciones según el país y el período considerado. Además de ello, es importante señalar que las variaciones en niveles pueden deberse también a

diferencias en las metodologías utilizadas, debido principalmente a la ausencia de tablas de composición de sustancias potencialmente cancerígenas en los alimentos completas y actualizadas

La presencia de NA en los alimentos se debe a diferentes procesos realizados para su elaboración. Los más importantes son el curado, el ahumado, el deshidratado y la salazón (Hotchkiss et al, 1989; Tricker and Preussman, 1991). Debido a ello, las principales fuentes de estos compuestos son las carnes procesadas, los productos curados y ahumados y las bebidas a base de malta como la cerveza y en menor medida el whisky (Walker , 1990). La ingesta de dichas sustancias se ha reducido en los últimos años debido a modificaciones en las técnicas empleadas por la industria alimentaria. La reducción lograda es tan importante que se señala como una de las posibles causas de la disminución del CG en los países desarrollados (Walker , 1990).

Figura 8. Fuentes de exposición a las nitrosaminas



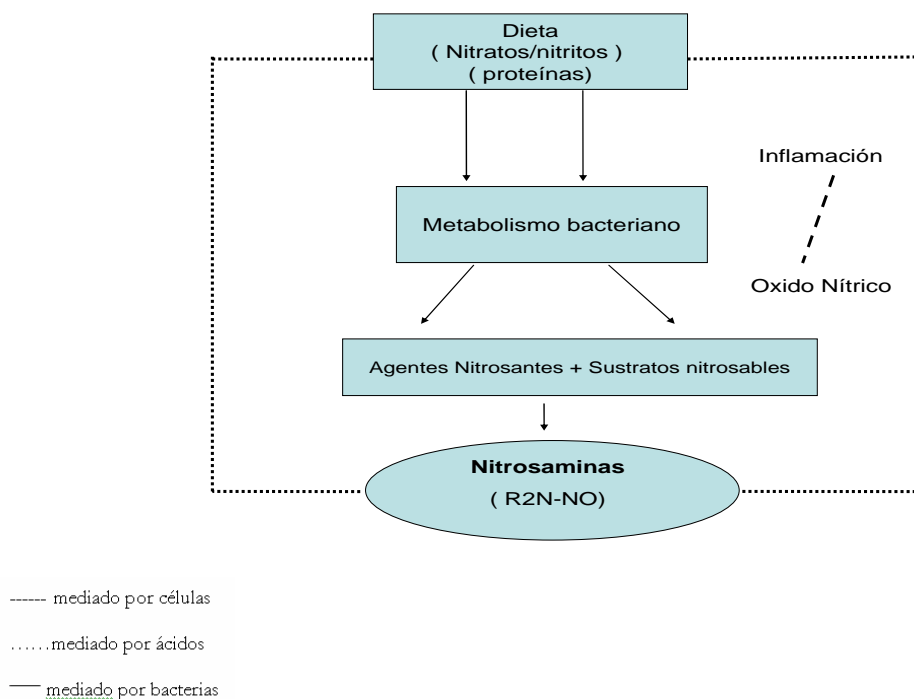
Exposición endógena

Mecanismos y sitios de formación

Los primeros estudios que evaluaron la formación endógena de NA fueron llevados a cabo por Oshima en la década del 80 (Oshima, 1986). Estos estudios cuantifican la presencia de NPRO, un tipo de NA, en orina. El compuesto elegido fue la NPRO porque es una de las NA que se ha sido considerada sin potencial carcinogénico (IARC, 1994). El procedimiento consiste en administrar a un individuo por vía oral nitrato y L-prolina y luego evaluar sus niveles de excreción en orina en las 14 horas posteriores. A través de estos estudios se observó que el nivel excretado era mayor al suministrado por vía oral sugiriendo que una parte importante de la NPRO eliminada por orina era sintetizada en el cuerpo humano.

La formación endógena de las NA puede darse por diversos mecanismos biológicos mediados por ácidos, bacterias o vías celulares (Mirvish, 1995) (Figura 9). Estas reacciones pueden darse en diversos sitios del organismo, como el estómago, la vejiga urinaria, y el intestino delgado y grueso (Hill, 1996).

Figura 9. Vías de formación endógena



El interés sobre el intestino como sitio de formación de NA surgió cuando fueron reportadas por primera vez en materia fecal (Wang et al, 1978). En el año 1993 investigaciones realizadas por Pignatelli sugerían que el sitio principal de formación de NA sería el intestino y no es el estómago (Pignatelli et al, 1993). Los niveles de NA medidos en jugo gástrico (1-1.5 nmol/g) son mucho menores de los que se encuentran en muestras de materia fecal (8.4 nmol /g). (Pignatelli et al, 1987).

Nitratos y Nitritos

La dieta además de aportarnos NA preformadas puede ser la vía de entrada de nitratos y nitritos que son sustratos para la formación endógena de NA. Los vegetales aportan aproximadamente el 80% de la ingesta diaria de nitratos, encontrándose la mayor concentración en la remolacha, el apio, el rábano, la acelga y la espinaca (Walter, 1990; Cornee, 1992) aunque existe variabilidad dependiendo del tipo de fertilizantes usados en su cultivo. El agua de consumo de pozo puede ser una fuente importante dependiendo del contenido de nitratos en el suelo. En algunos países se ha estimado que el 10% de la ingesta de nitratos provenía del agua (Sugimura, 2000). El promedio estimado de ingesta diaria de nitratos por persona en Francia fue de 120,9 mg/día. Los nitritos tienen dos fuentes principales: un 40% proviene de vegetales frescos o conservados, y el resto de la carne curada y preservada y de los cereales (Cornee, 1992). Los nitritos tienen propiedades bactericidas y el nitrito sódico se usa como conservante en la prevención del botulismo, especialmente durante el proceso de curado de la carne (Walters, 1992). En Francia la ingesta promedio se ha estimado en 1,9 mg por persona y día (Corneé, 1992). Hasta el momento no hay estudios en España que estimen el nivel de exposición dietética poblacional.

El nitrato (NO_3^-) es reducido a nitrito (NO_2^-) por las bacterias de la saliva y también en el estómago (Ralt and Tannenbaun, 1981). Aproximadamente un 25 % del nitrato ingerido recircula en la saliva, y un 20 % del mismo es convertido en nitrito. Del nitrito que llega al estómago, 20% proviene de los alimentos, mientras que el 80 % proviene de la reducción del nitrato en la saliva. La formación de nitritos a partir de nitratos se realiza en el estómago y se incrementa cuando aumenta el ph, lo que ocurre como consecuencia de la infección crónica por *Hp*. Bajo circunstancias específicas, como la gastritis crónica, los nitritos pueden oxidarse en el estómago a agentes nitrosantes (N_2O_3 , N_2O_4) y reaccionar con aminas secundarias para formar N-nitrosocompuestos. La formación

endógena representa entre un 45 % y un 75% de la exposición total de NOC (Mirvish, 1991).

ATNC (Apparent total Nitrosocompounds)

Una de las técnicas utilizadas para la determinación de NA endógenas es la que identifica ATNC. El término ATNC es usado cuando el método utilizado para determinar los Nitrosocompuestos (NOC) en materia fecal detecta la presencia de un grupo nitroso (Pignatelli, 1987). Si otros compuestos que contienen este grupo, como por ejemplo los S-nitrosothioles, están presentes en la muestra también pueden dar una respuesta positiva y debido a ello se utiliza del término “ aparente”. Investigaciones posteriores realizadas por el grupo de S. Bingham en Cambridge (Cross et al, 1998; Hughes et al, 2001; Bingham et al, 1996; Silvestre et al, 1995), midieron estas sustancias en la materia fecal de voluntarios a los cuales les administraron dietas con diferentes cantidades de carne roja fresca. En todos los ensayos realizados observaron una clara correlación entre los niveles de ingesta de carne y los de ATNC medidos en $\mu\text{g}/\text{día}$. Estos estudios sugieren que el sustrato más importante para la formación endógena de NA serían las carnes. Estos estudios muestran una relación dosis-respuesta entre el consumo de carnes rojas y la formación intestinal de NA. Otra consideración importante es que cuando administraron cantidades similares de carnes blancas (como el pollo o el pavo) o alimentos proteicos de origen vegetal no encontraron esta asociación.

La carne roja contiene hierro el cual es parte integral de la enzima nitrato reductasa. Dicha enzima cataliza la transformación de nitrato a nitrito y podría explicar dicho efecto. Por otro lado, debido a la reacción del nitrito con la mioglobina o la hemoglobina (carnes) se pueden formar N-Nitrosohemoglobina y N-Nitrosomioglobina (Bonnet et al, 1975). Además, el Oxido nítrico puede reaccionar directamente con la hemoglobina y la mioglobina para formar NOC (Wade and Castro, 1990) (Figura 9). Los estudios confirman que los niveles de NA endógenas son mucho mayores que los exógenos, ya que dietas con 600 g de carne proveen 13 μg de NA preformadas, mientras que los niveles reportados fueron de 190 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Silvester et al, 1995). Los individuos con alto nivel de consumo de carnes tuvieron valores ATNC similares a los que estaría expuesto un individuo fumador a través de las NA específicas del tabaco (Bingham et al, 1996).

iii. Inhibidores de la formación endógena

Las sustancias que tienen la capacidad de destruir agentes nitrosantes o reducirlos a productos no reactivos pueden inhibir la formación de NOC. Datos provenientes de estudios que utilizan modelos con NPRO para evaluar la formación endógena señalan como potentes inhibidores al ácido ascórbico, el alfa tocoferol, y los polifenoles (Ohshima and Barsth, 1981; Stich et al, 1984).

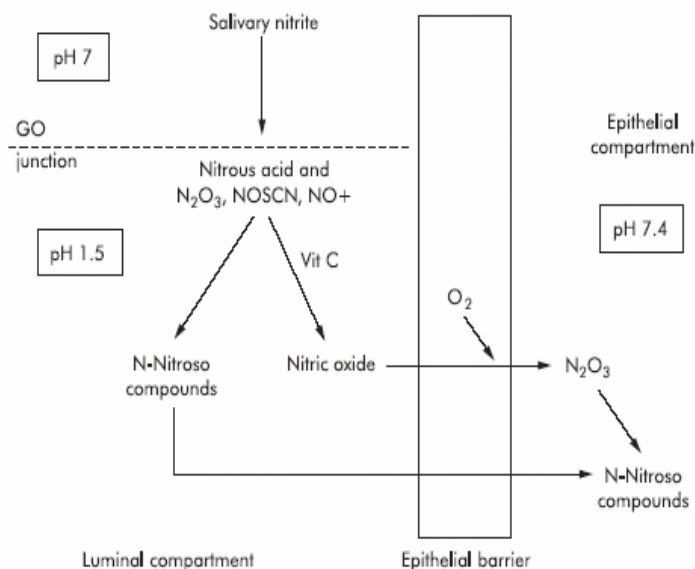
Acido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es una vitamina hidrosoluble y un potente agente reductor. El AA es secretado dentro de jugo gástrico y tiene un importante rol previniendo la nitrosación. Esto lo hace por competencia con las aminas secundarias mediante la acidificación del nitrito. En esta reacción el nitrito acidificado es reducido a ON (óxido nítrico) y el AA es oxidado a ácido dehidroascórbico. Existen dos mecanismos que involucran al ON y al AA en la nitrosación. El primero involucra la producción de concentraciones altas de ON en el la luz que provienen de la reacción entre el nitrito de la saliva y el AA del jugo gástrico. Este ON difunde dentro del epitelio y las células formando especies nitrosantes las cuales pueden dañar directamente el DNA (Wink et al , 1999). El segundo mecanismo comprende la generación de especies nitrosantes dentro del lumen debido a la acidificación del nitrito por una baja concentración de AA. Estas especies nitrosantes reaccionarán con compuestos nitrogenados para formar NOC. El primer mecanismo es promovido por la presencia de AA, mientras que el segundo por su ausencia. Todo depende de las condiciones del medio presentes en ese momento .Por ello las modificaciones del Ph que se dan en los procesos inflamatorios pueden influir para que un mecanismo prevalezca sobre el otro .Ambos mecanismos pueden operar en el mismo sitio pero no simultáneamente (Suzuki, 2006)(Figura 10).

Hay evidencias que sugieren que la infección por Hp reduce los niveles de AA en jugo gástrico (Sobala et al, 1993; Rokaas et al, 1995). Datos provenientes de un estudio realizado en UK muestran que los niveles de AA en individuos infectados fueron significativamente más bajos que en individuos normales (Zhang, 1998) Otro estudio realizado en 6746 individuos americanos mostró una relación inversa entre niveles plasmáticos de vitamina C y seroprevalencia a Hp (Simon et al, 2003). Bajo esta premisa podría especularse que los individuos infectados estén más susceptibles de estar

expuestos a las NA, por tener menores niveles circulante de AA, incrementando así los factores de riesgo presentes para desarrollar un tumor.

Figura 10. Reacciones químicas entre el nitrito y el ácido ascórbico



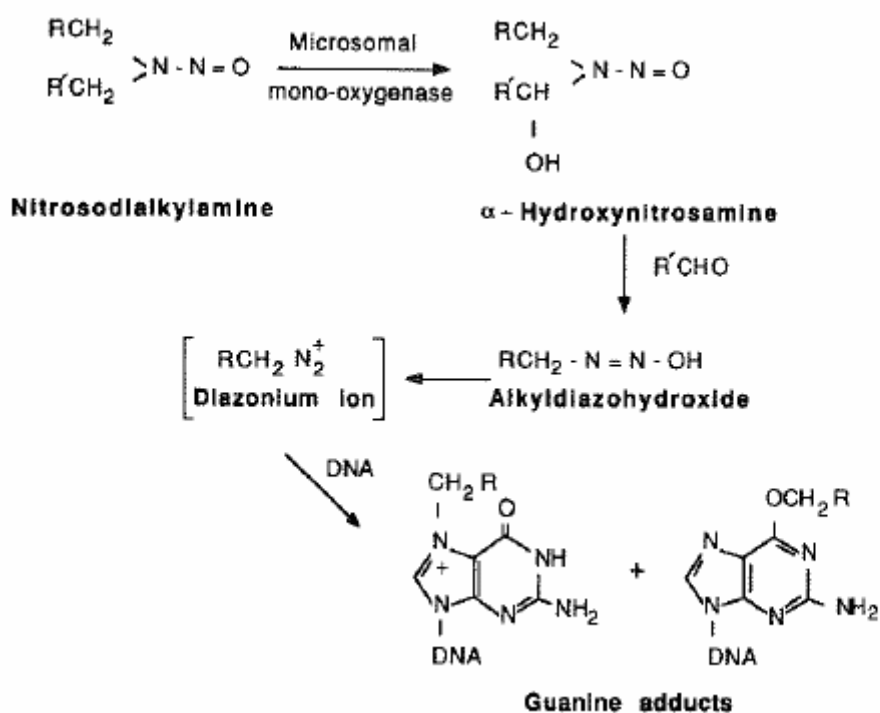
iv. Mecanismos de acción, carcinogenicidad

La carcinogenicidad de los NOC ha sido evaluada en más de 39 modelos animales. Los resultados demostraron que estas sustancias producen tumores en varias especies y órganos (Bogovski and Bogovski, 1981). Análisis posteriores demostraron que cerca del 85 % de las NA parecen ser cancerígenas (Mirvish, 1995).

La propiedad química más relevante de las NA es su capacidad mutagénica, ya que puede convertir sustancias electrofílicas en agentes alquilantes. Dichas agentes tiene la capacidad de reaccionar con el ADN alterando la configuración de sus bases e iniciar el proceso de carcinogénesis (Saffill et al, 1985). Las NA tiene la capacidad de reaccionar con el ADN en diversos sitios, aunque el principal sitio de alquilación es la posición N-7 de la guanina. Las primeras determinaciones de aductos de ADN en tejido humanos fueron las provenientes de muestras de hígado de una autopsia realizada por un caso fatal de intoxicación por NDMA (Herron and Shank, 1980). Las NA son estables a PH neutro y

requieren activación metabólica *in vivo* para producir un efecto. Por lo tanto, pueden producir tumores en variedad de órganos, aún si estos están alejados del sitio de exposición. Las enzimas del citocromo P450 son las responsables de la activación metabólica de las NA (Figura 11). Dicho proceso se produce por hidroxilación del átomo de carbono adyacente al grupo amino. Luego de activarse se forman intermediarios que pueden descomponerse espontáneamente hasta dar agentes alquilantes aptos para reaccionar con las zonas nucleófilas del ADN (Margison and O'Connor, 1979)

Figura 11. Bioactivación de las Nitrosaminas



3. Nitrosaminas y cáncer gástrico: evidencia epidemiológica

Cerca del 90% de las NA han sido clasificadas como potentes carcinogénicos en múltiples órganos de más de 40 especies animales (Bogovski and Bogovski, 1981, Walker, 1990; Tricker, 1991). Sin embargo, no hay evidencias suficientes para considerarlas cancerígenas en el ser humano.

La International Agency for Research on Cancer (IARC) incluye a algunas de las NA (NDMA, NDEA) dentro del grupo 2A, como probables cancerígenos (IARC, 1994). Es importante recordar que, aunque la exposición se ha reducido, estos compuestos son cancerígenos aún a pequeñas dosis, y que las NA son más efectivas como cancerígenos en animales cuando se aplican en dosis pequeñas y repetidas en comparación con una dosis alta aislada (Walker, 1990). Otros tipos, como la NNN/ NNK (NA específicas del tabaco), están clasificadas como cancerígenos para el ser humano por la IARC (IARC, 1994). Sin embargo, como fue comentado anteriormente, el informe de la WCRF (WCRF, 1997) considera insuficiente la evidencia disponible para considerar a las NA como factores de riesgo para el CG.

Una revisión posterior publicada por Eicholzer y Gutzwiller en el año 1998, hace también referencia a la débil asociación que sustenta la evidencia en cuanto al efecto de los nitritos y NA sobre el CG (Eicholzer and Gutzwiller, 1998). El artículo hace hincapié en varias limitaciones de estos estudios entre las que se incluyen: la falta de evidencia provenientes de estudios de cohorte, la utilización de estimaciones de alimentos fuentes como una aproximación de los niveles de exposición (en lugar de estimar la ingesta de nitritos y NA) y la falta de información sobre exposición endógena, entre otros.

Luego de esa revisión se realizaron varios estudios caso-control y algunos de cohorte en los que se evaluó el riesgo de CG en relación a exposición a NA y alimentos fuentes de las mismas. A pesar de que varios estudios caso-control (La Vecchia et al, 1995; De Stefani et al, 1998; Pobel et al, 1995) sugieren una asociación, el único estudio de cohortes no encuentra ningún efecto (Knekt et al, 1999). Una de las principales limitaciones de este estudio es su limitada potencia y reducido número de ítems alimentarios que se incluyen en su cuestionario. Los estudios que realizaron estimaciones indirectas a través de alimentos fuente de las mismas como carnes procesadas, embutidos varían sustancialmente en el número de ítems alimentarios que incluyen y las metodologías

utilizadas. Los resultados como cabe esperar son bastante diversos, si bien varios de ellos encuentran un efecto (van der brant et al, 2003; Ngoan et al, 2002; Boeing et al,1991; Zhang et al,1997; Ward et al,1997).Si analizamos la evidencia sobre la ingesta de carnes rojas sobre el riesgo de CG, los datos provenientes de los estudios caso-control encuentran un efecto. Sin embargo es importante tener en cuenta que la carne puede ser conjuntamente sustrato para la formación endógena de NA, así como fuente de otras sustancias cancerígenas como aminos heterocíclicos (AH) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).Solo uno (Ito et al, 2003) de los tres estudios de cohorte publicados encuentra un efecto (Ngoan et al, 1996 y 2002; Ito et al, 2003)

Por otro lado, hay también publicados estudios que evalúan la relación entre nitritos y CG, por ser estos precursores de la formación de NA. Como ocurre en los casos anteriores los resultados no son concluyentes, aunque la mayoría de los estudios caso-control señalan un efecto (Buiatti et al 1985; González et al, 1994b; La Vecchia et al, 1995; Mayne et al, 2001; Risch et al, 1985).

Valorar globalmente la evidencia disponible en relación al efecto de las NA y sus alimentos fuente sobre el riesgo de CG es muy dificultoso por la gran variabilidad metodológica, la potencia de cada estudio, la falta de evaluación de la contribución de las fuentes endógenas y la heterogeneidad de los ítems alimentarios incluidos en los métodos de recogida de dieta

En resumen, la evidencia proveniente de estudios caso control parece ser consistente aunque los resultados de estudios prospectivos son escasos. No encontramos ninguna revisión posterior a las realizadas en 1997 (WCRF, 997) y 1998 (Eicholzer, 1998) que evalúe en forma sistemática el efecto de las NA y sus alimentos fuente sobre el riesgo de CG.

Justificación

A pesar de que la principal fuente de exposición a NA en la población general es la dieta, los primeros estudios y evidencias sólidas sobre sus efectos provienen de grupos de población muy seleccionados (individuos sometidos a exposición laboral, personas que viven próximas a una fuente potencial de contaminación o aquellas que se han visto implicadas en una emisión accidental), en las que se dan generalmente exposiciones muy elevadas.

Por el contrario, existen muy pocos estudios epidemiológicos sobre los potenciales efectos de exposiciones crónicas como son las de origen dietético. Experimentos en animales mostraron que exposiciones repetidas a bajas dosis son más potentes que exposiciones altas aplicadas menos veces (IARC, 2001). A pesar de que las evidencias sobre los efectos de las NA en humanos no son concluyentes (WCRF, 1997) el interés por definir el rol de las NA en la etiología de distintos tipos de tumores continúa presente. Basándose en las conclusiones obtenidas en estudios realizados en modelos animales y experimentales, la hipótesis del efecto en humanos se sustenta en las siguientes premisas: a) varios NOC son cancerígenos en múltiples especies y órganos, b) el daño celular y molecular producido en tejidos animales y humanos es similar, c) los humanos están expuestos tanto exógena como endógenamente a lo largo de su vida, d) las exposiciones crónicas a bajas dosis tienen un efecto probado sobre el desarrollo de ciertos tipos de tumores en animales y este podría ser extensible a los humanos (Duckrey, 1967).

Estimar la exposición dietética a nitritos y NA es muy dificultoso debido a la incertidumbre que hay con respecto a su contenido en alimentos y a las limitaciones propias de estimar la dieta en la población. En efecto, al no tratarse de componentes propios de los alimentos o elementos con valor nutricional las tablas de composición de alimentos no incluyen valores sobre los mismos. Aún teniendo información sobre su contenido en alimentos, las dificultades continúan presentes debido a que su contenido no sólo está ligado al alimento en sí, sino a las circunstancias de su elaboración; características de la dieta que a menudo no son recogidas en los instrumentos de medición de la dieta habitual. Así, muchos de los estudios que proporcionan datos sobre consumo o efectos de estos cancerígenos lo hacen solo basándose en alimentos fuente de los mismos. Esta consideración es importante si tenemos en cuenta que cuando se evalúa la exposición no sólo influyen los alimentos que aportan una gran cantidad del

compuesto, sino alimentos con bajos niveles que se consumen frecuentemente en la población que se desea estudiar.

Por otra parte, las primeras evidencias de que las NA endógenas podrían tener relación con el CG fueron obtenidas de los trabajos realizados por Mirvish en el año 1983. Posteriormente su posible efecto en poblaciones humanas fue sugerido en estudios ecológicos realizados con habitantes de zonas de alto riesgo en Japón, Polonia y Costa Rica (Kamiyama et al, 1987; Zatonski et al, 1989, Sierra et al, 1991). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia de estudios prospectivos que confirmen esta hipótesis.

La WCRF concluye que a pesar de que la evidencia epidemiológica es débil, los estudios en laboratorio sustentan a la existencia procesos biológicos plausibles que relacionan la exposición a NA con el riesgo de CG. Por lo tanto, el panel concluye que las NA incrementarían el riesgo de CG, aunque la evidencia disponible es hasta el momento insuficiente (WCRF, 1997).

La incidencia global de CG continúa disminuyendo a nivel mundial, pero aún así es la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados (Globocan, 2002). Por tanto, a pesar de que las evidencias disponibles son insuficientes debido en gran parte de dificultades metodológicas, la relevancia de este tumor y la plausibilidad de la relación con las NA sustentan la necesidad de evaluar adecuadamente el rol de dichas sustancias en el proceso de carcinogénesis gástrica.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de las Nitrosaminas (NA) sobre el riesgo de cáncer gástrico (CG)

Objetivos específicos

1. Sistematizar la evidencia disponible sobre NA y CG
2. Desarrollar una herramienta que permita estimar la exposición de las NA de la dieta
3. Estimar los niveles de exposición dietética a NA en la población
4. Predecir el nivel de exposición a NA endógenas
5. Analizar el riesgo de CG según ingesta de las principales fuentes de NA (carnes y carnes procesadas)
6. Evaluar el efecto de las NA endógenas y exógenas en relación a CG.

Metodología

i. **Estudio EPIC** (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)

Este estudio multicéntrico comenzó el reclutamiento en el año 1992, y se desarrolla en varios centros de 10 países europeos: Grecia, España, Italia, Francia, Alemania, Holanda, Reino Unido, Dinamarca, Suecia y Noruega (Figura 12). La cohorte está formada por 153.451 hombres y 368.032 mujeres con edades comprendidas entre los 29 y 74 años de edad que provienen, habitualmente, de la población general residente en un área geográfica determinada (una ciudad o una provincia), con algunas excepciones: la cohorte francesa se formó a partir de afiliados a una mutualidad de trabajadores de la enseñanza de las escuelas públicas, una parte de las cohortes españolas e italianas incluyeron miembros de las asociaciones locales de donantes de sangre, la cohorte de Utrech (Holanda) se basó en las mujeres que participaron en un programa de cribado de cáncer de mama y finalmente, el estudio noruego del cáncer (NOWAC), realizado exclusivamente en mujeres, se asoció oficialmente al EPIC en el año 2000. Con respecto a la cohorte española está formada por 41.446 individuos provenientes de 5 centros españoles (Murcia, Granada, San Sebastián, Murcia y Asturias) y coordinada desde el Instituto Catalán de Oncología en Barcelona. Las características de este estudio han sido previamente descritas en varias publicaciones (Bingham and Riboli, 2004; González, 2004).

Todas las personas seleccionadas fueron invitadas, por carta, a participar en el estudio y en todos los casos se obtuvo un consentimiento informado para participar en el mismo.

En el momento de la incorporación al estudio fue recogida la siguiente información:

1. **Hábitos y factores generales relacionados con la salud.** El cuestionario incluyó preguntas sobre: educación, estatus socioeconómico, trabajo actual, ocupaciones actuales y pasadas en actividades industriales con posible exposición a cancerígenos, estado vital de padres o hermanos, historia de enfermedades previas e intervenciones quirúrgicas, historia del hábito de fumar y consumo de bebidas alcohólicas, actividad física, historia reproductiva, maduración sexual y contracepción.

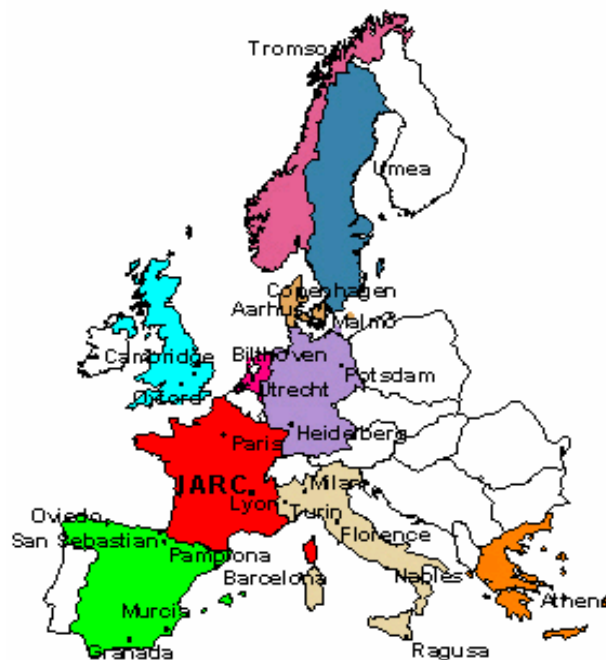
2. **La dieta habitual.** Se adoptaron tres posibles métodos de medición de la dieta:
 - ▶ Cuestionarios dietéticos auto-administrados, con datos sobre 300-350 alimentos por país, que fue usado en 7 de los 10 países.
 - ▶ Historia de dieta mediante entrevistas, muy similares en contenido a los anteriores e introducidos directamente en formato informatizado. Este método se usó en los cinco centros de España y en Ragusa (Italia).
 - ▶ Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos combinado con un registro del consumo de una semana que se utilizó en los centros ingleses.
3. **Medidas antropométricas.** Para cada uno de los miembros de la cohorte se midió peso, talla, y circunferencia de cintura y cadera según técnica referida en el protocolo. Finalmente, se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) como peso (Kg)/talla²(m)
4. **Muestras de sangre.** Se obtuvieron 30 ml. de sangre mediante punción venosa. Las muestras se fraccionaron en alícuotas de 28 pajuelas de plástico: 12 de plasma, 8 de suero, 4 de eritrocitos y 4 de células blancas para la obtención de ADN.

Validación de las mediciones de dieta: se utilizó un **Recuerdo de 24 horas** para calibrar los instrumentos de recogida de dieta, y este fue realizado en una sub-muestra de 369000 individuos de la cohorte. Los individuos provinieron de una muestra aleatoria de cada centro participante del estudio. El recordote 24 horas fue realizado con un programa computarizado (EPIC-SOFT) con la misma estructura y forma de utilización para cada país participante (Slimani et al, 2002). La información sobre alimentos y bebidas consumidas en el día anterior a la entrevista fue recogida y codificada por dietistas entrenadas. El tamaño de las porciones fue estimado un libro que contenía más de 140 fotografías (van Kappel et al, 1994) y utilizando muestras de medidas casera.

Seguimiento

La identificación de los nuevos casos de cáncer estuvo basada principalmente en el enlace de bases de datos de la cohorte con los registros de cáncer de base poblacional en siete de los países participantes (Dinamarca, Italia, Holanda, España, Suecia, Noruega y el Reino Unido). En los otros tres países (Francia, Alemania y Grecia) se basa en una combinación de métodos que incluye la revisión de datos de seguros médicos, registros de anatomía patológica, así como un seguimiento activo de los propios sujetos del estudio o de sus parientes y conocidos. La fecha y causa de muerte se recoge a partir de los registros nacionales de mortalidad. En España se hace a través de un convenio especial firmado con el Instituto Nacional de Estadística (INE).

Figura 12 .Centros participantes del estudio EPIC



ii. Estudio EURGAST:

El Estudio EUR-GAST es un estudio con doble diseño: de cohorte para el análisis de datos del cuestionario y caso-control anidado para el análisis de las determinaciones realizadas en laboratorio; que se inicio en el año 2000 y que fue financiado por el 5 Programa Marco de la Unión Europea. Dicho estudio esta coordinado por el grupo EPIC en Barcelona y sus principales objetivos son analizar el efecto de factores dietéticos y genéticos, la infección por Hp entre otros factores en el desarrollo de CG.

La clasificación de CG se hizo basándose en la 10^o Revisión de la clasificación internacional de enfermedades (ICD, WHO, 2002).La validación y la confirmación del diagnóstico y clasificación de la localización tumoral y tipo histológico fue llevada a cabo por un panel de patólogos que se formó con un representante de cada uno de los países participantes del estudio. Cada caso incidente y con muestra sanguínea disponible fue apareado por sexo , edad (+-2.5 años), centro y fecha de la extracción de sangre (+-45 días) con 4 controles provenientes de la cohorte.

La cuantificación de los anticuerpos anti helicobacter pylori fue realizado por ELISA, en todos los casos y controles del Estudio EURGAST. Los títulos de anticuerpos se expresaron como “enzyme-linked immunosorbent assay uunits (EU). Para clasificar a lo individuos como positivos o negativos fue utilizado 100 EU como punto de corte Las determinaciones fueron realizadas en un reconocido laboratorio de Florencia, centro participante del EPIC.

Las muestras de plasma fueron almacenadas en tubos de citrato y congeladas a a-196 ° C en la IARC, Lyon. Se seleccionaron dos controles por cada caso y en este grupo de casos y controles se midieron los niveles de vitamina C plasmática en el laboratorio de la Universidad de Cambridge utilizando fluorometría (Jenab et al, 2005).

- iii. **Exposición a NDMA y Nitritos:** La estimación de la exposición de nitritos y NDMA estuvo basada en los datos provenientes de la tabla de composición de alimentos que compilamos para tal fin y que forma parte de esta tesis. Dado que la información disponible para NA tiene valores completos sólo para NDMA decidimos centrarnos en estas sustancias. Se asignó un valor de nitritos y NDMA para cada uno de los alimentos incluidos en el cuestionario dietético, seleccionando los alimentos que fueran susceptibles de tener nitritos o NA. Es decir fueron descartados algunos grupos alimentarios, como dulces, por que no tiene valores conocidos, ni reportados de los mismos. Cuando para un alimento había varios valores posibles, la selección se hizo teniendo en cuenta el año de la determinación y el país de procedencia. En el caso de que hubiera varios valores apropiados se asignó una media de los mismos.
- iv. **Exposición a NA endógenas: (ENOC):** la estimación de los niveles de exposición endógena fue realizada indirectamente a través de la creación de un índice de ENOC. Este índice fue creado utilizando los datos provenientes de estudios previos realizados en voluntarios en los que se midió la formación de ATNC. Estos estudios fueron realizados en Cambridge bajo la dirección de la Dra. Sheila Bingham (Cross et al, 2003; Hughes et al, 2001; Bingham et al, 1996; Silvester et al, 1995). Ellos muestran una alta correlación entre los niveles de ATNC y la ingesta de carnes rojas, (no con carnes blancas o proteínas vegetales), sugiriendo que esta relación podría deberse al contenido en hierro de las carnes rojas. Por esto motivo, calculamos el nivel de hierro proveniente de estas dietas suministradas a los voluntarios utilizando las tablas de composición de alimentos inglesas (Food Standard Agency, 2002). Los coeficientes de correlación fueron de 0.948 cuando utilizamos hierro de las carnes y 0.54 cuando utilizamos la ingesta de carne roja. Por este motivo hemos decidido crear el índice a partir del valor de hierro utilizando una regresión lineal que nos permitiera obtener una ecuación y luego aplicarla a los individuos del EPIC. Los niveles de cada individuo de la cohorte fueron estimados usando al siguiente fórmula ($ENOC = 40.52 + 18.92 * \text{hierro de las carnes (mg/día)}$). Dado que a partir de niveles de ingesta de hierro mayores de 8.5 la relación entre ATNC y hierro no fue lineal, aplicamos un valor fijo de 201.41 que se obtuvo del mismo modelo (0.7 % de los casos).

v. Análisis de datos

Se realizó una descriptiva de los niveles de nitritos y NDMA de la cohorte española estandarizando por sexo y edad de la población entre 35 y 64 años (INE, 2003). Las diferencias entre las categorías de diferentes variables de interés fueron evaluadas mediante un análisis de la varianza ajustando por sexo, edad, ingesta calórica, centro e IMC.

Para evaluar el efecto de las carnes rojas, procesadas y NA (exógenas y endógenas) se estimaron los riesgos relativos (RR) y sus intervalos de confianza (IC 95 %) usando un modelo de regresión de COX de riesgos proporcionales.

Para analizar las interacciones entre los efectos de carnes con Hp y de NA endógenas con Hp y vitamina C plasmática, se diseñó el estudio caso control anidado. El cálculo de las *odds-ratio* (OR) fue realizado mediante un modelo de regresión logística no condicional ajustado por las variables de apareamiento. La significación de las interacciones fue evaluada utilizando el test de la razón de verosimilitudes (TRV).

Resultados

i. Presentación de los resultados

A continuación se presentan los 5 artículos que componen esta Tesis Doctoral cada uno de ellos acompañado de un breve resumen en castellano. La tabla 1 muestra los diferentes objetivos específicos y las publicaciones que se desprenden de cada uno de ellos.

Tabla 1. Publicaciones incluidas en el trabajo de Tesis

Objetivo	Artículo
Evaluar la evidencia disponible sobre nitrosaminas y riesgo de CG	Jakszyn and González. Nitrosamines and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. WJG, 2006 ,12 : 4296-303
Desarrollar una herramienta que permita estimar la exposición dietética a nitrosaminas	Jakszyn et al. Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. J Nutr. 2004, 134:2011-4
Estimar los niveles medios de exposición dietética en la población	Jakszyn et al .Intake and food sources of nitrites and N-Nitrosodimethylamine in Spain. Pub Health Nutr 2006 (in press)
Analizar el riesgo de cáncer gástrico según ingesta de carnes y carnes procesadas	González, Jakszyn et al. Meat Intake and Risk of Stomach and Esophageal Adenocarcinoma Within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). J Natl Canc Inst 2006 98; 645-54
Predecir el nivel de exposición a nitrosaminas endógenas Evaluar el efecto de las nitrosaminas endógenas y exógenas en relación a cáncer gástrico.	Jakszyn et al. Endogenous versus exogenous exposure to N-Nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. Carcinogenesis 2006,27:1497-1501

ii. Resumen Artículo 1

Jakszyn P and **González CA**. Nitrosamines and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *WJG*, 2006, 12:4296:303

El efecto de las nitrosaminas (NA) sobre el riesgo de tumores gastroesofágicos es controvertida. Con el objetivo de evaluar y sistematizar la evidencia disponible sobre la relación de las NA y alimentos fuente y el riesgo de CG se revisaron los artículos de cohorte y caso control publicados en MEDLINE entre los años 1985-2005 con información sobre ingesta de nitritos, NA y sus fuentes alimentarias, en relación al riesgo de CG y de esófago. Luego de eliminar algunos artículos duplicados o con información poco fiable, fueron incluidos 50 estudios caso-control y 11 de cohorte. La evidencia del efecto de los nitritos y NA proveniente de los estudios caso-control sugiere una asociación con CG. Una alta proporción de estos estudios también sugieren que un alto consumo de carnes rojas incrementaría el riesgo de CG. Con respecto a carnes procesadas 12 de 16 estudios encuentran un riesgo para CG. La mayoría de los estudios encuentran una asociación positiva entre alimentos preservados y ahumados y CG. Cuando evaluamos la evidencia proveniente de los estudios de cohortes, esta es escasa ($n=3$) y no tan consistente como la que aportan los estudios caso-control. Son necesarios más estudios prospectivos para extraer conclusiones definitivas, que incluyan un amplio número de casos, que utilicen métodos de recogida de dieta con una buena evaluación de la dieta habitual. Por otra parte, sería necesario que controlen por potenciales variables confusoras y que evalúen adecuadamente la exposición endógena a NA.

Jakszyn P, Gonzalez CA.

[Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence.](#)

World J Gastroenterol. 2006 Jul 21;12(27):4296-303.

iii. Resumen Artículo 2

Jakszyn P et al. Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Nutr.* 2004 Aug; 134(8):2011-4.

Algunas sustancias con potencial carcinogénico como las nitrosaminas (NA) se forman durante los procesos de conservación de los alimentos, mientras que las aminas heterocíclicas (AH) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) lo hacen durante la cocción. La mayoría de ellas han sido clasificadas por la IARC (Internacional Agency for Research on Cancer) como probables o posibles cancerígenos en humanos. Uno de los principales problemas para evaluar los niveles de exposición dietética en la población es que como no son componentes naturales de los alimentos no están incluidas en las tablas de composición nutricional. Nuestro objetivo fue crear un tabla de composición de alimentos con información sobre nitratos, nitritos, NA, HA e HAP. Para ello realizamos una revisión de los artículos con información sobre contenido de estas sustancias en los alimentos en las bases de datos MEDLINE y EMBASE. De los artículos seleccionados obtuvimos la siguiente información 1) Datos del alimento: nombre, método de cocción, métodos de conservación, grado de cocción, temperatura y tiempo 2) Información del compuesto analizado: tipo, cantidad, método analítico, método de muestreo 3) Información de la publicación: año, autor, país de procedencia. La tabla incluye 207 ítems alimentarios con información sobre nitratos, nitritos y NA, 297 con información sobre HA y 313 sobre PAH. La base de datos estuvo basada en 139 publicaciones provenientes de 23 países. Fue organizada por compuesto y grupo alimentario para hacer más práctica su utilización. Por otro lado, se incluyeron datos como el país de procedencia y el año para permitir seleccionar los valores más próximos a la realidad específica de cada estudio. Creemos que esta herramienta permitirá mejorar la precisión de las estimaciones de exposición a estas sustancias y así clarificar su rol en el desarrollo del cáncer.

Jakszyn P, Agudo A, Ibáñez R, García-Closas R, Pera G, Amiano P, González CA.
Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons.
J Nutr. 2004 Aug;134(8):2011-4.

iv. Resumen Artículo 3

Jakszyn et al . Intake and food sources of nitrites and N-Nitrosodimethylamine in Spain.

Pub Health Nutr 2006 (en prensa)

Debido al potencial efecto sobre la salud de las nitrosaminas (NA) y sus precursores (los nitratos y nitritos), es necesaria una adecuada evaluación de su exposición en la población general. El estudio fue realizado utilizando la población española del EPIC (European Prospective investigation into Cancer and Nutrition) .Se incluyeron 41.446 individuos sanos, de entre 29-69 años provenientes del Norte y el Sur de España. La ingesta dietética fue estimada mediante un versión computarizada de la historia dietética y administrada por un entrevistador. Luego se aplicó una tabla de composición de sustancias cancerígenas¹. La media geométrica de ingesta fue de 0.994 mg/día y de 0.114 µg/día para nitritos y N-Nitrosodimethylamina (NDMA) respectivamente .Para ambos compuestos se observó una tendencia positiva con respecto a la ingesta calórica. La NDMA mostró relación con edad y sexo ajustando por energía, mientras que los nitritos mostraron relación con vitamina C ($p < 0.001$). Los grupos de alimentos que más contribuyeron a la ingesta de NDMA fueron los productos cárnicos, cereales, vegetales y frutas para nitritos y carnes procesadas, cerveza, queso y pescado asado .Por otra parte, los fumadores y ex - fumadores que están expuestos a las NA a través del humo del tabaco, mostraron niveles de ingesta de NDMA mayores, así como menor ingesta de vitamina C (un reconocido inhibidor de la formación endógena de NA) Estos resultados muestran que los niveles de exposición en la población española están en la media del rango de los reportados en la literatura, aunque los fumadores y ex fumadores han sido identificados como grupos de riesgo.

¹ Jakszyn, J Nutr, 2004

Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibáñez R, Amiano P, Pera G, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Larrañaga N, Martinez C, Navarro C, Quirós JR, Sánchez MJ, Tormo MJ, González CA.

[Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain.](#)

Public Health Nutr. 2006 Sep;9(6):785-91.

v. Resumen Artículo 4

González, **Jakszyn** et al. Meat Intake and Risk of Stomach and Oesophageal Adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Canc Inst* 2006 98; 645-54

Los factores dietéticos tienen un importante rol en el proceso de carcinogénesis gástrica y esofágica, aunque la evidencia proveniente de estudios de cohorte es escasa. En este estudio examinamos el riesgo de cáncer de estómago y esófago asociado al consumo de carnes dentro del estudio de cohortes EPIC (European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC)). Un total de 521,457 hombres y mujeres de entre 35-70 años provenientes de 10 países europeos participantes del estudio fueron incluidos en el análisis. La información dietética y sobre diferentes variables sociodemográficas fue recogida al inicio del estudio. Fueron utilizados los datos de un sub-estudio de calibración para corregir las estimaciones debido a posibles errores de medida en la dieta. Dentro de la cohorte se constituyó un caso-control anidado para examinar el papel de la infección por *Helicobacter pylori* (Hp) (mediadas en plasma en 330 casos y 1000 controles) asociado a la ingesta de carnes. Se diagnosticaron 330 adenocarcinomas gástricos y 65 de esófago en 6.6 años de seguimiento. El riesgo de CG distal estuvo estadísticamente asociado con ingesta de carnes totales (RR = 3.52; 95% IC = 1.96 -6.34 para un incremento del 100 g /día), carne roja (RR = 1.73; 95% IC = 1.03 - 2.88 para un incremento de 50 g/día), y carnes procesadas (RR = 2.45; 95% IC = 1.43-4.21 para un incremento de 50 g /día). La asociación entre riesgo de CG distal y carnes fue mayor en los individuos infectados (OR = 5.32; 95% CI = 2.10- 13.4). La ingesta de carnes, de carnes rojas y de carnes procesadas estuvo asociada con un aumento del riesgo de cáncer distal, sobretodo en individuos infectados, pero no estuvo asociada con los tumores de cardias.

González CA, Jakszyn P, Pera G, Agudo A, Bingham S, Palli D, et al.

[Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition \(EPIC\).](#)

J Natl Cancer Inst. 2006 Mar 1;98(5):345-54.

vi. Resumen Artículo 5.

Jakszyn et al. Endogenous versus exogenous exposure to N-Nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* 2006

Estudios previos sugieren una relación dosis respuesta entre el consumo de carnes rojas y la formación endógena de nitrosaminas (NA), posiblemente debida a su contenido en hierro. En este estudio fue analizado el riesgo de CG en relación a la exposición a nitrosaminas exógenas provenientes de la dieta y a las NA endógenas. La población de estudio fue el EPIC que incluyó a 521 457 individuos sanos y 314 casos incidentes de CG que ocurrieron luego de 6.6 años de seguimiento. Para estimar los niveles de exposición endógena fue creado un índice de formación endógena (ENOC) correlacionando los datos de contenido de hierro y niveles de NA endógenas provenientes de estudios previos. Los niveles de exposición dietética a NA exógenas fueron calculados aplicando una tabla de composición de alimentos¹. Los niveles de vitamina C plasmática y anticuerpos contra *Helicobacter Pylori* (Hp) fueron medidos en una sub-muestra que constituyó un estudio caso-control anidado dentro de la cohorte. La exposición a NDMA fue de un 1 µg comparada con 93 µg para ENOC. No hubo asociación entre NDMA y GC (HR 1.00; 95 % CI 0.7-1.43). ENOC estuvo significativamente asociado con CG distal (HR 1.42; 95 % CI 1.14-1.78 para un incremento de 40ug/d) pero no con cardias (HR 0.96; 95 % CI 0.69-1.33). A pesar de que el número de casos sin infección es bajo, nuestros datos sugieren una posible interacción entre ENOC y Hp ($p = 0.09$). Por otro lado, observamos una interacción significativa entre vitamina C plasmática y ENOC ($p < 0.01$). Nuestros hallazgos ponen de manifiesto la importancia de cuantificar el efecto de las NA endógenas cuando evaluamos riesgo desarrollar un cáncer. Dicho efecto podría explicar los resultados reportados previamente sobre la relación de la ingesta de carnes rojas y procesadas y el riesgo de tumores gástricos.

¹Jakszyn, J Nutr, 2004

Jakszyn P, Bingham S, Pera G, Agudo A, Luben R, Welch A, et al. [Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition \(EPIC-EURGAST\) study.](#) Carcinogenesis. 2006 Jul;27(7):1497-501. Epub 2006 Mar 29.

Discusión

i. Exposición dietética

Niveles de exposición

Los niveles de medios de ingesta de nitritos y NDMA en la población del EPIC España fueron 0.994 mg/día y 0.114 µg/día para nitritos y NDMA respectivamente. Estos son los primeros datos provenientes de un estudio prospectivo en población española. Si comparamos estos valores con los reportados en la literatura (Tabla 2) vemos que para NDMA abarcan un rango de 0.08 a 0.55 µg/día. A pesar de que los niveles de NDMA son relativamente bajos, es importante considerar que un 10 % de la población tiene un media de 0.40 µg y que el 5 % tiene niveles 5 veces mayores que la media poblacional (0.78 µg/día). Por otra parte, otro factor que podría influenciar los valores reportados son las modificaciones que hicieron las industrias alimentarias para disminuir el contenido de nitratos y nitritos durante la década del 80. Esto provocó importantes disminuciones en los niveles de NA de los alimentos sobretodo en las carnes curadas y la cerveza (Tricker and Preussman, 1991). Por ejemplo, el valor asignado a la cerveza fue 10 veces menor que el utilizado en estudios previos. Es de esperar, por lo tanto, que dado que la cerveza tiene una importante contribución a la exposición, los niveles de NDMA en nuestra población sean menores que la mayoría de los estudios publicados en el pasado.

Los niveles de ingesta de nitritos estimados en este estudio (0.99 mg/día) fueron comparables a los reportados previamente en la literatura, que se encuentran en un rango de 0.8 a 5.3 mg /día. (Tabla 2)

Tabla 2. Estudios epidemiológicos sobre ingesta de nitritos y nitrosaminas

Autor	País	año	estudio	población	método	Nº ítems	NDMA (ug/día)	nitritos (mg/día)
Jakszyn	España	2006	cohorte	41446	DH	600	0,11	0,99
De stefani	Uruguay	1998	case-control	361 Cases	FFQ	28	0.18	
Dich	Finlandia	1996	health examination survey	100.054	DH	500	0.052	5.3
Wilkens	USA	1996	case-control	195 cas./390 cont.	DH	29	0.0192	
Pobel	Francia	1995	case-control	92 cas./128 cont.	DH		0.55 /0.33	1.96/1.94
La vecchia	Italia	1995	case-control	746 individuals	FFQ	29	0.18	
Rogers	USA	1995	case-control	960 cas/625 cont.	FFQ	114	0.06-0.179	1.06-1.6
Corneé	Francia	1992	INSEE survey	na	na	na	0.257	1.88
Tricker	Alemania	1991	Germany Nutritional Report	na	na	264	0.28	
Ellen	Holanda	1990	Household food consumption	NIPH 110 adults	D.S	na	0.10	
Penttila	Finlandia	1990	Finish population survey	1768	recall 48 hs.	na	0.08	1.88
Osterdahl	Suecia	1988	Swedish population survey	na	na	474	0.29	
Yamamoto	Japón	1984	Japan survey	na	na	na	0.5	
Stephany	Holanda	1980	population survey	na	DS	201	0.38	4.2

DH: diet history FFQ: food frequency questionnaire DS: duplicate sampling na: not available

Fuentes alimentarias

Con respecto a las fuentes alimentarias de NDMA las principales fueron las carnes procesadas (frankfurt, bacon, carnes curadas), la cerveza y el queso. Además encontramos que el pescado asado estuvo entre los 10 principales alimentos contribuyendo con el 10 % a la ingesta total. Este hallazgo es importante porque a pesar de que el pescado asado no contiene grandes niveles de NDMA, su consumo en los países mediterráneos es muy alto.

Por otra parte, alimentos con alto contenido de NDMA como los ahumados o salados, no fueron importantes fuentes en nuestra población ya que son consumidos en una proporción muy baja (0.3% y 3% respectivamente). Los patrones de consumo en países como Francia o Finlandia donde estos son consumidos por un muy alto porcentaje de la población muestran tendencias diferentes contribuyendo con un 22-25 % a la ingesta total (Pobel et al, 1995; Dich et al, 1996). Japón reportó los valores más altos dado su alto consumo de pescados desecados y ahumados (Yamamoto et al, 1984).

Con respecto a los nitritos, los grupos que más contribuyeron a la ingesta fueron las carnes procesadas, cereales, frutas y vegetales. Nuestros resultados muestran que las principales fuentes alimentarias fueron similares a las reportadas en estudios provenientes de otros países

Factores relacionados

Para NDMA y nitritos observamos una tendencia positiva con respecto a la ingesta calórica. Esto es de esperar ya que los alimentos que tienen un alto contenido de estas sustancias son además alimentos con alta densidad calórica (kcal/g). La ingesta de NDMA mostró también relación con edad y sexo (ajustando por energía). Varios estudios sugieren que los niveles de NDMA en hombres podrían ser hasta tres veces mayores (Dich et al, 1996;Spiegehalder and Preussman, 1983; Wilkens et al,1996). Una posible explicación para las diferencias encontradas en este estudio es que los hombres consumieron mayor cantidad de cerveza y embutidos, alimentos con alto contenido de NDMA. En relación a la edad, los niveles de exposición a NDMA fueron menores a medida que aumentaba la edad de los individuos. Esta tendencia negativa podría atribuirse a que las personas jóvenes consumen más bebidas alcohólicas y embutidos que las personas mayores. Por otra parte, además de su relación con la ingesta calórica, observamos una relación entre nitritos y vitamina C ($p < 0.001$).

Cuando analizamos la relación entre la ingesta de NDMA y vitamina C estratificando por categorías de fumador observamos que los fumadores y ex fumadores son los que tenían conjuntamente mayores niveles de ingesta de NDMA y menores niveles de vitamina C. Estos niveles más bajos de vitamina C exacerban la formación endógena ya que estos individuos tienen más sustrato disponible para la formación endógena de NA.. Esto podría explicarse en base a que los individuos fumadores tiene peores patrones alimentarios, ya que consumen menos frutas y verduras y más carnes procesadas y alcohol (Agudo et al, 2004; Dallongville et al ,1998), constituyendo una población especial de riesgo.

ii. Las carnes como factor de riesgo para el cáncer gástrico

Este es el primer estudio que analiza la relación de la ingesta de carnes y carnes procesadas según localización tumoral y analizando interacciones con Hp. Encontramos una asociación positiva entre carnes y carnes procesadas y CG distal, sobretodo restringida a pacientes con Hp. No encontramos un efecto de ningún tipo de carne sobre el cáncer de cardias. El hallazgo de que el Hp modifica la asociación entre carnes y CG distal, podría explicar el efecto diferencial de las carnes según localización tumoral. Un meta-análisis de los estudios prospectivos muestra que el efecto del Hp estaría focalizado en no cardias (Hp Collaborative group, 2003). Aunque los mecanismos que podrían explicar la interrelación entre Hp e ingesta de carnes no son del todo claros. Una de las hipótesis propuestas es que el hierro, contenido en las carnes, es un factor esencial para el crecimiento del Hp (Perez-perez and Israel, 2005). Es decir que el hierro podría interactuar positivamente con las carnes aumentando el riesgo de CG.

Pocos estudios de cohortes exploraron la asociación entre carnes y carnes procesadas y riesgo de CG. Con respecto a carnes rojas, en tres estudios (Ito et al, 2003; Ngoan et al, 2002; Kneller et al, 1991) no se observó asociación mientras que un estudio (Inou et al, 1996) observó una asociación débil, aunque no esta fue estadísticamente significativa. Con respecto a las carnes procesadas, los resultados son similares; algunos estudios describen una asociación (Ngoan et al, 2002; Van der Brant et al, 2003) mientras que otros no encuentran ningún efecto (Ito et al, 2003; Mc Cullough et al, 2001; Galanis et al, 1998)

Varios mecanismos sustentan la hipótesis de que las carnes podrían incrementar el riesgo de CG. En general se basan en las altas concentraciones de hierro, nitritos y NA, así como también de la presencia de aminos heterocíclicas y hidrocarburos aromáticos policíclicos que forman como consecuencia del uso de algunos métodos de cocción como la barbacoa o la parrilla. De los diversos mecanismos plausibles parece tener bastante peso el que sugiere que la ingesta de carnes podría contribuir a la formación endógena de NA (Bingham et al, 1996; Cross et al, 2003; Hughes, et al 2001. Silvestre et al, 1995). Estos resultados muestran una relación dosis respuesta clara entre el consumo de carnes rojas y la formación de NA. Por el contrario, para otros tipos de carne como el

pollo frito o a la brasa que contiene cantidades importantes de amina heterocíclicas no encontramos ningún efecto sobre el CG.

iii. Nitrosaminas como factor de riesgo para el cáncer gástrico.

Los humanos estamos expuestos a las NA no solo a través de sustancias provenientes de dieta, tabaco u ocupación (exposición exógena) sino como consecuencia de procesos que ocurren en el cuerpo (formación endógena). A pesar de que estudios realizados por Tricker en la década del 90 sugerirían que la exposición endógena podría representar hasta un 75 % del nivel total (Tricker, 1997), no han sido publicados hasta la fecha estudios analíticos que evaluaran conjuntamente el efecto de ambas vías. Este es el primer estudio prospectivo que reporta datos sobre exposición endógena y exógena en una población Europea y su relación con el CG.

En nuestro estudio el nivel de exposición a través de la dieta fue de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$, mientras que el de exposición endógena fue casi 100 veces superior (93 $\mu\text{g}/\text{día}$). A pesar de estas grandes diferencias, estos valores no son del todo comparables ya que la NDMA es un solo tipo de NA y las mediciones de NA endógenas abarcan un amplio número de compuestos. A pesar de que la estimación de las NA endógenas incluya globalmente a un mayor número de compuestos, esta es suficientemente mayor que la exógena como para sustentar la hipótesis de que sería la principal fuente de exposición a NA en humanos. Además, aunque incluye algunos compuestos como la NPRO, el 85 % de los mismos han sido clasificados como cancerígenos.

Con respecto al efecto de la NDMA exógena sobre el riesgo de CG no encontramos ninguna asociación (RR 0.99 IC 95 % 0.69-1.41) Tampoco encontramos diferencias en el efecto de la NDMA cuando lo analizamos según localización tumoral. Estos resultados están en concordancia con el trabajo de Knekt del año 1999 (RR 0.71 IC 95 % 0.28-1.78). Sin embargo un trabajo realizado en una cohorte Sueca y publicado recientemente (Larsson, *Int J Cancer*, 2006) si encuentra un efecto de las NDMA sobre el riesgo de CG.

El efecto observado para las NA endógenas se ve en los tumores distales. Esto es similar a lo que habíamos encontrado con respecto a carnes, y podría deberse a la posible interacción entre NA endógenas y Hp. Como fue comentado en el apartado anterior el efecto del Hp se da en esta región del estómago (Helicobacter Cancer Collaborative Group, 2003). Por otra parte, la infección por Hp incrementa la producción de óxido nítrico (ON) a partir de los macrófagos en respuesta al crecimiento de las bacterias. Es decir, que es de esperar que los niveles de ON que pueden ser sustrato para la formación de NA están aumentados durante los procesos de inflamación (Pignatelli et al, 1998).

Otro de las contribuciones importantes de este trabajo es la interacción descrita entre vitamina C plasmática y NA endógenas. La vitamina C puede ser un factor protector en el procesos de carcinogénesis gástrica debido a diversos mecanismos: incrementando la respuesta inmune celular, neutralizando radicales libres, reduciendo al formación de NA, inhibiendo la proliferación celular y actuando sobre el crecimiento del Hp (Zhang et al, 2005). Además los procesos inflamatorios que se dan a consecuencia de la infección por Hp, no solo aumentan significativamente los requerimientos de Vitamina C, son también reducen su secreción dentro de lumen gástrico. El efecto de las NA fue mayor en los individuos con bajos niveles plasmáticos de vitamina C. Es decir que un individuo que consume cantidades elevadas de carne roja y a su vez tiene una dieta pobre en cítricos tendría un riesgo mayor de padecer un tumor gástrico. Dada la capacidad del Hp del modular el efecto de la vitamina C (y vicerversa) analizamos el efecto de la vitamina C y la interacción estratificando por infección por Hp. Lo que observamos es que en los individuos positivos para Hp, el efecto se incrementaba. Esto sugiere un sinergismo de ambos factores que lleva a modificar el efecto de las NA endógenas sobre el riesgo de CG.

iv. Limitaciones del estudio

A pesar de que el estudio EPIC es uno de los estudios de cohorte más amplios a nivel mundial con una población de medio millón de individuos la muestra no es siempre representativa de la población general de cada país. Esto afectaría sobretodo a las estimaciones sobre niveles de ingesta de NA y nitritos que realizamos para la población española. Sin embargo, las características de la ingesta de dicha población se corresponden con otras reportadas en encuestas alimentarias de base poblacional (Aranceta, 1990; Mataix Verdú, 1999). Por otro lado, las estimaciones fueron ponderadas por las características de edad y sexo de la población española consiguiendo con ello que las estimaciones sean más representativas (INE, 2003).

Teniendo en cuenta los análisis que fueron realizados con respecto a CG, una limitación importante a considerar es el número relativamente bajo de casos (330 para el análisis de carnes y 314 para el de NA) que se han detectado en los 6.5 años de seguimiento. Esto es un problema sobretodo cuando se quieren hacer análisis por subgrupos de localización tumoral o histológica y para analizar posibles interacciones con otros factores. A pesar de ello, los efectos encontrados son bastante consistentes y esperamos poder confirmarlos a medida que aumente el tiempo de seguimiento y por ende la potencia del estudio.

Para la estimación de la exposición a nitritos y NA de la dieta fueron utilizados valores compilados de la literatura. Esto es una limitación ya que no siempre están disponibles valores de todos los alimentos para los cuales necesitamos información y existe variación en los niveles reportados entre los diferentes países. Para contrarrestar esta limitación seleccionamos los alimentos en función del país de procedencia, y año en que fue realizada la determinación, entre otras variables. En los casos en que consideramos que varios valores cumplían criterios para ser utilizados, construimos una media de los mismos que luego fue aplicada al alimento respectivo.

Con respecto a las NA exógenas, en este estudio solo evaluamos los niveles de ingesta en una de ellas que es la NDMA. La mayoría de los estudios publicados también evalúan los niveles de esta sustancia permitiendo así una adecuada comparación. Por otro lado, hay autores que sugieren que a pesar de que esta representa solo una parte de la

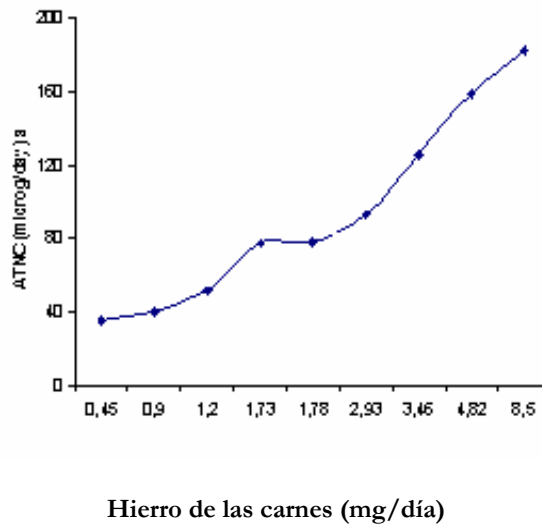
exposición dietética puede ser utilizada como marcador de la misma (Ministry of Agriculture, 1992)

Otra limitación importante son los errores de medida que tienen todos los métodos de recogida de la dieta, que persisten aunque en menor medida en los estudios prospectivos. El amplio rango de ingesta dietética que hay en el estudio, los cuestionarios validados y específicamente diseñados para cada país, pueden reducir pero en ningún caso eliminar los potenciales efectos de los errores de medida. Por otra parte, en el caso de los estudios prospectivos, podríamos asumir que el error es no diferencial, ya que la información sobre dieta habitual fue recogida al inicio del estudio (cuando todos los individuos eran sanos). En este caso el error tendería a diluir el efecto reportado nunca mostrando una asociación inexistente (Rothman and Greenland, 1985)

La estimación de la exposición endógena fue realizada usando el contenido de hierro proveniente de las carnes. El efecto reportado de las carnes rojas sobre la formación de NA (Bingham et al, 1996) sería debido a su contenido en hierro hemínico. La única fuente de hierro hemínico de la dieta proviene de las carnes. Es por ello, y debido a que no contábamos con la información sobre ingesta de este tipo de hierro, utilizamos la ingesta de hierro proveniente de las carnes como medida aproximada. Además, dado que la correlación entre el valor de hierro proveniente de las carnes y los datos de NA endógenas fue de 0.94 consideramos pertinente utilizar esta variable para construir el índice. A pesar de que la estimación se basa en una medida indirecta de la formación endógena, el alto coeficiente de correlación entre hierro de las carnes y NA endógenas representa un buen indicador de la fiabilidad de la metodología propuesta (Figura 13). A pesar de ello, una mejor cuantificación de los niveles de formación endógena mediante biomarcadores podría contribuir a validar esta metodología.

Figura 13. Correlación entre niveles de ATNC y hierro proveniente de las carnes

(Jakszyn et al, Carcinogenesis, 2006)

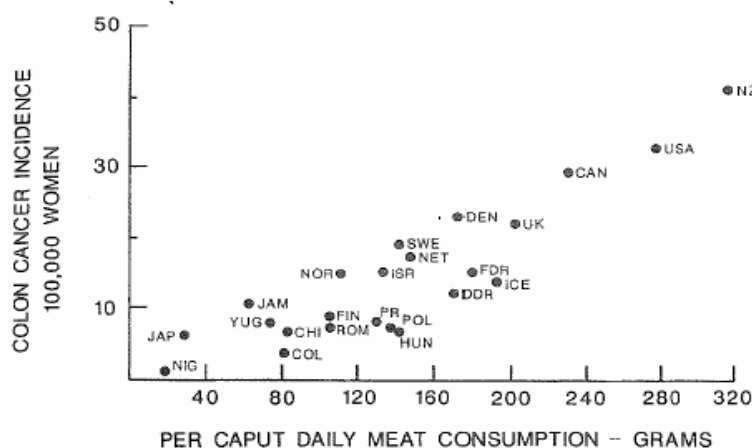


v. Implicaciones para Salud Pública

A pesar de que la incidencia de CG esta disminuyendo globalmente, aún provoca 876000 casos nuevos y 647000 muertes al año y es la segunda causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial (Parkin, 2004).

Estudios realizados por Armstrong y Doll en la década del setenta (Armstrong and Doll, 1975) mostraban correlaciones claras entre los patrones de consumo de carne e incidencia de cáncer de colón (Figura 14). La ingesta de carnes es una de las variables dietéticas que más ha sido estudiada en los últimos años por su relación con diversos tumores como colon y recto, mama, próstata, riñon (WCRF, 1997). Sin embargo, la revisión de la WCRF concluye que la evidencia es insuficiente para relacionar al consumo de carnes con el riesgo de CG.

Figura 14. Incidencia de Cáncer de colón e ingesta de carne
(Armstrong and Doll, 1975)



Utilizando datos sobre disponibilidad alimentaria, observamos que la ingesta de carnes se ha incrementado progresiva y considerablemente desde la década del 50. La disponibilidad media per capita ha aumentado globalmente cerca del 30 %, aunque países como Dinamarca o Portugal, duplicaron su ingesta, mientras otros como España casi la han cuadruplicado en ese mismo período (FAO, Food Balance Sheets, 2002; García-Closas, 2006).

Nuestros datos sustentan la hipótesis de que el consumo de carnes rojas incrementaría el riesgo de CG, sobretodo por contribuir a la formación endógena de NA. Sin embargo, este no es un efecto aislado, sino que se da sobretodo en individuos con infección por Hp y bajos niveles de vitamina C. Por estas razones, una aproximación cruda con estudios ecológicos como la que realizaron Armstrong y Doll no aportaría evidencia a favor de esta asociación. Si realizáramos una comparación cruda los datos muestran que el consumo de carnes esta aumentando mientras que la incidencia de CG esta disminuyendo (figura 15a y 15b). En este caso, una de las principales limitaciones de esta aproximación, es que otros factores, como la infección Hp o la ingesta de vitamina C interactúan con las carnes enmascarando su relación cruda con el CG. Por otra parte, es posible que esta disminución en la incidencia de CG, refleje otros cambios introducidos hace tiempo, sin embargo aún no se vea afectada por ciertos cambios en los patrones alimentarios. Es decir, sería necesario evaluar la evolución del CG en los próximos años

para analizar el impacto del incremento en el consumo de carnes rojas. Además, a pesar de que hemos encontrado que las NA endógenas son un factor de riesgo para el CG, no necesariamente son los de mayor importancia, y por lo tanto, tampoco cabría de esperar que las tendencias entre consumo e incidencia estén directamente relacionadas.

En este contexto, consideramos que comparaciones internacionales que se basen en datos crudos de consumo e incidencia de un tumor sin tener en cuenta otras variables de suma importancia no son apropiadas.

Figura 15a. Evolución del consumo de carnes en diferentes países

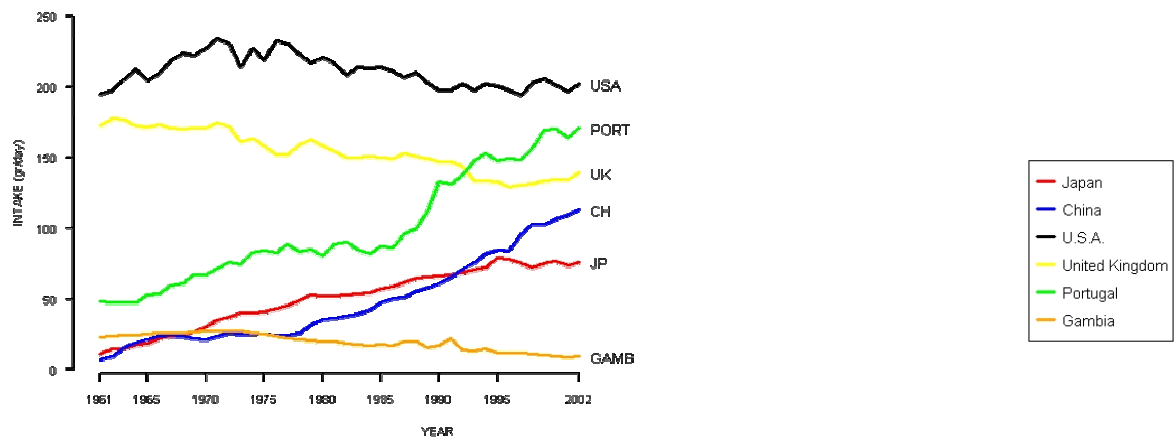
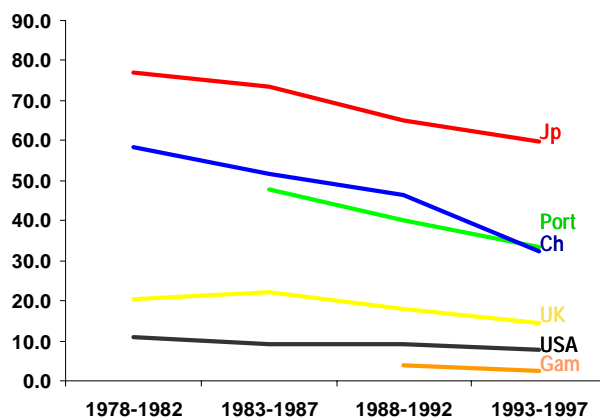


Figura 15b. Evolución de la incidencia de cáncer gástrico en diferentes países



A pesar de que los datos crudos de ingesta de carnes muestran estos patrones contrarios a la evolución de la frecuencia del tumor, los resultados provenientes de este estudio de cohortes sustentan la hipótesis de que el riesgo de CG se incrementa a medida que aumenta el consumo de carne roja. Además, si consideramos que el consumo de carnes rojas está directamente relacionado con la formación endógena de NA (Bingham et al, 1996; Cross et al, 2003; Hughes et al, 2001) la relevancia de estos hallazgos tiene implicancias importantes sobre la salud de la población. A pesar de que el Hp ha sido reconocido como la principal causa de CG, es claro que otros factores dietéticos, de estilo de vida y de susceptibilidad genética son los que intervienen para que algunas personas desarrollen el tumor y otras no.

Otro de los hallazgos importantes de esta Tesis es la interacción entre vitamina C y NA endógenas. La vitamina C ha sido identificada como un potente inhibidor de la formación endógena de NA en estudios in vivo (Mirvish, 1975). En la cohorte EPIC se observó que el efecto de las NA fue tres veces mayor en los individuos con más bajos niveles plasmáticos de vitamina C (OR 3.24 vs. OR 1.10 p interacción < 0.001). Este es de suma importancia, ya que varias investigaciones muestran que los individuos que consumen más carnes y alimentos procesados, consumen menos frutas y verduras (Dallongville et al, 1998). Este patrón se ve más claramente en individuos fumadores que además están expuestos a las NA a través del tabaco (Agudo et al, 2004)

En resumen, nuestros resultados sugieren la importancia de disminuir el consumo de carnes rojas y fomentar conjuntamente el consumo de vegetales y frutas dentro de un patrón de dieta saludable, como una de las posibles estrategias para la prevención del CG.

vi. Nuevas líneas de investigación**Biomarcadores de exposición**

Luego de su activación metabólica, las NA forman sustancias que son capaces de reaccionar con zonas específicas del DNA y formar aductos. Hay evidencia suficiente de que la medición del daño del DNA puede ser un indicador útil no solo de exposición sino también del efecto de posibles cancerígenos. La medición y cuantificación de estos aductos podrían utilizarse para evaluar la exposición total a NA (tanto exógena como endógena). Hay varios métodos disponibles para la detección del daño del DNA, utilizando leucocitos, mucosa o biopsias de un tumor y se espera que en los próximos años el conocimiento sobre este campo progrese de manera exponencial.

Durante más de la mitad del último siglo hubo mucho interés sobre el efecto de los tóxicos químicos en el desarrollo de cáncer. Sin embargo, evidencia reciente, también sustentada por los resultados principales de esta Tesis sugieren que los bajos niveles de exposición a algunos agentes exógenos, como es el caso de las NA, no son el principal determinante del efecto de ese factor al desarrollo de un cáncer. Por el contrario, la exposición a sustancias que se producen endogenamente serían los puntos clave en el proceso carcinogenesis (Shuker, 2002). Por este motivo, técnicas orientadas a cuantificar y evaluar el efecto global de una sustancia son necesarias para una adecuada estimación de sus potenciales efectos sobre la salud de un individuo.

Sin embargo, hasta el momento no había evidencia clara del daño que producen las NA formadas en el intestino luego de la ingesta de carnes rojas. Un trabajo publicado recientemente por el grupo de Bingham en Cambridge muestra una clara correlación entre los niveles de aductos en DNA de células colónicas y la ingesta de carnes rojas (Lewin, 2006). La O6 carboximetilguanina es un aducto promutagénico y tóxico que se forma a partir de las NA. Dicha sustancia a diferencia de otras, no es reparada fácilmente, siendo por ello un marcador útil del daño producido (Shuker and Margison 1997).

Relación con polimorfismos genéticos

Las NA necesitan activación metabólica mediante las enzimas del citocromo P450 para poder realizar daño celular. En muchas de estas enzimas han sido detectados diferentes polimorfismos que pueden afectar su función enlenteciendo o acelerando la actividad enzimática.

La enzima CYP2E1 es una de las enzimas principales en el proceso de activación ya que cataliza la α hidroxilación de varias NA (Yang, 1990). Hay otras enzimas importantes, aunque no específicas, como la CYP2A6 que interviene también en la activación de las aminas heterocíclicas.

Uno de los principales estudios que investigó la relación de estos polimorfismos con la ingesta de carnes y el riesgo de cáncer colorrectal fue publicado en el año 2002 por Le Marchand (Le Marchand, 2002). Los individuos con alta ingesta de carnes portadores de la mutación de la enzima CYP2E1, tuvieron un riesgo más elevado de padecer el tumor. Además, ellos observaron que la acción combinada de carnes procesadas y el polimorfismo fue mayor en los individuos con baja ingesta de frutas y verduras, tal vez debido al bajo aporte de vitamina C de la dieta.

Con respecto a CG no hay muchos estudios que analicen estas interacciones. La mayoría de los estudios publicados provienen de poblaciones asiáticas ya que la prevalencia de ciertas mutaciones en población caucásica es muy baja y muchas veces imposibilita un adecuado análisis. Un estudio realizado en un área de alto riesgo de CG de China muestra que el riesgo de desarrollar dicho tumor según la ingesta de alimentos en salazón, fuente de NA, fue mayor en los individuos con la mutación para el CYP2E1 (OR: 3.33 IC 1.12-9.93.) Estos estudios señalan la importancia de analizar estas interacciones, aunque en nuestro contexto tal vez sea necesario incluir información de varias cohortes de población caucásica para poder arribar a resultados más concluyentes.

Conclusiones

De los resultados obtenidos y discutidos en esta Tesis Doctoral se desprenden las siguientes conclusiones:

- i. Los niveles actuales de exposición a nitritos y NA a través de la dieta en España son relativamente bajos y comparables con otros estudios realizados en poblaciones Europeas en los años 90. Los niveles de exposición más elevados continúan siendo los reportados en poblaciones asiáticas donde hay un consumo muy elevado de alimentos ahumados, desecados y salados.
- ii. Al evaluar el riesgo de CG en función de la ingesta de carnes rojas frescas y procesadas como fuentes de NA se observó un incremento del mismo restringido a la región distal. También se observó que el efecto parece estar restringido a los individuos infectados por Hp.
- iii. Nuestros resultados sugieren que las NA preformadas provenientes de la dieta no tendrían un efecto determinante sobre el riesgo de CG, aún cuando su efecto es analizado según localización tumoral. Los niveles de exposición exógena en nuestra población son significativamente más bajos que los endógenos y tal vez insuficientes para producir un efecto.
- iv. Por el contrario, las NA endógenas producirían un efecto sobre el CG, sobretodo en la región distal. Estos resultados abren una nueva línea para explicar el efecto de las carnes rojas sobre el riesgo de CG y otros tumores gastrointestinales.
- v. Se observó que el efecto de las NA endógenas fue mayor en los individuos infectados con Hp. A pesar de que el número de casos no infectados es bajo, los datos sugieren una interacción entre ambos factores.

- vi. Cuando analizamos el efecto de las NA endógenas en relación a los niveles de vitamina C plasmática, vemos que el efecto fue significativamente mayor en los individuos con más bajos niveles. Cuando el análisis fue restringido a los individuos con infección por HP el efecto aumentó. Dichos resultados sugieren un sinergismo entre estos factores.

- vii. Los resultados de esta Tesis Doctoral aportan evidencias sobre la interrelación de las NA endógenas, la infección por Hp y la vitamina C en el proceso de carcinogénesis gástrica. Serán necesarios nuevos estudios con más casos y años de seguimiento para confirmar estos hallazgos.

Bibliografía

Agudo A, Pera G, Rodriguez M, Quiros JR, Navarro C, Martinez C, Larranaga N, et al. Changes in smoking habits in adults: results from a prospective study in Spain. *Ann Epidemiol.* 2004;14:235-43.

Agudo A, Sala N, Pera G, Capella G, Berenguer A, Garcia N, et al. No association between polymorphisms in CYP2E1, GSTM1, NAT1, NAT2 and the risk of gastric adenocarcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:1043-5.

Ames, B. N , Gold LS. Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 1990; 249: 970-971.

Aranceta J, Perez C, Eguileor I, Gonzaloz de Goldeano L, Mataix J & Saez; de Burauga J Nutritional Survey. Technical Documents of Public Series A, no.9. Vitoria: Government of the Basque country.1990

Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer.* 1975;15 :617-31.

Baena Diez JM, Garcia Lareo M, Marti Fernandez J, Leon Marin I, Muniz Llama D, Teruel Gila J, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in primary care: sero-epidemiological study]. *Aten Primaria.* 2002 ;29 :553-7.

Bingham S, Riboli E..Diet and cancer--the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Nat Rev Cancer.* 2004 ;4:206-15.

Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK. (1996) Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis.* 17:515-23.

Bogovski, P. and Bogovski, S. Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. *Int. J. Cancer* 1981; 27: 471-474

Bonnett R, Holleyhead R, Johnson BL, Randall EW. Reaction of acidified nitrite solutions with peptide derivatives: evidence for nitrosamine and thionitrite formation from ¹⁵N N.m.r. studies. *J Chem Soc [Perkin 1].* 1975;2261-41.

Botterweck AA, Schouten LJ, Volovics A, Dorant E, van Den Brandt PA. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol.* 2000 ; 29:645-54.

Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. *Int J Cancer* 1990; 45: 896-901.

Charnley G, Tannenbaum SR. Flow cytometric analysis of the effect of sodium chloride on gastric cancer risk in the rat. *Cancer Res.* 1985 ;45 :5608-16.

Cornee J, Lairon D, Velema J, Guyader M, Berthezene P. An estimate of nitrate, nitrite and N-nitrosodimethylamine concentrations in french food products or food groups. *Sciences des Aliments*, 1992;12:155-97

Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, et al. Chemoprevention of Gastric Dysplasia: Randomized Trial of Antioxidant Supplements and Anti-Helicobacter pylori Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1881-1888.

Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988 ; 48:3554-60.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992 ;52:6735-40.

Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* 2003 ; 63:2358-60.

Dallongeville J, Marecaux N, Fruchart JC, Amouyel P. Cigarette smoking is associated with unhealthy patterns of nutrient intake: a meta-analysis. *J Nutr.* 1998,128:1450-7.

De Stefani E, Boffetta P, Mendilaharsu M, Carzoglio J, Deneo-Pellegrini H. Dietary NA, heterocyclic amines, and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*, 1998;30:158-62.

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer.* 1998; 83:2049-53

Dich J, Jarvinen R, Knekt P, Penttila PL. Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Food Addit Contam.* 1996; 13:541-52.

Druckey H, Preussmann R., Ivanovic S, S., & SCHMÄHL, D. . Organotropic carcinogenic effects of 65 different N-nitroso- compounds in BD-rats. *Z. Krebsforsch.* 1967; 69: 103-201 (in German).

Eichholzer M, Gutzwiller F. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Rev.* 1998: 56:95-105.

Ellen G, Egmond E, Van Loon JW, Sahertian ET, Tolsma K. Dietary intakes of some essential and non-essential trace elements, nitrate, nitrite and N-NA, by Dutch adults: estimated via a 24-hour duplicate portion study. *Food Addit Contam.* 1990; 7:207-21.

El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.

Faivre J, Forman D, EsteÁve J, Gatta G and the EURO CARE Working Group*Survival of Patients with Oesophageal and Gastric Cancers in Europe. *European Journal of Cancer*, 1998; 34: 2167-75,

Fajen JM, Carson GA, Rounbehler DP, Fan TY, Vita R, Goff UE, Wolf MH, Edwards GS, Fine DH, Reinhold V, Biemann K.N-nitrosamines in the rubber and tire industry.Science. 1979 ;205:1262-4.

Feldman RA.: would eradication of *Helicobacter pylori* infection reduce the risk of gastric cancer? *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 ;15 Suppl 1:2-5.

Ferlay J, F. Bray, P. Pisani and D.M. Parkin.GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004

Food Balance Sheets. FAO. Last access 2006 <http://faostat.fao.org/>

Food Standards Agency. McCance and Widdowson's The Composition of Foods, Sixth summary edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2002

Forbes GM, Warren JR, Glaser ME, Cullen DJ, Marshall BJ, Collins BJ.Long-term follow-up of gastric histology after *Helicobacter pylori* eradication.J Gastroenterol Hepatol. 1996 ;11:670-3.

Freund, H. A. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann. int. Med.*1937; 10: 1144-1155.

Galanis DJ, Kolonel LN, Lee J, Nomura A. Intakes of selected foods and beverages and the incidence of gastric cancer among the Japanese residents of Hawaii: a prospective study. *Int J Epidemiol* 1998; 27:173 – 80.

Garcia-Closas R, Berenguer A, Gonzalez CA.Changes in food supply in Mediterranean countries from 1961 to 2001.*Public Health Nutr.* 2006 ;9:53-60.

Gatta G, Capocaccia R, Coleman MP, Gloeckler Ries LA, Hakulinen T, et al. Toward a comparison of survival in American and European cancer patients.*Cancer.* 2000 15;89:893-900.

Geuther A, Lie bigs, *Annalen* 1863; 128-1519

J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani and D.M. Parkin. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARC Press, Lyon, 2004

Gonzalez CA, Agudo A, Montes J, Riboli E, Sanz JM. Tobacco and alcohol intake in relation to adenocarcinoma of the gastric cardia in Spain. *Cancer Causes Control.* 1994a ; 5:88-9

Gonzalez CA, Riboli E, Badosa J, Batiste E, Cardona T, Pita S. et al. Nutritional factors and gastric cancer in Spain. *Am J Epidemiol.*1994b; 139 : 466-73.

Gonzalez CA, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Dorronsoro M, Barricarte A, et al. The European prospective investigation about cancer and nutrition (EPIC)]. *Rev Esp Salud Publica.* 2004 ;78:167-76.

Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Bueno-de-Mesquita HB, Ceroti M, Boeing H, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer*. 2006 ;118:2559-66.

Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Nyren O, Agren A, Martinez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Tormo MJ, Quiros JR, Allen N, Bingham S, Day N, Miller A, Nagel G, Boeing H, Overvad K, Tjonneland A, Bueno-De-Mesquita HB, Boshuizen HC, Peeters P, Numans M, Clavel-Chapelon F, Helen I, Agapitos E, Lund E, Fahey M, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2003 ; 107:629-34.

Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*. 2002 Jul 20;100(3):249-60.

González CA. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr*. 2006 ;9 (1A):124-6.

Harrison. *Principios de medicina interna*. Mc Graw –Hill. 16 edición. 2005

Hecht SS, Trushin N. DNA and hemoglobin alkylation by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and its major metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in F344 rats. *Carcinogenesis*. 1988 ;9:1665-8.

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut*. 2001 ;49:347-53.

Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med*. 2004 ;128:765-70.

Herron DC, Shank RC. Methylated purines in human liver DNA after probable dimethylnitrosamine poisoning. *Cancer Res*. 1980 Sep; 40:3116-7.

Hill M. J. Factors controlling endogenous N-nitrosation. *Eur. J. Cancer Prev*. 1996; 5:71-74

Hotchkiss JH. Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. *Cancer Surv*. 1989; 8:295-321.

Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol*. 2001 ;14:767-90.

Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. *Gut*. 1992, 33:429-31.

Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*. 2001; 22:199-202.

- IARC Monographs (Vol 83) Tobacco Smoke and Involuntary Smoking .June 2002
- IARC Handbooks of Cancer Prevention, Vol. 8. Fruit and Vegetables Bianchini and Baino . Oxford University Press, 2004
- Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, Suzuki T, Matsuura A, Nakamura T, et al. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer — data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer* 1996 ; 66 :309 – 14.
- Instituto Nacional de Estadística (INE). 2003. Available at <http://www.ine.es>
- International Agency for Research on Cancer. Overall Evaluation of Carcinogenicity to Humans. IARC monographs Vol. 1-82. (Last updated January 2004, last accessed March 2004). <http://monographs.iarc.fr>
- Ito LS, Inoue M, Tajima K, Yamamura Y, Kodera Y, Hirose K, et al. Dietary factors and the risk of gastric cancer among Japanese women: a comparison between the differentiated and non-differentiated subtypes. *Ann Epidemiol* 2003; 13 : 24 – 31.
- Jenab M, Bingham S, Ferrari P, Friesen MD, Al-Delaimy WK, Luben R, et al.. Long-term cryoconservation and stability of vitamin C in serum samples of the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:1837-40.
- Kamiyama S, Ohshima H, Shimada A, Saito N, Bourgade MC, Ziegler P, Bartsch H Urinary excretion of N-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants in high- and low-risk areas for stomach cancer in northern Japan. *IARC Sci Publ*. 1987; 84:497-502.
- Knekt P, Jarvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer*. 1999 ;80:852-6.
- Kneller RW, McLaughlin JK, Bjelke E, Schuman LM, Blot WJ, Wacholder S, et al. A cohort study of stomach cancer in a high-risk American population. *Cancer* 1991 ; 68 : 672 – 8.
- Kogevinas M, Sala M, Boffetta P, Kazerouni N, Kromhout H, Hoar-Zahm S. Cancer risk in the rubber industry: a review of the recent epidemiological evidence. *Occup Environ Med*. 1998 ;55:1-12.
- La Vecchia C, D'Avanzo B, Airoldi L, Braga C, Decarli A. Nitrosamine intake and gastric cancer risk. *Eur J Cancer Prev*. 1995;4:469-74.
- Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int J Cancer*. 2000 ;85:340-6.
- Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *Int J Cancer*. 2006 ;119:915-9

Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathology Microbiology Scand*, 1965;64, 31–49.

Le Marchand L, Donlon T, Seifried A, Wilkens LR. Red meat intake, CYP2E1 genetic polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Oct; 11:1019-24.

Levi F, Lucchini F, Gonzalez JR, Fernandez E, Negri E, La Vecchia C. Monitoring falls in gastric cancer mortality in Europe. *Ann Oncol*. 2004 Feb; 15(2):338-45.

Levi F, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. Cancer mortality in Europe, 1995-1999, and an overview of trends since 1960. *Int J Cancer*. 2004 ; 110:155-69.

Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res*. 2006 ;66:1859-65.

Licht W.R., Deen W.M. Theoretical model for predicting rates of nitrosamine and nitrosamide formation in the human stomach. *Carcinogenesis*. 1988; 9 :227-37.

Lindblad M, Rodriguez LA, Lagergren J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. *Cancer Causes Control*. 2005;16:285-94.

Lunet N, Lacerda-Vieira A, Barros H. Fruit and vegetables consumption and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutr Cancer*. 2005;53:1-10.

Maki T, Tamura Y, Shimamura Y, Naoi Y. Estimate of the volatile nitrosamine content of Japanese food. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1980;25:257-61.

Margison, G. P. and O'Connor, P. J. Nucleic acids and modification by N-nitroso compounds. In Grover, P. L., ed., *Chemical Carcinogens and DNA*, 1979; Vol 1. Boca Raton, Florida, CRC Press: 111-159.

Mataix Verú J, Llopis González J, Martínez de Victoria E, Montellano Delgado MA, Lopez Frías M & Aranda Ramirez P 1999. Evaluation of the Nutritional Status in the Autonomous Community Of Andalucía. Granada: Public health Service & Institute of Nutrition and Food Technology of the University of Granada.

Mayne ST, Risch HA, Dubrow R, Chow WH, Gammon MD, Vaughan TL. et al. Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10. 1055-1062.

McCullough ML, Robertson AS, Jacobs EJ, Chao A, Calle EE, Thun MJ. A prospective study of diet and stomach cancer mortality in United States men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 ; 10 : 1201 – 5.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food .Nitrate, Nitrite and N-Nitrosocompounds in foods: Second Report.Food surveillance Paper o.23. HMSO, London.1992

Mirvish SS. Blocking the formation of N-nitroso compounds with ascorbic acid in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci.* 1975 Sep 30;258:175-80.

Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* 1995 ; 93:17-48. Review. Erratum in: *Cancer Lett* 1995; 97:271.

Ngoan LT, Mizoue T, Fujino Y, Tokui N, Yoshimura T. Dietary factors and stomach cancer mortality. *Br J Cancer* 2002; 87: 37 – 42.

Norat T, Riboli E. Fruit and vegetable consumption and risk of cancer of the digestive tract: meta-analysis of published case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ.* 2002; 156:123-5.

Ohshima H, Bartsch H. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res.* 1981 ;41:3658-62.

Osterdahl BG. Volatile nitrosamines in foods on the Swedish market and estimation of their daily intake. *Food Addit Contam.* 1988 ;5:587-95.

Palli D, Bianchi S, Decarli A, Cipriani F, Avellini C, Cocco P, Falcini F, Puntoni R, Russo A, Vindigni C, et al. A case-control study of cancers of the gastric cardia in Italy. *Br J Cancer.* 1992; 65:263-6.

Parkin DM. International variation. *Oncogene.* 2004 ; 23:6329-40.

Penttila PL, Rasanen L, Kimppa S. Nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds in Finnish foods and the estimation of the dietary intakes. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1990 Apr; 190(4):336-40.

Perez-Perez C, Israel D. Role of iron in *Helicobacter pylori*: its influence in outer membrane protein expression and in pathogenicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 1263 -5

Pignatelli B, Bancel B, Esteve J, Malaveille C, Calmels S, Correa P, Patricot LM, Laval M, Lyandrat N, Ohshima H. Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *Helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev.* 1998;7 :439-47.

Pignatelli B, Malaveille C, Rogatko A, Hautefeuille A, Thuillier P, Munoz N, Moulinier B, Berger F, De Montclos H, Lambert R, et al. Mutagens, N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesions of the stomach. *Eur J Cancer.* 1993;29A(14):2031-9.

Pignatelli B, Richard I, Bourgade MC, Bartsch H. Improved group determination of total N-nitroso compounds in human gastric juice by chemical denitrosation and thermal energy analysis. *Analyst.* 1987 Jul;112(7):945-9

Pignatelli,B., Bancel,B., Esteve,J., Malaveille,C., Calmels,S., Correa,P.,et al. (1998). Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and Helicobacter pylori infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7, 439–447.

Plummer M, Franceschi S, Munoz N. Epidemiology of gastric cancer.*IARC Sci Publ.* 2004;157:311-26.

Pobel D, Riboli E, Cornee J, Hemon B, Guyader M. Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: a case-control study in Marseille, France. *Eur J Epidemiol.*1995; 11:67-73.

Preston-Martin S.N-nitroso compounds as a cause of human cancer. *IARC Sci Publ.* 1987; 84:477-84.

Preussmann R. Occurrence and exposure to N-nitroso compounds and precursors. *IARC Sci Publ.* 1984;57:3-15

Ràfols A., Solanas P., Ramió G. et al. Prevalencia de la infecció per Helicobacter Pylori en atenció primària de salut. *Atenció Primària* 2000; 25: 563-567

Ralt D and Tannenbaum SR . The role of bacteria in nitrosamine formation. In: N-Nitroso Compounds, R.A. Scanlan and S.R. Tannenbaum (eds.), *Advances in Chemistry Series No. 174*, American Chemical Society: Washington, DC, 1981;pp. 157-164

Ridd JH. Nitrosation, diazotisation and diamination. *Q Rev* 1961; 15: 418-441

Risch HA, Jain M, Choi NW, Fodor JG, Pfeiffer CJ, Howe GR, Harrison LW, Craib KJ, Miller AB. Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 947-959.

Rodés J. y Guardia J., *Medicina Interna Rodés-Guardia*. Segunda edició, 2004

Rogers MA, Vaughan TL, Davis S, Thomas DB. Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer.*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4:29-36.

Rokkas T, Papatheodorou G, Karameris A, Mavrogeorgis A, Kalogeropoulos N, Giannikos N. Helicobacter pylori infection and gastric juice vitamin C levels. Impact of eradication. *Dig Dis Sci.* 1995;40: 615-21.

Rothman and Greenland.*Modern Epidemiology*.Lippincott Raven.2 Edition 1998

Saffill R, Margison G, O'Connor P. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents.*Biochim Biophys Acta* 1985;823:111-145.

Simon JA, Hudes ES, Perez-Perez GI.Relation of serum ascorbic acid to Helicobacter pylori serology in US adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey.*J Am Coll Nutr.* 2003 ; 22:283-9

Shimizu N, Ikehara Y, Inada K, Nakanishi H, Tsukamoto T, Nozaki K, Kaminishi M, Kuramoto S, Sugiyama A, Katsuyama T, Tatematsu M. Eradication diminishes enhancing effects of *Helicobacter pylori* infection on glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* 2000 ;60:1512-4.

Shuker DE, Margison GP. Nitrosated glycine derivatives as a potential source of O6-methylguanine in DNA. *Cancer Res.* 1997 ; 57:366-9.

Shuker DE. The enemy at the gates? DNA adducts as biomarkers of exposure to exogenous and endogenous genotoxic agents. *Toxicol Lett.* 2002 ;134:51-6.

Sierra R, Ohshima H, Munoz N, Teuchmann S, Pena AS, Malaveille C, Pignatelli B, Chinnock A, el Ghissassi F, Chen C, et al. Exposure to N-nitrosamines and other risk factors for gastric cancer in Costa Rican children. *IARC Sci Publ.* 1991; 105:162-7.

Silvester KR, Bingham SA, Pollock JR, Cummings JH, O'Neill IK. Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. *Nutr Cancer.* 29:13-23.

Slimani, N., Kaaks, R., Ferrari, P., Casagrande, C., Clavel-Chapelon, F., Lotze, G., Kroke, A., Trichopoulos, D., Trichopoulou, A., Lauria, C., Bellegotti, M., Ocke', M. C., Peeters, P. H. M., Engeset, D., Lund, E., Agudo, A., Larrañaga, N., Mattisson, I., Andren, C., Johansson, I., Davey, G., Welch, A. A., Overvad, K., Tjønneland, A., van Staveren, W. A., Saracci, R., and Riboli, E. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition calibration study: rationale, design and population characteristics. *Publ. Health Nutr.*, 2002; 5 : 1125–1145.

Sobala GM, Schorah CJ, Shires S, Lynch DA, Gallacher B, Dixon MF, Axon AT. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut.* 1993 ;34:1038-41

Spiegelhalter B, Preussmann R. Occupational nitrosamine exposure. 1. Rubber and tyre industry. *Carcinogenesis.* 1983 ;4 :1147-52

Stadtlander CT, Waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis.* 1999 ;20:2195-208.

Stephany RW, Schuller PL. Daily dietary intakes of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique. *Oncology.* 1980;37:203-1

Stewart, Bernard W. and Paul Kleihues, eds. *World Cancer Report.* IARC Press: Lyon, 2003.

Stich HF, Hornby AP, Dunn BP. The effect of dietary factors on nitrosoproline levels in human urine. *Int J Cancer.* 1984 ;33:625-8

Straif K, Weiland SK, Bungers M, Holthenrich D, Taeger D, Yi S, Keil U. Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers. *Occup Environ Med.* 2000 ;57:180-7.

- Sugimura, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000;21: 387-195.
- Suzuki H, K Iijima, A Moriya, K McElroy, G Scobie, V Fyfe and K E L McColl are maximal at the gastric cardia Conditions for acid catalysed luminal nitrosation. *Gut* 2003; 52:1095–1101
- Tatematsu M, Tsukamoto T, Mizoshita T. Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: the origin of gastric cancers and heterotopic proliferative glands in Mongolian gerbils. *Helicobacter*. 2005;10:97-106.
- Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 1997 Aug 7; 72(4):565-73.
- Tricker AR, Pfundstein B, Theobald E, Preussmann R, Spiegelhalter B. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Food Chem Toxicol*. 1991 ; 29:729-32.
- Tricker AR, Pfundstein B, Theobald E, Preussmann R, Spiegelhalter B. Mean daily intake of volatile N-nitrosamines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Food Chem Toxicol* 1991;29:729-32.
- Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential *Mutat Res*. 1991 ; 259:277-89.
- Tricker AR. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev*. 1997; 6:226-68.
- U.S. Assembly of Sciences. The health effects of nitrate, nitrite and Nitrosocompounds. Part I of a two-part Study by the Committee on Nitrate and alternative curing agents in foods. National Research Council. Washington DC: National Academy Press .1981
- Van den Brandt PA, Botterweck AA, Goldbohm RA. Salt intake, cured meat consumption, refrigerator use and stomach cancer incidence: a prospective cohort study (Netherlands). *Cancer Causes Control* 2003; 14 :427 – 38.
- van Kappel, A. L., Amoyel, J., Slimani, N., Vozar, B., and Riboli, E. EPIC-SOFT Picture Book for Estimation of Food Portion Sizes. Lyon: IARC, 1994
- Wade RS, Castro CE. Redox reactivity of iron (III) porphyrins and heme proteins with nitric oxide. Nitrosyl transfer to carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur. *Chem Res Toxicol*. 1990 ;3:289-91.
- Walker R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 1990; 7:717-68
- Walker, R. Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit Contam* 1990; 7:717-768.
- Walters CL. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. *Food Addit Contam* 1992;9:441-7

Wang T, Kakizoe T, Dion P, Furrer R, Varghese AJ, Bruce WR. Volatile nitrosamines in normal human faeces. *Nature*. 1978 ; 276:280-1.

Warren, J. R y Marshal JI B. 1983. *Lancet*: 1273-1275.

Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, and Forman D. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life *BMJ*, Mar 1994; 308: 750 – 753

WHO. International Statistical Classification of diseases and Related Health Problems 10th version Geneva, World Health Organization. 1992

Wilkins LR, Kadir MM, Kolonel LN, Nomura AM, Hankin JH. Risk factors for lower urinary tract cancer: the role of total fluid consumption, nitrites and NA, and selected foods. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996: 5:161-6.

Wink DA, Fellisch M, Vodovotz Y, et al. In: Gilbert DL, Coton CA, eds. *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. New York: Kluwer. Academic/Plenum Publishers, 1999:245–91.

Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS; China Gastric Cancer Study Group. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 ;291:187-94

World Cancer Research Fund. *Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington DC: American Institute for Cancer Research. 1997

Wu-Williams AH, Yu MC, Mack TM. Life-style, workplace, and stomach cancer by subsite in young men of Los Angeles County. *Cancer Res*. 1990 May 1;50(9):2569-76.

Yamamoto M, Iwata R, Ishiwata H, Yamada T, Tanimura A. (1984) Determination of volatile nitrosamine levels in foods and estimation of their daily intake in Japan. *Food Chem Toxicol*. 1984;22:61-4.

Yang C. S., Yoo J. S. H., Ishizaki H., Hong J. Cytochrome P450IIE1: role in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab. Dispos*. 1990; 22: 147-159,

Zatonski W, Ohshima H, Przewozniak K, Drosik K, Mierzwinska J, Krygier M, Chmielarczyk W, Bartsch H. *Int J Cancer*. 1989;44:823-7. Urinary excretion of N-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high- and low-risk areas for stomach cancer in Poland.

Zhang, Z.W. and Farthing, M.J. The roles of vitamin C in *Helicobacter pylori* associated gastric carcinogenesis. *Chin. J. Dig. Dis*. 2005; 6, 53–58.

Zhang ZW, Patchett SE, Perrett D, Katelaris PH, Domizio P, Farthing MJ. The relation between gastric vitamin C concentrations, mucosal histology, and CagA seropositivity in the human stomach. *Gut*. 1998 Sep;43(3):322-6.