

2
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTO DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL
EN LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO
P450 DE HIGADO DE RATA:

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A
JOSUNE ASTEINZA CASTRO

DIRECTOR: DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

1 9 9 8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258143



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Citocromos P450	1
Clasificación	2
Nomenclatura	2
Evolución	3
Subfamilias de interés	3
Regulación de la expresión de CYP	5
Albendazol y Mebendazol	9
ANTECEDENTES	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO	17
ALCANCE	18

MATERIALES Y MÉTODOS	19
Ensayos de mutagenicidad	19
Determinación de citocromo P450 total	20
Determinaciones de actividad enzimática	21
Detección inmuno-específica de CYP	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
Ensayos de mutagenicidad	24
Determinación de CYP total	28
Determinaciones de actividad enzimática	29
Inmunoblots	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	42
ABREVIATURAS	43
REFERENCIAS	45

EFFECTO DE ALBENDAZOL Y MEBENDAZOL EN LA ACTIVIDAD DEL CITOCROMO P450 DE HÍGADO DE RATA

INTRODUCCIÓN

Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYP) son un grupo de enzimas que al ser reducidas con ditionita de sodio y mezcladas con monóxido de carbono desarrollan un pigmento que presenta un pico máximo de absorción en luz visible alrededor de los 450 nm¹. Estas moléculas forman una superfamilia de hemoproteínas que han sido encontradas en bacterias, levaduras, plantas y animales. En los mamíferos presentan dos funciones principales, el metabolismo oxidativo de esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, etc. y la transformación de innumerables fármacos, carcinógenos químicos, mutágenos y otros contaminantes ambientales².

Los CYP involucrados en el metabolismo de compuestos exógenos se localizan en el retículo endoplásmico, unidos a la membrana por la interacción de la porción amino-terminal de la proteína en el seno de la bicapa lipídica. Dicha localización les permite llevar a cabo el metabolismo de sustancias hidrofóbicas como lo son varios de los xenobióticos, los cuales deben ser transformados en moléculas más hidrofílicas para poder ser fácilmente eliminados del organismo.

El proceso de transformación se realiza mediante dos fases: la *Fase I o Funcionalización* que consiste en la adición de un grupo hidroxilo a un átomo de carbono. Estas reacciones pueden ser catalizadas por flavin-monooxigenasas y citocromos P450, los cuales utilizan O₂ como cosustrato; y la *Fase II o Conjugación*, en la que los grupos hidroxilo sirven como sustrato para la adición de moléculas hidrofílicas (sulfatos, glutatión, glicina, etc.). Dentro de este grupo se encuentran las transferasas de glutatión y de grupos acilo, acetilo y metilo, entre otras³.

En las reacciones mediadas por los CYP, éstos se reducen por la transferencia de electrones de alta energía provenientes del NADPH o

NADH a través de la citocromo P450 reductasa y el citocromo b₅⁴. Esto da como resultado la activación del CYP a un estado de alto espín, la formación del complejo con oxígeno molecular y el sustrato, y finalmente la inserción de oxígeno en la forma de oxígeno singulete o radical hidroxilo en la molécula del xenobiótico.

Este proceso se lleva a cabo en ciclos durante los cuales el CYP es secuencialmente reducido por la transferencia de electrones de NADPH y NADH. El hierro (Fe) de la molécula de CYP debe encontrarse en estado ferroso para poder unirse al sustrato, debido a esta unión se oxida a su fase férrica regresando posteriormente al estado ferroso al ser reducida por los electrones provenientes del NADPH y del NADH, integrándose en esta fase el oxígeno atmosférico. Después de esta unión, el Fe del CYP queda en estado férrico y el sustrato oxidado es liberado. El CYP es reducido posteriormente hasta llegar al estado ferroso y el ciclo se inicia nuevamente⁵.

♣ *Clasificación*

Debido a la gran cantidad de citocromos P450 encontrados ha sido necesario agruparlos en familias y subfamilias; esta clasificación se basa en similitudes en la secuencia de aminoácidos. Dentro de una familia, la similitud en la secuencia de aminoácidos debe ser mayor del 40%. Una familia de CYP no exhibe más de 40% de similitud con respecto a las otras familias⁶. Para el caso de mamíferos, el porcentaje de identidad dentro de una subfamilia es siempre mayor de 55%⁷.

Hasta 1991 se habían descrito 30 familias de P450 de las cuales 10 corresponden a mamíferos. Posteriormente se han reportado al menos 6 familias más, 2 de ellas en mamíferos⁸. Los CYP que metabolizan xenobióticos se agrupan en las familias 1, 2, 3 y 4⁹.

♣ *Nomenclatura*

Al nombrar un gen o ácido desoxirribonucléico complementario (ADNc) de P450, se deben utilizar las letras CYP en itálicas que denotan citocromo P450, un número arábigo designando la familia de P450 a que pertenece, una letra que indica la subfamilia (si existen dos o más subfamilias dentro de esa familia), y un número arábigo que representa al gen individual. Como ejemplo: CYP1A1. El ratón es la excepción y en su

caso se escribe *Cyp1a-1*. Cuando se refiere al ácido ribonucleico mensajero (ARNm) o a las proteínas, se utiliza el mismo sistema de nomenclatura, con la diferencia de que no se usan letras itálicas; esto se aplica en todas las especies, incluyendo al ratón⁸.

Existen nombres triviales para los CYP que les fueron asignados por diversas razones (la forma en que se obtuvieron, la especie en que se estudiaron, etc.); esto llevó a que hubieran varios nombres para un mismo gen, por ejemplo: *CYP1A1* es conocido como *c* o β NF-B en rata^{10, 11}; *P₁*, *c* o forma 6 en humano^{12, 13, 14}; forma 6 en conejo¹⁵; *Dah 1* en perro¹⁶; *IA1* en hamster¹⁷; *Mkah1* en mono¹⁸; etc. La actual nomenclatura permite la regularización de esta situación.

* Evolución

Se cree que este tipo de moléculas han evolucionado desde hace millones de años. Parece que los primeros citocromos fueron aquéllos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y esteroides (*CYP11, 17, 19, 21*), ya que desempeñaban una función vital en el mantenimiento de la integridad membranal en algunos procariontes y en los primeros eucariontes. Otra de las primeras funciones de los CYP fue la utilización de sustancias xenobióticas como fuentes de energía. Posteriormente, debieron haber evolucionado para resolver los retos que representaron para los organismos las exposiciones a nuevos compuestos ambientales como los metabolitos de vegetales. Debido a esto se sugiere que la mayoría de los genes de P450 encargados del metabolismo de xenobióticos (*CYP1, 2, 3 y 4*), han evolucionado en animales herbívoros, primero en respuesta a los metabolitos de las plantas y posteriormente a productos de la combustión⁴.

Se considera que la conversión génica divergente y convergente así como la duplicación, son los mecanismos más plausibles de evolución de estos genes y proteínas¹⁹.

* Subfamilias de interés

Dentro de la superfamilia de CYP existen al menos 12 familias identificadas en mamíferos, incluyendo humanos, ratas, ratones, conejos, perros, hámsters, monos, ovejas, cerdos, etc; cuatro de ellas incluyen los genes que codifican para las enzimas relacionadas con el metabolismo de

xenobióticos comprendiendo a las subfamilias 1A, 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H, 3A, 4A y 4B. El resto de las familias están involucradas en la biosíntesis de esteroides, prostaglandinas, tromboxanos, etc⁸.

A continuación se describen algunas de las familias de mayor importancia para el metabolismo de mutágenos y carcinógenos.

Subfamilia 1A. Esta subfamilia cuenta con dos integrantes: *CYP1A1* y *CYP1A2*. Ambos genes han sido detectados en todos los mamíferos que se han estudiado al respecto, con actividades catalíticas muy similares. La actividad de *CYP1A1*, hidroxilasa de hidrocarburos aromáticos policíclicos (AHH), se ha encontrado en otros organismos no mamíferos como hongos, insectos, peces y aves¹⁹. Esta situación y el hecho de que son genes evolutivamente conservados, hacen pensar que codifican para enzimas que podrían tener un papel crítico en el metabolismo de sustancias endógenas, aunque esto aún no se ha comprobado. El *CYP1A1* metaboliza benzo[a]pireno (BaP) y otros sustratos, mientras que el *1A2* cataliza la transformación de la aflatoxina B₁, la cafeína, arilaminas heterocíclicas y puede activar promutágenos que resultan de la pirólisis de aminoácidos y proteínas^{20, 21, 22}. Ambas enzimas tienen un importante papel potencial en la carcinogénesis química en humanos²³. El *CYP1A1* es inducido en pulmón de fumadores²⁴ y se le ha relacionado con cáncer pulmonar^{25, 26}.

Subfamilia 2B. Los *CYP2B1* y *2B2* son fácilmente inducidos con fenobarbital (FB)²⁷. Entre ambas proteínas existe un 97% de homología y a pesar de ello muestran propiedades electroforéticas y cromatográficas distintas. Ambas enzimas comparten sustratos, aunque su afinidad y actividad son diferentes²⁸. Estas proteínas se encuentran bien caracterizadas en la rata. La contraparte del *CYP2B1* en el humano se conoce como *CYP2B6* y presenta un 78% de similitud²⁹.

Subfamilia 2E. En ratas, ratones, monos y humanos sólo se conoce el *CYP2E1* mientras que en conejo existen los *CYP2E1* y *2E2*³⁰. El *CYP2E1* tiene un 80% de homología entre especies^{31, 32}. Este tipo de enzima se expresa constitutivamente en hígado y se induce por etanol y varias

sustancias hidrofóbicas de bajo peso molecular²¹. El CYP2E1 participa en el metabolismo de cuerpos cetónicos en la gluconeogénesis³³.

* Regulación de la expresión de CYP

Los citocromos tienen una amplia gama de sustratos y varios CYP pueden metabolizar a un mismo sustrato, aún cuando éstos sean muy distintos estructuralmente. Por otro lado, estas proteínas pueden expresarse constitutivamente y/o ser inducidas por algunos compuestos, además de que su expresión puede variar de acuerdo con la etapa del desarrollo por la que se curse, el sexo, el tipo de tejido o célula del que se trate, etc. Los mecanismos de regulación son prácticamente desconocidos y, por lo que se ha visto, muy complejos. A continuación se dan algunos ejemplos.

Inducción por 3-metilcolantreno y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo paradióxina. Desde hace 30 años se sabe que algunos xenobióticos pueden inducir su propio metabolismo³⁴. Dentro de estos compuestos se encuentra el 3-metilcolantreno (MC)³⁵, que a nivel de la transcripción³⁶ induce la actividad de AHH^{37, 38}, asociada con el CYP1A1. El mecanismo de inducción de la actividad de AHH se ha podido analizar gracias a que se descubrió, en ratones, un polimorfismo relacionado con la inducción por MC^{39, 40}. Esta situación y el hecho de que las células en cultivo mantuvieran el mismo fenotipo⁴¹, permitieron encontrar el locus *Ah* que controla la expresión de la AHH y otras enzimas, entre ellas una forma de glutatión transferasa⁴² y el CYP1A2⁴³. Otro elemento importante en este proceso fueron los experimentos que mostraron a la 2,3,7,8-tetraclorodibenzoparadióxina (TCDD) como potente inductor de AHH, a través del receptor que controla al locus *Ah*, conocido como receptor *Ah* (AhR)⁴⁴.

El mecanismo de inducción de CYP1A1 y CYP1A2 por TCDD comienza con la unión de la TCDD al receptor citoplásmico AhR. Posteriormente, el complejo TCDD:AhR sufre una transformación que involucra la disociación de cuando menos tres proteínas, una de las cuales es una proteína de choque térmico con un peso molecular de 90kDa. El complejo transformado es transportado al núcleo en donde se asocia con una proteína nuclear translocadora del receptor *Ah* (ARNT). Gracias a

esta unión adquiere la capacidad de unirse al ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente en lo que se conoce como "elementos de respuesta a dioxina o a xenobióticos" (DRE o XRE), los cuales son secuencias de ADN adyacentes al *CYP1A*. Este proceso provoca el desdoblamiento de ADN, la disrupción de la cromatina, el incremento de la accesibilidad al promotor y la subsecuente elevación de la transcripción del gen del *CYP1A1* con la acumulación de ARNm⁴⁵.

Adicionalmente existen datos que revelan la activación del AhR en ausencia de ligando^{46, 47}. Ejemplo de ello lo constituye la inducción de *CYP1A1* en cultivos primarios de hepatocitos de conejo y humano por derivados del benzimidazol. Ninguna de estas moléculas cumplen con las condiciones estructurales requeridas para actuar como ligandos del AhR, puesto que no son moléculas aromáticas policíclicas planas. De hecho, ninguna de ellas compite con el TCDD por el sitio de unión específico del receptor Ah⁴⁸.

Con respecto al *CYP1A2*, se sabe que se expresa constitutivamente aunque también existen evidencias de que el receptor Ah modula la expresión del gene⁴⁹. El *Cyp1a-2* se expresa constitutivamente en hígado y puede inducirse; no se expresa significativamente en tejidos extrahepáticos, sin embargo, el TCDD a altas concentraciones eleva un poco los niveles de ARNm en pulmón, riñón e intestino⁵⁰. El incremento en ARNm del *CYP1A2* se debe tanto a activación transcripcional como a una gran estabilización post-transcripcional del mensajero.

Inducción por fenobarbital. La administración de fenobarbital induce la producción de las isoenzimas *CYP2B1* y *2B2* a nivel transcripcional²⁷. Este compuesto regula coordinadamente la expresión de los *CYP2B2* y *2B1* en el hígado de la rata en donde se expresa constitutivamente el primero, pero no el segundo. La administración de fenobarbital incrementa los ARNm originados por ambos genes, aunque en mucho mayor grado el que codifica para *CYP2B1*⁵¹. Este efecto de inducción sólo se observa en hígado, a pesar de que *CYP2B1* se expresa constitutivamente en pulmón⁵².

El mecanismo de regulación de la expresión de *CYP2B* es complejo y no ha sido totalmente elucidado. Sin embargo, se han descrito varios elementos de respuesta a la inducción con fenobarbital localizados hacia

el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción. Shephard y col⁵³, identificaron una primera secuencia de los nucleótidos (nt) -183 a -199 y otra entre los nucleótidos -31 y -72, se piensa que la primera está relacionada con la expresión tejido-específica y la segunda se ha visto que interactúa con proteínas de la familia C/EBP que forman heterodímeros con otros factores de transcripción. Otra región comprendida entre los nucleótidos -2155 y -2318, la cual es capaz de inducir la expresión del gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa) al ser estimulada con fenobarbital, fue descrita recientemente por Trottier y col⁵⁴. Por otro lado, los segmentos de -69 a -98 nt y de -126 a -160 nt han sido identificados como elementos de regulación positiva y negativa, respectivamente. El elemento positivo incluye la secuencia de 17 pares de bases (pb) llamada "barbie box", que se encuentra en varios genes que codifican proteínas inducibles por barbitúricos⁵⁵. Finalmente, a -1441 nt Roe y col⁵⁶ reportaron otro sitio de unión a proteínas inducidas por fenobarbital, cuya secuencia es parecida a los sitios AP-1.

Inducción por esteroides. El CYP3A1 de rata es inducido por dexametasona y 16 α -carbonitril-pregnenolona (PCN) a nivel transcripcional⁵⁷. Otros genes de la misma subfamilia son inducidos en humanos por dexametasona⁵⁸. Es posible que en este proceso de inducción esté involucrado el receptor de glucocorticoides⁵⁹, el cual controla la expresión de varios genes en el hígado. Por otra parte, los citocromos 3A1 y 3A2 de rata también se regulan post-transcripcionalmente, ya que compuestos como el antibiótico triacetil-oleandomicina (TAO) estabilizan a dichas proteínas⁶⁰. Un dato interesante es que la dexametasona también estabiliza al ARNm del CYP2B1⁵⁷.

Regulación transcripcional durante el desarrollo. El momento después del nacimiento y la pubertad son ejemplos de situaciones en las que se da este tipo de regulación. En la rata recién nacida se observa una elevación en los niveles de ARNm de 2E1, 2D1 y 2D2³¹. En el caso del CYP2E1, la activación inicia a las pocas horas del nacimiento y los niveles de ARNm alcanzan el nivel máximo a los 6 días de edad. Se propone que los cambios en el patrón de metilación del gen sirven como señal para la transcripción⁶¹.

También en ratas, los genes de la subfamilia 2C activan su transcripción al llegar la pubertad⁶². El mecanismo específico de regulación se desconoce y al entrar en la etapa adulta su expresión se estabiliza.

Expresión sexo-específica. Como ejemplo tenemos al CYP2C11 de rata que se expresa exclusivamente en hígado de machos adultos⁶³. Esta situación está controlada de alguna manera por la exposición neonatal a andrógenos⁶⁴. El gen CYP2C12 en cambio, se expresa en ambos sexos durante la pubertad, sin embargo, al llegar a la edad adulta se reprime su expresión en machos²⁰. La expresión de este gen en hembras, depende sólo parcialmente de la exposición a estrógenos⁶⁴.

Se han estudiado a la glándula pituitaria y a la hormona de crecimiento para tratar de determinar si juegan un papel en esta regulación⁶⁵. Esto es debido a que los patrones de secreción de dicha hormona varían no sólo en las diferentes etapas del desarrollo sino también entre hembras y machos; en estos últimos existe una secreción intermitente, mientras que en las hembras se mantienen niveles constantes⁶⁶. El posible mecanismo de regulación no está determinado.

Regulación post-transcripcional. Un ejemplo importante que presenta este mecanismo de regulación es el CYP2E1, que es inducido por compuestos como etanol, acetona, estreptozotocina y por condiciones de ayuno. En este tipo de inducción, los niveles de ARNm no se alteran aunque sí los de la proteína⁶⁷. Ello se debe a la estabilización y acumulación de los productos de transcripción al quedar protegidos de la degradación. Contrariamente a lo mencionado, existen reportes de que la inducción por etanol involucra un incremento en la transcripción, aunque esta variación parece deberse a diferencias en los esquemas de tratamiento⁶⁸.

Otros ejemplos son los CYP3A1/2, estabilizados por TAO⁶⁰; y la estabilización del CYP2B por dexametasona⁵⁷.

Expresión tejido específica. La mayoría de los CYP se expresan en hepatocitos. Por ejemplo, los CYP1A2 y CYP2A1/2 en rata, sólo son detectados en hígado. Por otra parte el CYP1A1 puede inducirse en

diversos tejidos y el CYP2A3 sólo se expresa en pulmón^{50, 69}. Los citocromos de la subfamilia 2B se han detectado en cerebro de rata⁷⁰ y el citocromo 2E1 se expresa en hígado, pulmón y riñón⁷¹. Los diferentes patrones de expresión en diversos tejidos tanto en condiciones normales como de inducción, hacen pensar que los mecanismos de regulación son tejido-específicos.

Albendazol y Mebendazol

El albendazol y el mebendazol (Figura 1) son medicamentos ampliamente utilizados para el tratamiento de infestaciones por *Taenia*, *Echinococcus*, *Ascaris*, así como para el combate de la cisticercosis cerebral^{72, 73}. Ambos antiparasitarios pertenecen a la familia de los benzimidazoles y algunos de sus miembros han mostrado potencial para inducir a las subfamilias 1A, 2B y 2E⁷⁴.

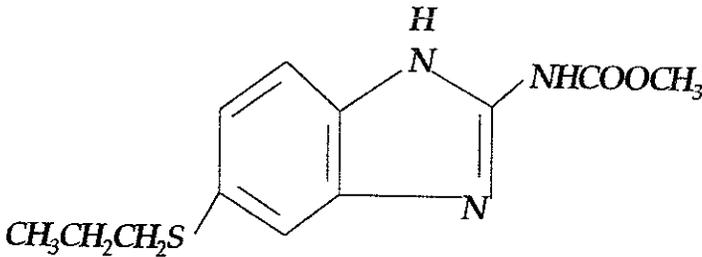
El albendazol se absorbe menos del 5% cuando es ingerido por vía oral en humanos. La primera etapa en la bioconversión del albendazol es la oxidación del átomo de azufre, dando lugar al sulfóxido de albendazol⁷⁵. Esta oxidación es importante para la expresión de la actividad antihelmíntica y la toxicidad del albendazol, ya que se ha demostrado que en el plasma de humanos⁷⁶, ratas⁷⁷, becerros⁷⁸ y borregos⁷⁹, la concentración de la molécula original es mínima (<0.01 µg/ml). Posteriormente, el sulfóxido es oxidado y transformado en sulfona, la cual es inactiva e inocua⁸⁰ (Figura 2).

El mebendazol se absorbe pobremente por el tracto gastrointestinal. Después de la administración de 0.1mg/kg de peso en humanos, sólo se absorbe del 5 al 10% y el resto se excreta en heces. La concentración máxima detectada en plasma se alcanzó entre 2-4 horas representando el 0.5% de la dosis total administrada⁸¹. Los metabolitos que se han detectado en la orina de humanos son los siguientes: el 2-amino-5-(6)benzoilbenzimidazol, el carbamato de metil-5(6) [α -hidroxibenzil] benzimidazol y el 2-amino-5(6) [α -hidroxibenzil] benzimidazol⁸². No se conoce la actividad farmacológica de estos metabolitos. No se han reportado efectos teratogénicos o embriotóxicos

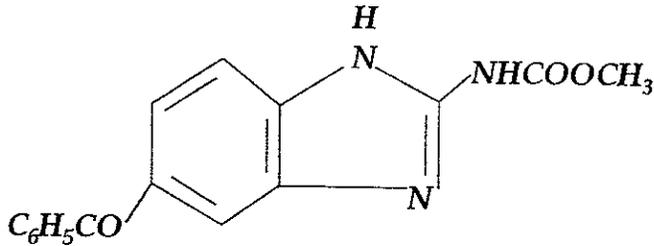
del fármaco en perros, ovejas, cerdos o caballos, aunque se ha mencionado su efecto teratogénico y embriotóxico en ratas gestantes por lo que su uso está contraindicado durante el embarazo⁸³.

En general los benzimidazoles comparten la característica de unirse a tubulina e inhibir el ensamble de microtúbulos⁸⁴, además de que alteran la incorporación de glucosa⁸⁵. El tratamiento con albendazol y mebendazol de ratones infectados con *Echinococcus granulosus*, mostró que estos compuestos inhiben enzimas de la vía glucolítica como son: piruvato cinasa, fosfoenolpiruvato cinasa y ATPasa de sodio, potasio y magnesio, en la pared cística del parásito⁸⁶.

Figura 1. Estructura química de las moléculas de albendazol y mebendazol.

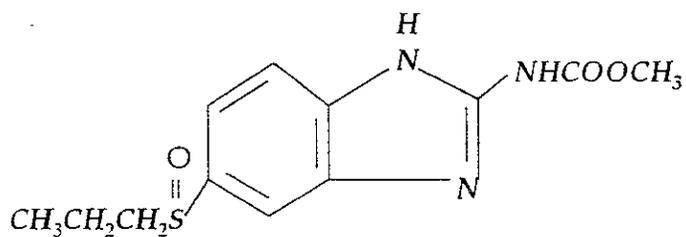


Albendazol

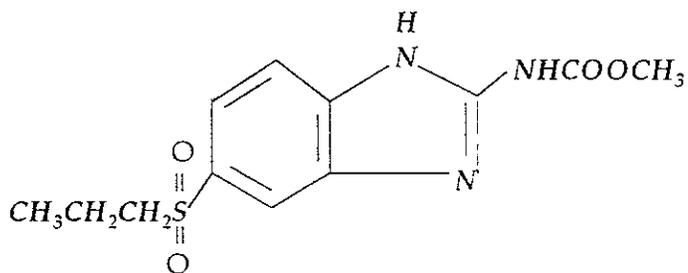


Mebendazol

Figura 2. Estructura química de los metabolitos de albendazol.



Sulfóxido de albendazol



Sulfona de albendazol

ANTECEDENTES

Existen múltiples reportes sobre la alteración de CYP por imidazoles. Simon y col.⁷⁴ mostraron que los derivados lanzoprazol, omeprazol y pantoprazol inhiben *in vitro* algunas actividades enzimáticas dependientes de CYP, como son: dealquilación de 7-etoxicumarina, *N*-demetilación de etilmorfina e hidroxilación de Ionazolac. Dichas reacciones reflejan la actividad de isoenzimas pertenecientes a la subfamilia CYP2B. El pantoprazol inhibe además la actividad de CYP2E1 mediada por microsomas de ratas normales. Los autores señalan que estos resultados deben ser corroborados con estudios *in vivo*.

Varios autores concluyen que el omeprazol induce la actividad del CYP1A. El compuesto es ampliamente utilizado para el tratamiento de acidez estomacal, úlcera péptica y reflujo gastroesofágico, por largos períodos de tiempo⁸⁷. El omeprazol incrementa la actividad de CYP1A1 en el hígado⁸⁸ y el tracto digestivo de humanos⁸⁹, representando un posible efecto adverso en tratamientos a largo plazo⁹⁰. Sin embargo, dicho efecto podría ser contrarrestado por el incremento en la actividad de enzimas de fase II (que acompaña a la inducción del CYP1A1), como UDP-glucuronosiltransferasa y glutatión S-transferasa, en hígado e intestino delgado de rata, respectivamente^{91, 92}. Existen reportes contradictorios acerca de la interacción de omeprazol con el receptor citosólico Ah^{46, 93}.

En conejos adultos, el tratamiento con imidazol induce el CYP2E1, además de que en conejos neonatos, en donde el CYP2E1 no se expresa, el tratamiento con este compuesto induce la producción de CYP2E2, CYP1A1 y CYP1A2 hepáticos. Los experimentos de Northern blot revelaron que no existe incremento en el ARNm de ninguna de estas proteínas⁹⁴.

Mori *et al.*⁹⁵ estudiaron el efecto del S9 obtenido por inducción con *N*-benzilimidazol sobre la transformación mutagénica de seis grupos de carcinógenos, usando el sistema de Ames para la detección de mutágenos. Los resultados mostraron que la actividad mutagénica de 5 *N*-nitrosaminas y 2-arilaminas se incrementó hasta 5 veces por arriba del S9 testigo, mientras que se obtuvo un incremento mayor con aflatoxina B₁, 2 hidrocarburos aromáticos policíclicos, dos compuestos aminoazo y

seis sustancias derivadas de la pirólisis de aminoácidos. Estos datos sugieren que el benzimidazol es un potente inductor de las familias CYP1 y CYP2.

Souhaili-El Amri y sus colaboradores⁹⁶ realizaron un estudio amplio respecto al potencial del albendazol para modular el CYP. Después del tratamiento de ratas con 10.6 mg/kg/día de albendazol durante 10 días por vía oral, encontraron una elevación en la actividad hepática de 7-etoxi-resorufin-deetilasa y de etilmorfín-deetilasa las cuales reflejan la actividad de CYP1A1 y CYP2B1, respectivamente. Este hallazgo fue corroborado por experimentos de inmunoblot en que usaron anticuerpos contra citocromos inducidos por tratamientos con metilcolantreno y fenobarbital. La actividad de anilina hidroxilasa, sustrato para el CYP2E1, no se vio modificada. Con respecto a enzimas de fase II, el tratamiento con este antihelmíntico incrementó la actividad de UDP-glucuronosiltransferasa de tipo I, enzima que participa en la conjugación de metabolitos tóxicos con el ácido glucurónico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cotidianamente estamos expuestos a compuestos químicos extraños al organismo que pueden afectar nuestra salud. Dicha exposición puede desencadenar una respuesta toxicológica a corto, mediano o largo plazos, dependiendo de las entidades celulares comprometidas y de la magnitud y tiempo de la exposición. Dentro de los efectos tóxicos posibles, se encuentran aquéllos que resultan del daño a la molécula de ADN, denominados efectos toxicogenéticos.

Existen evidencias que hacen pensar que la mayoría de los cánceres tienen un origen ambiental, esto es, son el resultado de la exposición a carcinógenos químicos presentes en los alimentos o el agua que consumimos o en el aire que respiramos. Es importante señalar que la mayoría de los carcinógenos conocidos adquieren sus propiedades nocivas después de que son biotransformados en el organismo²¹, dando como resultado compuestos altamente electrofílicos capaces de interactuar con macromoléculas importantes como proteínas y ácidos nucleicos. De interés para los humanos es el hecho de que los carcinógenos más frecuentemente consumidos son las aminas heterocíclicas generadas durante la cocción de los alimentos (derivadas de prolina, arginina, hidroxiprolina, pirrolidina, piperidina, etc.); las aminas aromáticas provenientes del tabaco (derivadas de piridina, fenilalanina, etc.); y la aflatoxina B₁, presente en granos. Y que son activadas por la isoforma CYP1A2.

En muchos casos el metabolismo de xenobióticos sirve para detoxificarlos o eliminarlos del organismo, sin embargo, algunos compuestos químicos inertes pueden ser transformados en metabolitos electrofílicos por los CYP⁵. En este sentido las enzimas de P450 juegan un papel muy importante en la mutagénesis y la carcinogénesis químicas, ya que la iniciación del cáncer requiere de estos metabolitos electrofílicos para la formación de aductos con el ADN.

Como ya se mencionó con anterioridad, la expresión de los genes que codifican para isoenzimas de CYP puede ser modulada por factores químicos ambientales o factores bioquímicos generados por alteración de la homeostasis del organismo⁹⁷. Así pues, se conoce que el etanol, el fenobarbital, algunos hidrocarburos aromáticos como benzo[a]pireno y

nitroareños, fármacos como la isoniazida, condiciones de ayuno, diabetes y algunas parasitosis, son capaces de modular la concentración y actividad de CYP1A, 2B y 2E.

Por otro lado, se ha sugerido que las propiedades anticarcinogénicas de isotiocianatos presentes en la dieta, es debida a una combinación de la inhibición de niveles enzimáticos de CYP y de la inducción de enzimas de fase II del metabolismo⁹⁸. Otros autores han reportado un incremento de la hepatocarcinogénesis en rata aunado a la inducción de actividad específica de CYP por varios barbitúricos⁹⁹. En contraste, la inducción de la familia CYP1A por 3-metilcolantreno en ratas, se refleja en un incremento de la tasa de detoxificación del carcinógeno 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] quinolina, ocasionando una disminución en la generación de aductos en el ADN de hígado y tejidos extrahepáticos¹⁰⁰. Adicionalmente, Bartsch y colaboradores¹⁰¹ y otros¹⁰², sugieren que la elevación en la expresión de CYP1A1 pulmonar en fumadores, parece estar asociada con el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Los estudios anteriores muestran la importancia que tiene la modulación de los niveles normales de CYP sobre la toxicidad y carcinogenicidad de sustancias químicas. Sin embargo, la toxicidad crónica ocasionada por moduladores de CYP, no es la única que se ve afectada. El ejemplo más documentado es el referente al incremento en la hepatotoxicidad del acetaminofén debido a la inducción del sistema de CYP por consumo de etanol o por la ingestión crónica de isoniazida en pacientes con tuberculosis.

El síndrome conocido como alcohol-acetaminofén, puede ser la forma más común de disfunción hepática aguda en los Estados Unidos de América y Australia¹⁰³. En el caso de que una persona alcohólica ingiera acetaminofén en dosis por arriba de las recomendadas (4 g/ 24 hrs), el resultado puede ser una reacción tóxica acompañada de niveles elevados en los valores de aminotransferasas en suero, debido a la inducción enzimática y a la disminución de glutatión, que es un tripéptido capaz de unirse a electrófilos potentes. De igual manera, se ha reportado el caso de pacientes bajo tratamiento profiláctico con isoniazida, que presentaron un deterioro muy rápido en el funcionamiento hepático después de ingerir una dosis de acetaminofén para aliviar el dolor abdominal¹⁰⁴. Estos casos

de hepatotoxicidad aguda constituyen también un reflejo de la importancia de la modulación de la actividad de CYP.

Independientemente de la exposición a sustancias moduladoras de CYP, existen diferencias interindividuales en su expresión y actividad lo cual conlleva diferencias en la susceptibilidad y respuesta a los fármacos¹⁰⁵. Recientemente se han hecho intentos por establecer relaciones entre diferencias genómicas de los CYP y susceptibilidad a fármacos y/o enfermedades^{25, 106, 107, 108}.

Por lo descrito con anterioridad y por el conocimiento de que la respuesta al tratamiento con albendazol en pacientes que sufren neurocisticercosis, presenta variaciones interindividuales de consideración, es importante caracterizar con mayor precisión el patrón de expresión de diferentes CYP en hígado de ratas tratadas con dicho antiparasitario.

HIPÓTESIS

Por ser moléculas pertenecientes a la familia de los benzimidazoles, el albendazol y el mebendazol poseen capacidad de alterar la expresión de algunas subfamilias de CYP.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de los tratamientos con albendazol y mebendazol sobre la concentración y actividad de algunas isoformas del citocromo P450 en hígados de ratas.

HIPÓTESIS

Por ser moléculas pertenecientes a la familia de los benzimidazoles, el albendazol y el mebendazol poseen capacidad de alterar la expresión de algunas subfamilias de CYP.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de los tratamientos con albendazol y mebendazol sobre la concentración y actividad de algunas isoformas del citocromo P450 en hígados de ratas.

ALCANCE

El conocimiento sobre la capacidad de un medicamento para modular la actividad y expresión de algunas de las isoformas del CYP nos permite advertir efectos de co-toxicidad, co-mutagenicidad o co-carcinogenicidad para así evitar la exposición a compuestos bioactivados por citocromos cuyo mecanismo de expresión ha sido alterado. En segundo lugar, nos proporciona evidencia con respecto a los mecanismos que regulan la variabilidad interindividual, y por último, nos puede indicar la ruta metabólica que sigue el fármaco.

En una etapa posterior, este tipo de estudios proporcionarán las bases para la determinación de los niveles de CYP en humanos utilizando metodologías no invasivas¹⁰⁹, y así contar con un biomarcador de susceptibilidad que ayude a proporcionar una mejor dosificación del fármaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 230g de peso corporal promedio. Se les dividió en tres grupos de tratamiento (4 animales por grupo): testigos (inoculadas con aceite de maíz (Sigma Chemical Co.)), tratadas con albendazol (Smith Kline & French) y tratadas con mebendazol (Depto. de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM). Las dosis de albendazol y mebendazol fueron de 50 mg/kg/día; ambos medicamentos se resuspendieron en aceite de maíz (23 mg/ml) y se administraron por vía intraperitoneal. El tratamiento se dio durante 3 días, al cuarto día se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se les extrajo el hígado. El tejido fue homogenizado y se obtuvieron las fracciones postmitocondrial (S9) y microsomal (la primera en condiciones de esterilidad). Con la fracción S9 se realizaron experimentos de mutagenicidad de acuerdo con el método de Maron y Ames¹¹⁰, y con la fracción microsomal se hicieron ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos contra CYP1A, 2B y 2E1; de cuantificación de citocromo total; y de actividad enzimática (O-dealquilación de Alkoxi-resorufinas (AROD))¹¹¹. La determinación de proteínas en las fracciones S9 y microsomal fue realizada de acuerdo al método de Bradford¹¹², utilizando un reactivo obtenido de BioRad Laboratories.

Ensayos de mutagenicidad

Se realizaron con el fin de analizar la capacidad del S9 (obtenido de hígado de 4 animales de un mismo grupo) para activar premutágenos de los cuales se conoce que son metabolizados por enzimas específicas del CYP; los premutágenos utilizados fueron benzo[a]pireno (CYP1A1), 2-aminofluoreno (CYP1A2), N-nitrosodimetilamina (CYP2E1) y ciclofosfamida (CYP2B). La capacidad de activación se cuantificó en términos del número de colonias mutantes (revertantes) de *Salmonella typhimurium* inducidas por la acción de los metabolitos generados por una isoenzima específica de CYP.

A un tubo estéril que contenía dos mililitros de agar de superficie a 45°C se agregaron, en el siguiente orden: 0.1 ml de un cultivo de 16 hrs de las cepas TA98, TA1535 o TA100 de *S. typhimurium*; 0.1 ml de la solución de mutágeno a diferentes concentraciones; y 0.5 ml de la mezcla S9 (10% de la fracción S9 hepática, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, glucosa-6-fosfato 5 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4). Después de agitar el contenido, la mezcla resultante se vació en cajas de Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner. Después de solidificar, las cajas se incubaron a 37°C por 48-72 horas. La mutagenicidad de benzo[a]pireno y de 2-aminofluoreno (AF) fue detectada con la cepa TA98, la de *N*-nitrosodimetilamina (NDMA) con la cepa TA100 y la de ciclofosfamida (CF) con la cepa TA1535. En los experimentos con *N*-nitrosodimetilamina se realizó una modificación consistente en preincubar por 60 minutos la mezcla de reacción en ausencia del agar de superficie y posteriormente incorporarla en cajas con medio mínimo. El pH del amortiguador usado en la modificación fue de 6.5. En los ensayos con BaP y NDMA, la mezcla de S9 contenía 30% de esta fracción.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se contó el número de colonias mutantes en las cajas. Después de graficar el número de revertantes por cada concentración de mutágeno, se determinó la pendiente, la cual representa la **potencia mutagénica** y se expresó como número de mutantes por microgramo de mutágeno.

Determinación de citocromo P450 total

Se usó el método de Omura y Sato¹, el cual se basa en la reducción del Fe⁺⁺⁺ con ditionita de sodio y su posterior unión a CO, lo cual provoca la formación de un cromóforo detectable espectrofotométricamente a una longitud de onda (λ) de 450 nm. Se realizó una dilución de los microsomas con solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M y glicerol al 20% pH 7.4, para tener una concentración de 1-2 mg/ml de proteína en un volumen total de 5 ml, se agregó una pizca de ditionita de sodio agitándose perfectamente. Se tomó una primera lectura de la mezcla para ser usada como blanco. Posteriormente, se burbujeó con CO por 30

segundos y el pigmento resultante se leyó en el intervalo de longitudes de onda de 400 nm a 500 nm.

Determinaciones de actividad enzimática

Para estos experimentos se utilizó la fracción microsomal, y las determinaciones se hicieron para cada individuo de los tres grupos. Estas pruebas se basan en la conversión de un sustrato específico para cada tipo de citocromo, en un metabolito cuantificable. Las actividades evaluadas fueron la dealquilación de: etoxi-resorufina (EROD), metoxi-resorufina (MROD), pentoxi-resorufina (PROD) y benziloxi-resorufina (BROD). Las reacciones para tales determinaciones se hicieron de la siguiente manera: en una celda de cuarzo para fluorimetría se mezclaron: una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 25 mM a pH 7.6, el sustrato específico (la alcox-resorufina correspondiente para cada CYP^{113, 114, 115, 116}) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y la suspensión microsomal. La mezcla se incubó durante 3 min a 37°C. Posteriormente se inició la reacción con la adición de 20 µl de una solución 50 mM de NADPH. La cinética de aparición de resorufina fue evaluada durante 3 min a 37°C en un fluorómetro. La medición se realizó en una λ de excitación de 530 nm, y una λ de emisión de 285 nm. Para estos ensayos se realizó una gráfica de calibración de resorufina con las siguientes concentraciones: 0, 2.5, 5, 10, 25 y 50 pmoles/ml. Los resultados de actividad se expresan en pmoles de resorufina/min mg de proteína. En la Tabla 1 se muestran los sustratos específicos para cada CYP.

Para la determinación de la actividad de CYP2E1 se evaluó la actividad de hidroxilasa de *p*-nitrofenol (HPNF)¹¹⁷. Para ello se preparó una mezcla de reacción que contenía 50 µl de microsomas y 930 µl de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM y *p*-nitrofenol 0.2 mM a pH 7.4. La mezcla se incubó a 37°C y la reacción se inició con la adición de 20 µl de solución de NADPH 50 mM en amortiguador. De cada muestra se corrió un blanco al cual no se le añadió NADPH. Después de 10 min de incubación a 37°C, la reacción se detuvo al agregar 500 µl de HClO₄ 0.6 N. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se tomó 1 ml del sobrenadante, al que se le añadieron 100 µl de

NaOH 10 N. Después de mezclar bien, las muestras se centrifugaron en una microfuga a máxima velocidad durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante se leyó en una λ de 510 nm. Adicionalmente se elaboró una curva de calibración con 0, 5, 10, 25 y 50 nmoles de *p*-nitrocatecol (producto de la hidroxilación del *p*-nitrofenol). Los resultados de actividad se expresan en nmoles de *p*-nitrocatecol/min mg de proteína.

Tabla 1. Relación de sustratos utilizados para la evaluación de las diferentes isoformas de CYP en los ensayos de actividad enzimática en microsomas hepáticos.

Citocromo	Ensayo	Sustrato	Producto
1A1	EROD	Etoxi-resorufina	Resorufina
1A2	MROD	Metoxi-resorufina	Resorufina
2B1	PROD	Pentoxi-resorufina	Resorufina
2B2	BROD	Benziloxi-resorufina	Resorufina
2E1	HPNF	<i>p</i> -Nitrofenol	<i>p</i> -Nitrocatecol

Detección inmunoespecífica de CYP

Estos ensayos se hicieron utilizando la fracción microsomal, mediante la técnica de Western blot¹¹⁸.

Primeramente se hizo una separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio¹¹⁹. El gel concentrador se hizo con 4% de acrilamida, mientras el separador (7 x 8 x 0.75 cm) se preparó con 10% de acrilamida y 0.3% de bisacrilamida. Se

colocaron 5µg de proteína microsomal en cada carril y la electroforesis se corrió a 100V por 60 minutos a temperatura ambiente. El amortiguador utilizado estuvo compuesto por Tris-HCl 0.05M, glicina 0.38M y dodecilsulfato de sodio al 0.1%, a un pH de 8.3.

Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales contra CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 de rata, desarrollados en cabra, de DAIICHI Pure Chemicals Co. LTD, Tokyo, Japón. El segundo anticuerpo fue un anti IgG de cabra (monoclonal) desarrollado en ratón, de Sigma Chemical Co. Se usaron como controles positivos microsomas de hígados de ratas tratadas con inductores químicos con especificidad para incrementar la actividad enzimática del CYP, estos fueron: 3-metilcolantreno (1A1), fenobarbital (2B) y acetona (2E1) (DAIICHI Pure Chemicals Co. LTD, Tokyo, Japón.). Al igual que en las determinaciones de CYP total y de actividad enzimática, se realizaron evaluaciones individuales.

Análisis estadístico

Las potencias mutagénicas se calcularon utilizando el programa SALANAL (Salmonella Assay Analysis) versión 1.0, desarrollado por Integrated Laboratory Systems (Research Triangle Park, NC, USA).

Para obtener la significancia estadística se aplicó el método de la t de Student.

RESULTADOS

Ensayos de mutagenicidad

Los datos obtenidos en las pruebas de mutagénesis se presentan en las gráficas de las Figuras 3 a 6, y las potencias mutagénicas se muestran en la Tabla 2. La potencia mutagénica del BaP fue 4.8 veces mayor cuando se utilizó el S9 proveniente de animales tratados con albendazol, en comparación con el S9 obtenido de animales testigo. Por su parte el tratamiento con mebendazol redujo moderadamente la mutagenicidad de dicho mutágeno. Con la NDMA, la mutagenicidad detectada con los S9's inducidos no se vio significativamente incrementada respecto a la obtenida con el S9 de animales no inducidos, mientras que la inducción de mutantes con la ciclofosfamida, activada por el S9 proveniente de ratas tratadas con ambos benzimidazoles, fue ligeramente menor que la inducida con S9 testigo. Por último, ambos tratamientos provocaron una discreta elevación de la mutagenicidad del 2-aminofluoreno, aunque sólo en el caso del albendazol se obtuvieron resultados estadísticamente significativos.

Tabla 2. Potencia mutagénica de cada promutágeno empleado en las pruebas de Ames, mediada por los S9's hepáticos de los diferentes tratamientos (revertantes/ μg de mutágeno).

Mutágeno	BaP	AF	CF	NDMA
Testigos (C)	12.97	281.03	0.078	0.199
Albendazol (A)	62.97 ^{A*}	383.54 ^E	0.032 ^C	0.649 ^N
Mebendazol (M)	4.55 ^C	385.03 ^N	0.021 ^A	0.815 ^N

^{A*} $p << 0.005$; ^A $p < 0.005$; ^C $p < 0.025$; ^E $p < 0.100$; ^N no significativo.

BaP=Benzo[a]pireno AF=2-Aminofluoreno CF=Ciclofosfamida

NDMA=N-Nitrosodimetilamina

Figura 3. Mutagenicidad de benzo[a]pireno en la cepa TA98 mediada por S9 obtenido de hígado de ratas pretratadas con albendazol y mebendazol.

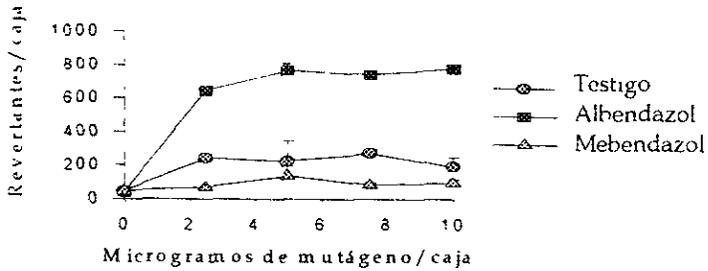


Figura 4. Mutagenicidad de 2-aminofluoreno en la cepa TA98 mediada por S9 obtenido de hígado de ratas pretratadas con albendazol y mebendazol.

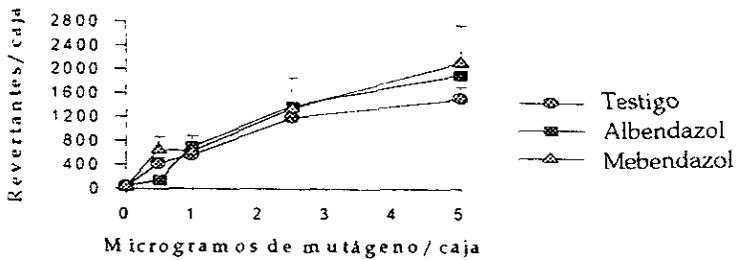


Figura 5. Mutagenicidad de ciclofosfamida en la cepa TA1535 mediada por S9 obtenido de hígado de ratas pretratadas con albendazol y mebendazol.

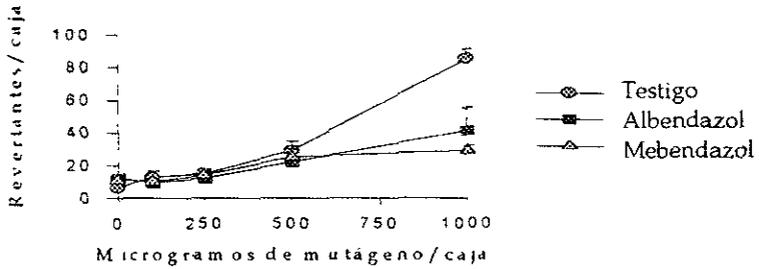
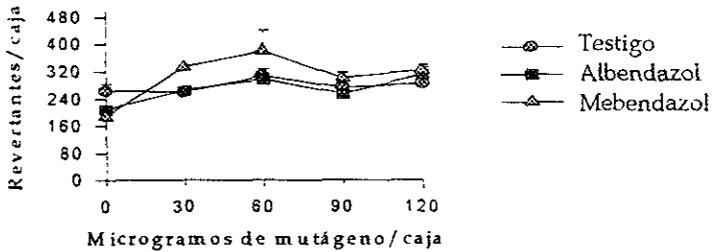


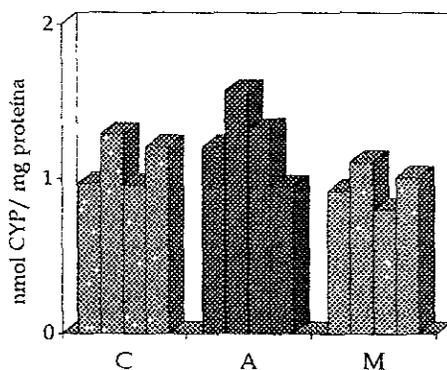
Figura 6. Mutagenicidad de *N*-nitrosodimetilamina en la cepa TA100 mediada por S9 obtenido de hígado de ratas pretratadas con albendazol y mebendazol.



Determinación de CYP total

En las determinaciones de CYP total no se observaron diferencias individuales significativas dentro de un mismo grupo o entre grupos. Los promedios obtenidos fueron de 1.1047, 1.3135 y 0.9759 nmoles de CYP/mg de proteína para los grupos testigo, inducido con albendazol e inducido con mebendazol, respectivamente (Fig. 7).

Figura 7. Determinación de CYP total en microsomas hepáticos de ratas.



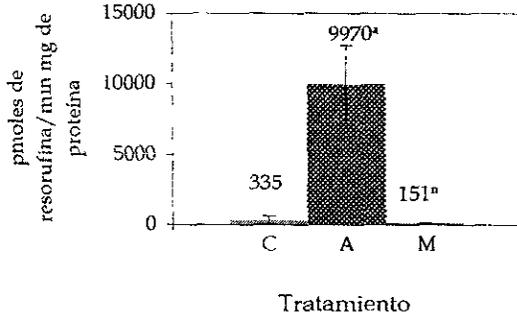
Tratamiento

C=Testigos A=Albendazol M=Mebendazol

Determinaciones de actividad enzimática

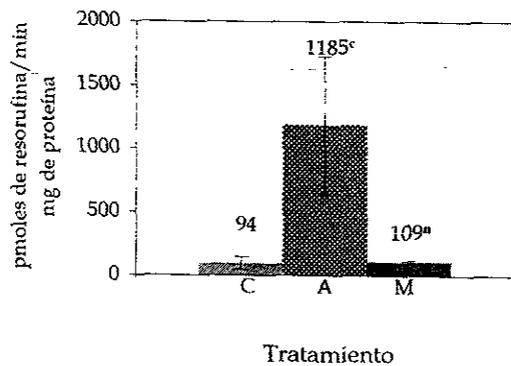
En la Fig. 8 se muestra que la actividad de EROD en los microsomas de albendazol se incrementó, en promedio, 30 veces con respecto a sus testigos, siendo la elevación constante en cada uno de los individuos del grupo. Cabe hacer notar que uno de los animales del grupo control mostró una actividad de EROD estadísticamente diferente a la detectada en las tres ratas restantes, pero sin ser igual a la actividad encontrada en animales del grupo tratado con albendazol, dicho animal también presentó una actividad de MROD elevada. Con este mismo tratamiento (albendazol) se detectaron elevaciones en las actividades de MROD, PROD y BROD de 12.6, 2 y 3.7 veces, respectivamente, en relación con los valores detectados en los microsomas testigo (Figs. 9 a 11). Todos estos resultados señalan un incremento en las actividades de CYP1A1/2 y CYP2B1/2. Con respecto al tratamiento con mebendazol, las actividades de EROD y MROD no sufrieron alteración significativas, mientras que aquéllas correspondientes a PROD y BROD se vieron disminuidas 1.9 y 2.6 veces, respectivamente (Figs. 8 a 11). En cuanto a la actividad del CYP2E1, los resultados en los ensayos de HPNF muestran una aparente disminución de tal actividad en los microsomas de ratas tratadas tanto con albendazol como con mebendazol, aunque el efecto fue un poco menor en este segundo grupo (Figura 12).

Figura 8. Actividad de EROD (CYP1A1) en microsomas hepáticos de ratas.



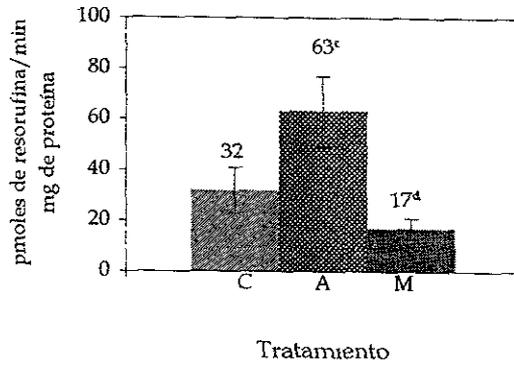
* $p < 0.005$; * no significativo.
C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

Figura 9. Actividad de MROD (CYP1A2) en microsomas hepáticos de ratas.



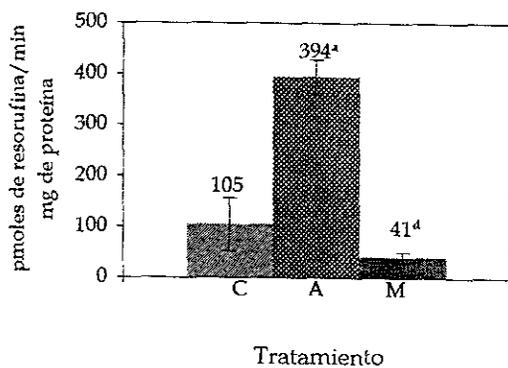
^c p < 0.025; ^a no significativo.
C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

Figura 10. Actividad de PROD (CYP2B1) en microsomas hepáticos de ratas.



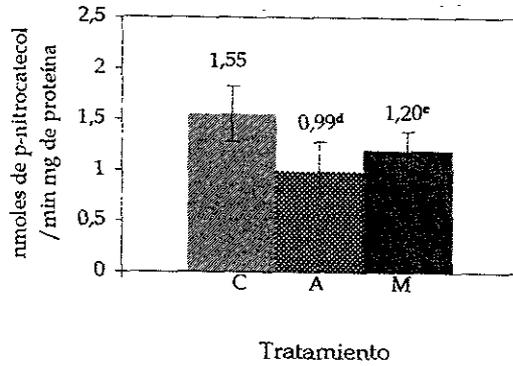
^c $p < 0.025$; ^d $p < 0.050$.
C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

Figura 11. Actividad de BROD (CYP2B2) en microsomas hepáticos de ratas.



^a $p < 0.005$; ^d $p < 0.050$.
C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

Figura 12. Actividad de HPNF (CYP2E1) en microsomas hepáticos de ratas.



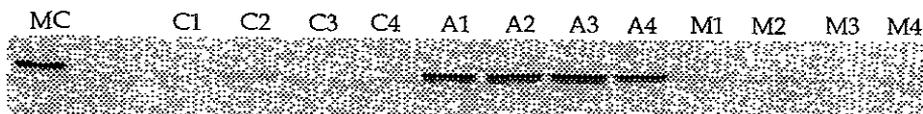
^d $p < 0.050$; ^e $p < 0.100$.
C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

Inmunoblots

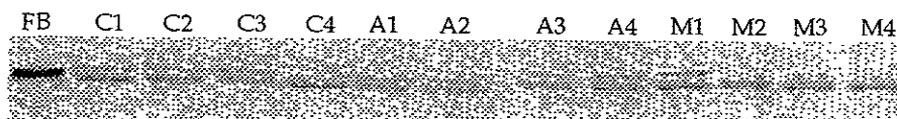
Los resultados de Western blot con anticuerpos policlonales contra CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 se encuentran en la Fig. 13. En ellos se aprecia que, con excepción del tratamiento con albendazol el cual incrementó claramente los niveles de CYP1A1/2 (6.5 veces por arriba del control), ninguno de los tratamientos tuvo efecto sobre los CYP analizados. Dentro del grupo control, uno de los animales mostró una elevación en la cantidad de CYP1A1/2 (2.8 veces el control), el mismo que presentó una mayor actividad de EROD. El análisis densitométrico también reveló una discreta disminución en CYP2E1 por el tratamiento con albendazol, ya que la cantidad resultó 2.2 veces menor que la del grupo testigo.

Figura 13. Resultados de los inmunoblots realizados en microsomas hepáticos de cada una de las ratas de los diferentes grupos de tratamiento.

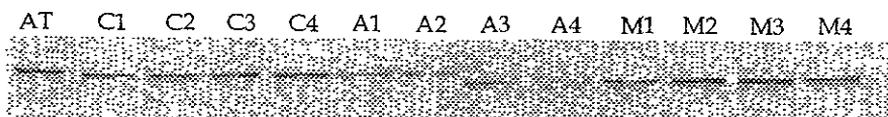
Detección de CYP1A1/2



Detección de CYP2B1/2



Detección de CYP2E1



Notas:

La primera muestra de cada línea es un control positivo para cada CYP.

MC=3-Metilcolantreno FB=Fenobarbital AT=Acetona

C=Testigo A=Albendazol M=Mebendazol

El número después de las letras C, A o M, se refiere a un individuo específico dentro de cada grupo de tratamiento.

DISCUSIÓN

El albendazol es una molécula que pertenece a la familia de los benzimidazoles y ha mostrado su efectividad contra la mayoría de los helmintos intestinales y la hidatidosis humana¹²⁰. En nuestros días, esta molécula está siendo usada con mucho éxito en el tratamiento de la neurocisticercosis, padecimiento que hasta hace poco tiempo no tenía un tratamiento farmacológico específico¹²¹. La neurocisticercosis es una enfermedad neurológica muy común en comunidades que viven en condiciones pobres de higiene¹²². Los intervalos de dosis de albendazol usados inicialmente para este propósito se propusieron empíricamente, estableciéndose los esquemas de terapia después de los estudios de toxicidad¹²³. La dosis recomendada es de 15 mg/kg/día dividida en dos administraciones diarias durante 8 días⁷³. Por otro lado, la dosis recomendada para parasitosis intestinales es de 400 mg/día durante tres días en niños o adultos⁷².

Es interesante hacer notar que los estudios farmacocinéticos muestran una gran variabilidad interindividual en el metabolismo del albendazol, aunque no se ha podido demostrar una asociación clara entre este tipo de mediciones y la efectividad del tratamiento en pacientes con neurocisticercosis¹²⁴. Después de la administración del fármaco por vía oral en humanos y roedores, es casi imposible detectar la molécula parental en la sangre, en su lugar aparece el metabolito sulfoxidado además de la sulfona de albendazol⁷⁶. Se ha reportado que el primero es el responsable de la actividad farmacológica, además de que presenta embriotoxicidad, mientras que la sulfona no es activa ni tóxica. Es claro que el conocimiento de los sistemas enzimáticos que participan en la conversión del albendazol en sus dos derivados, resulta indispensable para explorar el papel del metabolismo en la variabilidad interindividual reportada en pacientes bajo tratamiento.

Los primeros estudios realizados por Fargetton y col. en 1986¹²⁵, mostraron la participación de la flavin-adenin-dinucleótido-monooxigenasa (FMO) hepática de rata en la sulfoxidación del albendazol. La inmunoinhibición de la reacción por IgG anti-FMO fue la primera evidencia de la participación de esta enzima presente en microsomas de hígado. Este resultado se confirmó mediante inactivación

térmica de FMO, así como por adición de metamizol que es un inhibidor específico de la proteína. Adicionalmente, cuando se utilizaron IgG anticitocromo *c* reductasa y clotrimazol, un inhibidor no competitivo de CYP que no afecta la actividad de FMO, se inhibió también la sulfoxidación mostrando la participación de esta familia enzimática.

Posteriormente, se abordó el estudio de las familias de CYP involucradas en el primer paso del metabolismo del albendazol. El pretratamiento de ratas con dexametasona, que induce al CYP3A1, incrementa 4 veces la actividad de sulfoxidación de albendazol presente en microsomas¹²⁶, confirmando que al menos esta isoenzima de CYP posee una participación. El hecho de que el tratamiento conjunto de dexametasona y albendazol en humanos incrementa en sangre la concentración de metabolito sulfoxidado, que había quedado como inexplicable cuando se observó¹²⁷, ratifica los hallazgos en el modelo animal. De igual manera, el pretratamiento de ratas con fenobarbital, inductor de CYP2B1/2, incrementó en microsomas la producción de sulfóxido de albendazol al doble¹²⁶, lo cual es una evidencia de la participación de esta otra subfamilia de CYP.

Hasta este punto podemos resumir que la primera reacción metabólica que sufre el albendazol en mamíferos está mediada por las enzimas: FMO, CYP3A y CYP2B, siendo la primera la de mayor participación. La ausencia de efectos observados en el pretratamiento de animales con 3-metilcolantreno¹²⁶, descarta la participación de la isoforma CYP1A en la sulfoxidación del antihelmíntico.

Con objeto de discernir el camino metabólico correspondiente a la segunda oxidación del albendazol, Souhaili-El Amri y colaboradores estudiaron la participación del CYP en la sulfonación del derivado sulfóxido en hígado de rata perfundido¹²⁸. En estas condiciones el hígado de rata normal puede metabolizar la molécula parental a sus derivados sulfóxido y sulfona, y el pretratamiento con albendazol promueve el incremento del segundo metabolito. En microsomas provenientes de animales pretratados con albendazol, 3-metilcolantreno, aroclor e isosafrol, la curva de biotransformación del sulfóxido de albendazol en sulfona es bifásica, lo cual sugiere que más de una enzima participa en la reacción. Dicha biotransformación es inhibida totalmente por *n*-octilamina por lo que la FMO no está involucrada en este paso. Podemos interpretar

estos resultados como que el albendazol induce su propio metabolismo en la etapa de conversión del sulfóxido en sulfona.

Como se ha mencionado con anterioridad, el 3-metilcolantreno es un inductor de la subfamilia CYP1A en hígado de roedores, por lo que alguna de estas isoenzimas se encuentra involucrada en la segunda fase de conversión del albendazol.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman un notable incremento en la actividad de CYP1A1 en hígado de ratas que recibieron albendazol. Dicho incremento fue detectado mediante las tres metodologías propuestas: medición de actividad enzimática, análisis por inmunoblot o utilizando pro-mutágenos específicos en el sistema de Ames. Aunque cuantitativamente el incremento no fue similar en las tres estrategias (30 veces cuando se compararon actividades enzimáticas, 6.5 veces en experimentos de Western blot, y 4.8 veces por experimentos de mutagénesis), se muestra que esta última metodología puede ser utilizada para la estimación de las variaciones de CYP ocasionadas por agentes xenobióticos. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio con ciclohexanol, se llegó a una conclusión similar¹²⁹. La importancia de ello radica en que las pruebas de mutagénesis resultan más económicas y podrían resultar sensibles para la detección de alteraciones en las concentraciones de CYP en linfocitos de individuos expuestos a xenobióticos.

Aún cuando, anteriormente al presente trabajo, existían datos referentes a la inducción del CYP1A1 por el pretratamiento con albendazol, no se había realizado una búsqueda sistemática de otras isoenzimas de CYP que, por su participación en el metabolismo de xenobióticos, son importantes. Tal es el caso de CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 cuyos niveles se encuentran alterados por el tratamiento con albendazol. La actividad enzimática de CYP1A2 se eleva 12.6 veces y la de CYP2B1 y CYP2B2 se elevan 2 y 3.7 veces, respectivamente. La participación de CYP2B en la sulfoxidación del albendazol queda de manifiesto en los experimentos en los que la producción de este metabolito por microsomas hepáticos se incrementó dos veces (Moroni y col., 1995)¹²⁶.

Un dato adicional observado con microsomas de ratas tratadas con albendazol, es la disminución en la expresión tanto de proteína como de

actividad enzimática correspondientes a CYP2E1. Esta isoenzima es importante ya que se encuentra involucrada en el metabolismo de moléculas con diferente estructura química como pueden ser: etanol, acetaminofén, anestésicos, isoniazida, etc¹³⁰. La expresión de esta isoenzima se ha relacionado con susceptibilidad de poblaciones a cáncer pulmonar y de estómago^{25, 131}. Una pregunta interesante por resolver, es el significado biológico que representa una disminución en las concentraciones basales de CYP, en especial de aquellos citocromos involucrados en el metabolismo de moléculas endógenas como lo es el CYP2E1.

Por otro lado, resulta interesante el hecho de que el mebendazol no mostró el mismo efecto que tuvo el albendazol sobre los CYP estudiados. Parece ser que la acción de los citocromos involucrados en el metabolismo del albendazol se centra en el azufre exocíclico localizado en el carbono 5 del anillo de benzimidazol. El mebendazol carece de él y, al no presentar potencial para inducir a este tipo de moléculas (CYP), debilita la hipótesis de que sea la estructura del imidazol o del benzimidazol la responsable de la inducción. Sin embargo, este antihelmíntico mostró un efecto inhibitorio sobre la actividad de ambos miembros de la subfamilia 2B sin afectar la concentración y actividad de la subfamilia 1A.

Los datos de variabilidad interindividual en la farmacocinética del albendazol en pacientes con neurocisticercosis, habían sido explicados en base a diferencias en absorción¹³², restándole importancia a la existencia de variaciones del metabolismo. Los datos referidos aquí y reportados por otros autores, así como los obtenidos por nosotros, hacen pensar en diferencias en el metabolismo como una de las principales causas en las variaciones individuales reportadas. Partiendo de esta premisa y tomando en cuenta que el sulfóxido de albendazol es la molécula terapéuticamente efectiva, podemos aventurar que los pacientes con una actividad basal elevada de CYP1A1, rápidamente metabolizarán el sulfóxido a sulfona, presentando una mayor resistencia al tratamiento; de igual manera que aquellos que presenten una actividad baja de FMO y de CYP3A. Para estos últimos, la elección de dar dexametasona en combinación con albendazol repercutirá en una mejoría en la respuesta farmacológica. Del mismo modo, y considerando que las isoenzimas de

CYP estudiadas juegan un papel preponderante en la activación de pre-carcinógenos ambientales y de fármacos de uso común, los pacientes bajo tratamiento deberían tener un control estricto respecto a su dieta, hábitos de fumar y tratamiento con otros fármacos.

CONCLUSIONES

- ♣ El tratamiento con albendazol induce al CYP1A1, principalmente, y a los CYP1A2, 2B1 y 2B2 en menor proporción.
- ♣ La inducción detectada en el CYP1A1 mediante las técnicas de Western blot y actividad enzimática, fue también evidente al usar las pruebas de mutagénesis en *S. typhimurium*.
- ♣ El CYP2E1 se ve discretamente alterado por el albendazol de forma negativa.
- ♣ El tratamiento con mebendazol modificó negativamente al CYP2B, pero no mostró efecto sobre el resto de los CYP analizados.
- ♣ La estructura benzimidazólica no parece ser la responsable de la inducción de la actividad de los CYP.
- ♣ El radical tiopropilo en el carbono 5 del anillo imidazólico, es el blanco de acción de los CYP involucrados en el metabolismo del albendazol.
- ♣ Existe variabilidad interindividual en la actividad del CYP1A.

ABREVIATURAS

A	Albendazol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AF	2-Aminofluoreno
AHH	Hidroxilasa de hidrocarburos aromaticos policiclicos
AhR	Receptor Ah
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNT	Proteina nuclear translocadora del receptor Ah
AROD	O-Dealquilasas de alcox-resorufinas
AT	Acetona
BaP	Benzo[a]pireno
BROD	O-Deetilasa de benziloxi-resorufina
C	Controles o testigos
CF	Ciclofosfamida
CYP	Citocromo(s) P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRE	Elementos de respuesta a dioxina
EROD	O-Deetilasa de etoxi-resorufina
FB	Fenobarbital
Fe	Fierro
FMO	Flavin-monooxigenasa(s)
HPNF	Hidroxilasa de <i>p</i> -nitrofenol

λ	Longitud de onda
M	Mebendazol
MC	3-Metilcolantreno
mM	Milimolar
MROD	O-Deetilasa de metoxi-resorufina
N	Normal
NADH	Nicotinamida adenina nucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina nucleótido fosfato reducido
NDMA	N-Nitrosodimetilamina
nm	Nanómetros
nmoles	Nanomoles
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCN	16 α -carbonitril-pregnenolona
pmoles	Picomoles
PROD	O-Deetilasa de pentoxi-resorufina
rpm	Revoluciones por minuto
S9	Fracción postmitocondrial
TAO	Triacetil-oleandomicina
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzoparadioxina
V	Volts
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos

REFERENCIAS

- ¹ Omura T y Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239:2370-2378.
- ² Guengerich FP. 1987. *Mammalian Cytochromes P450*, vol. 1. Boca Raton, Florida, E. U. A. CRC Press.
- ³ Gonzalez FJ y Gelboin HV. 1993. Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40:289-308.
- ⁴ Nebert DW y Gonzalez FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56:945-993.
- ⁵ Parke DV, Ioannides C y Lewis FV. 1991. The 1990 Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada keynote lecture. The role of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69:537-549.
- ⁶ Nebert DW y Nelson DR. 1991. P450 gene nomenclature based on evolution. *Meth. Enzymol.* 206:3-11.
- ⁷ Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR y Waxman DJ. 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10:1-14.
- ⁸ Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K y Nebert DW. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12(1):1-51.
- ⁹ Gonzalez FJ. 1992. Human cytochromes P450: problems and prospects. *TiPS* 13:346-352.
- ¹⁰ Hines RN, Levy JB, Conrad RD, Iversen PL, Shen ML, Renli AM y Bresnik E. 1985. Gene structure and nucleotid sequence for rat cytochrome P450c. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:465-476.
- ¹¹ Fagan JB, Pastewka JV, Chalberg SC, Gozukara E, Guengerich FP y Gelboin HV. 1986. Noncoordinate regulation of the mRNAs encoding

cytochromes P-450-BNF/MC-B and P-450-ISF/BNF-G. *Arch. Biochem. Biophys.* 244:261-272.

- ¹² **Jaiswal AK, Gonzalez FJ y Nebert DW.** 1985. Human P₁-450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res.* 13:4503-4520.
- ¹³ **Kawajiri K, Watanabe J, Gotoh O, Tagashira Y, Sogawa K y Fujii-Kuriyama Y.** 1986. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur. J. Biochem.* 159:219-225.
- ¹⁴ **Quattrochi LC, Okino ST, Pendurthi UR y Tukey RH.** 1985. Cloning and isolation of human cytochrome P-450 cDNAs homologous to dioxin-inducible rabbit mRNAs encoding P-450 4 and P-450 6. *DNA* 4:395-400.
- ¹⁵ **Kagawa N, Mihara K y Sato R.** 1987. Structural analysis of cloned cDNAs for polycyclic hydrocarbon-inducible forms of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biochem. (Tokyo)* 101:1471-1479.
- ¹⁶ **Uchida T, Komori M, Kitada M y Kamataki T.** 1990. Isolation of cDNAs coding for three different forms of liver microsomal cytochrome P-450 from polychlorinated biphenyl-treated beagle dogs. *Mol. Pharmacol.* 38:644-651.
- ¹⁷ **Sagami I, Ohmachi T, Fujii H, Kikuchi H y Watanabe M.** 1991. Hamster cytochrome P-450IA gene family, P-450IA1 and P-450IA2 in lung and liver: cDNA cloning and sequence analysis. *J. Biochem. (Tokyo)* 110:641-647.
- ¹⁸ **Komori M, Kikuchi O, Kitada M y Kamataki T.** 1992. Molecular cloning of monkey P450 IA1 cDNA and expression in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1131: 23-29.
- ¹⁹ **Gonzalez FJ.** 1989. The molecular biology of cytochrome P540s. *Pharmacol. Rev.* 40(4):243-288.
- ²⁰ **Ryan DE, Thomas PE, Reik LM y Levin W.** 1982. Purification, characterization, and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P-450 isozymes. *Xenobiotica* 11:727-744.
- ²¹ **Guengerich FP y Shimada T.** 1991. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4:391-407.
- ²² **Johnson EF, Levitt AS, Muller-Eberhard U y Thorgeirsson SS.** 1980. Divergent pathways of carcinogens metabolism: metabolism of 2-

acetylaminofluorene by multiple forms of Cytochrome P-450. *Cancer Res.* 40:4456-4460.

²³ **Pelkonen O y Nebert DW.** 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34:189-222.

²⁴ **McLemore T, Adelberg S, Liu MC, McMahan NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinski M, Coudert BP, Moscow JA, Stinson S, Storeng R, Lubet RA, Eggleston JC, Boyd MR y Hines RN.** 1990. Cytochrome P4501A1 gene expression in living cancer patients: Evidence for cigarette smoke-induced expression in normal lung and altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *JNCI* 82:1333-1339.

²⁵ **Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, Hirvonen A y Pelkonen O.** 1995. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene* 159:113-121.

²⁶ **Kawajiri K, Eguchi H, Nakachi K, Sekiya T y Yamamoto M.** 1996. Association of *CYP1A1* germ line polymorphisms with mutations of the *p53* gene in lung cancer.

²⁷ **Atchison M y Adesnik M.** 1983. A cytochrome P-450 multigene family: characterization of a gene activated by phenobarbital administration. *J. Biol. Chem.* 258:11285-11295.

²⁸ **Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV y Kaminsky LS.** 1982. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital and β -naphthoflavone. *Biochemistry* 21:6019-6030.

²⁹ **Miles JS, Spurr NK, Gough AC, Jowett TJ, McLaren AW, Brook JD y Wolf CR.** 1988. A novel human cytochrome P450 gene (P45011B): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucl. Acids Res.* 16:5783-5795.

³⁰ **Khani SC, Porter TD, Fujita VS y Coon MJ.** 1988. Organization and differential expression of two highly similar genes in the rabbit alcohol-inducible cytochrome P-450 subfamily. *J. Biol. Chem.* 263:7170-7175.

³¹ **Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS y Gonzalez FJ.** 1986. Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and

human P-450s: transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J. Biol. Chem.* 261:16689-16697.

³² **Khani SC, Zaphiropoulos PG, Fujita VS, Porter TD, Koop DR y Coon MJ.** 1987. cDNA and derived amino acid sequence of ethanol-inducible rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a (P-450_{ALC}). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:638-642.

³³ **Casazza JP, Felver ME y Veech RL.** 1984. The metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* 259:231-236.

³⁴ **Conney AH.** 1967. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* 19:317-366.

³⁵ **Conney AH, Miller EC y Miller JH.** 1956. The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 16:450-459.

³⁶ **Gelboin HV y Blackburn N.** 1963. The stimulation effect of 3-methylcholanthrene (MC) on microsomal amino acid incorporation and benzopyrene (BP) hydroxylase activity and its inhibition by actinomycin D. *Biochim. Biophys. Acta* 72:657-660.

³⁷ **Conney AH, Miller EC y Miller JH.** 1957. Substrate-induced synthesis and other properties of benzopyrene hydroxylase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 228:753-756.

³⁸ **Nebert DW y Gelboin HV.** 1970. The role of ribonucleic acid and protein synthesis in microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. The independence of transcription and translation. *J. Biol. Chem.* 245: 160-168.

³⁹ **Gielen JE, Goujon FM y Nebert DW.** 1972. Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple mendelian expression in mouse tissues *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 247:1125-1137.

⁴⁰ **Thomas PE, Kouri RE y Hutton JJ.** 1972. The genetics of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mice: a single gene difference between C57BL/6J y DBA/2J. *Biochem. Genet.* 6:157-168.

⁴¹ **Nebert DW y Gelboin HV.** 1968. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J. Biol. Chem.* 243:6242-6249.

⁴² **Pickett CB, Telakowski-Hopkins CA, Ding CJF, Argenbright L y Lu AY.** 1984. Rat liver glutathione S-transferase. Complete nucleotid

sequence of a glutathion S-transferasa mRNA and the regulation of the Ya, Yb, and Yc mRNAs by 3-methylcholanthrene and phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 259:5182-5188.

⁴³ **Gonzalez FJ, Tukey RH y Nebert DW.** 1984. Structural gene products of the Ah locus. Transcriptional regulation of cytochrome P₁-450 y P₃-450 mRNA levels by 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.* 26:117-121.

⁴⁴ **Polland A y Glover E.** 1975. Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: evidence for a receptor mutation in genetically non-responsive mice. *Mol. Pharmacol.* 11:389-398.

⁴⁵ **Bank PA, Yao EF, Swanson HI, Tullis K y Denison MS.** 1995. DNA binding of the transformed Guinea pig hepatic Ah receptor complex: Identification and partial characterization of two high-affinity DNA-binding forms. *Arch. Biochem. Biophys.* 317(2):439-448.

⁴⁶ **Daujat M, Peryt B, Lesca P, Fourtanier G, Domergue J y Maurel P.** 1992. Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 y 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 188(2):820-825.

⁴⁷ **Ayalogu EO, Snelling J, Lewis DFV, Talwar S, Clifford MN e Ioannides C.** 1995. Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus. *Biochim. Biophys. Acta* 1272:89-94.

⁴⁸ **Lesca P, Peryt B, Larrieu G, Alvinerie M, Galtier P, Daujat M, Maurel P y Hoogenboom L.** 1995. Evidence for the ligand-independent activation of the AH receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209(2):474-482.

⁴⁹ **Landers JP, Winhall MJ, McCready TL, Sanders DAR, Rasper D, Nakai JS y Bunce NJ.** 1991. Characterization of an inducible aryl hydrocarbon receptor-like protein in rat liver. *J. Biol. Chem.* 266(15):9471-9480.

⁵⁰ **Kimura S, Gonzalez FJ y Nebert DW.** 1986. Tissue specific expression of the mouse dioxin-inducible P₁450 end P₃450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol. Cell. Biol.* 6:1471-1477.

⁵¹ **Omicinski CJ, Walz FG Jr y Vlasuk GP.** 1985. Phenobarbital induction of rat liver cytochromes P-450b and P-450c: quantitation of

specific RNAs by hybridization to synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *J. Biol. Chem.* 260:3247-3250.

⁵² Omiecinski CJ. 1986. Tissue-specific expression of rat mRNAs homologous to cytochromes P-450b and P-450e. *Nucl. Acids Res.* 14:1525-1539.

⁵³ Shephard EA, Forrest LA, Shervington A, Fernandez LM, Ciaramella G y Phillips IR. 1994. Interaction of proteins with a cytochrome P450 2B2 gene promoter: Identification of two DNA sequences that bind proteins that are enriched or activated in response to phenobarbital. *DNA Cell Biol.* 13(8):793-804.

⁵⁴ Trottier E, Belzil A, Stoltz C y Anderson A. 1995. Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene* 158:263-268.

⁵⁵ He JS y Fulco AJ. 1991. A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria. *J. Biol. Chem.* 266(12):7864-7869.

⁵⁶ Roe AL, Blouin RA y Howard G. 1996. *In vivo* phenobarbital treatment increases protein binding to a putative AP-1 site in the CYP2B2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 228:110-114.

⁵⁷ Simmons DL, McQuiddy P y Kasper CB. 1987. Induction of the hepatic mixed-function oxidase system by synthetic glucocorticoids: transcriptional and post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 262:326-332.

⁵⁸ Molowa DT, Schuetz EG, Wrighton SA, Watkins PB, Kremers P, Mendez-Picon G, Parker GA y Guzelian PS. 1986. Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5311-5315.

⁵⁹ Govinda MV, Devic M, Green S, Gronemeyer H y Chambon P. 1985. Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. *Nucl. Acids Res.* 13:8293-8304.

⁶⁰ Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P y Guzelian PS. 1986. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes *in vivo* and in primary monolayer culture. *J. Biol. Chem.* 261:6264-6271.

- ⁶¹ Umeno M, Song BJ, Kozak C, Gelboin HV y Gonzalez FJ. 1988. The rat P450IIE1 gene: complete intron and exon sequence, chromosome mapping, and correlation of development expression with specific 5'-cytosine demethylation. *J. Biol. Chem.* 263:4956-4962.
- ⁶² Gonzalez FJ, Kimura S, Song BJ, Pastewka J, Gelboin HV y Hardwick JP. 1986. Sequence of two related P-450 mRNAs transcriptionally increased during rat development: an R.dre.1 occupies the complete 3'-untranslated region of an mRNA. *J. Biol. Chem.* 261:10667-10672.
- ⁶³ Ryan DE, Shinji I, Wood AW, Thomas PE, Lieber CS y Levin W. 1984. Characterization of three highly purified cytochromes P-450 from hepatic microsomes of adult male rats. *J. Biol. Chem.* 259:1239-1250.
- ⁶⁴ Waxman DJ, Dannan GA y Guengerich FP. 1985. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex specific isoenzymes. *Biochemistry* 24:4409-4417.
- ⁶⁵ Williams MT y Simonet LC. 1988. Effects of growth hormone on cytochrome P-450j. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 155:392-397.
- ⁶⁶ Jansson JO, Eden S e Isaksson O. 1985. Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Rev.* 6:128-150.
- ⁶⁷ Koop DE y Tierney DJ. 1991. Regulation of cytochrome P450 2E1. *Bioessays* 12:429-435.
- ⁶⁸ Ronis MJJ, Huang J, Crouch J, Mercado C, Irby D, Valentine CR, Lumpkin CK, Ingelman-Sundberg M y Badger TM. 1993. Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264(2):944-950.
- ⁶⁹ Matsunaga T, Nagata K, Holsztynska EJ, Lapenson DP, Smith AJ, Kato R, Gelboin HV, Waxman DJ y Gonzalez FJ. 1988. Gene conversion and differential regulation in the rat P450IIA gene subfamily: purification, catalytic activity, cDNA and deduced amino acid sequence, and regulation of an adult male-specific testosterone 15 α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 263:17995-18002.
- ⁷⁰ Warner M, Kohler C, Hansson T y Gustafsson JA. 1988. Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: spectral quantitation and contribution of P-450b,e and P-450c,d. *J. Neurochem.* 50:1057-1065.

- ⁷¹ Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV y Gonzalez FJ. 1987. Stabilization of cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol. Endocrinol.* 1:542-547.
- ⁷² Mandell WF y Neu HC. 1988. Parasitic infections: therapeutic considerations. *Med. Clin. North America* 73(3):669-690.
- ⁷³ Sotelo J. 1997. Treatment of brain cysticercosis. *Surg. Neurol.* 48:110-112.
- ⁷⁴ Simon WA, Büdingen C, Fahr S, Kinder B y Koske M. 1991. The H⁺, K⁺-ATPase inhibitor pantoprazole (BY1023/ SK&F96022) interacts less with cytochrome P450 than omeprazole and lansoprazole. *Biochem. Pharmacol.* 42(2):347-355.
- ⁷⁵ Gyurik RJ, Chow AW, Zaber B, Bruner EL, Miller JA, Villani AJ, Petka LA y Parish RC. 1981. Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug Metab. Dispos.* 19:503-508.
- ⁷⁶ Marriner SE, Morris DL, Dickson B y Bogan JA. 1986. Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30:705-708.
- ⁷⁷ Delatour P, Garnier F, Benoit E y Longin C. 1984. A correlation of toxicity of albendazole and oxfendazole with their free metabolites and bound residues. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 7:139-145.
- ⁷⁸ Prichard RK, Hennessy DR, Steel JW y Lacey E. 1985. Metabolite concentrations in plasma following treatment of cattle with five anthelmintics. *Res. Vet. Sci.* 39:173-178.
- ⁷⁹ Marriner SE y Bogan JA. 1980. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Amer. J. Vet. Res.* 41:1126-1129.
- ⁸⁰ Delatour P, Parish RC y Gyurik RJ. 1981. Albendazole: a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Ann. Rech. Vet.* 12:159-167.
- ⁸¹ Brugmans J, Thienpont DC, Van Wijngaarden I, Vanparijs OF, Schuermans VL y Lauwers HL. 1971. Mebendazole in enterobiasis: Radiochemical and pilot clinical study in 1278 subjects. *JAMA* 217:313-316.
- ⁸² Dawson M y Watson TR. 1985. The effects of dose form on the bioavailability of mebendazole in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 19:87-90.
- ⁸³ Keystone JS y Murdoch JK. 1979. Diagnosis and treatment. Drugs five years later. Mebendazole. *Ann. Int. Med.* 91:582-586.

-
- ⁸⁴ **Laclette JP, Guerra G y Zetina C.** 1980. Inhibition of tubuline polymerization by mebendazole. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92:417-423.
- ⁸⁵ **Van den Bossche H, Rochette F y Hori C.** 1982. Mebendazole and related anthelmintics. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 19:67-125.
- ⁸⁶ **Xiao S, Feng J y Yao M.** 1995. Effect of anti-hydatidic drug on carbohydrate metabolism of metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Clin. Med. J. Engl.* 108:682-688.
- ⁸⁷ **Maton PN.** 1991. Omeprazole. *N. Engl. J. Med.* 324:965-975.
- ⁸⁸ **Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint-Aubert B, Bories P, Michel H y Maurel P.** 1990. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 99:737-747.
- ⁸⁹ **McDonnell WM, Scheiman JM y Traber PG.** 1992. Induction of cytochrome P450IA genes (cyp 1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology* 103:1509-1516.
- ⁹⁰ **Parkinson A y Hurwitz A.** 1991. Omeprazole and the induction of human cytochrome P450: a response to concerns about potential adverse effects. *Gastroenterology* 100:1157-1164.
- ⁹¹ **Penman ID, El-Omar E, McGregor JR, Hillan KJ, O'Dwyer PJ y McCoil KEL.** 1993. Omeprazole inhibits colorectal carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Gut* 34:1559-1565.
- ⁹² **Kashfi K y Dannenberg AJ.** 1995. Omeprazole coinduces multiple xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 768:237-242.
- ⁹³ **Quattrochi LC y Tukey RH.** 1993. Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: transcriptional activation of the human *CYP1A1* gene. *Mol. Pharmacol.* 43(4):504-508.
- ⁹⁴ **Ding X, Peng HM, Pernecky SJ, Davis CJ y Coon MJ.** 1992. Induction of P-450 cytochromes 2E2, 1A1 and 1A2 by imidazole in neonatal rabbits. *Drug Metab. Dispos.* 20(6):792-796.
- ⁹⁵ **Mori Y, Iimura K e Hirano K.** 1993. N-Benzylimidazole, a potent inducer of rat liver enzymes involved in mutagenic activation of various carcinogens. *Mut. Res.* 302:129-133.
- ⁹⁶ **Souhaili-El Amri H, Fargetton X, Benoit E, Totis M y Batt AM.** 1988. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92:141-149.

- ⁹⁷ **International Agency for Research on Cancer.** 1991. Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. A consensus report of an IARC monographs working group. IARC, Lyon, France, December.
- ⁹⁸ **Zhang Y y Talalay P.** 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 54:1976s-1981s.
- ⁹⁹ **Rice JM, Diwan BA, Hu H, Ward JM, Nims RW y Lubet RA.** 1994. Enhancement of hepatocarcinogenesis and induction of specific cytochrome P450-dependent monooxygenase activities by the barbiturates allobarbitol, aprobarbitol, pentobarbitol, secobarbitol and 5-phenyl- and 5-ethylbarbituric acids. *Carcinogenesis* 15(2):395-402.
- ¹⁰⁰ **Snyderwine EG, Nouse K y Schut HA.** 1993. Effect of 3-methylcholanthrene induction on the distribution and DNA adduction of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in F344 rats. *Food. Chem. Toxicol.* 31:415-423.
- ¹⁰¹ **Bartsch H, Castegnaro M, Rojas M, Camus AM, Alexandrov K y Lang M.** 1992. Expression of pulmonary cytochrome P4501A1 and carcinogen DNA adduct formation in high risk subjects for tobacco-related lung cancer. *Toxicol. Lett.* 64-65, 477-483.
- ¹⁰² **Anttila S, Hietanen E, Vainio H, Camus AM, Gelboin HV, Park SS, Heikkila L, Karjalainen A y Bartsch H.** 1991. Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P450IA in lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 47:681-685.
- ¹⁰³ **Brotodihardjo AE, Batey RG, Farrell GC y Byth K.** 1992. Hepatotoxicity from paracetamol self-poisoning in western Sydney: a continuing challenge. *Med. J. Aust.* 157:382-385.
- ¹⁰⁴ **Crippin JS.** 1993. Acetaminophen hepatotoxicity: Potentiation by Isoniazid. *Amer. J. Gastroenterology* 88(4):590-592.
- ¹⁰⁵ **Steiger U, Cotting J y Reichen J.** 1990. Albendazole treatment of Echinococcosis in humans: Effect on microsomal metabolism and drug tolerance. *Clin. Pharmacol Ther.* 47(3):347-353.
- ¹⁰⁶ **Kim RB, O'Shea D y Wilkinson GR.** 1995. Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clin. Pharmacol. Ther.* 57:645-655.
- ¹⁰⁷ **Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, Abe T, Sagami I, Ohmachi T, Wakui A, Kanamaru R y Watanabe M.** 1991. Association between

restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82:254-256.

¹⁰⁸ **Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Karjalainen A y Vainio H.** 1993. The human CYP2E1 gene and lung cancer: *Dra*I and *Rsa*I retraction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 14(1):85-88.

¹⁰⁹ **Berthou F, Goasduff T, Lucas D, Dréano Y, Le Bot MH y Ménez JF.** 1995. Interaction between two probes used for phenotyping cytochromes P450IA2 (caffeine) and P4502E1 (chlorzoxazone) in humans. *Pharmacogenetics* 5:72-79.

¹¹⁰ **Maron DM y Ames BN.** 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.* 110:173-215.

¹¹¹ **Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR y Mayer RT.** 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 48(5):923-936.

¹¹² **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

¹¹³ **Burke MD y Mayer RT.** 1975. Inherent specificities of purified cytochromes P450 and P448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation. *Drug. Metab. Dispos.* 3:245-253.

¹¹⁴ **Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T y Mayer RT.** 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.* 34:3337-3345.

¹¹⁵ **Rodrigues AD y Prough RA.** 1991. Induction of cytochromes P450IA1 and P450IA2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol.* 206:423-431.

¹¹⁶ **Nerurka PV, Parks SS, Thomas PE, Nims RW y Lubet RA.** 1993. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P450IA2 y 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem. Pharmacol.* 46:933-943.

¹¹⁷ **Koop DR.** 1986. Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Mol. Pharmacol.* 29:399-404.

-
- 118 **Towbin H, Staehelin T y Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- 119 **Laemmli EK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 120 **Saimot AG, Cremieux AC, Hay JM, Meulemans A, Giovanageli MD, Delaitre B y Coulaud FP.** 1983. Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *Lancet* 2:652-656.
- 121 **Escobedo F, Penagos P, Rodriguez J y Sotelo J.** 1987. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch. Intern. Med.* 147:738-741.
- 122 **Sotelo J y Flisser A.** 1997. Neurocysticercosis: Practical treatment guide- lines. *CNS Drugs* 7(1):17-25.
- 123 **Sotelo J, Penagos P, Escobedo F y Del Brutto OH.** 1988. Short course of albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 45:1130-1133.
- 124 **Jung, H., Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M. T. y Sotelo, J.** 1990. Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin. Neuropharmacol.* 13(6):559-564.
- 125 **Fargetton X, Galtier P y Delatour P.** 1986. Sulfoxidation of albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes. *Vet. Res. Commun.* 10:317-324.
- 126 **Moroni P, Buronfosse T, Longin-Sauvageon C, Delatour P y Benoit E.** 1995. Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 23(2):160-165.
- 127 **Jung H, Hurtado M, Medina MT, Sanchez M y Sotelo J.** 1990. Dexamethasone increases plasma levels of albendazole. *J. Neurol.* 237:279-280.
- 128 **Souhaili-El Amri H, Mothe O, Totis M, Masson C, Batt AM, Delatour P y Siest G.** 1988. Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246:758-764.
- 129 **Espinosa-Aguirre JJ, Rubio J, López I, Nosti R y Asteinza J.** 1997. Characterization of the CYP isozyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis* 12(3):159-162.

¹³⁰ Guengerich FP, Kim DH e Iwasaki M. 1991. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 4:168-178.

¹³¹ Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, Weston A y Harris CC. 1992. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 52:6712-6715.

¹³² Sánchez M, Suástegui R, González-Esquivel D, Sotelo J y Jung H. 1993. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin. Neuropharmacol.* 16(1):77-82.