

Papel de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en la carcinogénesis

Gilberto Pérez Trueba* y Gregorio Martínez Sánchez.*

Centro de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Avenida 146, No. 3102, Playa, Código Postal 11600, *Centro de Investigación y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de marzo del 2000. Aceptado: 22 de enero del 2001.

Palabras clave: estrés oxidativo, mutagénesis, promoción de tumor, p53, apoptosis, antioxidantes.
Key words: oxidative stress, mutagenesis, tumor promotion, p53, apoptosis, antioxidants.

RESUMEN. En los organismos aeróbicos puede generarse estrés oxidativo tanto de fuentes endógenas como de fuentes exógenas. No obstante los mecanismos de defensa antioxidantes, el daño celular por especies reactivas del oxígeno (ERO), que incluyen anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, es ubicuo. Las lesiones relacionadas con las ERO que no causan muerte celular pueden estimular el desarrollo de diversas patologías relacionadas con la edad como son la aterosclerosis, la artritis, los desórdenes neurodegenerativos y el cáncer. En esta revisión se discuten los efectos del estrés oxidativo en diferentes estados de carcinogénesis y el papel de las enzimas antioxidantes y de algunos elementos nutrientes en este proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos. La mutagénesis debida al daño oxidativo sobre el ADN está contemplada como un evento frecuente en las células humanas normales. Un gran cúmulo de experiencias sugiere un importante papel de las ERO en la expansión de clones tumorales y su malignización, siendo considerados como carcinógenos de gran relevancia. Por otra parte usando técnicas inmunohistoquímicas fue demostrado que todos los cánceres examinados hasta la fecha tienen algunos desbalances en los niveles de enzimas antioxidantes con respecto a la célula de origen. En un futuro el desarrollo de nuevos avances en la terapia contra este mal, basados en la modulación de estados redox celulares, pueden conducir a herramientas adicionales contra la carcinogénesis por ERO.

ABSTRACT. In aerobic life, oxidative stress arise from both endogenous and exogenous sources. Despite antioxidant defense mechanisms, cell damage from oxygen free radicals (OFR), which include superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, is ubiquitous. OFR-related lesions that do not cause cell death can stimulate the development of several age-dependent pathologies such as atherosclerosis, arthritis, neurodegenerative disorders and cancer. This review discusses the effects of oxidative stress at different stages of carcinogenesis and the role of antioxidant enzymes and some nutrients in this microevolutionary process that requires the cumulative action of multiple events. Mutagenesis through oxidative DNA damage is widely hypothesized to be a frequent event in the normal human cell. A large body of evidence suggests an important role of OFR in the expansion of tumor clones and acquisition of malignant properties, being considered a relevant class of carcinogens. In addition, the use of immunohistochemical techniques has showed that all cancers examined to date manifest some imbalance in their antioxidant mechanisms to respect the primary cell. In the near future new insights in cancer therapies, based on modulation of cellular redox state, may lead to a way to additional tools against carcinogenesis from OFR.

INTRODUCCION

Las ERO pueden formarse en el organismo no solo a través del metabolismo de los xenobióticos, sino también como una consecuencia de procesos fisiológicos normales tales como la fosforilación oxidativa y a través de la acción de oxidasas de función mixta. Durante el primero de los procesos entre un 1 y un 5 % del oxígeno total experimenta la transferencia de un único electrón, generando el radical anión superóxido en cantidades correspondientes a 2 kg por año en el humano.¹ Una vez generado este radical, constituye el punto de partida para la formación del resto de las ERO (peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo). Afortunadamente, existe en el organismo un balance entre la generación de especies oxidantes y especies antioxidantes, el cual al romperse origina lo que se conoce como estrés oxidativo. Sin embargo, a pesar de los mecanismos de defensa antioxidantes que neutralizan los efectos de estas especies, el daño a proteínas, a los lípidos y al ADN relacionado con las ERO se va acumulando durante la vida y conduce a estados patológicos diversos como son: la aterosclerosis, artritis, desórdenes neurodegenerativos (Parkinson, Alzheimer) y cáncer, entre otras alteraciones.^{2,3}

ERO EN LA INICIACIÓN, PROMOCIÓN Y PROGRESIÓN TUMORAL

Recientemente, se ha acumulado un gran número de evidencias que

*Correspondencia a: Gilberto Pérez Trueba.

identifican las ERO como carcinógenos de gran relevancia.^{4,8}

Actualmente, se conoce que el cáncer se desarrolla como un proceso microevolutivo que requiere de la acumulación de múltiples eventos,⁹ los cuales tienen lugar en un clón de células y comprenden tres estados:

- Inducción de mutación en el ADN de una célula somática (iniciación).
- Estimulación de la expansión tumoral del clón mutado (promoción).
- Malignización del tumor (progresión).

Se ha comprobado que las ERO pueden estimular el desarrollo tumoral en las tres etapas señaladas.¹⁰⁻¹⁴ Asimismo, estas desempeñan un papel clave en los mecanismos de iniciación y progresión de cáncer después de la exposición ocupacional a partículas minerales. El estímulo inducido primariamente por ERO resulta en la secreción incrementada de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores, promoviendo eventos importantes en la progresión del daño celular y la enfermedad pulmonar.¹⁵

Estudios recientes destacan el posible papel de las ERO en la angiogénesis en la que los breves episodios de hipoxia-reoxigenación, sobre las células del endotelio microvascular humano, causan la formación de ERO y la activación del factor de transcripción nuclear (NF-Kappa B), acelerando significativamente el grado de morfogénesis tubular o neovascularización que define este proceso.¹⁶

Mecanismos mutagénicos de las ERO

La primera fase de la carcinogénesis; para que tenga lugar debe ocurrir una modificación permanente del material genético de una célula. Se ha estimado que el número de ataques por agentes oxidantes al ADN es de 100 000 por célula, por día en el humano.¹⁷ Aunque estos daños son continuamente reparados, una pequeña proporción escapa a los mecanismos reparadores y representa un importante potencial mutagénico que se acumula en el transcurso de los años.¹⁸

Se han descrito más de 100 modificaciones sobre el ADN por parte de las ERO, incluyendo modificaciones de bases purínicas y pirimídicas, de la desoxirribosa, rupturas de cadena simple del ADN, entre otras a partir de experimentos *in vitro* y de estudios radioquímicos del ADN y nucleótidos.^{19,20,21}

Los posibles mecanismos por los que transcurre el daño al ADN inducidos por estrés oxidativo son:

- Acción del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), generado por la interacción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con el hierro (Fe^{2+}) o cobre (Cu^{2+}) constitutivos, unidos o cercanos al ADN, o liberados en el interior celular a causa del estrés oxidativo. La reacción del H_2O_2 con estos iones metálicos reducidos es conocida como reacción de Fenton y es una vía fundamental en la generación de la especie más reactiva y potente de todas las derivadas del oxígeno que es el $\text{OH}\cdot$.

El radical $\text{OH}\cdot$ es capaz de reaccionar con todos los componentes del ADN, provocando ruptura de las cadenas (simple y doble) del ADN. Su interacción directa con las bases rinde una gran cantidad de productos de degradación característicos que pueden bloquear la replicación o inducir puntos de mutación al impedir la lectura de la base durante dicho fenómeno. Al mismo tiempo, puede provocar ruptura del enlace glicosídico, generando sitios desprovistos de bases, tanto purínicas como pirimidínicas (sitios abásicos) que han mostrado ser mutagénicos *in vivo*²² (Fig. 1).

- Incremento del calcio (Ca^{2+}) libre intracelular, ya sea como consecuencia de su movilización a partir de sus depósitos intracelulares (el retículo endoplasmático y la mitocondria) o a través del influjo extracelular. Esta respuesta es provocada por una sobrecarga de estrés oxidativo que agota las reservas de antioxidantes endógenos, lo que constituye una señal para la liberación de este elemento; que una vez liberado, además de provocar otras respuestas, conduce a la activación de endonucleasas que fragmentan al ADN (proceso que normalmente tiene lugar durante la apoptosis)²³ (Fig. 1). Estos mecanismos no son excluyentes, por lo que pueden tener lugar simultáneamente.

El incremento en la generación de ERO en las células de los mamíferos conduce a un incremento de la mutagénesis (Fig. 2). La relación entre la concentración de estas y el efecto provocado es compleja, siendo más conveniente para lograr un efecto mutagénico (iniciador), concentraciones intermedias de ERO. Sin embargo, en la figura 2 no se presentan bien delineados los efectos de

la concentración de las ERO en cada una de las etapas señaladas, tomando en consideración que una concentración pequeña de ERO puede causar la muerte celular si el gen blanco de su ataque es esencial para la viabilidad celular y que la magnitud del estrés oxidativo depende de diferentes factores, como el tipo y reactividad de la ERO involucrada, la presencia de carcinógenos y la posición del ciclo celular por el que transcurre la célula en el momento del ataque oxidativo.¹³

Las ERO dañan el ADN tanto desde el punto de vista químico como estructural. Las modificaciones que producen son características y se han encontrado en numerosos tumores.^{24,25} Son capaces de atacar sus bases, así como a su esqueleto desoxirribosilico, al mismo tiempo que producen alteraciones sobre otros componentes celulares tales como proteínas, lípidos, para generar otros intermediarios reactivos que se acoplan a las bases del ADN. Esas lesiones son genotóxicas e inducen mutaciones que se observan en oncogenes y en genes supresores de tumores mutados.^{26,27,28}

Dentro de los productos de degradación de las bases, como consecuencia del ataque de estas especies, la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) es la modificación más frecuente con una incidencia de 1 por cada 100 000 residuos de guanidina.^{29,30} Una vez formada, puede originar transversión de G-C a T-A, la que es frecuente en los oncogenes ras^{31,32} y representa el posible mecanismo iniciador tumoral por ERO. Esta transversión en el gen supresor de tumores p53 se ha observado en cáncer de pulmón e hígado.³³

El oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es una de las principales ERO involucradas en la inducción de la ruptura de las hélices del ADN y en la formación de aductos de la 8-OH-dG.³⁴ La excesiva producción de NO también ha sido asociada a este proceso patológico que es el cáncer.³⁵

Ha sido constatada la participación de las ERO en el daño tisular, manifestado a través de un incremento de la peroxidación lipídica, en la carcinogénesis renal empleando ratas como biomodelo.³⁶

ERO en la promoción tumoral

Las ERO pueden estimular la expansión de clones celulares mutados mediante la modulación temporal de genes relacionados con la proliferación y muerte celular. Nive-

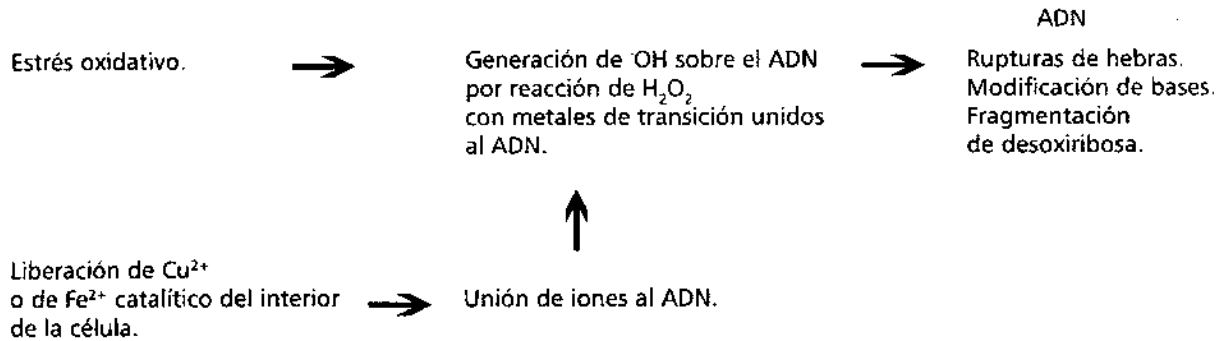
les muy elevados de estrés oxidativo pueden inhibir la proliferación celular por sus efectos citotóxicos, mientras que niveles intermedios estimulan la división y promoción tumoral

(Fig. 2). Se considera que la estimulación de la producción intracelular de ERO es la vía fundamental para la promoción tumoral por ERO.¹³

Promoción tumoral mediada por Ca^{2+}

Las ERO inducen un incremento notable del Ca^{2+} citosólico, movilizándolo de las reservas intrace-

A. REACCIÓN DE FENTON



B. ACTIVACIÓN DE NUCLEASAS

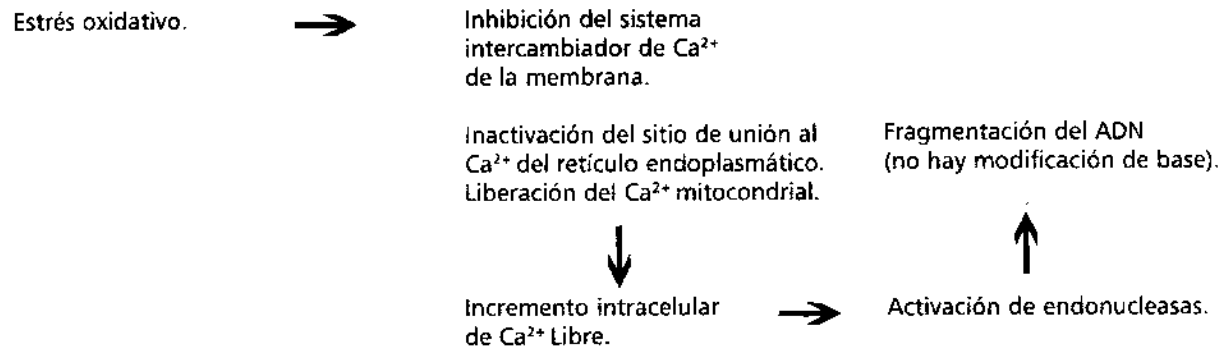


Fig. 1. Hipótesis para explicar el daño al ADN como resultado de la exposición de las células al estrés oxidativo.

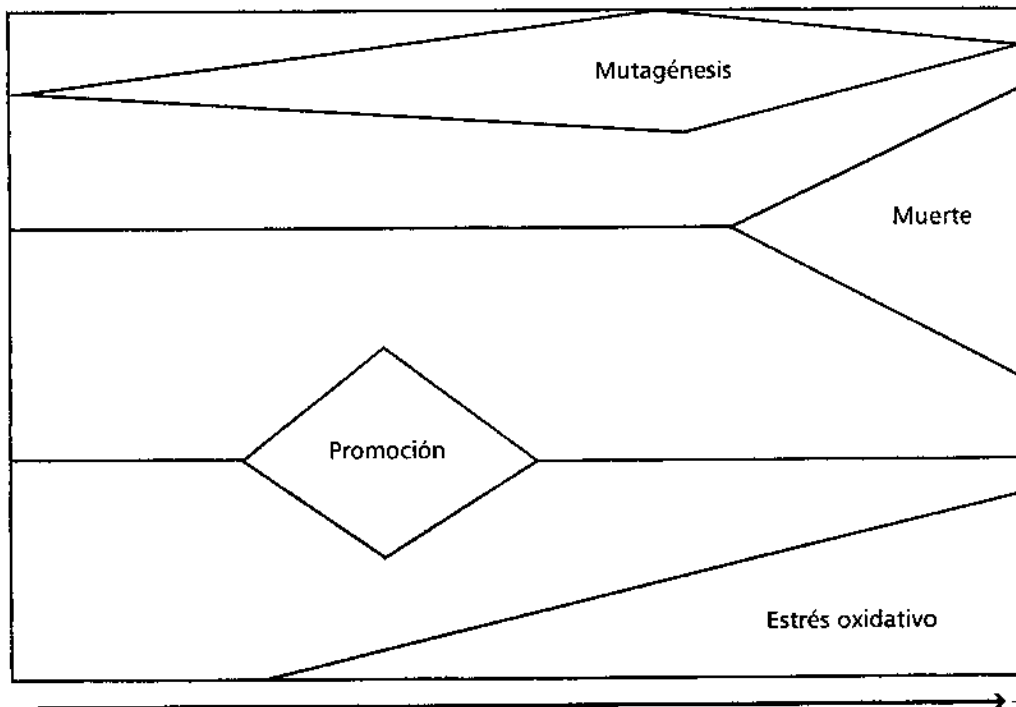


Fig. 2. Modelo hipotético que muestra la posible relación concentración-respuesta entre la generación de ERO, el estrés oxidativo y el efecto carcinogénico.

lulares e incrementando su flujo desde el medio extracelular.³⁷ El efecto del Ca^{2+} puede tener lugar por vía directa induciendo proto-oncogenes como *c-fos*³⁸ o de forma indirecta, modificando la fosforilación de factores transcripcionales por proteína quinasa C dependiente de Ca^{2+} (PKC), la cual conjuntamente con otras quinasas, regula la actividad de factores transcripcionales por múltiples cascadas de fosforilación.

Otros mecanismos de promoción tumoral por ERO

Las ERO pueden estimular la actividad PKC por vía directa mediante la oxidación de sus residuos cisteína en el dominio regulatorio de la enzima. Pueden ejercer efectos directos sobre la regulación de la actividad de factores transcripcionales como el factor NF-Kappa B que tiene bajo su control una gran variedad de genes.³⁹

En experimentos *in vitro* se ha visto que las uniones de los factores transcripcionales NF-Kappa B y AP-1 al ADN tienen lugar en ambientes reductores y se reprimen en condiciones oxidativas. Los mecanismos de esta regulación redox de los factores transcripcionales incluyen al calcio y a la fosforilación de proteínas; aunque ciertos factores de transcripción son activados por oxidación.³⁶

Recientemente fue demostrado, a partir de estudios *in vitro*, que el H_2O_2 actúa como un promotor de tumores en células epiteliales (línea celular T51 B) no neoplásicas de hígado de rata, a través de la inducción de la expresión de *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* y *egr-1* (genes de respuesta temprana) y la alteración a nivel de la comunicación entre las uniones abiertas (*gap-junctions*).⁴⁰

ERO en la progresión tumoral

El estado final del cáncer es la malignización tumoral que se caracteriza por un crecimiento acelerado de las células, la evasión de la vigilancia inmunológica y la invasión de otros tejidos. Muchos de estos cambios involucran lesiones adicionales al ADN, pensándose que la generación elevada de ERO en las células originan un estrés oxidativo persistente que incrementa su inestabilidad genómica, acompañándose de una disminución de las enzimas antioxidantes lo cual incrementa a su vez la sensibilidad de estas células a las ERO.⁴¹

La mayoría de los tumores sólidos experimentales presentan eleva-

dos niveles de la óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS) en el tejido tumoral y el NO así generado facilita la permeabilidad vascular, la cual acelera el suplemento nutricional del tejido tumoral y permite su rápido crecimiento.⁴²

Las alteraciones del gen p53 están entre las de mayor frecuencia en los cánceres humanos. El gen p53 está normalmente involucrado tanto en el control del ciclo celular como en la inducción de la muerte celular; y está involucrado en este segundo proceso principalmente a través de la regulación transcripcional de proteínas pro y antiapoptóticas. Las ERO son poderosos inductores de la actividad de dicho gen; además de que desempeñan un papel en la ejecución de la apoptosis dependiente de este.

La pérdida de la función del p53 representa un evento muy frecuente en la carcinogénesis humana, pero los mecanismos moleculares que relacionan este proceso con el incremento de la malignidad de la célula no están todavía completamente aclarados.⁴³

Frente a radiaciones u otras fuentes de ERO que causan lesiones al ADN, se verifican incrementos del p53 y retardo del ciclo celular, lo cual permite la reparación del ADN antes de la replicación. Mientras que en células con p53 afuncional no tiene lugar un retardo del ciclo celular, por lo que el ADN dañado se perpetúa en las generaciones siguientes, originándose constantes reordenamientos cromosómicos con respecto al ADN inicial. Diferentes resultados experimentales han permitido suponer que el papel primario del p53 es el de proteger de la carcinogénesis a la célula frente a ERO generadas espontáneamente.⁴¹

Varios estudios han confirmado que el gen p53 regula negativamente la Mn SOD, lo que ha evidenciado una actividad incrementada de esta enzima cuando se suprime este gen; así como una disminución de ella misma, luego de una transfección temporal de este en células Hela. Esto produjo una reducción significativa de los niveles de ARNm para la Mn SOD. Por tanto, la Mn SOD constituye un blanco potencial para la proteína p53. Al ponerse de manifiesto una pérdida de la función de este gen en muchos tipos de cánceres humanos, se evidencia una expresión anormalmente incrementada de esta enzima.⁴³

Muchos tipos de tumores pueden originar una respuesta de inten-

sidad variable del sistema inmune. En dependencia de la intensidad de esta respuesta y la susceptibilidad del tumor, las ERO generadas por leucocitos activados pueden:

- Originar un proceso inflamatorio crónico que lejos de conducir a la eliminación del tumor, incrementa la progresión tumoral.
- Conducir a la muerte celular por citotoxicidad o inducir la muerte apoptótica.

Solo elevadas concentraciones de ERO son capaces de destruir el tumor, mientras que bajas concentraciones, combinadas o no con el bloqueo de los mecanismos de muerte celular y el estrés oxidativo, contribuyen a la progresión tumoral.

El proto-oncogén bcl-2 protege la célula tumoral de la muerte apoptótica inducida por ERO, especulándose que tumores con una sobreexpresión de este gen son capaces de burlar la muerte apoptótica inducida por estas especies químicas.¹³ Al mismo tiempo, se ha visto dicha sobreexpresión puede promover la susceptibilidad a mutagénesis inducida por metabolitos del benceno, originados por mecanismos que involucran la participación de ERO, a través de un aumento en la apoptosis y una atenuación de la capacidad reparadora del ADN.⁴⁴

Las especies oxidantes generadas por neutrófilos y eosinófilos activados desempeñan un papel potencial en la carcinogénesis. Los mecanismos involucran la reacción del ácido hipocloroso (HOCl) o del ácido hipobromoso (HOBr), generados por peroxidasas, con el O_2^- intracelular formando el OH. La incubación de ADN con mieloperoxidasa aislada o peroxidasa eosinofílica, concentraciones plasmáticas de Cl⁻ y Br⁻ y un sistema generador de O_2^- , origina daño oxidativo al ADN, lo que da lugar a la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.⁴⁵

PAPEL DE LAS ENZIMAS ANTI-OXIDANTES EN EL CÁNCER

Dentro de los sistemas con que cuenta la célula para la regulación de las concentraciones de ERO se encuentran los antioxidantes de bajo peso molecular (Vitaminas A, C y E; glutatión, etc.) y las enzimas antioxidantes:

- La superóxido dismutasa (SOD) que existe en tres formas: CuZnSOD en el citoplasma, MnSOD en la mitocondria y ECSOD en el fluido extracelular, también acoplada a Cu y Zn.

- La catalasa (CAT), de la que se han encontrado dos formas en tejidos de mamíferos: la citoplasmática y la localizada en los peroxisomas.
- La glutatión peroxidasa (GPx), en tres formas seleno-dependientes; una intracelular (GPx-c), una extracelular o plasmática (GPx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH) que por lo general, está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, posee diferencias estructurales.

La SOD dismuta el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 , mientras que la CAT y la GPx reducen el H_2O_2 a H_2O . Estos tres antioxidantes primarios protegen contra el daño celular y molecular causado por ERO.⁷

Los estudios iniciales, por métodos bioquímicos en homogenatos de tumores, de la actividad de las enzimas antioxidantes aportaban resultados contradictorios debido a que estos métodos no permitían discriminar entre la actividad enzimática en la célula tumoral y la de otros tipos de células que conforman el tumor. El desarrollo reciente de métodos inmunohistoquímicos permitió un estudio más acertado del comportamiento de estas enzimas en un grupo de tumores⁴⁶ (Tabla 1).

Estos estudios han permitido precisar que:

- No existe translocación de las enzimas en su localización subcelular en las células humanas que fueron estudiadas.⁴⁶
- En las células en que se aprecian bajos niveles de MnSOD existen bajos niveles de ARNm para esta enzima presumiblemente por alteraciones de los genes de la región regulatoria o en las proteínas que se unen a estos genes y no en la región que codifica la enzima.
- El mecanismo de inducción de esta enzima por su sustrato ($O_2^{\cdot-}$) no tiene lugar mientras la inducción por citoquinasas se mantiene (TNE, IL, ésteres del forbol).

En las células de adenocarcinomas se aprecia heterogenicidad con respecto a MnSOD (Tabla 1), hecho de implicaciones prácticas, pues sugiere que tumores con elevadas concentraciones de MnSOD son resistentes a terapias generadoras de ERO por radiaciones ionizantes.⁴⁷

Otro hecho importante de repercusión terapéutica es la baja capacidad de un grupo importante de tumores para detoxificar H_2O_2 por disponer de muy bajos niveles de CAT y GPx.⁴⁸

La transfección de ADNc para MnSOD de líneas tumorales humanas (melanoma, carcinoma de mama, glioma, carcinoma escamoso oral)^{48,49} empleando cultivo de tejidos, evidenció que un incremento en la actividad de la MnSOD suprime el crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. El mecanismo por el cual tiene lugar no se conoce, pero se dispone de evidencias que indican que no transcurren por la inducción de muerte celular. El incremento de MnSOD conduce a una disminución de $O_2^{\cdot-}$ y a un incremento de H_2O_2 , este cambio origina modificaciones en el estado redox celular que condicionan daños subletales o modificaciones en rutas fisiológicas que conducen a una disminución del crecimiento tumoral.

Por otra parte, se ha encontrado una disminución de la actividad de la SOD en pacientes con cáncer de pulmón con respecto a individuos sanos.⁵⁰

Las modificaciones de la actividad de MnSOD en los tumores indican en parte trastornos durante el proceso de diferenciación celular⁵¹ y ponen en evidencia que probablemente muchos tumores se originan de células indiferenciadas precursoras. Durante la diferenciación tiene

Tabla 1. Resultados del análisis histoquímico de enzimas antioxidantes en diferentes cánceres humanos.

Tumores	Actividad de las enzimas antioxidantes			
	Cu Zn SOD	Mn SOD	CAT	GPx
Tumores renales				
Carcinoma papilar	↓	↓	↓	↓
Carcinoma transitorio de pelvis renal	↓	↓	↓	↓
Tumor de Wilm's	↓	↓	↓	↓
Adenocarcinoma:				
- Células no granulares	↓	↓	↓	↓
- Células granulares	—	↑	↑	—
Tumores pulmonares				
Carcinoma de células escamosas	↓	↓	↓	↓
Carcinoma de células broncoalveolares	↓	↓	↓	↓
Carcinoma adenoescamoso	↓	↓	↓	↓
Carcinoma de células alargadas indiferenciadas	↓	↓	↓	↓
Carcinoma de pequeñas células	↓	↓	↓	↓
Adenocarcinoma:				
- Células no granulares	↓	↑	↓	↓
- Células granulares	↓	↓	↓	↓
Carcinoma de próstata				
Neoplasia intraepitelial prostática	—	↓	↓	—
Adenocarcinoma:				
- Células no granulares	—	↑	—	—
- Células granulares	—	↓	—	—

Actividad de la enzima superior (↑) inferior (↓) a la del entorno (células normales). Actividad enzimática no determinada.

lugar la especialización mitocondrial (organelo portador de MnSOD), estas crecen en número y tamaño; una desregulación de este proceso conduce a la expresión de concentraciones anormales de esta enzima.

El tratamiento de las enfermedades inducidas por ERO con antioxidantes constituye un aprovechamiento terapéutico. Sin embargo, los mecanismos ejercidos por la mayoría de los agentes quimioterapéuticos y radiaciones ionizantes en la muerte de la célula tumoral, no transcurren a través de un incremento en las acciones antioxidantes por parte de estos agentes, sino por el contrario, a través de la generación de más RL, guiando a un daño tisular irreversible.⁵² Por tanto, niveles relativamente bajos de estrés oxidativo promueven la proliferación celular más que causar degeneración y muerte.²¹

Las radiaciones ionizantes, las cuales son recibidas por aproximadamente la mitad de los pacientes con cáncer, causan modificaciones a las bases del ADN de linfocitos. Los derivados de la antraciclina, cuya citotoxicidad se atribuye a la inhibición de la topoisomerasa II y a la producción intracelular de las ERO, como es el caso de la doxorubicina, producen por ciclaje redox ERO que modifican las bases del ADN.⁵³

Otras terapias incluyen la transfección con ADN de enzimas antioxidantes como forma de modificar el balance redox, compuestos de bajo peso molecular que posean actividad antioxidante, liposomas con enzimas o compuestos antioxidantes, etcétera. Estas terapias deben ser diseñadas atendiendo a las especificidades del tumor. La comprensión y desarrollo de las terapias redox necesita un conocimiento más profundo sobre el balance pro-antioxidante en el interior celular.⁵⁴

En un estudio llevado a cabo con 54 pacientes con cáncer de mama, se evidenció un elevado grado de producción de O_2^- , de H_2O_2 y malondialdehído (MDA) con respecto al grupo control (pacientes con problemas quirúrgicos menores y sin ninguna historia de desórdenes respiratorios ni neoplasia). Al mismo tiempo, las actividades de la SOD y de la GPx estuvieron significativamente aumentadas en todos los grupos, no sucediendo así con la actividad de la CAT, que estuvo significativamente deprimida. Esto último pudiera atribuirse a la producción incrementada de ERO, particularmente de O_2^- y del $\cdot OH$, no sucedien-

do así con las otras dos enzimas, cuyo aumento se atribuyó a la incrementada producción de ERO en sangre. Esto contribuye a reafirmar la hipótesis del estrés oxidativo en la carcinogénesis.⁴⁶

La generación de O_2^- por leucocitos polimorfonucleares (PMN) fue significativamente incrementada en pacientes con leucemia, especialmente en aquellos portadores de las linfocíticas y no linfocíticas agudas; mientras que las concentraciones de H_2O_2 fueron comparables con los controles. Las actividades de la SOD Cu-Zn dependiente y de la GPx en las células rojas estuvieron incrementadas significativamente y no mostraron correlación con el contenido de hemoglobina. Esto puede ser la causa de que en los niveles lipídicos en estos pacientes se mantuvieran normales a pesar del incremento en la producción de O_2^- .

Los cambios no fueron específicos para un determinado tipo de leucemia teniendo en cuenta que no hubo variación de ellos en diferentes tipos de esta patología.²⁷

Un experimento con pacientes mujeres que presentaban cáncer en la cervix, puso de manifiesto una reducción en el contenido de GSH, de vitamina E y de vitamina C. Al mismo tiempo, dichos pacientes exhibieron una reducción de la actividad de la GPx y de la SOD comparados con los grupos controles. Esta reducción fue más evidente en pacientes con estados más avanzados de este tipo de cáncer, sugiriendo un estado antioxidante alterado en este tipo de cáncer.¹⁴

TERAPIA ANTIOXIDANTE

Principios generales

Las hipótesis sobre la participación de las ERO en numerosas patologías ha condicionado que muchos investigadores se propongan el uso de tratamientos antioxidantes. Antes de proceder a un ensayo clínico de esta índole deben tenerse en consideración los aspectos siguientes:

a) Participación del daño oxidativo en la fisiopatología de la enfermedad.

Debe demostrarse mediante la medición de las concentraciones de moléculas de importancia biológica oxidadas.

b) Relevancia (magnitud, papel) del daño oxidativo en el proceso patológico (papel central o epifenómeno).

c) Localización del daño oxidativo.

d) Funcionamiento, efectividad del sistema de antioxidantes (ocurrencia de fallos o alteraciones).

e) Concentración del agente en el sitio blanco.

f) Efectividad del antioxidante seleccionado en el proceso oxidativo.

g) Tolerancia y seguridad en las dosis empleadas.

La existencia de dos grupos de enfermedades caracterizadas por la disrupción aguda o crónica del balance redox marca también estrategias propias.

De gran interés ha sido la posibilidad de que dietas ricas en antioxidantes contribuyan a la reducción del riesgo de contraer el cáncer.⁵⁵ Los estudios epidemiológicos señalan que las personas con elevada ingesta de antioxidantes en la dieta tienen menos posibilidades de contraer el cáncer,⁵⁶ pero en general, los efectos beneficiosos que se detectan son pequeños, no pudiéndose correlacionar estrictamente con los factores dietéticos.³³ Un estudio reciente finalizado en Finlandia, valoró el efecto del α -tocoferol y β -caroteno en 29 133 hombres fumadores de mediana edad durante 6 años.⁵⁷ Se comprobó que lejos de lograrse protección aparecieron nuevos casos de cáncer de pulmón en los tratados con β -caroteno (dosis 10 veces superior a los requerimientos normales). Este hecho llama la atención sobre las precauciones a tomar en cuenta a la seguridad del agente que se ensaya, teniendo en cuenta que la inducción del cáncer es un proceso que requiere de varios años para expresarse y por tanto, los tratamientos son prolongados.

Son promisorios en esta dirección los trabajos con diversos flavonoides y otros constituyentes vegetales, particularmente, relacionados con la prevención de mutagénesis,¹⁷ así como los trabajos en biología molecular que posibilitan elevar la expresión intracelular de enzimas antioxidantes.

Elementos micronutrientes como agentes quimioprotectores

Adecuadas cantidades de elementos micronutrientes reducen el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares y cáncer, al mismo tiempo que aseguran un óptimo estado de salud.

Carotenoides y vitamina A

Los carotenoides son una amplia familia de pigmentos ampliamente distribuidos en frutas y vegetales. Están normalmente presentes en la

sangre humana, siendo predominantes el β -caroteno, licopeno, luteína, α -caroteno, α -criptoxantina, β -criptoxantina y zeaxantina. De los 700 carotenoides más abundantes en la naturaleza, sólo 53 pueden ser precursores de la vitamina A.⁵⁸ Existen numerosas evidencias epidemiológicas que indican una disminución del cáncer de pulmón al incrementarse la ingestión de β -caroteno.⁵⁹ Los hallazgos epidemiológicos avalados por muchas evidencias experimentales indican que el β -caroteno es secuestrador de ERO, modula el sistema inmune y el metabolismo del citocromo P-450, inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, induce la diferenciación, inhibe la inestabilización cromosómica, la actividad de las enzimas ornitina descarboxilasa, adenilato y guanilato ciclasa.⁶⁰ El superar las dosis óptimas en la administración de este tipo de compuesto puede entrañar graves riesgos.⁶¹

Al mismo tiempo, evidencias experimentales aseguran una protección contra el cáncer de mama por parte de los carotenoides β -criptoxantina, licopeno, luteína y zeaxantina.⁶²

Estudios sobre el riesgo de cáncer de pulmón asociado con antioxidantes dentro de los cuales se encuentran los carotenoides, sugieren que el β -caroteno es un marcador para algunos factores protectores contra este tipo de cáncer; que el α -caroteno y la criptoxantina deben ser además investigados como factores potencialmente protectores o asociados a factores protectores y que el licopeno está probablemente asociado con el riesgo de contraer cáncer de pulmón.⁶³ Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estos elementos micronutrientes llevan a cabo su acción protectora en este tipo de acción no han sido discutidos con profundidad. Es posible que estos provoquen un aumento de las funciones de las uniones abiertas (*gap-junctions*), las cuales son vitales en el control del crecimiento y desarrollo, así como en la mediación de la comunicación intercelular;⁶⁴ teniendo en cuenta que reconocidos promotores de tumores han mostrado inhibir la comunicación a través de estas uniones *in vitro*. Tal es el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). No obstante, esto es hipotetizado a partir de un estudio *in vivo* en hígado de rata, en el que los efectos protectores que mostraron el β -caroteno, el α -caroteno y el licopeno fueron dependientes de la dosis, los cuales no tuvie-

ron lugar al aplicar dosis subóptimas y por el contrario, se produjo una inhibición de estas uniones a dosis excesivas.⁶⁵

Sin embargo, ningún estudio relacionado con la dieta en las comunicaciones abiertas parece haberse publicado; quizá por la dificultad para medir estos efectos de una manera fácil en tejidos humanos.

Otros estudios epidemiológicos ponen de relieve que el β -caroteno es capaz de inhibir la transformación maligna de células inducida por el 7,12- dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA) y que la máxima inhibición se observa en la fase de iniciación al prevenir la activación metabólica del DMBA. Un similar efecto se encontró frente al daño producido por benzo[*a*]pireno (BP), donde el β -caroteno previno la formación de radicales libres por la luz ultravioleta activando al BP.⁶⁶

Vitamina E

La vitamina E es el antioxidante más importante de la membrana celular; el α -tocoferol es la forma más activa y abundante. Esta vitamina reacciona con los oxiradicales y el oxígeno singlete previniendo los procesos de peroxidación de los lípidos polinsaturados de la membrana. Entre otros efectos bioquímicos se ha descrito su actividad como estabilizante fisicoquímico de las membranas, estimulador de indicadores inmunológicos, potenciador del sistema metabólico del citocromo P-450, inductor de los mecanismos de la diferenciación intracelular, inhibidor de la proliferación, de la PKC, de la 5-lipoxigenasa, la formación de nitrosaminas y la actividad de la ornitina descarboxilasa; así como activador de la proteína fosfatasa y de la diacil-glicerol-kinasa.^{65,67,68}

Muchos estudios epidemiológicos evidencian una relación inversa entre el consumo de vitamina E y diferentes tipos de tumores. En un estudio realizado en Finlandia en hombres fumadores (50 mg/d por 6 años) no se observó reducción en el riesgo de cáncer de pulmón y sí disminuyó el riesgo de cáncer de próstata.⁶⁷

Las combinaciones de estas vitaminas con otros antioxidantes como selenio (Se) y beta-carotenos, han sido efectivas en la reducción de cáncer oesofaríngeo.⁶⁹ Se considera que la administración entre 60 y 400 UI de vitamina E por varios años no produce efectos adversos y que las concentraciones óptimas en plasma son de 30 $\mu\text{mol/L}$.⁶¹

La vitamina E puede inducir apoptosis en células de cáncer colorectal. Este efecto es mediado por inducción del p21waf1/cip1, un poderoso inhibidor del ciclo celular.⁷⁰

Vitamina C

Una gran ingesta de vitamina C se ha asociado a una disminución del riesgo de cáncer oesofaríngeo, laríngeo, de la cavidad oral, páncreas, recto, mamas, cervical, de pulmón y gástrico. La reducción de este último tipo de tumor está relacionada con la acción inhibitoria de la vitamina C de la formación de compuestos n-nitrosos, transformando los nitritos en nitratos, de esta forma previene la reacción entre los nitritos y los grupos aminos.⁷¹ Los efectos a nivel sistémicos se relacionan con su actividad antioxidante e inmunoestimulante.⁷²

Las dosis no deben exceder 1 g/d, siendo las concentraciones óptimas en suero 50 $\mu\text{mol/L}$.⁶¹ La administración de 2 g diarios I.V. de 5,6-bencilideno-L-ascorbato (BA) en pacientes con carcinoma tumoral inoperable produjo una rápida y drástica reducción del tamaño del tumor, sin presentarse efectos adversos. Posteriores investigaciones demostraron que el BA induce *in vivo* la apoptosis del tumor; su acción no es bloqueada por la CAT o análogos de la cisteína (lo cual sí tiene lugar para el ácido ascórbico) no estando involucrado en este caso el H_2O_2 .⁷³

Estudios recientes llevados a cabo en pacientes con cáncer de pulmón (258 casos y 515 controles) evidenciaron un efecto protector, aunque no muy significativo, por parte del ácido ascórbico.⁶¹

La vitamina C protege contra la oxidación *in vivo* del ADN en humanos, particularmente en personas expuestas a un estrés oxidativo aumentado, tales como los fumadores. Numerosos estudios epidemiológicos sugieren fuertemente que el consumo de vitamina C disminuye la incidencia, así como la mortalidad por cáncer y que esto puede ser atribuido a las propiedades antioxidantes de esta vitamina, aunque otros mecanismos puedan contribuir.⁷⁴

Selenio

El Se ha demostrado ser un potente inhibidor del cáncer hepático en numerosos modelos experimentales.⁷⁵ La suplementación del alimento animal con Se también reduce la incidencia del cáncer de piel,

mama, pulmón, oesofaríngeo, colorrectal, renal, pancreático, oral y gástrico.⁷⁶ El mayor inconveniente de su empleo radica en su estrecho margen terapéutico.⁷⁶ Las funciones estudiadas para el Se en mamíferos son las de formar parte de la enzima GPx; adicionalmente modifica el metabolismo de carcinógenos, la formación de aductos de ADN, la proliferación celular y también la respuesta inmunológica.⁷⁶

Los compuestos que contienen selenio han mostrado ser inhibidores de la tumorigénesis en una gran variedad de modelos animales. Su empleo como suplemento en la dieta reduce el riesgo de contraer cáncer. Además, se ha comprobado que algunos tipos de protectores contra el cáncer, que involucran antioxidantes, involucran a su vez selenoenzimas y que metabolitos específicos del Se, que se producen en cantidades significativas a relativamente grandes consumos de Se, también manifiestan funciones antitumorígenicas.⁷⁷

Un estudio efectuado en pacientes con cuatro tipos de cánceres (respiratorio, digestivo, hematológico y ginecológico) mostró concentraciones de Se estadísticamente significativas más bajas comparadas con sujetos sanos. Sin embargo, el Se no puede ser utilizado con el objetivo de determinar si un paciente tiene o no cáncer.⁷⁸ Por otro lado, se asegura que las bajas concentraciones de Se en plasma pueden ser consideradas como un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad.⁷⁹

El suplemento de Se en la dieta, bajo la forma de seleniometonina, demostró tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varias líneas de células tumorales humanas, resultando en muerte apoptótica y mitosis aberrante.⁸⁰ Mientras que puntos de vista comunes sugieren que una concentración sérica de Se inferior a 45 µg/L puede correlacionarse con un riesgo incrementado de cáncer.⁸¹

En ensayos con pacientes que presentaban cáncer colorrectal se demostró una asociación entre los niveles bajos de Se y la presencia de tumores avanzados, pero no fue posible establecer si este fenómeno es una causa o una consecuencia para el desarrollo del cáncer.⁸²

Después de haber presentado todas estas evidencias que involucran las ERO con la carcinogénesis, solo queda concluir que la mutagénesis relacionada con las ERO, la cual pue-

de resultar en la iniciación y progresión de cáncer, es un evento frecuente en las células humanas normales. La promoción tumoral mediada por estas especies no ha sido directamente demostrada en humanos, pero hay evidencias experimentales convincentes de que el estrés oxidativo puede inducir la proliferación de células tumorales. De esta manera, las ERO pueden ser consideradas como una clase importante de carcinógenos que estimulan el desarrollo de cáncer en múltiples estados.

La intervención de los mecanismos antioxidantes, ya sean enzimáticos o no, es un arma de doble filo que pudiera aumentar los efectos del estrés oxidativo. Sin embargo, aún una protección perfecta contra las ERO por una acción antioxidante bien balanceada, pudiera estimular el desarrollo de cáncer a través del mejoramiento de las células tumorales. En la mayoría de los estudios poblacionales en los que se ha llevado a cabo una terapia con antioxidantes, no ha habido un efecto consistente en la incidencia de cáncer. Esta aparente ineficacia pudiera deberse a que el seguimiento no ha sido lo suficientemente largo como para poder ver los efectos de los antioxidantes en la iniciación tumoral por ERO.

Resulta difícil aclarar completamente los efectos de los componentes dietéticos en el estrés oxidativo porque existen otros muchos factores, tanto endógenos como exógenos, que pueden estar influyendo en este sentido. Dentro de los factores exógenos se encuentran las radiaciones ionizantes, el humo de los cigarrillos, las enfermedades autoinmunes, la hepatitis crónica, la fibrosis cística, el consumo de alcohol, la contaminación ambiental, las radiaciones no ionizantes como la luz ultravioleta y las microondas, el estrés fisiológico y la cantidad de ejercicio físico.

Finalmente, todavía no se poseen suficientes pruebas en humanos para establecer una relación causal entre el daño oxidativo al ADN y la carcinogénesis como sostienen otros autores.⁸³

En el futuro el uso de biomarcadores proveerá esta evidencia y permitirá un mayor número de investigaciones sobre la importancia cualitativa y cuantitativa de la modificación oxidativa del ADN y la carcinogénesis en humanos, lo cual permitirá elucidar posibles medidas preventivas.

BIBLIOGRAFIA

1. Chance B., Sies H. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527, 1979.
2. Oshima H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **305**, 253, 1994.
3. Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147, 1995.
4. Guyton K.Z. and Kensler T.W. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.*, **49**, 523, 1993.
5. Feig D.I., Reid T.M., Loeb L.A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer-Res.*, **54**, 1890s, 1994.
6. Cerutti P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, **344**, 862, 1994.
7. Ray G., Batra S., Shukla N.K., Deo S., Raina V., Ashok S., Husain S.A. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast. Cancer Res. Treat.*, **Jan 59**, 163, 2000.
8. Matsui A., Ikeda T., Enomoto K., Hosoda K., Nakashima H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer. Lett.*, **Apr.**, **3**, 151, 87, 2000.
9. Klein G. The approaching era of tumor suppressor genes. *Science*, **238**, 1539, 1987.
10. Hussain S.P., Aquilar F., Amstad P., Cerutti P. Oxi-radicals induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene*, **9**, 2277, 1994.
11. Nakamura Y., Gindhart T., Winterstein D., Tomita I., Seed J., Colburn N. Early Superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epithelial JB6 cell. *Carcinogenesis*, **9**, 203, 1998.
12. Salim A.S. The permissive role of oxygen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, **53**, 1031, 1993.
13. Dreher D. and Junod A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *European J. of Cancer*, **324**, 30, 1996.
14. Ahmed M.I., Fayed S.T., Hossein H., Tash F.M. Lipid peroxidation and antioxidant status in human cervical carcinoma. *Dis. Markers*, **Dec.**, **15**, 283, 1999.
15. Vallyathan V., Shi X., Castranova V. Published erratum appears in *Environ. Health. Perspect.*, **Dec.**, **106** Suppl 6, 1595. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **Oct.**, **106**, Suppl 5, 1151, 1998.
16. Leikes P.I., Hahn K.L., Sukovich D.A., Karniol S., Schmidt D.H. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **454**, 295, 1998.

17. Ames B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915, 1993.
18. Demple B. and Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 915, 1994.
19. Poulsen H.E., Prieme H., Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European J. of Cancer Prevention*, **7**, 9, 1998.
20. Izumi T., Hazra T.K., Boldogh I., Tomkinson A.E., Park M.S., Ikeda S., Mitra S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis*, **Jul.**, **21**, 1329, 2000.
21. Hudson C.E., Kelly M.M., Schwartz D.A., Schofield D.A. Glutathione S-transferase in hormonal carcinogenesis. *Chem Biol Interact.*, **Apr.**, **24**, 111; 343, 1998.
22. Halliwell B., Aruoma O.I. DNA damage by oxygen-derived species. It's mechanisms of action and measurements in mammalian system. *FEBS Lett.*, **281**, 9, 1991.
23. Maki A., Berezinski I.K. Role of [Ca²⁺] in the induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *FASEB*, **6**, 912, 1992.
24. Olinski R., Zastawny T., Budzbon J., Sokowski J., Zegarski W. Dna base modification in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett*, **309**, 193, 1992.
25. Jaruga P., Zastawny H.T., Sokowski J., Dizdaroğlu M., Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett*, **341**, 59, 1994.
26. Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **Mar.**, **21**, 361, 2000.
27. Devi G.S., Prasad M.H., Saraswathi I., Raghu D., Rao D.N., Reddy P.P. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin. Chim. Acta*, **Mar.**, **293**, 53, 2000.
28. Olinski R., Jaruga P., Zastawny T.H. Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim. Pol.*, **45**, 561, 1998.
29. Grollman A.P. and Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.*, **9**, 246, 1993.
30. Boiteux S., Radicella J.P. Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, **Jan.-Feb.**, **81**, 59, 1999.
31. Bos J. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **195**, 225, 1998.
32. Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.*, **May**, **400**, 99, 1998.
33. Takahashi T., Gazdar A.F., Chiba I. P53: frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, **246**, 491, 1989.
34. Yang J.L., Wang L.C., Chang C.Y., Liu T.Y. Singlet oxygen is the major specie participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environ. Mol. Mutagen.*, **33**, 194, 1999.
35. Oshima H. Cytotoxicity and Site-specific DNA Damage Induced by Nitroxyl Anion (NO-) in the Presence of Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, July, 20909, 1999.
36. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and it's application in pathology. *Pathol. Int.*, **Feb.**, **49**, 91, 1999.
37. Dreher D. and Junod A.F. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, **162**, 147, 1995.
38. Crawford D., Zbinden I., Amstad P., Cerutti P. Oxidant stress induces the protooncogenes c-jos and m-myc in mouse epiderma cells. *Oncogenes*, **3**, 27, 1988.
39. Gilmore T.D. Malignant transformation by mutant rel proteins. *Trends Genet.*, **7**, 318, 1991.
40. Huang R.P., Peng A., Hossain M.Z., Fan Y., Jagdale A., Boynton A.L. Tumor promotion by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis*, **Mar.**, **20**, 485, 1999.
41. Punnonen K., Asaishi H., Hyoty M., Kudo R., Ahotupa M. Anti-oxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **120**, 374, 1994.
42. Maeda H., Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. *Biochemistry (Mosc)*, **Jul.**, **63**, 854, 1998.
43. Pani G., Bedogni B., Anzevino R., Colavitti R., Palazzotti B., Borrello S., Galeotti T. Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.*, **Aug.**, **60**, 4654, 2000.
44. Kuo M.L., Shiah S.G., Wang C.J., Chuang S.E. Suppression of apoptosis by Bcl-2 to enhance benzene metabolites-induced oxidative DNA damage and mutagenesis: A possible mechanism of carcinogenesis. *Mol. Pharmacol.*, **May**, **55**, 894, 1999.
45. Shen Z., Wu W., Hazen S.L. Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical. *Biochemistry*, **May**, **39**, 5474, 2000.
46. Oberley T.D. and Oberley L.W. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histology and Histopathology*, **12**, 525, 1997.
47. Church S.L., Grant J.W., Ridnour L.A., Oberley L.W., Swanson P.E., Meltzer P.S., Trent J.M. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **90**, 3113, 1993.
48. Nakano T., Oka K., Taniguchi N. Manganese superoxide dismutase expression correlates with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res.*, **56**, 2771, 1996.
49. Li J.J., Oberley L.W., St. Clair D.K., Ridnour L.A., Oberley T.D. Phenotypic changes induced in human breast cancer cell by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene*, **10**, 1989, 1995.
50. Martin-Mateo, M.C., Molpeceres L.M., Ramos G. Assay for erythrocyte superoxide dismutase activity in patients with lung cancer and effects on pollution and smoke trace elements. *Biol. Trace. Element. Res.*, **60**, 215, Dec., 1997.
51. Tomlinson P.M. and Bodmer W.F. Failure of programmed cell death and differentiation as causes of tumors. some simple mathematical models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 11130, 1995.
52. Kong Q., Lilliehei K.O. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypotheses*, **Nov.**, **51**, 405, 1998.
53. Olinski R., Jaruga P. Epirubicin induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy. *Molec. Pharm.*, **52**, 882, 1997.
54. Maxwell S.R. J. Anti-oxidant therapy: does it have a role in the treatment of human diseases? *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **6**, 211, 1997.
55. Byers T. and Perry J. Dietary carotenes, vitamin C, vitamin E as a protective antioxidants in human cancers. *Ann. Rev. Nutr.*, **12**, 139, 1992.
56. Albanes D., Heinonen O.P., Huttunen J.K. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplements on cancer incidence in the α -tocopherol and β -carotene Cancer Prevention Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 14275, 1995.
57. Marantz P.R. Beta-carotene, vitamin E and lung cancer. *New Engl. J. Med.*, **331**, 661, 1994.
58. Omenn G.S. Micronutrients (vitamins and minerals) as cancer-preventive agents. Principles of Chemoprevention. Stewart B.W., McGregor D. and Kleihues P Eds. IARC Scientific Publication No. 139. Lyon. 33-45, 1996.
59. Von Poppel G. Carotenoids and cancer: an update with emphasis on human intervention studies. *Eur. J. Cancer* **29A**, 1335, 1993.
60. Toma S., Losardo P.L., Vincent M., Palumbo R. Effectiveness of β -carotene in cancer chemoprevention. *Eur. J. Cancer Prev.*, **4**, 213, 1993.
61. Bieslski H.K., Bohles H., Estervaber P., Furst E. Antioxidant vitamins in prevention. *Clinical Nutrition*, **16**, 151, 1997.

62. Dorgan J.F., Sowell A., Swanson C.A., Potischman N., Miller R., Schusler N., Sthepenson H.E., Jr. Relationship of serum carotenoids, β -carotene, α -tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia Missouri (United States); *Cancer-Causes-Control*, Jan., 9, 49, 1998.
63. Comstock G.W., Alberg A.J., Huang H.Y., Wu K., Burke A.E., Hoffman S.C., Norkus E.P., Gross M., Cutler R.G., Morris J.S., Spate V.L., Helzlsouer K.J. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acid, carotenoids, α -tocopherol, selenium and total peroxyl radical absorbing capacity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Nov., 6, 907, 1997.
64. Bottrill K. The Use of Biomarkers as Alternatives to Current Animal Tests on Food Chemicals. *ATLA*, 26, 421, 1998.
65. Krutovskikh V. Differential dose-dependent effects of α -, β -carotenes and lycopene on gap-junctional intercellular communication in rat liver *in vitro*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 1121, 1997.
66. Biesalki H.K. Vitamins and carotenoids as biological antioxidants. From Research and Practical Experience. Edition 33, Nov., 4/5, 1992.
67. Azzi A., Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog-Lipid-Res.* May, 39, 231, 2000.
68. Azzi A., Breyer I., Feher M. Specific cellular responses to α -tocopherol. *J. Nutr.* Jul., 130, 1649, 2000.
69. Kelloff G.I., Crowl J.A., Boone C.W. Clinical development plans for cancer chemopreventive agents. *J. Cell. Biochem (Suppl.)*, 20, 63, 1994.
70. Chinery R., Brockman J.A., Peiler M.O., Skyr Y., Beauchamp R.D., Coffey R.J. Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21. WAFI/CIP1 via C/EBP. *Beta-Nat.-Med.*, Nov., 3, 1233, 1997.
71. Tannenbaum S.R., Wishnock J.S., Leaf C.D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr. (Suppl.)* 53, 2475, 1991.
72. Block G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiological evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 2705, 1997.
73. Sakagami H. and Satoh K. Modulating Factors of Radical Intensity and Cytotoxic Activity of Ascorbate. *Anticancer Research*, 17, 3513, 1997.
74. Carr C.A. and Balz F. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69, 1086, 1999.
75. EL-Bayoumy K. The role of selenium in cancer prevention. In: De Vita Jr., Hellman S. & Rosenberg S.A. Cancer prevention. Philadelphia, PA, J. B. Lippincott, 1-15, 1991.
76. Medina D. & Morrison D.G. Current ideas on selenium as a chemopreventive agent. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 7, 1988.
77. Combs G.F. Jr., Gray W.P. Chemoprotective agents: Selenium. *Pharmacol.-Ther.*, Sep., 79, 179, 1998.
78. Navarro A.M., De la Serrana H.L., Pérez V.V., López M.C. Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers. *Sci. Total Environ.*, Apr., 212, 195, 1998.
79. Scieszka M., Danch A., Machalski M., Drozd M. Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia. *Neoplasma*, 44, 395, 1997.
80. Redman C., Scott J.A., Baines A.T., Basye J.L., Clark L.C., Calley C., Roe D., Payne C.M., Nelson M.A. Inhibitory effect of seleniomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer-Lett.*, Mar., 125, 103, 1998.
81. Torra, M.; Rodamilans, M.; Montero, F.; Corbella, J. Serum selenium concentration of healthy northwest Spanish population. *Biol.Trace. Elem. Res.*, Jul.-Aug., 58, 127, 1997.
82. Psathakis D., Wedemeyer N., Olvermann E., Krug F., Siegers C.P., Brush H.P. Blood selenium and glutathione peroxidase status in patients with colorectal cancer. *Dis-Colon-Rectum.*, Mar., 41, 328, 1998.
83. Loft S., Poulsen H.E. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74, 297, 1996.

**NUEVO
PRODUCTO
PARA RECUBRIR
SUS SEMILLAS**

EcoMic

Especialmente indicado para:
arroz, algodón, cafeto, frutales, hortalizas,
frijol, maíz, cítricos, pastos, girasol, soya,
flores, maní y sorgo.

EcoMic es un inoculante sólido que funciona como un biofertilizante y contiene propágulos de hongos micorrizógenos con un elevado grado de pureza y estabilidad biológica. Se emplea para elevar la población de una o más especies microbianas en el suelo, favoreciendo el crecimiento de las plantas.

Es producido por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba y ha sido evaluado con éxito, así como también, comercializado en Colombia, Bolivia y México.

COMERCIAL MERCADU S.A.

Calle 13 y 8, No. 915, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana.

Fax: (53)(7) 55 3784 y 33 302. Correo electrónico: agencia@mercadu.get.cma.net