

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

5

2ej

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

PAPEL DEL CICLOHEXANOL EN LA REGULACION  
DE LA ACTIVIDAD DE LA ISOENZIMA CYP2E1

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**BLANCA ILIAN GONZALEZ SANCHEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

MEXICO, D. F.

1998

265198

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología Genética de la Torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría y en el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la dirección del

Dr. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

## **DEDICATORIA**

**Dedico esta tesis con todo mi amor a mis más grandes tesoros: mis hijos**

**ALFONSITO Y ELENITA**

**Por su ejemplo, apoyo y amor incondicional a mi esposo**

**ALFONSO**

**Por su confianza y cariño a mis padres**

**BLANCA Y FERNANDO**

**Por todos los buenos momentos a mis hermanos**

**DIANA, FERNANDO Y KAROL**

**Y muy especialmente a mis abuelos, por todo el amor que han sabido dar, compartir y transmitir**

**CONSUELO Y RAMÓN**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por sus invaluable consejos, orientaciones y apoyo sin los cuales, la realización de este trabajo no hubiese sido posible.

A la Química Rosario Nosti Palacios por su ayuda en el manejo de las técnicas y por sus buenos consejos.

A la M. en C. Silvia Caballero Salazar por su apoyo académico

Y al Dr. Alfonso Alfaro Rodríguez por sus valiosos consejos para mejorar la calidad de este trabajo

## INDICE

I RESUMEN . . . . .	2
II INTRODUCCION. . . . .	3
1) Inhibición de enzimas de Citocromo P450 . . . . .	8
a) Inhibidores reversibles . . . . .	8
b) Inhibidores catálisis-dependientes . . . . .	11
c) Inhibición específica de isoenzimas. . . . .	13
2) Inducción de isoenzimas P450 hepáticas... . . . .	13
3) Nitrosaminas. . . . .	16
4) Ciclohexanol . . . . .	22
III ANTECEDENTES..... . . . .	23
1) Citocromo P450 en el metabolismo de nitrosaminas. . . . .	23
2) Ensayo de mutagénesis. . . . .	29
IV HIPÓTESIS . . . . .	32
V OBJETIVO GENERAL . . . . .	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.. . . .	32
VI. MATERIAL Y MÉTODOS . . . . .	33
1) Animales... . . . .	33
2) Fracción S9 . . . . .	33
3) Microsomas. . . . .	34
4) Obtención y mantenimiento de cepas de prueba... . . . .	34
5) Métodos para verificar la presencia de marcadores genéticos y determinar la frecuencia de reversión espontánea. . . . .	36
a) Requerimiento de Histidina. . . . .	36
b) Sensibilidad a cristal violeta... . . . .	36
c) Presencia de plásmido . . . . .	36
d) Frecuencia de reversión espontánea. . . . .	37
6) Reacción de demetilación (Actividad Enzimática) . . . . .	37
7) Prueba de mutagénesis . . . . .	40
VII. RESULTADOS. . . . .	40
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES. . . . .	45
IX REFERENCIAS . . . . .	53

## I. RESUMEN

Muchas nitrosaminas son metabolizadas por isoenzimas del Citocromo P450, una de las cuales (CYP2E1) ha recibido mucha atención debido a que está involucrada en la activación metabólica de la N-Nitrosodimetilamina (NDMA). La mutagenicidad y carcinogenicidad de las nitrosaminas es un tema que nos concierne seriamente debido a la exposición del hombre a éstos compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente como contaminantes y que además se pueden formar *in vivo* por nitrosación de compuestos endógenos o aminas que se encuentran en la dieta.

Estudios previos realizados en *Salmonella typhimurium* mostraron que la mutagénesis causada por nitrosaminas como la N-Nitrosodietilamina (NDEA) es inhibida por ciclohexanol (CH).

El ciclohexanol es un solvente de uso común en la industria, además de que resulta del metabolismo de otras moléculas como la ciclohexanona y el ciclohexano. Recientemente se ha reportado la presencia de derivados de éste alcohol en la orina de recién nacidos en una unidad de terapia intensiva, se sospecha que la fuente de estos metabolitos es la ciclohexanona que se encuentra como contaminante en soluciones de dextrosa comercial y que proviene de la fabricación de contenedores y tapones de plástico.

En el presente trabajo mostramos evidencias de que el CH actúa sobre el sistema enzimático de mamíferos que se encarga de la detoxificación de fármacos y contaminantes ambientales, específicamente del CYP2E1 (Citocromo P450 2E1).

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g, las cuales se dividieron en dos grupos. El primer grupo (experimental) recibió un pretratamiento de CH al 2.5% en agua de bebida durante 5 días; el otro grupo (control) recibió agua estéril. Ambos grupos recibieron alimento *ad libitum*.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron las fracciones microsomal y S9 hepática, la cual es llamada así debido a que se obtiene de una centrifugación a 9000g. Se midió la actividad de CYP2E1 expresándose en nmol de HCOH formado/mg de proteína microsomal/minuto. El ensayo de mutagénesis, basado en la prueba de Ames se realizó con la cepa TA100 de *S. typhimurium* además de los inhibidores CH, 4-Metilpirazol (4MP) y dietilditiocarbamato de sodio (DDCM). Los resultados que se obtienen de esta prueba son indicio de actividad biológica.

Se observó que la actividad enzimática en microsomas inducidos es 4-5 veces más elevada que la encontrada en microsomas provenientes de animales testigos. Cuando se agregó CH a la mezcla de incubación en la reacción de demetilación, se observó la inhibición del metabolismo de NDMA. Los ensayos de mutagénesis mostraron que la fracción S9 inducida activó eficientemente la NDMA a productos mutagénicos para la bacteria. Se presentó una marcada inhibición de la mutagénesis con 4MP y CH en los experimentos realizados con S9 inducido. En base a nuestros resultados, concluimos que el CH es un inductor específico de CYP2E1 y que actúa como inhibidor del metabolismo de NDMA.

## II. INTRODUCCIÓN

La biotransformación de xenobióticos como fármacos, solventes, compuestos químicos carcinogénicos y mutagénicos entre otros compuestos ambientales y de endobióticos como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas y aminas biogénicas, se lleva a cabo por un sistema enzimático que se encuentra distribuido en hígado, riñón, pulmón, cerebro y epitelio gastrointestinal en diferentes concentraciones.

Estas enzimas se encuentran en los microsomas que se forman cuando las células del tejido se rompen por homogeneización obteniendo vesículas de aproximadamente 100 nm de diámetro. Algunos tipos de microsomas se obtienen del retículo endoplásmico rugoso (RER), retículo endoplásmico liso (REL), fragmentos vesiculares de membrana plasmática, aparato de Golgi, endosomas y mitocondrias. Los microsomas obtenidos de homogenado hepático son derivados de REL, debido a que existen enormes cantidades de éste en los hepatocitos. Las enzimas del Citocromo P450 están incluidas en la bicapa lipídica del REL.

La fracción microsomal contiene un importante grupo de enzimas denominadas monooxigenasas las cuales requieren un agente reductor: fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) y oxígeno molecular (atmosférico). Las reacciones de biotransformación catalizadas por las monooxigenasas incluyen N-dealquilación, O-dealquilación, hidroxilación sobre ciclos aromáticos y cadenas laterales, formación de sulfóxidos, N-oxidación, N-hidroxilación, deaminación de aminas primarias, desulfuración, dehalogenación y epoxidación (Coon y col, 1976). El paso clave de éstas reacciones



oxidativas es la inserción de un átomo de oxígeno molecular en el sustrato, produciendo a menudo un intermediario inestable, que se rompe para dar el producto final. Muchas de estas reacciones resultan en la formación de compuestos tóxicos y carcinogénicos, de ahí la importancia de conocer los factores que determinan la especificidad de algunas reacciones catalizadas por el P450 (Ingelman-Sundberg y Johansson, '80)

A partir de los estudios de Cooper y col (1965) y Gillette (1966), los cuales mostraron que el Citocromo P450 estaba involucrado en el metabolismo de muchos compuestos endógenos y exógenos, cobró importancia la diversidad de sustratos de éstas enzimas de donde surgieron estudios encaminados a responder la pregunta de si la capacidad del Citocromo P450 para metabolizar una amplia gama de sustratos se debía a la presencia de un solo Citocromo P450 inespecífico o a una familia de Citocromos cada uno con especificidad a un sustrato.

Estudios de reconstitución y purificación realizados en diferentes laboratorios, demostraron que existen múltiples formas del P450 con diferentes especificidades a sustrato en una variedad de tejidos en todas las especies animales (Coon y col, 1977, Johnson 1979, Guengerich, 1979; Lu y West, 1980, Ryan y col, 1982; Nebert y Negishi, 1982) Estudios posteriores, se enfocaron en la estructura, función y regulación de varias isoenzimas para definir la naturaleza del sitio de acción de éstas isoenzimas y probar cómo la especificidad a sustrato está determinada en las reacciones catalizadas por P450 Actualmente se sabe que el Citocromo P450 comprende una superfamilia de formas multifuncionales codificadas por distintos genes, que son influenciados de manera independiente por factores como la herencia el sexo y la edad (Raucy and Lasker, 1991)

Últimamente se han hecho considerables progresos en la purificación y caracterización de enzimas de P450 de animales y la información recolectada ha proporcionado un buen fundamento para el estudio de enzimas del P450

Para observar el metabolismo del P450 se han desarrollado varias pruebas dentro de las cuales se encuentra el estudio con Citocromo P450 purificado en sistemas reconstituidos y con anticuerpos los estudios *in vivo* con inductores e inhibidores de P450, estudios de inhibición *in vitro* y estudios espectrales (Yang y Lu, 1987)

Compuestos como el etanol, N-nitrosodimetilamina (NDMA), tetracloruro de carbono acetaminofén entre otros, son metabolizados por enzimas del Citocromo P450, las cuales catalizan tanto la activación como la detoxificación de xenobióticos

El sitio activo del P450 contiene un grupo prostético ferroprotoporfirina IX, en el cual el oxígeno molecular se une, se reduce y se activa (fig. 1-3)

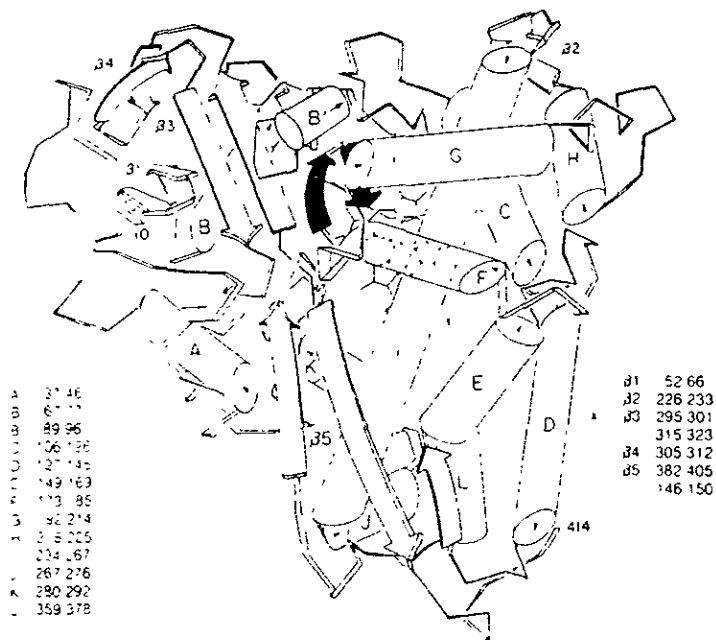


Fig 1. Representación esquemática de la molécula de P450 cam. Las hélices están indicadas por las  $\alpha$  y las estructuras  $\beta$  por flechas. La región punteada muestra el ligando hemoaxial. (de la Modificación de Druz de Montellano, 1986)

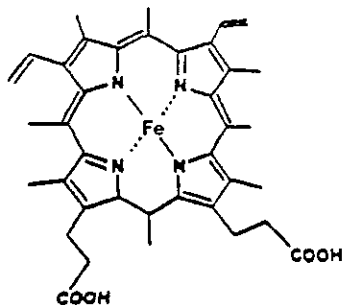


Fig 2 Estructura de protoporfirina IX, (Modificado de González, 1993).

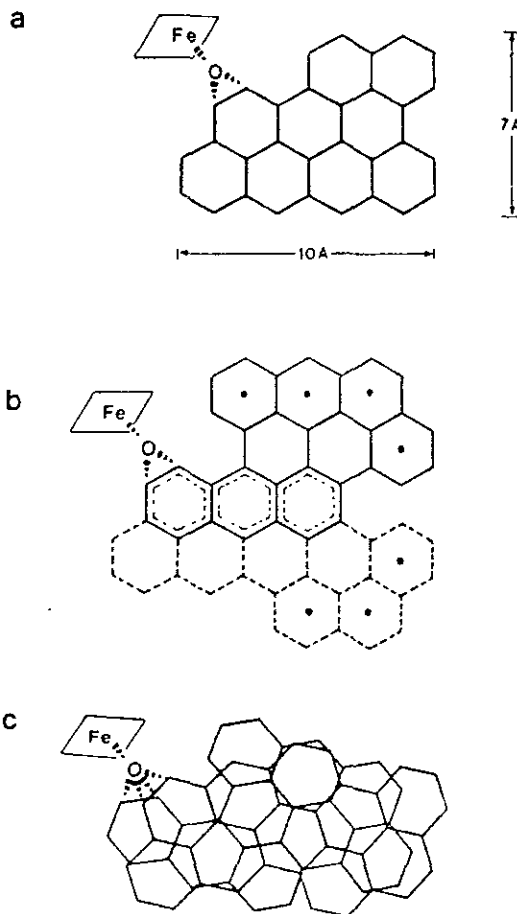


Fig 3 Modelos para el sitio activo de Citocromo P450: a) Modelo corriente que muestra el tamaño de la region hidrofobica. b) Modelo expandido (\*) c) Modelo propuesto para mostrar flexibilidad en el angulo de la adición del oxígeno y para determinar estereo y regioselectividad por el plano de entrada del sustrato en el sitio activo, (Modificado de González 1993)

El ciclo catalítico del Citocromo incluye

- Unión al sustrato para dar un complejo de alto espín férrico
- Reducción por medio de un electrón del grupo Fe (III) a Fe (II)
- Unión del oxígeno molecular para generar la forma oxi de  $SFe^{3+}O_2^-$
- Una segunda reducción para formar la especie superóxido
- Heterólisis formal de la unión O-O con generación concomitante de la especie reactiva oxidante  $(FeO)^{3+}$  y de una molécula de agua
- Un segundo electrón para oxidar el sustrato obteniéndose la especie SO con la regeneración del complejo férrico y la enzima (**fig. 4**), ( McMurry y Groves, 1986)

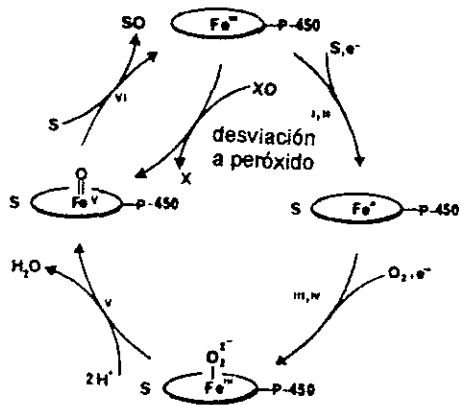


Fig 4 Ciclo catalítico del Citocromo P450. (Modificado de Ortiz de Montellano, 1986)

## 1) INHIBICIÓN DE ENZIMAS DE CITOCROMO P450

El ciclo catalítico del Citocromo P450 atraviesa tres etapas en las cuales es particularmente vulnerable a la inhibición:

- 1 La unión al sustrato
- 2 La unión subsecuente a oxígeno molecular para la primera transferencia de *electrones*
3. El paso catalítico en el cual el sustrato es oxidado

Los inhibidores de P450 se pueden dividir en tres grupos

- a) Agentes que se unen reversiblemente
- b) Agentes que forman complejos quasi-irreversibles con el átomo de hierro
- c) Agentes que se unen de forma irreversible a las proteínas o al grupo hemo

En su mayoría, los grupos que interfieren en el ciclo catalítico antes del evento oxidativo son inhibidores reversibles competitivos o no competitivos. Los agentes que actúan durante o después del paso de transferencia de oxígeno, generalmente son inhibidores irreversibles o quasi-irreversibles, y muchas veces, caen dentro de la categoría de inhibidores catálisis-dependientes

### A) INHIBIDORES REVERSIBLES

Los inhibidores que compiten reversiblemente con el sustrato para ocupar el sitio activo incluyen sustancias que se unen al dominio hidrofóbico, que se combinan con el grupo prostético hemo-hierro, o que participan en la unión específica a hidrógeno o

interacciones iónicas con residuos específicos del sitio activo (Testa y Jenner, 1981, Netter 1980)

El primer mecanismo, una simple competencia por la unión al dominio lipofílico del sitio activo está evidenciado por la competencia que existe entre los sustratos afines a una isoenzima de P450. Esta inhibición es óptima cuando la sustancia inhibidora se une estrechamente pero es un sustrato pobre. La inhibición por medio de éste mecanismo no es muy efectiva, pero en situaciones apropiadas, puede causar cambios metabólicos fisiológicamente relevantes (Sato y Nakajima, 1979)

Dentro de los inhibidores reversibles se encuentran los siguientes tipos:

- Los que se coordinan al grupo hemo-férrico, dando un espectro de unión "tipo 2" con una máxima absorbancia de 430 nm debido al estado de alto y bajo espín que se forma (Kumaki y col, 1978; Schenkman y col, 1981), y que está acompañado por un cambio en el potencial de óxido-reducción de la misma por P450-reductasa (Sligar y col, 1979, Guengerich, 1983). Este cambio en el potencial es responsable de la inhibición asociada con la unión de ligandos fuertes en el grupo férrico.
- Los que se coordinan al grupo hemo-ferroso como el monóxido de carbono que se une exclusivamente al grupo hierro (reducido) del P450 (Hanson y col, 1976)
- En la coordinación al grupo hemo y unión lipofílica, los inhibidores se unen simultáneamente a las regiones lipofílicas de las proteínas y al grupo prostético hemo-hierro y éstas uniones son mucho más efectivas que los agentes que dependen solamente de una de estas interacciones.

La actividad de los agentes que inhiben al P450 está gobernada por su carácter hidrofóbico y por la fuerza de la unión entre su heteroátomo y el grupo prostético. Los agentes menos efectivos incluyendo alcoholes, éteres, cetonas, lactonas y otras estructuras en las cuales el átomo de coordinación es un oxígeno, se coordinan débilmente al grupo prostético hemo-hierro. (Schenkman y col. 1981, Cohen y Mannering, 1972, Testa 1981; Wattenberg y col., 1979, Remmer y col., 1966) En contraste, los inhibidores reversibles más efectivos interactúan fuertemente tanto con las proteínas como con el grupo prostético, ya que poseen, en su mayoría, compuestos nitrogenados aromáticos y alifáticos (**fig. 5**). Los derivados de piridina e imidazoles son los más utilizados.

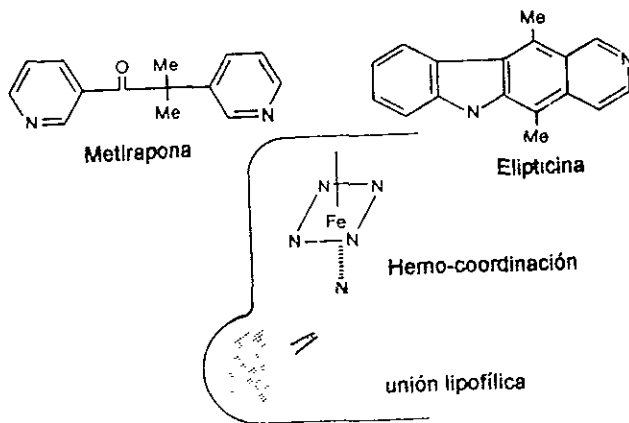


Fig 5 Diagrama de la unión en 2 puntos de agentes con un dominio lipofílico y una función de coordinación de nitrógeno. Se dan las estructuras de cada uno de los agentes. (Modificado de Schenkman 1986;

### B, INHIBIDORES CATALISIS-DEPENDIENTES

Se sabe que algunas clases de inhibidores que son catalíticamente activados por la enzima a especies transitorias, inhiben la enzima irreversible o quasi-irreversiblemente. Los inhibidores dependientes de catálisis son mucho más específicos que los inhibidores reversibles debido a que

- el inhibidor debe unirse primero a la enzima y satisfacer los requerimientos de los inhibidores clásicos
- posteriormente se activa catalíticamente, con lo cual es aceptado como sustrato
- las especies reactivas producidas por el recambio catalítico irreversible alteran a la enzima y la remueven permanentemente del ciclo catalítico (Walsh, 1982, Santi y Kenyon, 1980).

Se conocen tres clases de inhibidores irreversibles catálisis-dependientes:

1. Agentes que se unen covalentemente a la proteína. Incluyen una variedad de compuestos sulfurados como disulfito de carbono, dietilditiocarbamato, isotiocianatos, tioureas, además de estructuras halogenadas como cloranfenicol **(fig. 6)**.
2. Agentes que se coordinan quasi-irreversiblemente con el grupo prostético hemo-hierro. Los inhibidores que son catalíticamente oxidados a intermediarios que se coordinan estrechamente al grupo prostético de P450 y que únicamente pueden ser removidos bajo condiciones experimentales especiales son los llamados quasi-irreversibles. Incluyen compuestos alquil y aril dioximetileno, algunos de los cuales son utilizados comercialmente como insecticidas, aminas aromáticas y



alquil aminas que son convertidas *in situ* a metabolitos nitrosos muchas de las cuales son utilizadas clínicamente como antibióticos. Además de acilhidrazinas e hidrazinas 1-1 disustituidas. (fig. 7)

3. Agentes que alquilan o degradan el grupo prostético. Son inhibidores que actúan sobre el grupo prostético hemo-hierro, llevándose a cabo una alquilación del mismo ó bien, una degradación

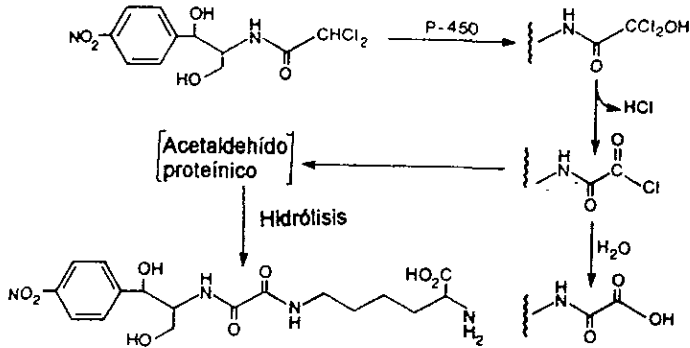


Fig 6 Mecanismo propuesto para la inactivación catalisis dependiente de P450 por cloramfenicol. El residuo proteínico de acetaldehído ha sido aislado y caracterizado, (Modificado de Ortiz de Montellano 1986)

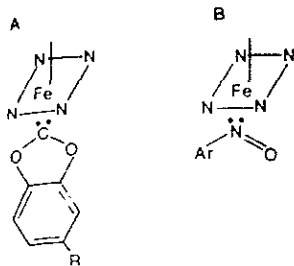


Fig 7 Estructura propuesta para los complejos quasi-irreversibles formados durante la activación catalítica de A) compuestos metilendioxifenílicos y B) aminas primarias (Modificado de Ortiz de Montellano 1986)

### C) INHIBICIÓN ESPECÍFICA DE ISOENZIMAS

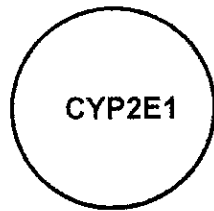
Existen además los inhibidores específicos para isoenzimas de P450, los cuales son de potencial importancia no solo como agentes terapéuticos, insecticidas o herbicidas, sino también como sondas para determinar estructuras, mecanismos y el papel biológico de dichas isoenzimas. Los inhibidores específicos para éstas isoenzimas pueden ser reconocidos como tales únicamente después de haber sido probados contra una amplia diversidad de isoenzimas (Ortíz de Montellano y Reich, 1986).

### **2) INDUCCIÓN DE ISOENZIMAS DE P450 HEPÁTICAS**

En el hígado de los mamíferos se realiza principalmente el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos mediado por P450. Se han purificado múltiples formas de P450 a partir de hígado de roedores (Lu y West, 1980, Mannering, 1981). Algunas de estas proteínas de P450 son expresadas constitutivamente, mientras que otras son expresadas solamente en respuesta a estímulos químicos específicos u hormonales. Para apoyar esto se han hecho estudios tratando de identificar los procesos celulares que conectan al estímulo químico con la expresión de una proteína específica del P450. (Eisen, 1986) Algunos ejemplos de la estimulación con compuestos químicos son los compuestos aromáticos policíclicos, barbitúricos y esteroides **(fig. 8)**

La alteración en la expresión de una enzima ocurre como resultado tanto de polimorfismo genético como de la exposición a compuestos que inducen o reprimen las isoenzimas de manera individual, el hecho de que existan isoenzimas de P450 con diferentes formas de regulación y de selectividad, conduce al concepto de variabilidad, en razón al metabolismo del sustrato tanto de productos tóxicos como no tóxicos

AYUNO  
DIABETES  
ACETONAS  
CETONAS  
ISOPROPANOL  
ETANOL  
BENZENO  
ETER  
PIRAZOL  
IMIDAZOL  
ISONIAZIDA  
PIRIDINA



N-NITROSODIMETILAMINA  
ACETONA  
ALCOHOLES  
ANILINA  
ENFLUORANO  
ETERES  
CLOROFORMO  
TETRACLORURO DE CARBONO  
BENZENO  
ALCANOS  
ACETAMINOFEN  
AZOXIMETANO

Fig 8. Inductores y sustratos de CYP2E1

Se ha observado en el humano que la expresión de algunas isoenzimas de P450 puede ser influenciada tanto por polimorfismo genético como por inducción, en donde cada polimorfismo tiene un papel importante en las diferencias observadas entre individuos con respecto a la respuesta y toxicidad a fármacos y cada mutación puede resultar no solo en la ausencia de las proteínas de P450, sino también en la producción de enzimas funcionalmente deficientes

Entre los P450 que metabolizan xenobióticos se encuentran las familias CYP1, CYP2 CYP3 y CYP4 La familia CYP2 es la más compleja, tiene 7 subfamilias en mamíferos Con respecto a la toxicidad, la subfamilia CYP2E1 se encuentra entre las más importantes debido a su enorme capacidad para metabolizar fármacos, solventes y procarcinógenos ambientales a metabolitos citotóxicos y carcinogénicos (Raucy y col,

1993); La regulación de éstas enzimas es la que se ha estudiado más extensamente utilizando rata, ratón, conejo y otros mamíferos, encontrándose diferencias en la expresión del P450 entre especies (Waxman y Azaroff 1992; González, 1992; González y col, 1993);

La concentración y los tipos de Citocromo P450 en el hígado pueden ser limitantes para el metabolismo de xenobióticos, por lo que la inducción enzimática podría tener un papel clínicamente importante en fenómenos como interacciones en la acción terapéutica de fármacos "idiosincrasia" metabólica en las reacciones hepatotóxicas de fármacos, y diferencias individuales en la susceptibilidad a los efectos tóxicos de compuestos químicos ambientales

La exposición del hombre a compuestos que inducen P450 en animales incluyendo fármacos como fenobarbital, difenilhidantoína, o compuestos ambientales como pesticidas organoclorados, aceleran la desaparición en sangre de sustratos de Citocromo P450 administrados ó aceleran la aparición de metabolitos en los gases de la exhalación (Henry y col. 1979) Los pacientes pueden exhibir también un incremento de metabolitos en la excreción urinaria que provienen de sustratos endógenos tales como derivados de cortisol (Saenger y col 1981; Ohnhaus y Park, 1979; Fukushima y col, 1971, Poland y col, 1970).

Una evidencia adicional de inducción hepática en humanos es la proliferación de retículo endoplásmico liso en los hepatocitos e incremento en la excreción urinaria de ácido glucurónico (Pamperl y col. 1984. Hunter y col. 1971)

El consumo de alcohol es un factor importante que contribuye al cáncer en humanos (Doll y Peto 1981 Tuyns. 1979). A pesar de esto, el etanol ha mostrado que altera el

organotropismo de las nitrosaminas (VonGibel 1976; Griete y col, 1981) Estos resultados se han atribuido a la inhibición del metabolismo de las nitrosaminas por etanol (Swann 1982) Aunado a esto, se ha visto que el etanol es también inductor de la isoenzima CYP2E1, la cual es la responsable del metabolismo de las nitrosaminas (Renxiu y col 1982)

### 3) NITROSAMINAS

La mutagenicidad y carcinogenicidad de las nitrosaminas es un tema que nos concierne seriamente debido a la exposición del hombre a estos compuestos, los cuales son el producto de la reacción de nitrito con aminas secundarias y terciarias alifáticas, aminas terciarias heterocíclicas y derivados pirimidínicos (Chow, 1973; Fiddler y col, 1972; Lijinski y Greenblatt, 1972) **(fig. 9)**

Las nitrosaminas han sido usadas industrialmente como solventes, aditivos, antioxidantes, fumigadores y como intermediarios en la síntesis de un tipo de hidralazina utilizada como combustible en cohetes, por lo que se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente como contaminantes (IARC, 1972. Fishben, 1979). La primera confirmación de esto fue mostrada por Edner y col en 1964, quienes encontraron trazas de NDMA en el forraje para ovejas el cual contenía nitrito como conservador, resultando en una epidemia hepatotóxica

Los reportes de una toxicidad hepática aguda en trabajadores expuestos a NDMA (Freund 1937 Barnes 1954), dieron pie a los estudios de Magee y Barnes, quienes fueron los primeros en demostrar la hepatocarcinogenicidad de NDMA en ratas en 1956 El

metabolismo de las nitrosaminas fue también reportado por Dutton y Heath (1956) quienes mostraron que la  $^{14}\text{CNDMA}$  era metabolizada rápidamente por ratas y ratones, que lo exhalaban a  $^{14}\text{CO}_2$ . Estos hallazgos sugirieron que la NDMA y otras alquilnitrosaminas pueden sufrir desalquilación oxidativa *in vivo* a sus correspondientes aldehídos. Desde entonces se ha probado la actividad carcinogénica de más de 300 derivados N-nitroso y cerca del 90% han mostrado resultados positivos en muchas de las 39 especies animales probadas (Preussmann 1984, Preussmann y Stewart, 1984, Bogovski y Bogovski, 1981).

**(fig. 10)**

Se han llevado a cabo varios estudios para determinar la importancia que tienen las isoenzimas del Citocromo P450 en la activación metabólica de NDMA y otras nitrosaminas (Yamazaki y col 1992, Glatt y col 1981, Yoo y Yang, 1985, Peng y col, 1982, Czygan y col 1973, Tu y col 1981)

Aunque la carcinogenicidad de nitrosaminas no ha sido directamente establecida en humanos existen fuertes evidencias que indican que los compuestos N-nitroso se pueden formar *in vivo* en varios órganos del cuerpo, en especial en el tracto digestivo por reacciones con aminas secundarias y terciarias que se encuentran en la dieta, o de procesos metabólicos con agentes nitrosantes como los nitritos que son ampliamente utilizados como conservadores alimenticios o que se forman a partir de nitratos obtenidos de la dieta por la acción de la microflora que se encuentra en la saliva y en el intestino. Las nitrosaminas requieren de su activación metabólica para que actúen como carcinógenos.

Se piensa que una  $\alpha$ -hidroxilación inicial seguida por una N-dealquilación por isoenzimas de P450 son los pasos críticos de la activación del metabolismo de las

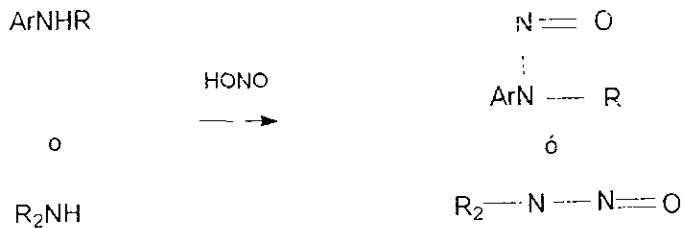
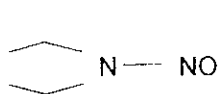
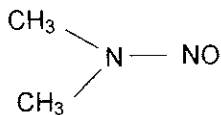


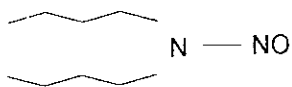
Fig 9 Mecanismo propuesto para la reacción de nitrosaminas aromáticas y alifáticas con el ácido nitroso que forman nitrosaminas



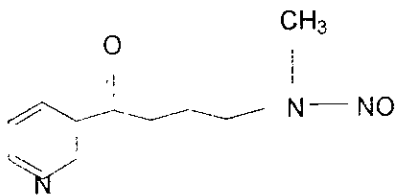
N-Nitrosodietilamina



N-Nitrosodimetilamina



N-Nitrosodibutilamina



4-(N-Nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona

Fig 10 Estructuras de algunas nitrosaminas

nitrosaminas dando como productos finales iones de diazonio, que son especies químicas muy reactivas (Magee y col. 1976. O'Neill y col. 1984 Fine y col, 1975) **(fig. 11)**

La fuente más importante y conocida de precursores de compuestos N-nitroso son los alimentos como carnes y pescados preservados, productos lácteos como quesos y leche descremada en polvo (Bratsch y Montesano, 1984), además de las fuentes de contaminantes que incluyen. productos de hule, pesticidas, cosméticos, líquidos para lavar platos y limpiadores

Aunque los alimentos y bebidas representan la forma de exposición de nitrosaminas y nitrosamidas más importante y frecuente en la población en general, existe también la exposición ocupacional, que aunque restringida a una parte de la población, es muy importante debido a las altas concentraciones que pueden alcanzar en el medio de trabajo. En algunas industrias como la del hule, curtido e industrias químicas en donde se trabaja con aminas, se han detectado concentraciones muy elevadas de nitrosaminas en el ambiente (Fine 1982)

Otra fuente de exposición es el tabaco, el cual ha sido identificado como uno de los principales factores etiológicos de cáncer en humanos (Hoffmann y Adams, 1981). Druckrey y Preussman (1962) postularon la formación de nitrosaminas carcinogénicas en el humo de cigarro. la cual ocurre frecuentemente por medio de la interacción de óxidos de nitrógeno y aminas del tabaco

También se ha detectado que diversos medicamentos empleados frecuentemente son susceptibles de sufrir nistrosación. Algunos ejemplos son la piperazina (antiparasitario) y la cimetidina (antiácido) que, administradas junto con nitrito de sodio (presente en alimentos) puede inducir cáncer en animales de laboratorio. Aunque el riesgo que



representa la nitrosación de medicamentos no ha sido evaluada debido a la complejidad de factores que afectan las reacciones *in vivo* (Lijinski, 1974; Lijinski, 1980; Scheider y col, 1977).

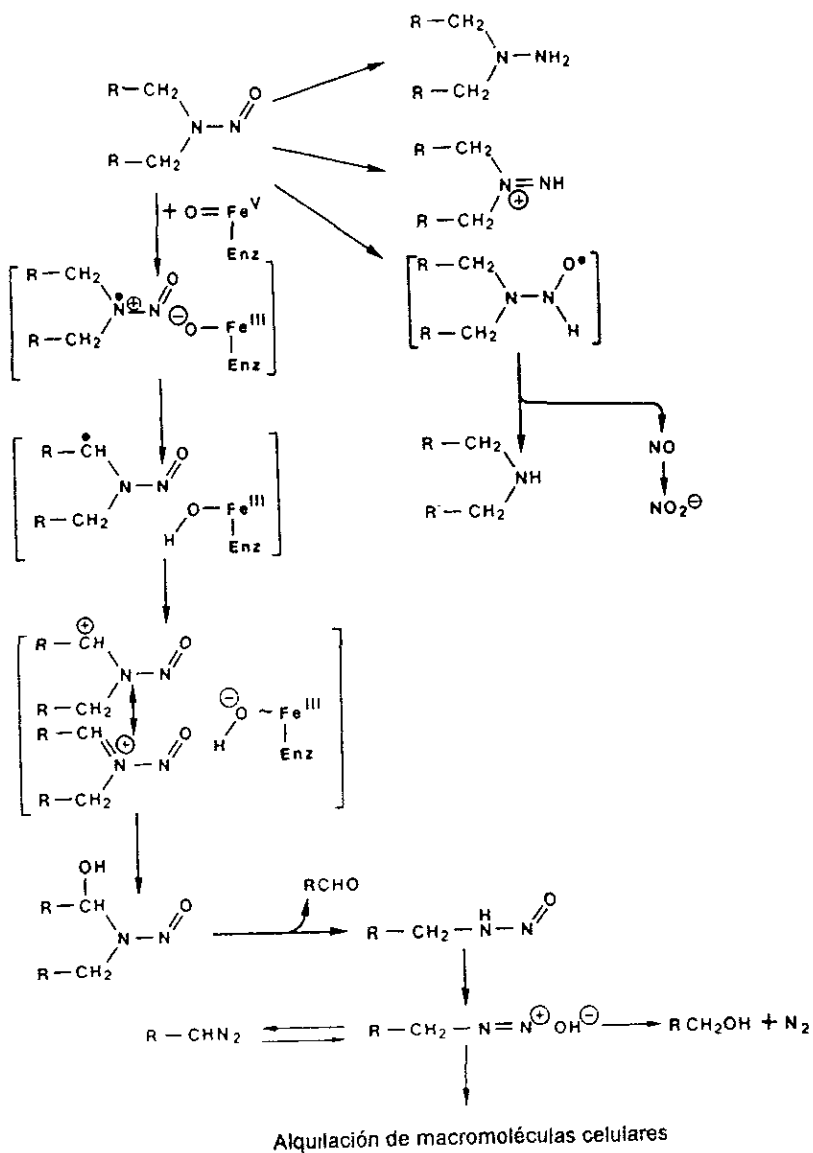


Fig 11 Mecanismo propuesto para el metabolismo oxidativo y reductivo de nitrosaminas carcinogénicas, (Modificado de Chow, 1973)

Se ha observado que la formación de nitrosaminas y nitrosamidas puede ser inhibida por sustancias que se encuentran distribuidas en la naturaleza, en especial en las plantas. Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que un alto consumo de vegetales verdes y amarillos, especialmente de los de la familia de las crucíferas (mostaza) y del género Brassica (coliflor, brocoli, col de Bruselas, col) reducen el riesgo de desarrollar cáncer en varios órganos. Evidencia bien documentada muestra que la alimentación con vegetales como la col y la col de Bruselas inducen enzimas tanto de la fase I como de la fase II en animales, en tanto que en el humano se estimula el metabolismo de fármacos (Prochaskes y col, 1992). En otros estudios, se observaron los efectos que la cebolla y el ajo tienen sobre la prevención del cáncer (Brady y col, 1991). Un grupo más de componentes alimenticios considerados como inhibidores de tumores inducidos por las nitrosaminas son los isotiocianatos, los cuales se encuentran en plantas. Estos compuestos son electrófilos y probablemente ejercen su efecto protector en parte por la inducción de Glutathión-S-transferasa y otras enzimas de conjugación (Hong y col, 1987).

La cafeína, el ácido caféico,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, entre otros, pueden inhibir la formación *in vitro* de los compuestos N-nitroso. Se ha tomado a la N-nitrosodimetilamina (NDMA) como modelo para el estudio del metabolismo de las nitrosaminas a partir del descubrimiento de su carcinogenicidad (Magee y Barnes, '67, Lai y Arcos, '80 y Yoo y Yang '85).

Además, se han hecho estudios de la inhibición de la mutagénesis causada por nitrosaminas con compuestos químicos uno de ellos, realizado en *Salmonella typhimurium* mostró que la mutagénesis de nitrosaminas como la N-nitrosodietilamina (NDEA) y la 4-(N-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) fue inhibida por ciclohexanol, este efecto

antimutagénico no se observó cuando se probaron mutágenos que siguen otra ruta metabólica como el benzo[a]pireno (BP), 2 aminoantraceno (2AA) y mutágenos directos como el metilmetanosulfonato (MMS), lo cual sugiere que el mecanismo antimutagénico del ciclohexanol podría estar relacionado con la inhibición del metabolismo de las nitrosaminas (Espinosa-Aguirre y col, '93).

#### 4) CICLOHEXANOL

El ciclohexanol (**fig. 12**) es un solvente de uso común en lacas, pinturas, removedores de barniz, como intermediario en la preparación de plásticos y otros compuestos químicos (Proctor and Hughes, '78). Proviene del metabolismo de otros solventes de uso industrial como la ciclohexanona y el ciclohexano (Mraz y col, '94 y Yasugi y col, '94).

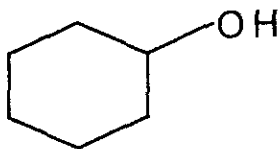


FIG 12 Compuesto líquido de peso molecular 100.16 g/mol, densidad de 1.18 g/ml, punto de ebullición de 161.5 °C solubilidad en agua a 20°C de 3.6% (w/w), miscible con etanol, acetato de etilo e hidrocarburos aromáticos, cuya fórmula química es C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O.

En 1993 Moszczyński sugirió que el humo del cigarro tenía un papel importante como co-factor en los cambios inmunológicos que se presentan durante la exposición ocupacional a solventes orgánicos como los que hemos mencionado. Otro estudio reveló

que la exposición ocupacional crónica a ciclohexanona reduce la habilidad y precisión de los movimientos manuales (Waszkowska y Bazylewicz, '92 y Ong, '91)

Utilizando el método de cromatografía de gases-espectrofotometría de masas, se investigaron las orinas de 278 recién nacidos en una unidad de cuidados especiales. El 40% de las muestras analizadas, presentaron isómeros de ciclohexanediol, se sospechó que la fuente de éstos metabolitos era la ciclohexanona, la cual se encuentra como contaminante de soluciones de dextrosa usadas por vía intravenosa y de soluciones para alimentación parenteral. El contaminante proviene de la fabricación de tapones y contenedores de plástico (Mills, '90), lo cual fue reportado por Snell (1989,1993) y Daniel (1991 1992), quienes realizaron estudios en soluciones parenterales cerradas con tapones de hule y en lixiviados de materiales plásticos utilizados en hospitales encontrando rastros de ciclohexanona presente en ellos.

La ciclohexanona incrementa el contenido hepático de Citocromo P450 y la actividad de glutathion-S-transferasa (GST) (Brondeau y col, '89 y Liubchenko y col, '94)

### III. ANTECEDENTES

#### 1) EL CITOCROMO P450 EN EL METABOLISMO DE LAS NITROSAMINAS

Muchas nitrosaminas son metabolizadas por isoenzimas de Citocromo P450 (**Tabla 1 y 2**) una de las cuales (CYP2E1) ha recibido mucha atención debido a que está involucrada en la activación metabólica de la NDMA. Esta isoenzima está presente tanto en humanos como en animales (rata, ratón, hamster y otras especies), y se encuentra no solamente en hígado, sino en otros tejidos como riñón y cerebro (Hansson y col, 1990). La modulación en la expresión de CYP2E1 por xenobióticos, ha sido mostrada en mamíferos incluyendo al humano, sin embargo existe controversia respecto a los mecanismos por los cuales los xenobióticos inducen dicha isoenzima (Raucy y col, 1993)

que la exposición ocupacional crónica a ciclohexanona reduce la habilidad y precisión de los movimientos manuales (Waszkowska y Bazylewicz, '92 y Ong, '91)

Utilizando el método de cromatografía de gases-espectrofotometría de masas, se investigaron las orinas de 278 recién nacidos en una unidad de cuidados especiales. El 40% de las muestras analizadas, presentaron isómeros de ciclohexanediol, se sospechó que la fuente de éstos metabolitos era la ciclohexanona, la cual se encuentra como contaminante de soluciones de dextrosa usadas por vía intravenosa y de soluciones para alimentación parenteral. El contaminante proviene de la fabricación de tapones y contenedores de plástico (Mills, '90), lo cual fue reportado por Snell (1989,1993) y Daniel (1991 1992) quienes realizaron estudios en soluciones parenterales cerradas con tapones de hule y en lixiviados de materiales plásticos utilizados en hospitales encontrando rastros de ciclohexanona presente en ellos

La ciclohexanona incrementa el contenido hepático de Citocromo P450 y la actividad de *glutathion-S-transferasa* (GST) (Brondeau y col, '89 y Liubchenko y col, '94)

### III. ANTECEDENTES

#### 1) EL CITOCROMO P450 EN EL METABOLISMO DE LAS NITROSAMINAS

Muchas nitrosaminas son metabolizadas por isoenzimas de Citocromo P450 (**Tabla 1 y 2**) una de las cuales (CYP2E1) ha recibido mucha atención debido a que está involucrada en la activación metabólica de la NDMA. Esta isoenzima está presente tanto en humanos como en animales (rata, ratón, hamster y otras especies), y se encuentra no solamente en hígado, sino en otros tejidos como riñón y cerebro (Hansson y col, 1990). La modulación en la expresión de CYP2E1 por xenobióticos ha sido mostrada en mamíferos incluyendo al humano, sin embargo existe controversia respecto a los mecanismos por los cuales los xenobióticos inducen dicha isoenzima (Raucy y col, 1993).

TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLOS DE SUSTRATO	PRODUCTOS
Hidroxilación alifática	ácidos grasos. n-alcános. ciclohexano, hexobarbital, testosterona	derivados hidroxilados, dependiendo de la isoenzima de P450 y del sustrato, la oxigenación puede ocurrir en diferentes sitios de la molécula
Oxidación aromática	bencenos halogenados, bifenilos, hidrocarbónos aromáticos policíclicos	hidroxilación o epoxidación en diferentes sitios
Alqueno-epoxidación	aflatoxina B1, benzo(a)pireno 7,8 dihidrodiol	aflatoxina B1 2,3-óxido, benzo(a)pireno-7,8-9,10- epóxido
N-dealquilación	aldrin, benzfenetamina, aminopirina	dieldrin, formaldehído, norbenzfenetamina formaldehído, monometil-4- aminoantipirina
Deaminación oxidativa	Étilmorfina anfetamina	formaldehído, noretilmorfina fenilacetona, amonío
O-dealquilación	7-etoxicumarina fenacetina	acetaldehído, 7- hidroxicumarina acetaldehído, acetaminofén
N-oxidación	2-acetilaminofluoreno fenacetina fentermina	N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno N-hidroxi-fenacetina N-hidroxi-fentermina
Desulfuración oxidativa	paratión disulfito de carbono	paraxón sulfuro, carbonil sulfito
Sulfoxidación	clorpromazina	sulfóxido de clorpromazina
Dehalogenación oxidativa	dibromometano	monóxido de carbono
Denitrificación oxidativa	dibromometano	
Denitrosación oxidativa	N-nitrosodimetilamina	nitrito, metilamina formaldehído

TABLA 1 Reacciones catalizadas por el Citocromo P450

TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLO DE SUSTRATO	PRODUCTOS
Nitroreducción	ácido p-Nitrobenzóico	ácido p-Aminobenzóico
	<i>nitrobenzeno</i>	<i>anilina</i>
Azoreducción	prontosil	sulfanilamida, triaminobenzeno
	azobenzeno	<i>anilina</i>
N-oxidoreducción de aminas terciarias	imipramina N-oxidada	imipramina
	N,N-dimetilanilina N-oxidada	N,N-dimetilanilina
Oxidoreducción de arenos	benzo(a)pireno 4,5-oxidada	benzo(a)pierno
Dehalogenación reductiva	tetracloruro de carbono	cloroformo
Cromato reducción	cromato(VI)	cromo (III)

TABLA 2. Reacciones de reducción catalizadas por Citocromo P450

La localización celular de CYP2E1 en el estado basal e inducido, es una determinación importante que refleja el sitio y severidad de la toxicidad provocada por exposición a xenobióticos bioactivados por ésta isoenzima .

La inducción de CYP2E1 y su regulación han sido atribuidas a diferentes mecanismos, dependiendo del estado fisiológico, especie animal y tipo de tratamiento (agudo o crónico) o de agente inductor (Forket y col, 1995). **(Tabla 3)**

INDUCTOR	TRATAMIENTO	NIVEL DE INDUCCIÓN	LOCALIZACIÓN HEPÁTICA	NIVELES DE ARNm	REFERENCIAS
ETANOL	crónico 4 semanas/agua bebida	Estabilización de proteínas	área centrilobular	_____	Ingleman '88 Biochem Biophys. Res. Comm.
AYUNO	48h de ayuno	Post - transcripcional	región perivenosa	se incrementan	Johansson '90 Biochem. Biophys Res. Comm.
ACETONA	5ml/kg 1 dosis				
ETANOL	10%/agua bebida 10 días	Transcripción	_____	incremento en ARNm transcrito	*Kubota '88 Biochem Biophys Res. Comm.
PIRAZOL	200 mg/kg 1dosis				
PIRIDINA	100 mg/kg i.p.	transcripción	_____	incremento	Kim '90 Biochim. Biophys. Res. Comm.
ACETONA	2.4 g/kg i p				
ETANOL ↑[]	infusión i g 35%	transcripción	_____	elevados no aumenta	Badger '93 Biochem Biophys Res Comm
ETANOL ↓[]					
ACETONA	agudo 5ml/kg 1dosis crónico 1%v/v 8días	post transcripcional	región centrilobular	se encuentran elevados	**Forkert '95 Laboratory Investigation
PIRAZOL	300mg/kg i.p. 2días	estabilización específica de proteínas	_____	se encuentran elevados	Song '89 J. Biol. Chem.
ACETONA	5% v/v 10días				
PIRAZOL	150 mg/kg i p. 1vez al día X 2 d	_____	zona pericentral	_____	Dicker '91 Biochim Biophys. Acta

TABLA 3. INDUCCIÓN DE CYP2E1 CON DIFERENTES SUSTANCIAS.

La mayoría de los trabajos reportados son hechos en rata a excepción de:

- \* Experimentos realizados en Hámster
- \*\* Experimentos realizados en ratón



Los mecanismos propuestos incluyen incremento en el ARNm por activación transcripcional o a la estabilización de ARNm, incremento en la síntesis de proteína y disminución en la degradación de la enzima. Los tres mecanismos pueden actuar individualmente o en combinación dando por resultado un incremento del contenido de CYP2E1 hepático

Los compuestos que incrementan CYP2E1 en roedores, como el etanol y agentes similares (acetona pirazol, 4-metilpirazol e imidazol) incrementan 5 veces la concentración de la enzima lo cual no está asociado con una elevación en la concentración de ARNm (Song y col. 1986; Porter y col , 1989; Hong y col, 1987).

Wrighton y col (1986) no encontraron una correlación en las concentraciones de ARNm y de proteína en hígado humano concluyendo que el aumento en la actividad de CYP2E1 en humanos no requiere de la acumulación de transcritos

La regulación de CYP2E1 se ve afectada por factores endógenos que incluyen estados fisiopatológicos como ayuno prolongado, diabetes y obesidad. Por su parte, los factores exógenos incluyen exposición a xenobióticos como etanol, acetona, isoniazida, benzeno y otros compuestos químicos. El CYP2E1 es la isoenzima que cataliza mejor la activación de la N-nitrosodimetilamina y N-nitrosopirrolidina En el metabolismo de N-nitrosobutílmtilmetilamina, la enzima oxida preferentemente el grupo metilo sobre el grupo butilo sin embargo CYP2B1 oxida eficientemente los dos grupos funcionales (Yang y col , 91)

Aunque Czygan y col, '73. Lotlikar y col '75 y Guengerich y col. '82 han demostrado que la activación metabólica de la NDMA es dependiente del Citocromo P450 otros

autores han cuestionado el papel de este Citocromo en la activación metabólica *in vivo* e *in vitro* de dicha nitrosamina (Lai y col., '80 ; Yoo y col., '85), debido a las siguientes observaciones

- 1 La NDMA<sub>d</sub> no es inducida por inductores clásicos como el fenobarbital y el 3-metilcolantreno
2. Existen múltiples valores de  $K_m$  para la NDMA<sub>d</sub>, observándose valores de  $K_m$  muy altos (> 100) para microsomas inducidos con fenobarbital.

Yang y col ('91) propusieron la hipótesis de que la multiplicidad en los valores de  $K_m$  para la NDMA<sub>d</sub> se debían a la actividad catalítica de múltiples formas de Citocromo P450, y que las especies de P450 que mostraban los valores más bajos de  $K_m$  y más altos de  $V_{max}$  eran, probablemente las enzimas responsables de la activación de este carcinógeno.

En 1981, Tu y col encontraron que el tratamiento de ratas con pirazol elevaba la actividad de la DMNA<sub>d</sub>, observándose que éste tratamiento inducía una nueva isoenzima de P450 con un peso molecular de 52,000 dal; se demostró la hemoproteína pirazol-inducida involucrada en el metabolismo de NDMA por medio de un experimento con  $CoCl_2$  el cual disminuyó tanto el contenido total de P450 como la actividad de NDMA<sub>d</sub>. En el mismo año Glatt y col estudiaron el efecto del pretratamiento con etanol ó acetona en ratones *in vitro* (prueba de Ames) e *in vivo* (ensayo intrasanguíneo vía-hospedero) y encontraron que con el sistema *in vitro*, la actividad de el sistema metabolizador es limitado por la activación de NDMA y la inducción, por tanto, incrementa la mutagenicidad, sin embargo *in vivo* la NDMA es metabolizada cuantitativamente tanto por los animales inducidos como por los animales testigos

La inducción de CYP2E1 por etanol y acetona proceden principalmente por mecanismos postranscripcionales involucrados en la estabilización proteínica sustrato-inducida (Song y col 1989) La transcripción del CYP2E1 comienza dentro de las dos primeras horas de vida del recién nacido y alcanza sus máximos niveles alrededor de los 7 días (Song y col 1986). Estudios de transcripción *in vitro* y trans-activación sugieren que CYP2E1 es controlado en parte por el factor HNF-1 $\alpha$  hepático (Ueno y González,1990. Liu y González 1995) El promotor CYP2E1 no puede ser activado por cotransfección con HNF-1 $\beta$  aunque éste factor está estrechamente relacionado con HNF-1 $\alpha$  y es capaz de formar un heterodímero estable con él mismo *in vitro* (Mendel y col, 1991) Para activar directamente al promotor HNF-1 $\beta$  requiere la presencia de un coactivador distinto al de HNF-1 $\alpha$ .

## 2) ENSAYO DE MUTAGENESIS

Una de las pruebas más difundidas para la identificación de mutágenos, es la desarrollada por el Dr Bruce Ames en la Universidad de California (Ames, 1971) empleando como sistema biológico diversas cepas bacterianas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium*.

Las bacterias mutantes se diferencian de las silvestres en que las primeras requieren de histidina para crecer. la base de la prueba consiste en revertir el fenotipo mediante la inducción de mutaciones en el operón de histidina, lo que confiere a las revertantes la capacidad de crecer en medios carentes de aminoácidos o con cantidades limitantes de él

Uno de los intereses de esta prueba, además de la fácil manipulación, economía y rapidez de ejecución deriva del conocimiento de los cambios moleculares ocurridos en el operón de histidina como consecuencia de las mutaciones originales, lo que permite averiguar no tan solo si un agente químico es mutagénico, sino a través de qué mecanismo induce la mutación. Varias de éstas cepas se originaron, en efecto, a través de sustituciones de bases y otras por desfasamiento de la secuencia nucleotídica (Frameshift). lo que implica que su reversión requiere del concurso de los mismos mecanismos, es decir. sustitución de bases en el primer caso o eliminación de bases en el segundo, para correr la secuencia y restablecer el código genético

La sensibilidad del sistema se ha incrementado mediante modificaciones adicionales como

- *Reparación deficiente del ADN*, como consecuencia de una deleción en la región *uvrB* del cromosoma, lo que da como resultado deficiencia en el sistema de reparación por escisión. Esto permite la detección de mutaciones que normalmente son reparadas (Ames,1971)
- *Alteración de la permeabilidad*, para lo cual se seleccionaron mutantes que presentaron un defecto en la *capa de polisacáridos* que las rodea, lo cual facilita el acceso de moléculas de gran tamaño.(Ames y col, 1973)
- *Introducción de moléculas circulares de ADN con replicación autónoma (plásmidos)*, portadoras de información que confiere resistencia a antibióticos.(McCann y col, 1975)

- Biotransformación de agentes químicos, es decir que la prueba se ha complementado con la adición de homogenados de órganos de algunos mamíferos que contienen enzimas que son responsables de la transformación metabólica de compuestos que acceden al organismo y que están ausentes en *S typhimurium* (Ames 1973)

En el presente trabajo se utilizó *Salmonella typhimurium* de la cepa TA100, la cual se obtuvo al introducir el plásmido pkm101 a la cepa TA1535; dicho plásmido contiene los genes *umuB* y *umuC* que promueven el mecanismo de reparación propenso a error, lo cual hace a la TA100 más sensible. Esta cepa posee la mutación *hisG46* localizada en el codón 96, que consiste en un triplete que codifica para la síntesis de prolina (GGG), en lugar del triplete original que codifica para la síntesis de leucina (GAG) que posee la cepa silvestre LT2. Tiene además una delección del gen *rfa* que proporciona la carencia de una lipoproteína en la pared celular, lo que hace a la cepa más sensible al paso de compuestos de gran tamaño. Otra característica de la TA100 es la delección del gen *uvrB*, el cual está involucrado en el sistema de reparación por escisión, con lo cual se mejora la eficiencia del sistema en la detección de compuestos capaces de dañar al ADN.

La mutación en la cepa TA100 puede ser revertida por mutágenos que actúan por sustitución de bases en el par G/C del codón 96 del gen *hisG*.

#### **IV. HIPÓTESIS**

- *La actividad de CYP2E1 de microsomas inducidos con ciclohexanol es mayor que la de microsomas testigo*
- *La mutagenicidad de DMNA en presencia de S9 inducido con ciclohexanol y la actividad enzimática en microsomas obtenidos de animales tratados con el mismo compuesto serán inhibidas por 4Metilpirazol y Dietilditiocarbamato de sodio*

#### **V. OBJETIVO GENERAL:**

- *Demostrar que el ciclohexanol induce la isoenzima CYP2E1.*

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- *Determinar la actividad de la isoenzima CYP2E1 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con ciclohexanol y sus testigos*
- *Inhibir la actividad de la isoenzima CYP2E1 y la mutagenesis de DMNA con 4Metilpirazol y Dietilditiocarbamato de sodio*

#### IV. HIPÓTESIS

- La actividad de CYP2E1 de microsomas inducidos con ciclohexanol es mayor que la de microsomas testigo
- La mutagenicidad de DMNA en presencia de S9 inducido con ciclohexanol y la actividad enzimática en microsomas obtenidos de animales tratados con el mismo compuesto *serán inhibidas por 4Metilpirazol y Dietilditiocarbamato de sodio*

#### V. OBJETIVO GENERAL:

- Demostrar que el ciclohexanol induce la isoenzima CYP2E1.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la actividad de la isoenzima CYP2E1 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con ciclohexanol y sus testigos
- Inhibir la actividad de la isoenzima CYP2E1 y la mutagenesis de DMNA con 4Metilpirazol y Dietilditiocarbamato de sodio

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1) ANIMALES

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g de peso, las cuales se dividieron aleatoriamente en dos grupos.

El primer grupo de 9 ratas recibió un pretratamiento de ciclohexanol al 2.5% en el agua de bebida durante 5 días, y se les dio alimento *ad libitum*

El otro grupo recibió agua y alimento *ad libitum*. A ambos grupos se les midió el consumo de agua durante los 5 días de tratamiento

Al quinto día (con un ayuno previo de 12 hrs) se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se procedió a la obtención de la fracción S-9 y los microsomas.

### 2) FRACCIÓN S9

Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Una vez sacrificado el animal, se procedió a la extracción del hígado según lo propuesto por Maron y Ames (1983)

La preparación de la fracción S9 está basada en el procedimiento de Garner y col (1972) el cual se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y a 4°C para conservar la actividad enzimática.

El hígado se colocó en un vaso previamente tarado conteniendo 15 ml de cloruro de potasio 0.15 M se pesó y se transfirió a otro vaso, al cual se le agregaron 3 ml de cloruro



de potasio 0.15 M por cada gramo de hígado, cortándolo en trozos pequeños para facilitar la obtención del homogenado

La homogenización del tejido se llevó a cabo en un aparato Potter-Elvehjem con pistilo de teflón. El homogenado se centrifugó a 9.000 g por 10 minutos y el sobrenadante (la fracción S9) se decantó, se hacen alícuotas en viales que inmediatamente se congelaron sobre hielo seco, los cuales se almacenaron en un ultracongelador a -70°C hasta el momento de su uso. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (1953)

### **3) MICROSOMAS**

Los microsomas se obtuvieron de la fracción S9 según el método de Yang y col (1977). La fracción S9 se colocó en tubos de polipropileno para ultracentrífuga, los cuales se calibraron con una solución de sacarosa 0.25 M; se hizo una centrifugación a 105,000 g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en una solución de sacarosa 0.25 M en un homogenizador manual. Se hizo una segunda centrifugación a 105,000 g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se decantó y la pastilla se volvió a resuspender en sacarosa 0.25 M. Se hicieron alícuotas y se almacenó a -70 C hasta el momento de su uso. La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (1953)

### **4) OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS DE PRUEBA**

Las cepas bacterianas se obtuvieron directamente del Dr. Bruce N. Ames, Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California, 94720, BC43, U S A

Las bacterias se recibieron en discos de papel filtro impregnados con cultivos recientes de cada cepa dentro de bolsas de plástico con agar blando para evitar su desecación. En condiciones de esterilidad, se colocaron los discos en 5 ml de caldo nutritivo y se incubaron durante 16 horas a 37°C con agitación. Posteriormente, los cultivos se sometieron a pruebas para verificar la presencia de marcadores genéticos, verificar la reversión espontánea y comprobar la sensibilidad a mutágenos conocidos.

De los cultivos de 16 horas, se prepararon los cultivos de reserva agregando 0.8 ml de la suspensión bacteriana en 0.9 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), los cuales se congelaron inmediatamente sobre hielo seco para posteriormente almacenarlos a -70°C. Cada vez que se utilizaron éstos cultivos de reserva, se comprobó la presencia de marcadores genéticos.

Para evitar congelar y descongelar constantemente los cultivos de reserva se prepararon cajas de Petri con cultivos que se pudieron guardar a 4°C hasta 2 meses (cajas de reserva). En condiciones de esterilidad, se tomó una muestra del cultivo de reserva y se sembró en 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37°C con agitación durante 16 h. Este cultivo se sembró por medio de estrías en cajas de Petri con medio mínimo Vogel-Bonner complementado con exceso de histidina y adicionado con 0.1 ml de una solución estéril de ampicilina (8 mg/ml) en el caso de la cepa TA100. Nuevamente se verificaron los marcadores genéticos: reversión espontánea y sensibilidad a mutágenos.

Los cultivos para las pruebas de mutagénesis se obtuvieron de las cajas de reserva en condiciones de esterilidad: se sembraron en 5 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 37°C con agitación durante 16 horas.

## 5) MÉTODOS PARA VERIFICAR LA PRESENCIA DE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINAR LA FRECUENCIA DE REVERSIÓN ESPONTANEA.

### A) REQUERIMIENTO DE HISTIDINA

Se sembró por medio de estrías el cultivo de 16 h en cajas con medio mínimo Vogel-Bonner y con medio mínimo Vogel- Bonner complementado con exceso de histidina. Solamente debe haber crecimiento en las cajas complementadas con histidina

### B) SENSIBILIDAD A CRISTAL VIOLETA

Para verificar el marcador *rfa* , se determinó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Se hicieron dos estrías paralelas con cristal violeta y se dejó secar. Posteriormente, se hicieron otras dos estrías de forma perpendicular a las primeras, pero ésta vez con el cultivo Se incubaron 24 horas a 37°C Se observó inhibición del crecimiento sobre las estrías de cristal violeta.

### C) PRESENCIA DEL PLASMIDO

La presencia del plásmido se verificó comprobando la resistencia de las cepas a la ampicilina Para ello. se hicieron dos estrías paralelas aplicando una solución de ampicilina sobre medio mínimo con exceso de histidina y se dejaron secar Posteriormente, se hicieron otras dos estrías de forma perpendicular a las primeras, aplicando el cultivo. Se incubaron 24 horas a 37°C Las cepas que contienen el plásmido no mostraron inhibición en el crecimiento

#### D. FRECUENCIA DE REVERSIÓN ESPONTANEA

Se colocó 0.1 ml del cultivo de 16 h en un tubo con tapón de rosca conteniendo 2.5 ml de agar de superficie a 45°C. se agitó por 2 seg en un vortex para mezclar bien el contenido se vació en cajas de Petri con medio mínimo y se distribuyó homogéneamente en la superficie. Se dejó solidificar e incubar a 37°C durante 48 horas. Se contaron las revertantes espontáneas. Para la cepa TA100 los valores se encuentran entre 100 y 200, (fig 13 A y B).

#### 6) REACCIÓN DE DEMETILACION (ACTIVIDAD ENZIMATICA)

La reacción de demetilación se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 50 mM Tris-Base (pH 7.4), 10 mM  $MgCl_2$ , 150 mM KCl, 1.2 mg de proteína microsomal por ml de mezcla, 10 mM ácido isocítrico, 0.4 mM NADP, 0.3 unidades de isocitrato deshidrogenasa y 0.2 mM NDMA. La reacción fue iniciada con el sistema generador de NADPH, el cual se preincubó durante 2 minutos con agitación a 37°C, seguido por una incubación durante 30 minutos con agitación a 37°C. Blancos y estándares de formaldehído se incubaron simultáneamente con omisión del sistema generador de NADPH.

La reacción se detuvo con la adición de 0.1 ml de  $ZnSO_4$  al 25% y 0.1 ml de  $Ba(OH)_2$  saturado. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm. durante 10 minutos y 0.7 ml del sobrenadante se mezcló con 0.3 ml de reactivo de Nash concentrado para la determinación de formaldehído (HCOH) (Nash, 1953). Después de una incubación a 50°C durante 30 minutos, se determinó la absorbancia a 412 nm. la actividad enzimática se expresó en nmoles de HCOH formado/ mg de proteína microsomal/ minuto.

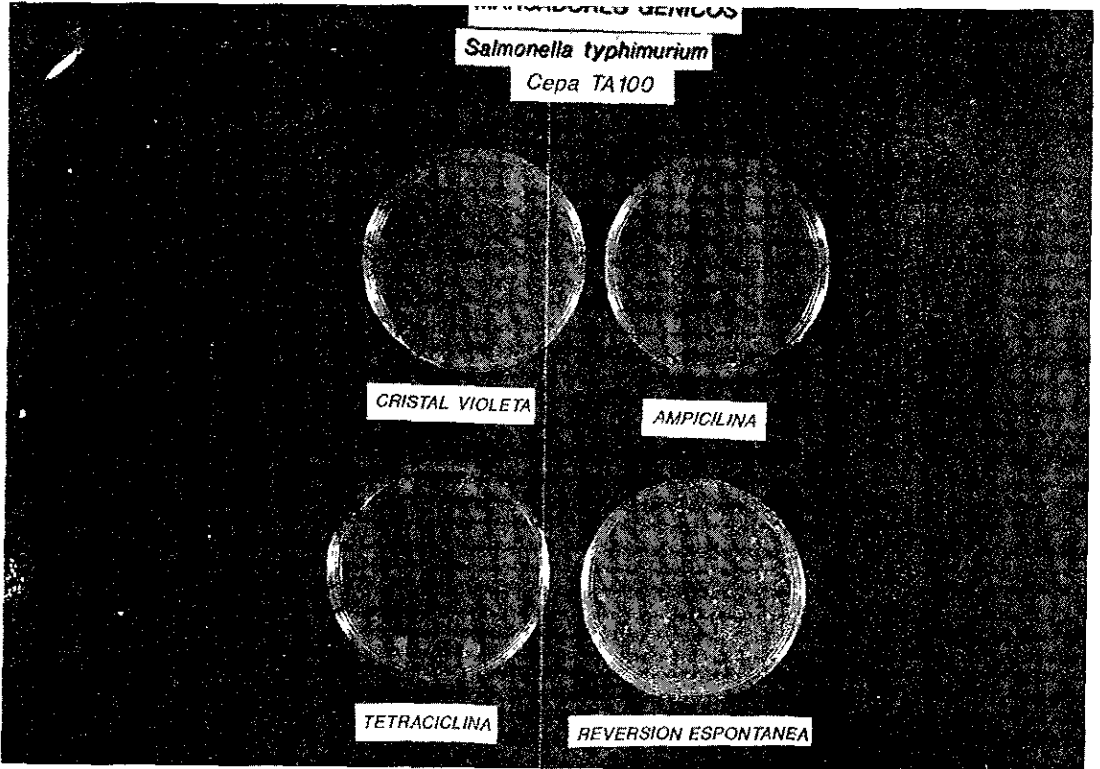


Fig 13 a Marcadores genéticos de la cepa TA-100. A) Sensibilidad a Cristal Violeta, B) Resistencia a ampicilina, C) Sensibilidad a Tetraciclina, D) Reversión espontánea (de entre 100 y 200 colonias por caja)

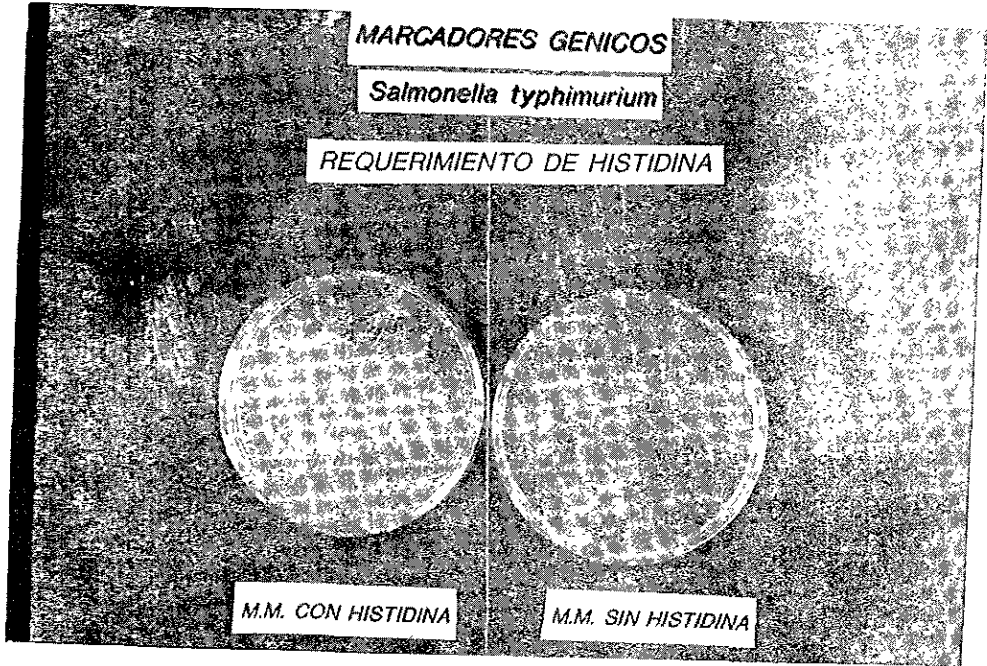


Fig 13 b. Marcadores genéticos de la cepa TA-100 No se observó crecimiento en la caja sin histidina

## 7) PRUEBAS DE MUTAGENESIS

La prueba se llevó a cabo en una mezcla que contiene 0.4 ml de un cultivo de 16 hrs amortiguador de fosfatos pH 6.4, 2 ml de mezcla S9. DMNA 30 mM y diferentes concentraciones de inhibidor (10, 20, 50 y 100 M).

NOTA Se utilizaron 3 inhibidores diferentes. 4 metilpirazol (4MP), dietilditiocarbamato de sodio (DDCM) y ciclohexanol (CH)

La mezcla se incubó durante una hora a 37°C con agitación (en el caso del 4MP y DDCM) y 40 minutos a 37°C con agitación (en el caso de CH) Los testigos positivos y negativos se incubaron simultáneamente

Posteriormente se tomaron 0.663 ml de la mezcla y se agregaron a 2.5 ml de agar de superficie para realizar la incorporación en placa en cajas de agar de medio mínimo. Las cajas se incubaron durante 48 hrs y se contaron las colonias revertantes

## VII. RESULTADOS

La administración de ciclohexanol en solución al 2.5% en agua de bebida a las ratas durante 5 días incrementa la actividad de la CYP2E1 4.5 veces con respecto al control (Tabla 4)

NDMA (mM)	MICROSOMAS CONTROL	MICROSOMAS INDUCIDOS
0.2	0.399 ± 0.001	1.644 ± 0.012
2.0	0.800 ± 0.021	3.900 ± 0.220

TABLA 4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS INDUCIDOS CON CICLOHEXANOL Y SU TESTIGO. Mezcla de reacción con 1.2 mg/ml de proteína microsomal de microsomas control y microsomas inducidos con ciclohexanol al 2.5% en el agua de bebida

## 7) PRUEBAS DE MUTAGENESIS

La prueba se llevó a cabo en una mezcla que contiene 0.4 ml de un cultivo de 16 hrs amortiguador de fosfatos pH 6.4, 2 ml de mezcla S9, DMNA 30 mM y diferentes concentraciones de inhibidor (10, 20, 50 y 100 M).

NOTA Se utilizaron 3 inhibidores diferentes: 4 metilpirazol (4MP), dietilditiocarbamato de sodio (DDCM) y ciclohexanol (CH)

La mezcla se incubó durante una hora a 37°C con agitación (en el caso del 4MP y DDCM) y 40 minutos a 37°C con agitación (en el caso de CH). Los testigos positivos y negativos se incubaron simultáneamente.

Posteriormente se tomaron 0.663 ml de la mezcla y se agregaron a 2.5 ml de agar de superficie para realizar la incorporación en placa en cajas de agar de medio mínimo. Las cajas se incubaron durante 48 hrs. y se contaron las colonias revertantes.

## VII. RESULTADOS

La administración de ciclohexanol en solución al 2.5% en agua de bebida a las ratas durante 5 días incrementa la actividad de la CYP2E1 4.5 veces con respecto al control (Tabla 4)

NDMA (mM)	MICROSOMAS CONTROL	MICROSOMAS INDUCIDOS
0.2	0.399 ± 0.001	1.644 ± 0.012
2.0	0.800 ± 0.021	3.900 ± 0.220

TABLA 4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MICROSOMAS INDUCIDOS CON CICLOHEXANOL Y SU TESTIGO. Mezcla de reacción con 1.2 mg/ml de proteína microsomal de microsomas control y microsomas inducidos con ciclohexanol al 2.5% en el agua de bebida.



Cuando se agregó ciclohexanol a la mezcla de incubación, éste resultó ser un inhibidor del metabolismo de NDMA (fig. 14)

La inhibición se incrementa conforme se incrementa la concentración de ciclohexanol. A una concentración de sustrato de 0.2 mM (DMNA), 0.15 mM de ciclohexanol causa aproximadamente 60% de inhibición en ambos microsomas.

El pretratamiento con ciclohexanol también incrementó la actividad mutagénica de la NDMA ya que la fracción S-9 de ratas tratadas activó eficientemente la nitrosamina a productos mutagénicos para la *Salmonella typhimurium* cepa TA100 (Tabla 15)

Se encontró una marcada inhibición de la mutagénesis con 4MP y ciclohexanol en los experimentos realizados con S-9 inducido, el DDCM presentó un patrón de inhibición de la mutagénesis diferente (fig. 15)

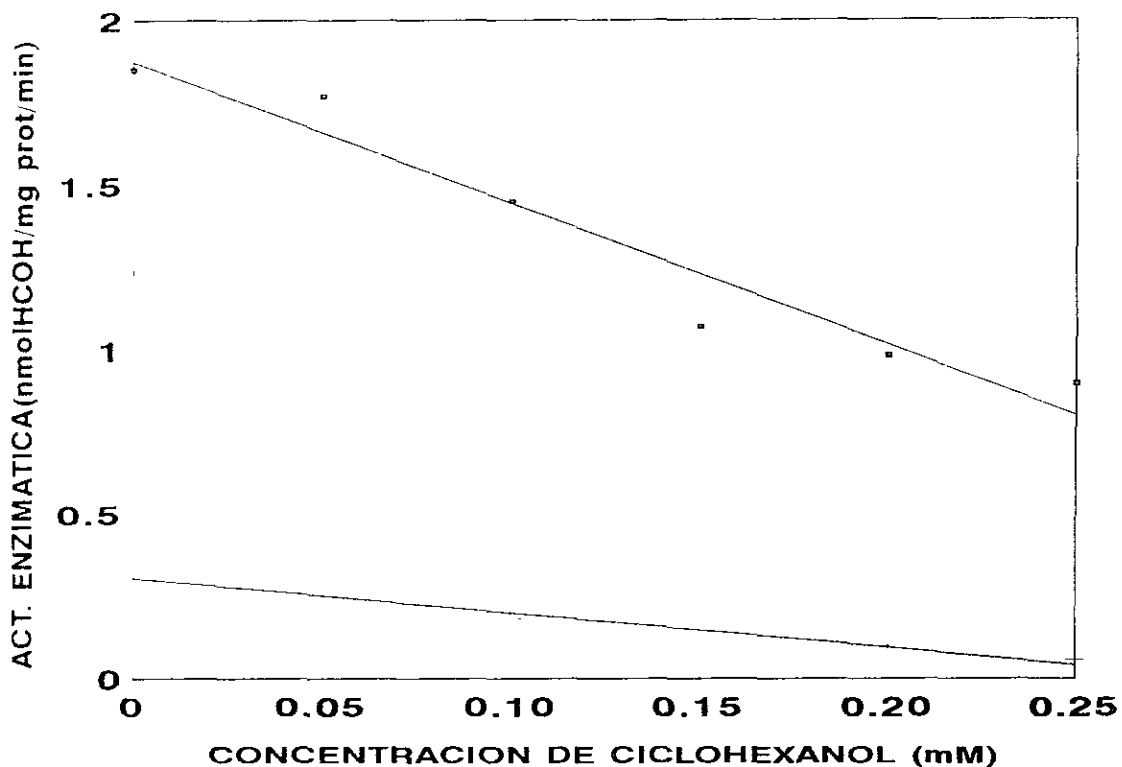
Se observó que las concentraciones más bajas de ciclohexanol (0.09 y 0.9 µM) presentan un efecto de potenciación de la mutagénesis dando un número mayor de colonias revertantes que el testigo positivo. Este efecto también se observó con el DDCM, (Tabla 6 y fig 17).

TABLA 5 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE CYP2E1 POR CICLOHEXANOL EN MICROSOMAS CONTROL E INDUCIDOS CON CICLOHEXANOL

conc ciclohexanol (mM)	microsomas control	microsomas inducidos
0	0.315 ± 0.012	1.85 ± 0.130
0.05	0.263 ± 0.018	1.77 ± 0.070
0.10	0.181 ± 0.014	1.45 ± 0.060
0.15	0.124 ± 0.036	1.07 ± 0.020
0.20	0.100 ± 0.059	0.98 ± 0.005
0.25	0.057 ± 0.019	0.89 ± 0.006

Mezcla de reacción con 1.2 mg/ml de proteína microsomal de microsomas control y microsomas inducidos con ciclohexanol

# INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE CYP2E1 POR CICLOHEXANOL



— MICROSOMAS INDUCIDOS — MICROSOMAS CONTROL

fig. 14 Se observa la inhibición de la actividad enzimática de ambos microsomas cuando se agrega ciclohexanol a la mezcla de reacción. La concentración de DMNA es de 0.2mM/ml de mezcla.

**INHIBICION DE LA MUTAGENESIS EN MICROSOMAS CONTROL E INDUCIDOS CON CICLOHEXANOL**

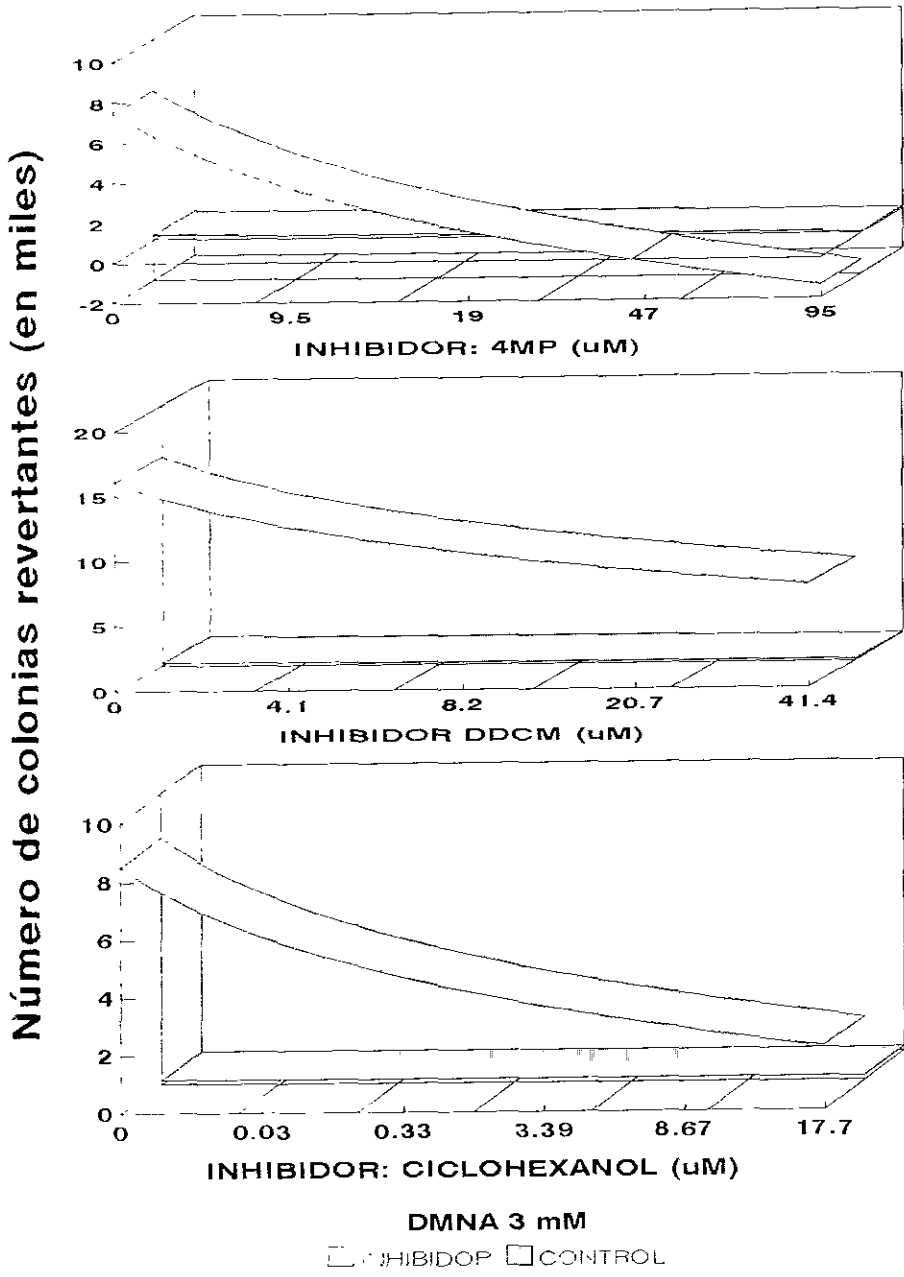


fig.15 Se observa que el ciclohexanol inhibe también el metabolismo de la DMNA al disminuir las revertantes de S. typhimurium cepa TA100.

TABLA 6 INHIBICIÓN DE LA MUTAGENESIS DE DMNA EN LA CEPA TA100

4-METILPIRAZOL * ( $\mu\text{M}$ )	S-9 CONTROL (No. de colonias revertantes)	S-9 INDUCIDO (No. de colonias revertantes)
0 0	248.0 $\pm$ 24.04	9169.0 $\pm$ 579.82
9.5	105.0 $\pm$ 2.82	1184.5 $\pm$ 54.44
19.0	127.5 $\pm$ 6.36	369.0 $\pm$ 2.82
47.0	102.0 $\pm$ 7.07	245.0 $\pm$ 1.41
95.0	100.5 $\pm$ 3.53	204.0 $\pm$ 18.38
DIETILDITIOCARBAMATO DE SODIO * ( $\mu\text{M}$ )	S-9 CONTROL (No. de colonias revertantes)	S-9 INDUCIDO (No. de colonias revertantes)
0 0	231.0 $\pm$ 8.48	12454.5 $\pm$ 386.78
10.9	160.0 $\pm$ 4.24	16437.5 $\pm$ 611.64
21.9	146.0 $\pm$ 2.82	15567.0 $\pm$ 181.01
54.9	121.5 $\pm$ 0.70	7853.5 $\pm$ 72.83
109.9	114.5 $\pm$ 3.53	3889.0 $\pm$ 140.00
CICLOHEXANOL ** ( $\mu\text{M}$ )	S-9 CONTROL (No. de colonias revertantes)	S-9 INDUCIDO (No. de colonias revertantes)
0.00	134.0 $\pm$ 0.00	6500.6 $\pm$ 278.46
0.09	145.0 $\pm$ 2.82	7672.3 $\pm$ 471.15
0.90	128.0 $\pm$ 7.07	6603.6 $\pm$ 95.66
9.00	137.0 $\pm$ 14.14	5395.0 $\pm$ 138.56
23.00	130.5 $\pm$ 19.09	1429.0 $\pm$ 170.60
47.00	128.5 $\pm$ 28.99	223.6 $\pm$ 27.79

MEZCLA DE REACCIÓN CON DMNA 3 MM

\* Inhibidores específicos para la isoenzima CYP2E1 (Feierman y Cederbaum, 1986, Yamamoto y col. 1990 respectivamente)

\*\* Compuesto de prueba que ha mostrado tener efecto inhibitorio sobre la mutagenicidad de nitrosaminas en *S. typhimurum* de la cepa TA100 (Espinosa y col. 1993).

## VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde hace tiempo se han venido estudiando sustancias químicas que inducen las isoenzimas del Citocromo P450, y se ha despertado el interés por isoenzimas específicas como la CYP2E1 ya que está involucrada en el metabolismo de medicamentos, solventes y compuestos mutagénicos y carcinogénicos. Así pues, Tu y col (1981) observaron que se incrementaba de manera importante la actividad de una enzima entonces llamada nitrosodimetilamina demetilasa (NDMA<sub>d</sub>) cuando se trataban ratas con pirazol. Sus conclusiones fueron que se inducía una nueva proteína que tenía un peso molecular de 52 000 dal y que se pensaba que era una isoenzima del Citocromo P450. En el mismo año Glatt y col estudiaron el efecto que tenía el pretratamiento con etanol ó acetona sobre la activación metabólica de la NDMA en la fracción microsomal hepática de ratones y por vía-hospedero.

Desde entonces se han probado diferentes compuestos químicos, entre los cuales, algunos alcoholes han mostrado ser inductores eficientes de CYP2E1. Nuestro interés en el ciclohexanol es debido a que es un solvente de uso común, además de que resulta del metabolismo de otras moléculas de uso industrial como la ciclohexanona. Aunado a esto se han encontrado derivados de éste alcohol presentes en sangre y orina de humanos debido probablemente a exposición ocupacional ó por el uso de soluciones parenterales los cuales presentan residuos de ciclohexanona, que se encuentra como contaminante de dichas soluciones y que proviene de la fabricación de contenedores y tapones de plástico.

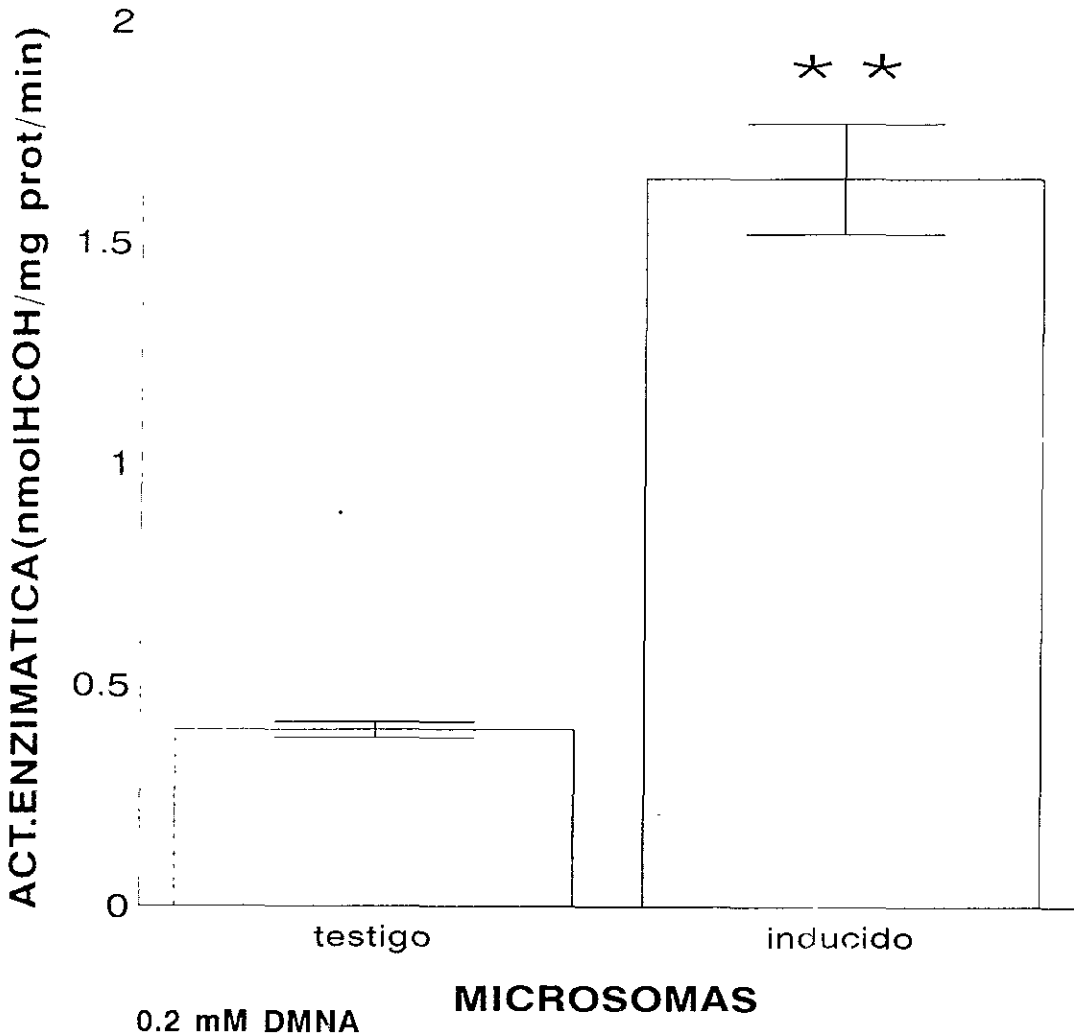
En el presente trabajo se observó que el ciclohexanol, un alcohol alicíclico de composición química muy diferente a la del etanol mostró un incremento en la actividad de la CYP2E1 en los microsomas de ratas tratadas con dicho alcohol, mientras que este *incremento* no estuvo presente en los microsomas de ratas control. Se probaron dos concentraciones diferentes de DMNA y en ambas se observa éste efecto, lo cual fue la primera indicación de que el ciclohexanol induce la isoenzima CYP2E1 (**fig. 16**)

Otra evidencia de la inducción de CYP2E1 por ciclohexanol se obtuvo de los ensayos de mutagénesis, en los cuales se observa que el pretratamiento con éste alcohol produce un incremento del metabolismo de la NDMA, elevando el número de colonias revertantes desde 180 hasta aproximadamente 9,000

En el ensayo de Ames, el criterio para evaluar una sustancia mutagénica es que el número de colonias revertantes debe elevarse cuando menos al doble. En éste caso no estamos evaluando la mutagenicidad de la DMNA, sino la activación metabólica de ésta por la isoenzima CYP2E1. En los microsomas control encontramos la CYP2E1 en cantidades normales, por lo que al ponerlos en contacto con el sustrato (DMNA) no se observa un aumento en el número de colonias revertantes. En contraste, al poner en contacto el S-9 inducido con el sustrato se observa un aumento dramático en el número de colonias revertantes lo cual se explica por el incremento de la isoenzima responsable del metabolismo de la DMNA (**Tabla 6**)

Realizamos además experimentos de inhibición cuya base se encuentra en los trabajos realizados por Wadell y Marlowe (1983) quienes, durante investigaciones sistematicas encaminadas a probar bloqueadores potenciales para compuestos

# ACTIVIDAD ENZIMATICA DE MICROSOMAS INDUCIDOS CON CICLOHEXANOL



**Fig. 16** Se observa el incremento de la actividad enzimática de los animales tratados con ciclohexanol a una concentración de 0.2 mM de sustrato

carcinogénicos descubrieron que algunos alcoholes comunes inhibían la acumulación de radioactividad de  $^{14}\text{C}$ -nitrosonornicotina en algunos sitios en donde aparecen tumores frecuentemente como el hígado, epitelio nasal esofageal y ducto salivario. Algunos alcoholes probados fueron etanol, n-butanol y t-butanol.

Wadell continuó con éstos estudios probando alcoholes a diferentes temperaturas para observar el efecto de éstos en la distribución de  $^{14}\text{C}$ -NNK por medio de autoradiografías de cuerpo entero. Los alcoholes probados fueron ciclohexanol, 1- y 2-octanol, 1-hexanol, 3-metilciclohexanol y 1-heptanol.

De éstos trabajos iniciales se derivaron otros en que se investigó la inhibición del metabolismo de otros compuestos carcinógenos como el uretano por etanol (Wadell, 1986, Yamamoto y col. 1987; Wadell y col., 1988).

Desde entonces se han realizado muchas investigaciones con una amplia gama de inhibidores, sin embargo, la capacidad inhibitoria del ciclohexanol no ha sido muy estudiada.

Para comprobar la inducción de CYP2E1 por CH, se realizó una prueba de inhibición basada en el trabajo de Peng y Yang (1982), quienes realizaron un estudio con ratas tratadas con etanol, de las cuales se obtuvieron microsomas hepáticos, posteriormente, en una mezcla de reacción que contenía dichos microsomas y etanol, se observó un efecto de inhibición sobre la actividad de la CYP2E1.

En nuestro trabajo, cuando agregamos ciclohexanol a la mezcla de reacción, observamos el mismo efecto que produce el etanol, es decir, un decremento en la actividad de la CYP2E1 tanto en los microsomas inducidos como en los microsomas



control (fig. 14) Esto se podría explicar con trabajos como los de Feiremann y Cederbaum (1985) en los cuales se ha mostrado que algunos inductores actúan inhibiendo la misma isoenzima que inducen. La relación entre los mecanismos de inducción e inhibición de un mismo compuesto sobre una isoenzima específica aún no ha sido esclarecida, sin embargo los resultados obtenidos en nuestro experimento se pueden tomar como una evidencia que demuestra que el ciclohexanol induce la isoenzima CYP2E1

Por otro lado se realizaron ensayos de inhibición de la mutagénesis con inhibidores específicos para CYP2E1 como el 4MP y el DDCM, además del ciclohexanol. Estos experimentos revelaron que los cuatro compuestos inhiben la mutagénesis de la DMNA. Se observó que el compuesto que presentó la inhibición más elevada a las concentraciones probadas fue el 4MP, con 97.78% de inhibición. Se observó particularmente con el 4MP que la inhibición se lleva a cabo de manera gradual, es decir, conforme va aumentando la concentración de inhibidor, el número de colonias revertantes disminuye hasta valores cercanos a los de la reversión espontánea. Los microsomas control también muestran una inhibición de la mutagénesis, aunque de manera diferente, ya que el decremento no es de manera gradual, pero se observa que con la mayor concentración de inhibidor se obtiene una disminución del 59.4%. Esto podría ser explicado por la presencia constitutiva de la isoenzima CYP2E1, la cual se ve inhibida por el 4MP de acuerdo a la cantidad presente en la fracción hepática S-9

Con el DDCM se presenta un efecto inhibitorio del 68.77%. Cabe mencionar que en contraste con los experimentos realizados con 4MP, el DDCM no presenta una inhibición gradual en cuanto al S-9 inducido, pues se observa que con las concentraciones más bajas

# INHIBICION DE LA MUTAGENESIS DE DMNA CON DIFERENTES INHIBIDORES

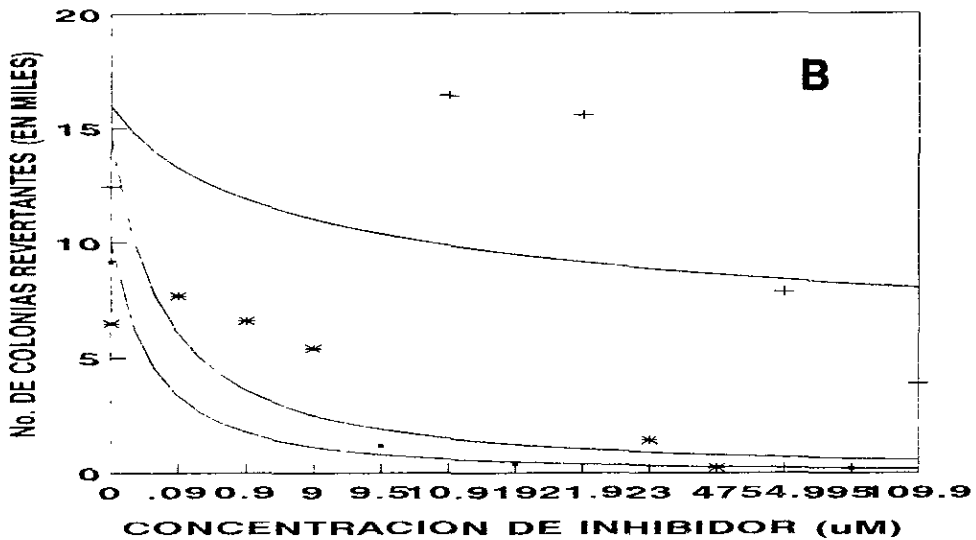
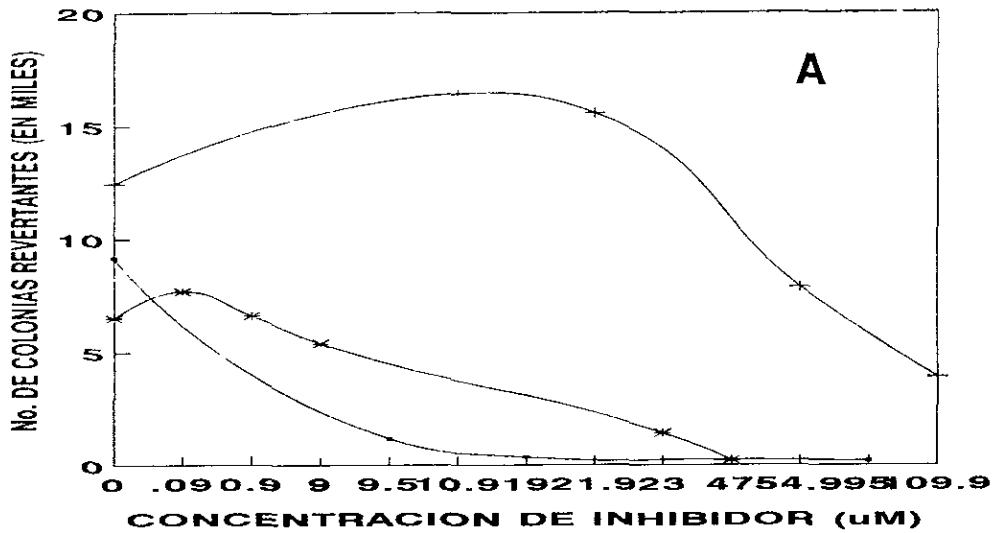


fig. 17 Inhibición de la mutagénesis de *S.typhimurium* cepa TA100 con diferentes inhibidores: 4Metilpirazol (4MP), ciclohexanol (CH) y dietilditiocarbamato de sodio (DDCM). A) Gráfica real, B) Gráfica ideal.

del inhibidor (10.9 y 21.9  $\mu\text{M}$ ) no existe un decremento en el número de colonias revertantes sino por el contrario se incrementan un 17% aproximadamente (**Tabla 6**). No se han encontrado reportes con respecto a esto pero una explicación sería que existe un posible efecto sincrético entre el DDCM y la isoenzima CYP2E1 o bien, que a concentraciones muy bajas, existe una competencia por el sustrato, el cual es metabolizado tanto por la CYP2E1 como por el DDCM. A la concentración siguiente (54.9  $\mu\text{M}$ ) se observa un decremento del 36.9% en el número de colonias revertantes. Con respecto al S9 control, también se observa un decremento del 50.4% en el número de colonias revertantes y el decremento se presenta de forma gradual.

Los experimentos realizados con ciclohexanol como inhibidor muestran que a la más alta concentración (47  $\mu\text{M}$ ) se observa una inhibición del 96.5%, en éste caso, también la primera concentración (0.09  $\mu\text{M}$ ) presenta un incremento de aproximadamente el 10% en el número de colonias revertantes. Con la siguiente concentración (0.9  $\mu\text{M}$ ) no se observa ni incremento ni decremento en el número de colonias revertantes. Con el S9 control no se presenta el efecto de inhibición, es decir que como no existe un incremento en la mutagenesis de DMNA no existe el efecto de inhibición. (**Tabla 6**)

*Podemos concluir basándonos en nuestros resultados, que el ciclohexanol es un inductor del CYP2E1 in vivo y que también actúa como inhibidor in vitro. La importancia de este trabajo es a nivel de metabolismo de fármacos y compuestos a los que estamos expuestos aún sin darnos cuenta como es el caso del ciclohexanol, que está presente en todos los envases de plástico tapas y tapones de hule.*

Sin embargo aún queda la pregunta ¿Qué tan importante es la inducción ó inhibición de una enzima? La respuesta a ésta pregunta es muy difícil de contestar, sobre todo cuando se ha observado que algunos medicamentos que causan hepatotoxicidad son metabolizados por la isoenzima CYP2E1, como es el caso del acetaminofén

## IX.- REFERENCIAS

- 1 Ames B N (1971) The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in **Chemical mutagens principles and methods for their detection** A. Hollander (editor), Plenum Press, New York, vol.1: 267-282
- 2 Ames B N F D Lee and W.E. Durston (1973) An improved bacterial test system for the detection and clasification of mutagens and carcinogens. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70:** 782- 786
- 3 Ames B N WE Durston E Yamasaki and F D. Lee (1973) Carcinogens are mutagens a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70:** 2280-2285
- 4 Badger T M . J Huang, M Roins and C K. Lumpkin (1993) Induction of cytochrome P4502E1 during chronic ethanol exposure occurs via transcription of the CYP2E1 gene when blood alcohol concentrations are high **Biochem. Biophys. Res. Commun 190(3):** 780-785
- 5 Barnes J M and P N Magee (1954) Some toxic properties of dimethylnitrosamine **Br. J. Int. Med. 11:** 167-170.
- 6 Bogovski P and S Bogovski (1981) animal species in which N-nitrosocompounds induce cancer **Int. J. Cancer 27:** 471-475
- 7 Brady J F . M H Wang, J Y. Hong (1991) Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. **Toxicol. Appl. Pharmacol 108:** 342-354
- 8 Bratsch H and R. Montesano (1984) Relevance of nitrosamines to human cancer. **Carcinogenesis 5:** 1381-1393.
- 9 Brondeau M T M Ban. P. Bonnet, J P Guenier y J de Ceaurriz (1989) Acetone compared to other ketones in modifying the hepatotoxicity of inhaled 1,2-dichlorobenzene in rats and mice **Toxicol. Lett. 49:** 69-78

- 10 Chow Y.L. (1973) Nitrosamin Patochemistry **Acc. Chem Res** **6**: 354- 360
- 11 Cohen G.M. and G.J. Mannering (1972) Involvement of a hydrophobic site in the inhibition of the microsomal para- hydroxylation of aniline by alcohols **Mol. Pharmacol.** **8**: 383-397
- 12 Coon M.J., D.A. Haugen, F.P. Guengerich, J.L. Vermilion and W.L. Dean (1976) in **The structural basis of membrane function. (Hatefi, Y. and L. Djavadi-Ohanian Eds.)**, Academic Press, New York. 409-427
- 13 Coon, M.J., J.L. Vermilion, K.P. Vatsis, J.S. French, W.L. Dean and D.A. Haugen (1977) Biochemical studies on drug metabolism: isolation of multiple forms of liver microsomal cytochrome P-450, in **Drug Metabolism Concepts, Jerina, D.M., Ed. American Chemical Society, Washington D.C.** 76-85
- 14 Cooper, D.Y., S. Levin, S. Narasimhulu, O. Rosenthal and R.W. Estabrook (1965) Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. **Science** **147**: 400-407
- 15 Czygan P., H. Greim, A.J. Garro, F. Hutterer, F. Schaffner, H. Popper, O. Rosenthal and D.Y. Cooper (1973) Microsomal metabolism of dimethylnitrosamine and the cytochrome P450 dependency of its activation to a mutagen. **Cancer Res** **33**: 2983-2986.
- 16 Daniel, E. (1991) Capillary gas chromatographic determination of cyclohexanone and 2-ethyl-1-hexanol leached from solution administration sets. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **74(3)**: 476-478
- 17 Daniel, E. (1992) Toxicity potential of compounds found in parenteral solutions with rubber stoppers **J. Parenter Sci. Technol.** **46 (2)**: 43-47
- 18 Dicker, E., T. McHugh and A. I. Cederbaum (1991) Increased catalytic activity of cytochrome P450IIE1 in pericentral hepatocytes compared to periportal hepatocytes isolated from pyrazole-treated rats. **Biochim. Biophys. Acta** **1073**: 316-323
- 19 Druckrey, H. and Preussman (1962) Zur Entstehung carcinogene nitrosamine an Beispiel des tabakrausen **Naturwissenschaften** **10**: 498-501

- 20 Dutton A and D F Heath (1956) Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice **Nature** **178**: 544-649
- 21 Edner F, G Havre A, Helgebostad, N, Koppang, R, Madsen and L Chen (1964) Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring **Naturwissenschaften**. **51**: 637-638
- 22 Eisen H.J. (1986) Induction of hepatic P-450 isozymes, in: **Cytochrome P-450. Structure, Mechanism and Biochemistry**, P.R. Ortiz de Montellano (editor), Plenum Press, New York 315-344
- 23 Espinosa-Aguirre, J.J., C. Vilchis, P. Osatrosky-Wegman, L. Benitez, I. Lares and J Rubio (1993) Antimutagenicity of cyclohexanol towards 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridil)-1- butanone and N-nitrosodiethylamine in *Salmonella typhimurium* strain TA100, **Mutation Res.** **300**: 151-154
- 24 Feierman D E. and A I. Cederbaum (1986) Inhibition of microsomal oxidation of ethanol by pyrazole and 4-methylpyrazole *in vitro* Increased effectiveness after induction by pyrazole and 4-methylpyrazole **Biochem. J.** **239**:671-677
- 25 Fiddler W, J Pensabene, R C. Doer and A E. Wasserman (1972) Formation of N-nitrosodimethylamine from natural occurring quaternary anion compounds and tertiary amines **Nature**. 236-307
- 26 Fine, H D Lieb and R. Rufer (1975) Principle of operation of the thermal energy analyzer (TEA) for the trace analysis of volatile and non-volatile N-nitroso compounds **J. Chromatogr.** **107**: 351-357
- 27 Fine H D (1982) Nitrosamines in the general environment and food. In: Magee, P.M , **Nitrosamines and human cancer**. Bahbury Report 132 Cold. Spring Harbor Laboratory 199- 207
- 28 Fishbein L (1979) Potential industrial carcinogens and mutagens. Elsevier. New York Press 123-129

29 Forket P G, S Chen and A C Jackson (1995) *In situ* hybridization analysis of hepatic cytochrome P450E1 messenger ribonucleic acid in mice. Modulation of expression by acetone **Laboratory investigation 72(1):** 92-99

60000000

30 Freund H A (1937) Clinical manifestation and studies in parenchymatous hepatitis. **Am. Int. Med.** **10:** 1144-1148

31 Fukushima D K, H L Bradlow and L Hellman (1971) Metabolites of cortisol derivatives in urine. **J. Clin. Endocrinol.** **32** 192-200.

32 Garner R C, E C Miller and J A Miller (1972) Liver microsomal metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivative toxic to *Salmonella thyphimurium* TA 1530 **Cancer Res.** **32** 2058-2066

33 Glatt, H L de Balle and F Oesch (1981) Ethanol- or acetone- pretreatment of mice strongly enhances the bacterial mutagenicity of imethylnitrosamine in assays mediated by liver subcellular fraction, but not in host-mediated assays. **Carcinogenesis 2 (10)** 1057-1061

34 Gillette, J R (1966) Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum **Adv. Pharmacol** **4:** 219-225

35 González F J. (1992) Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes **Keio J. Med** **41:** 68-75.

36 González F J, S.Y Liu and M Yano (1993) The AH-receptor: genetics, structure and function **Pharmacogenetics 3:** 51-57

37 Guengerich F P (1979) Isolation and purification of cytochrome P-450 and the existence of multiple forms. **Pharmacol. Ther.** **A 6:** 99-106

38 Guengerich F P, G A Dannan, S.T. Wright, M V Martin and L S Kaminsky (1982) Purification and characterization of liver microsomal cytochrome P450: electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rat treated with phenobarbital or *m*-naphthofalvone **Biochemistry**, **21:** 6019-6030



- 39 Guengerich F P (1983) Oxidation-reduction properties of rat liver cytochromes P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase related to catalysis in reconstituted systems **Biochemistry** **22**: 2811-2820
- 40 Hansson L K, W A Eaton, S G Sligar, Y Gunzalus, M Gouterman and C R Connell (1976) *Origin of the anomalous solet spectra of carboxycytochrome P450* **J. Am. Chem Soc.** **98**: 2672-2674
- 41 Hansson T, N Tindberg, M Ingelman-Sundberg and C Kler. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1 in the rat central nervous system **Neuroscience**. **34**: 451-463
- 42 Henry D G, Sharpe, S. Chaplain, S. Cartwright, G Kitchingam, G.D Bell and M J.S Langman (1979) **Br. J. Clin. Pharmacol.** **8** 539-545
- 43 Hoffman D and J D Adams (1981) Carcinogenic Tobacco specific N-nitrosamines in snuff and in the saliva of snuff dippers **Cancer Res.** **41(11)**: 4305-4308
- 44 Hong J, J Pan, F J González, H. V. Gelboin and C S. Yang (1987) *The induction of a specific form of cytochrome P450 (P450j) by fasting.* **Mutation Res.** **142**: 1077-1083
- 45 Hunter J, J D Maxwell, M Carrella, D A. Stewart and R. Williams (1971) **Lancet** **1**. 572-575
- 46 IARC (1972) IARC Monographs of the evaluation of carcinogenic Risk of chemicals to man **International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, vol. 1** 125
- 47 Ingelman-Sundber M. and I Johansson (1980) Catalytic properties of purified forms of rabbit liver microsomal Cytochrome P450 in reconstituted phospholipid vesicles **Biochemistry** **19** : 4004- 4011
- 48 Ingelman-Sundber M, Y Johansson, K.E Penttilä, H Glaumann and K O Lindros (1988) Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P450 (IIE1) in rat liver **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **157**: 55-60

- 49 Johansson. I. K O Lindros, H Eriksson and M Ingelman-Sundberg (1990) Transcriptional control of CYP2E1 in the perivenous liver region and during starvation. **Biochem. Biophys. Res Commun.** **173**: 331-338
- 50 Johnson E F (1979) Multiple forms of cytochrome P-450: criteria and significance **Rev. Biochem. Toxicol** **1**: 1-15
- 51 Kim, S.G. S.E Shehin, J.C States and R.F. Novak (1990) Evidence for increased translational efficiency in the induction of P450IIE1 by solvents: analysis of P450IIE1 mRNA Polyribosomal distribution. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.** **172(2)**: 767-774.
- 52 Kubota S. J M Lasker and C S. Lieber (1988) Molecular regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1 in hamster. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **150**: 304-310
- 53 Kumaki, K., M. Sato. H Kon and D.W Neberet (1978) Correlation of type Y, type II. and reverse type Y difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P450 iron from five mammalian species **J. Biol Chem.** **253**: 1048-1058
- 54 Lai D Y and J D Arcos (1980) Dialkylnitrosamine bioactivation and carcinogenesis **Life Sci** , **27**: 2149-2165
- 55 Lijinski W and M. M Greenblatt (1972) Carcinogen dimethylnitrosamine produced in vivo from nitrito and aminopirine. **Nature New. Biol.** **236**: 177-178
- 56 Lijinski W (1974) Reaction of drugs with nitroso acid as a source of carcinogenic nitrosamines **Cancer Res** **34**: 225-2258.
- 57 Lijinski W (1980) Significance of in vivo formation of N-nitroso compounds. **Oncology** **37**: 223-226
- 58 Liu S Y. and F J González (1995) Role of the liver enriched transcription factor HNF1 $\alpha$  in expression of the CYP2E1 gene **DNA Cell Biol.** **14**: 285-293

- 59 Liubchenko. P. N , R V Gorenkov. G. V Plaksina. O. L Kholod and B:S: Salganikova (1994) Work environment and health status in workers of decorative polyvinylchloride film production **Gig. Sanit. (4) : 29-31.**
- 60 Lotlikar P D , W. J Baldy Jr. and E N Dwyer (1975) Dimethylnitrosamine demethylation by reconstituted liver microsomal cytochrome P450 enzyme system **Biochem J. 152: 705-708.**
- 61 Lowry O H., N J. Rosebrough. A L. Farr and R L. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent **J. Biol. Chem. 193: 265-275.**
- 62 Lu. A Y and S B. West (1980) Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450 **Pharmacol. Rev. 31: 277-285.**
- 63 Magee P. N and J. M Barnes (1956) The malignant primary hepatic tumours in rat by feeding dimethylnitrosamine **Br. J. Cancer 10: 114-163.**
- 64 Magee P N. and J M Barnes (1967) Carcinogenic nitroso compounds, **Adv. Cancer Res. 10: 163-246.**
65. Magee P N , R. Montesano and R. Preussmann (1976) N-nitroso compounds and related carcinogens, in: C.E. Searle (Ed.), **Chemical Carcinogens (ACS Monograph 173), Washington D.C., American Chemical Society, 491-625 .**
- 66 Mannering, F. J (1981) Hepatic cytochrome P450 linked drug-metabolizing systems in: **concepts in Drug metabolism, Part B. (P. Jenner and B. Testa, eds.), Dekker, New York 277-302.**
- 67 Maron. D M and B. N Ames (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test **Mutation Res. 113: 173-215**
- 68 McCann J., N. E Spingar J. Kobori and B N. Ames (1975) Detection of carcinogens as mutagens bacterial tester strains with R factor plasmids **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 979-983**

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 69 McMurry, T. J and J. T. Groves (1986) Metalloporphyrin models for Cytochrome P-450 in: P.R. Ortiz de Montellano (editor), **Cytochrome P-450. Structure, mechanism and biochemistry, Plenum Press, New York, N.Y.**, 1-28.
70. Mendel, D. B. L. P. Hansen, M. K. Graves, P. B. Conley and G. R. Crabtree (1991) HNF1 $\alpha$  and HNF1 $\beta$  (vHNF1) share dimerization and homeodomains, but not activation domains. and form heterodimers *in vitro*. **Genes & Dev.** **5**: 1042-1056.
- 71 Mills (1990) Urinary excretion of cyclohexanediol, a metabolite of the solvent cyclohexanone, by infants in a special care unit. **Clin. chem.** **36(6)** :870-874.
72. Moszczynski, P. (1993) The effect of cigarette smoking on the indexes of immunity and acute phase reaction in subjects with occupational exposure to organic solvents. **Cent. Eur. J. Public Health.** **1 (1)**: 41-45.
73. Mraz, J., E. Galova., H. Nohova and D Vitkova (1994) Uptake, metabolism and elimination of cyclohexanone in humans. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.** **66**:203-208
74. Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **Biochem. J.** **55**:416-421
75. Nebert, D. W. and M. Negishi (1982) Multiple forms of cytochrome P-450 and the importance of molecular biology and evolution. **Biochem. Pharmacol.** **31**: 2311-2319.
- 76 Netter, K. J. (1980) Inhibition of oxidative drug metabolism in microsomes. **Pharmacol. Ther.** **10**: 515-535
77. Ohonhaus, E. E and B. K. Park (1979) **Eur. J. Clin. Pharmacol.** **15**: 139-145
- 78 O'Neill, I. K., R. C. von Borstel, C. T. Miller, J. Long and H. Bartsch, (1984) N-nitrosocompounds: occurrence, biological effects and relevance to human cancer. **eds, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France** (No 57)
- 79 Ong, C. N (1991) Determination of cyclohexanol in urine and its use in environmental monitoring of cyclohexanone exposure **J. Anal Toxicol.** **15(1)** :13- 16

- 80 Ong C N (1991) Monitoring of exposure to cyclohexanone through the analysis of breath and urine. **Scand. J. Work Environ. Health.** **17 (6):** 430-435.
- 81 Ortiz de Montellano, P R. and N O. Reich (1986) Inhibition of cytochrome P-450 enzymes in: **Cytochrome P-450. Structure, Mechanism and Biochemistry**, P.R Ortiz de Montellano (editor), Plenum Press, New York. 273-314.
- 82 Pamperl H., W Gradner, L. Fridrich, H Pointer and H. Denk (1984) **Liver 4** 294-300.
- 83 Peng, R. Y.Y. Tu and C S. Yang (1982) The induction and competitive inhibition of a high affinity microsomal nitrosodimethylamine demethylase by ethanol **Carcinogenesis.** **3(12):** 457-1461.
- 84 Poland, A., D. Smith, R. Kuntzman, M. Jacobson and A.H. Conney ((1970) **Clin. Pharmacol. Ther.** **11.** 724-732
- 85 Porchaska, H J., A. B Santamaría and P. Talalay (1992) Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:** 2394-2389.
- 86 Porter T., S. Khani and M Coon (1989) Induction and tissue-specific expression of rabbit cytochrome P450IIE1 and IIE2 genes. **Mol. Pharmacol.** **36:** 61-65.
- 87 Preussmann, R (1984) Carcinogenic N-nitroso compounds and their environmental significance **Naturwissenschaften 71:** 25-29.
- 88 Preussmann, R and B W. Stewart (1984) N-nitroso carcinogens, in **Chemical Carcinogens**, 2nd. ed., Searle C.E., de., American Chemical Society, Washington D.C., 643-737
- 89 Proctor, N H. and J P. Hughes (1978) Chemical Hazards of the Workplace, Philadelphia. **J.B. Lippincott Company.** Pp-533
- 90 Raucy J L and J M Lasker (1991) Isolation of P450 enzymes from human liver in **Methods in Enzimology. Cytochrome P450** Waterman Johnson., de., Academic Press USA. **206:** 577-587

- 91 Raucy J L, J C Kraner, J M. Lasker (1993) Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1 **Critical Rev. in Toxicol** **23(1)**: 1-20
- 92 Remmer, H. J. Schenkman, R W Estabrook, H Sasame, J Gillette, S Narasimhulu, D Y Cooper and O. Rosenthal (1966) Ligand interactions with hepatic microsomal cytochrome. **Mol. Pharmacol.** **2**: 187-190
- 93 Ryan, D E., P. E. Thomas, L. M. Reik and W. Levin (1982) Purification, characterization and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P-450 isozymes. **Xenobiotica** **12**: 727-732
- 94 Saenger, P., E. Forster and J. Kream (1981) **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **52**: 381-384.
- 95 Santi, D.V. and G.L. Kenyon (1980) Approaches to the rational design of enzyme inhibitors. in: **Burger's Medicinal Chemistry, 4<sup>th</sup> ed., Part 1, Wiley-Interscience, New York**, 349-391.
- 96 Sato, R and T Nakajima (1979) Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene in vivo and in vitro **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **48**: 249-256.
97. Scheider, V. J., R. Wazok and H. Schuarz (1977) Endogene bilding kanzerograbable von Pharmaka und Nitrit an ratten. **Exp. Path Bd.** **13**: 32-34.
- 98 Schenkman, J B, S. G. Sligar and D. L. Cinti (1981) Substrate interactions with cytochrome P-450 **Pharmacol. Ther.** **12**: 43-71.
- 99 Sligar, S G, D L. Cinti, G G Gibson and J B Schenkman (1979) Spin satate control of the hepatic cytochrome P450 redox potential **Biochem Piophys Res Commun** **90**: 925-932
- 100 Snell (1989) Capillary GC analysis of compounds leached into parenteral solutions packaged in plastic bags **J. Chromatogr. Sci.** **27 (9)** :524-528.
- 101 Snell (1993) Gas chromatographic determination of cyclohexanone leached from hemodialysis tubing **J. AOAC Int.** **76 (5)**:1127-1132

102 Song, B J H V Gelboin, S S Park, C S Yang and F J González (1986) Complementary DNA and protein sequences of ethanol inducible rat and Human P450: transcriptional and post transcriptional regulation of the rat enzyme. **J. Biol. Chem.** **261**: 16689- 16697

103 Song B J R L Veech, S. S. Park, H. V. Gelboin and F J. González (1989) Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. **J. Biol. Chem.** **264**: 3568-3572

104 Testa B (1981) Structural and electronic factor influencing the inhibition of aniline hydroxylation by alcohols and their binding to cytochrome P-450. **Chem. Biol. Interact.** **34**: 287-300

105 Testa, B. and P Jenner (1981) Inhibitors of cytochrome P-450s and their mechanism of action **Drug. Metab. Rev.** **12**: 1-117.

106 Tu Y. Y., J Sonnenberg, K. F Lewis and C. S Yang (1981) Pyrazole-induced Cytochrome P450 in rat liver microsomes, an isozyme with high affinity for demethylnitrossamine. **Biochem. and Biophys. Res. Com.** **103 (3)**: 905-912.

107 Ueno T and F J. González (1990) Transcriptional control of the rat hepatic CYP2E1 gene **Mol. Cell. Biol.** **10**: 4495-4505.

108 Wadell, W J. and C. Marlowe (1983) Inhibition by alcohols of the localization of radioactive nitrosornicotine in sites of tumor formation **Science** **221**: 51-52.

109 Wadell, W. J., C.Marlowe and W. M. Pierce, Jr. (1987) Inhibition of the localization of urethane in mouse tissues by ethanol. **Fd. Chem Toxic** **25 (7)**: 527-531.

110 Wadell, W. J., C. Marlowe, T Yamamsdoto and M.J Clark (1989) Inhibition of the metabolism of urethane in the mouse by dimethyl sulfoxide (DMSO) **Drug Metabolism and disposition** **17(5)**: 469-472

111 Walsh C (1982) Suicide substrates: Mechanism-based enzyme inactivators. **Tetrahedron** **38**: 871-909

- 112 Waszkowska, M., B. Bazylewicz-Waiczak (1992) Psychological evaluation of the effects of chronic occupational exposure of paint shop workers to the mixture of organic solvents. **Med Pr.** **43 (1)**: 35-39
- 113 Wattenberg, L. W., L. K. T. Lam and A.V. Fladmoe (1979) Inhibition of chemical carcinogen-induced neoplasia by coumarins and alpha-angelicalactone. **Cancer Res.** **39**: 1651-1654
- 114 Waxman, D. J. and L. Azaroff (1992) Phenobarbital induction of Cytochrome P450 gene expression **Biochem J.** **281**: 577-592.
115. Wrighton, S. A., P. E. Thomas, D. T. Molowa, M. Hanui, J. E. Shively, S. L. Maines and P. S. Watkins (1986) Characterization of ethanol-inducible human liver N-nitrosodimethylamine demethylase. **Biochemistry** **25**: 6731-6735.
- 116 Yamamoto, T., W. M. Pierce, Jr., H. E. Hurst, D. Chen and W. J. Wadell (1988) Inhibition of the metabolism of urethane by ethanol **Drug Metabolism and Disposition** **16 (3)**: 355-358
- 117 Yamamoto, T., W. M. Pierce, Jr., H. E. Hurst, D. Chen and W. J. Wadell (1990) Ethyl carbamate metabolism *in vivo* inhibitors and *in vitro* enzymatic systems. **Drug metabolism and disposition.** **18 (3)**: 276-280.
- 118 Yamazaki, H. Y. Oda, Y. Funae, S. Imaoka, Y. Inui, F. P. Guengerich and T. Shimada (1992) Participation of rat liver cytochrome P4502E1 in the activation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase-overexpressing *Salmonella typhimurium* strain (NM2009) **Carcinogenesis.** **13( 6)**: 979-985
- 119 Yang, D. S. and A. Y. H. Lu (1987) The diversity of substrates for Cytochrome P450 in Mammalian cytochromes P450 Vol II Guengerich, F.P., De., CRC Press, Boca Raton, FL, 1-17
- 120 Yang, C. S., F. S. Strickhart and L. P. Kitcha (1977) The effect of temperature on monooxygenase reactions in the microsomal membrane. **Biochim. Biophys. Acta** **465**: 362-370



121 Yang C. S. T. Smith, H. Ishizaki and J. Y. Hong (1991) Enzyme mechanism in the metabolism of nitrosamines. in: I.K. O'Neill, J. Chen and H. Bartsh (Eds) *Relevance to Human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*, **IARC Scientific Publications 105**. IARC Lyon France, 265-274.

122 Yasugi T., T.Kawai. K. Mizunuma, R. Kishi, I. Harabuchi, J. Yuasa, T. Eguchi, R. Sugimoto, K. Seiji and M. Ikeda (1994) *Exposure monitoring and health effect studies of workers occupationally exposed to cyclohexane vapor* **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, **65**: 343-350

123 Yoo. J. S. H. and C. S. Yang (1985) Enzyme specificity in the metabolic activation of *N*-nitrosodimethylamine to a mutagen for Chinese hamster V79 cells. **Cancer Res.**, **45**: 1140-145