

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“METAPLASIA GÁSTRICA PROVOCADA POR EL CONSUMO
CRÓNICO DE CLORURO DE SODIO ADMINISTRADO EN LA DIETA
DE LAS RATAS WISTAR”**

TESIS

Que para obtener el Título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

ARACELI VENCES MEJÍA

DIRECTOR: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	4
II.	INTRODUCCIÓN	
	1. Generalidades	5
	2. Metabolismo de xenobióticos	5
	3. Citocromo P450	7
	3.1. Generalidades	7
	3.2. Nomenclatura	8
	3.3. Estructura	9
	3.4. Función	10
	3.5. Mecanismo de acción	12
	3.6. Polimorfismo Genético	14
	3.7. Inducción	15
	3.7.1 <i>Mecanismos de Inducción</i>	16
	3.8. Familias CYP metabolizadoras de Xenobióticos	19
	3.8.1. <i>Familia CYP 1</i>	20
	3.8.2. <i>Familia CYP 2</i>	22
	3.8.3. <i>Familia CYP 3</i>	24
	3.9. CYP extrahepático	26
	3.9.1. <i>Expresión de CYP en estómago</i>	26
	4. Cáncer Gástrico	27
	4.1. Frecuencia y distribución geográfica	28
	4.2. Etiología	28
III.	JUSTIFICACIÓN	33
IV.	HIPÓTESIS	33
V.	OBJETIVO GENERAL	33
	1. objetivos particulares	33
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	
	1. Reactivos utilizados	34
	2. Anticuerpos	34

3.	Procedimiento experimental	34
4.	Análisis histopatológico	35
5.	Inmunohistoquímica	35
6.	Preparación de fracción S9 y microsomal	36
7.	Contenido de proteínas totales	37
8.	Actividad Enzimática	37
9.	Electroforesis y análisis de Inmunodetección (Western blot)	38
10.	Análisis estadístico	39
VII.	RESULTADOS	
1.	Consumo de agua y alimento, y peso corporal	40
2.	Análisis histológico	41
3.	Inmunohistoquímica	41
4.	Western blot	41
5.	Actividad Enzimática	46
VIII.	DISCUSIÓN	48
IX.	REFERENCIAS	52

I. RESUMEN

Las enzimas denominadas citocromo P450 (CYP) en tejidos extrahepáticos frecuentemente tienen un papel importante en la activación *in situ* de compuestos xenobióticos, lo cual confiere cierta susceptibilidad en estos órganos a los efectos tóxicos resultantes de la activación metabólica. Existe evidencia de la inducción de enzimas CYP en diversas neoplasias tales como cáncer de esófago, de mama, de colón y de estómago. Sin embargo en la mayoría de los casos se desconoce si la inducción de las enzimas CYP constituye un evento temprano y decisivo en el proceso de carcinogénesis o bien si dicha inducción es una consecuencia de la transformación maligna del órgano. En especial, la modulación de enzimas CYP en estómago ha tenido poca atención, debido a que éste órgano tiene una función secretora más que absorbente, y además que el epitelio del estómago en condiciones normales está cubierto por una capa mucosa que no permite el contacto con agentes genotóxicos provenientes de la dieta. Sin embargo durante el proceso de carcinogénesis gástrica la mucosa sufre una serie de cambios histológicos secuenciales que modifican la permeabilidad de la misma permitiendo el contacto con agentes xenobióticos. Es por lo anterior, que el objetivo de este trabajo fue el explorar la modulación de las principales subfamilias CYP involucradas en el metabolismo de xenobióticos durante el proceso de carcinogénesis gástrica provocada por el consumo de elevadas concentraciones de NaCl en la dieta de ratas Wistar. Para ello utilizamos ratas macho expuestas a dietas con diferentes concentraciones de NaCl (0.6% grupo control, 6%, 12%, 18% y 24%) durante 12 semanas, y se evaluó tanto la histopatología como la modulación de las enzimas CYP en la mucosa gástrica. Las alteraciones encontradas en la mucosa gástrica de animales tratados con 12%, 18% y 24% de NaCl fueron: gastritis atrófica crónica, hiperplasia regenerativa y focos de metaplasia. Se observó inducción del CYP1A1 y CYP3A2, principalmente en áreas de metaplasia. La expresión de enzimas CYP en la mucosa gástrica alterada por agentes irritantes como lo es el NaCl, puede contribuir a la activación química *in situ* de numerosos xenobióticos involucrados en el desarrollo de carcinogénesis gástrica.

II. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

El cáncer, como otros procesos patológicos y fisiológicos, es el resultado final de la interacción variable de dos tipos de determinantes, el endógeno (constitutivo o genético) y el exógeno (medioambiental). Sólo 1-2% de las neoplasias son consecuencia de la herencia de genes predisponentes, mientras que el restante 98 al 99% es consecuencia de la exposición a factores medioambientales (Ferris, et al 2001). Entre estos últimos se encuentran los carcinógenos químicos, como los identificados en el humo del cigarrillo y contaminantes de alimentos; carcinógenos físicos tales como radiación UV y radón; agentes patógenos como son *Helicobacter pylori*, el virus del papiloma humano y los virus de la hepatitis B y C; e incluso factores resultantes del estilo de vida, como son los componentes de la dieta. (Minamoto, et al 1999).

Los factores dietéticos involucrados en el proceso de carcinogénesis pueden ser divididos en forma general en 2 grandes categorías: (i) Microcomponentes con propiedades genotóxicas, como son las aminas heterocíclicas (AHCs), generadas durante la cocción de proteína animal a fuego directo, las cuales producen daño al ADN dando como resultado mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, recombinaciones, rearrreglos y amplificaciones, así como aberraciones cromosomales. El consumo de AHCs ha sido relacionado con el desarrollado de cáncer de mama, de colon y de próstata. (ii) Los Macrocomponentes o promotores de tumores, son agentes dietéticos cuyo consumo excesivo promueve la proliferación celular. Ejemplos de macrocomponentes son los ácidos grasos, relacionados con cáncer de colon y de mama y al cloruro de sodio con cáncer gástrico (Sugimura, 2000).

2. Metabolismo de Xenobióticos

Los xenobióticos son agentes químicos exógenos, usualmente liposolubles, que ingresan al organismo primordialmente por vía oral o respiratoria. Como

mecanismo de protección, durante la evolución se ha desarrollado diversas vías para disminuir el periodo de exposición y permitir su eliminación. Los xenobióticos ingeridos son biotransformados de forma tal que la molécula original es modificada a una forma más fácil de excretar. La duración y la intensidad de la acción de estos compuestos, sea farmacológica, como en el caso de los medicamentos, o tóxica, como ocurre por la acción de diversos compuestos químicos que ingresan al organismo, dependen fundamentalmente de la velocidad a la cual son metabolizados. El metabolismo de xenobióticos supone un amplio espectro de reacciones químicas: oxidación, reducción, hidrólisis, conjugación, condensación e isomerización. En los mamíferos, prácticamente todos los tejidos y órganos tienen la capacidad de metabolizar compuestos de carácter lipofílico en metabolitos solubles en agua. Las enzimas implicadas en estas reacciones por lo general, se encuentran más concentradas en el hígado. El metabolismo para la mayoría de los xenobióticos se lleva a cabo en 2 fases. En la fase I, se llevan a cabo reacciones no sintéticas, donde se incluyen procesos de oxidación, reducción o hidrólisis de la molécula original, que dan origen a metabolitos, los cuales pueden ser más o menos tóxicos que el compuesto original. Los metabolitos tóxicos, son intermediarios reactivos “activados”, capaces de formar uniones covalentes con macromoléculas lo cual puede generar una acción carcinogénica, inmunotóxica o necrótica. Esta fase involucra la acción de monooxigenasas, denominadas oxidasas de función mixta (OFM), conformadas por sistemas complejos que han evolucionado como una multiplicidad de hemoproteínas dependientes de CYP, las que se han clasificado en familias y subfamilias de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos y catalizan reacciones de biosíntesis o biodegradación de compuestos endógenos y exógenos (Lewis, et al 1998). En la Fase II, se produce la conjugación de los metabolitos formados en fase I con agentes endógenos, tales como ácido glucorónico, glutatión, sulfato, glicina o acetato (reacciones sintéticas), con lo que se aumenta la polaridad e hidrosolubilidad de los compuestos, lo que facilita su eliminación por vía renal o biliar. Los metabolitos formados en las reacciones sintéticas son más polares y más fácilmente

excretados por el riñón (en la orina) y por el hígado (en la bilis) que los formados en las reacciones no sintéticas (Peña, et al 2001).

3. Citocromo P450

3.1 Generalidades

El metabolismo de fase I que involucra reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, se realiza principalmente a través del sistema enzimático conocido como citocromo P450 (CYP). Este es un grupo diverso de proteínas localizadas en casi todos los tejidos en las fracciones subcelulares del retículo endoplásmico y en la mitocondria de la célula. Hasta ahora la diversidad más grande se ha encontrado en el parénquima de las células hepáticas. En organismos procariontes, los CYP se encuentra en citosol, por lo cual se les llama CYP solubles.

Una característica importante de las enzimas CYP es que metabolizan numerosos agentes químicos de diversas estructuras, como esteroides, ácidos biliares, prostaglandinas, ácidos grasos y xenobióticos, incluyendo medicamentos, contaminantes ambientales, mutágenos y carcinógenos. (González, 1994; Hukkanen, 2000; González-Jasso, 2003). La biotransformación de sustancias exógenas como son carcinógenos y mutágenos por el CYP no siempre resulta en la inactivación y eliminación del compuesto, sino que estas enzimas son las responsables de activar muchos xenobióticos inertes a metabolitos oxidados o reducidos altamente electrofílicos capaces de unirse a macromoléculas, iniciando el proceso de carcinogénesis química, mutagénesis, toxicidad o teratogénesis.

El primer reporte de la existencia de las enzimas CYP fue el publicado en 1958 por Martín Klingenberg, quien descubrió un pigmento en microsomas de hígado de rata, el cual se reducía en presencia de ditionita de sodio y monóxido de carbono, con un único pico de absorción a una longitud de onda de 450nm. Por lo que a estas enzimas se les denominó P (por pigmento) y 450 (por la absorción de longitud de onda). Después se nombraron Citocromos P450, al ser caracterizadas como hemoproteínas por Omura y Sato (Estabrook, 1997; Hukkanen, 2000).

3.2 Nomenclatura

El sistema de nomenclatura actual para clasificar las enzimas CYP, se realiza en relación con su evolución y se designa en árboles filogenéticos, derivados de la secuencia de aminoácidos. La construcción de un árbol filogenético depende de su secuencia. Para obtener un mejor resultado se acordó utilizar solo las partes del gen que codifiquen importantes características tridimensionales de la proteína. Estas secuencia de referencia son pocas en la región N-terminal, y más abundantes en la C-terminal de la hélice I, al final de la proteína CYP (Nelson, 1998).

Hasta el momento, se han estimado 53 diferentes genes CYP y 24 pseudogenes (Hukkanen, 2000). Una enzima codificada por un gen en una familia que usualmente exhibe hasta un 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos con genes de otra familia y las enzimas de la misma subfamilia concuerdan en más del 55%. La superfamilia CYP comprende alrededor de 20 familias génicas, de las cuales 10 están presentes en mamíferos (González, 1990, Nelson, 1998).

Los genes del citocromo P450 son nombrados con la raíz CYP, las familias son designadas por números, las subfamilias son representadas por letras y el número siguiente representa al gen individual. El número en las familias por debajo de 100 está reservado para eucariontes, y sobre 100 son designadas como enzimas de origen procarionte (Josephy, 1997; González, 1990).

Las subfamilias de genes CYP representan uniones fuertes de agrupación de genes. La nomenclatura refleja la proximidad física en cromosomas, y no necesariamente su funcionalidad (Nelson, 1998).

En mamíferos, las familias del CYP 1-4, 7, 17, 19 y 21 se encuentran en retículo endoplásmico, y en mitocondria se encuentran las familias 11 y 27. Se conocen 17 diferentes familias en humanos. Las enzimas de las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son más activas en el metabolismo de xenobióticos, y las otras restantes tienen una función importante en el metabolismo de compuestos endógenos (Hukkanen, 2000).

3.3 Estructura

La superfamilia enzimática CYP, consiste en una gran variedad de isoformas que tienen una selectividad inter e intrasustrato, y se caracteriza por ser hemoproteínas capaces de transportar electrones. Al ser hemoproteínas, poseen una parte proteica (apoproteína), la cual es responsable de su amplio intervalo de especificidad al sustrato, y un grupo hemo (grupo prostético) donde se localiza un solo átomo de hierro, protoporfirina del grupo prostético IX (Figura.1).

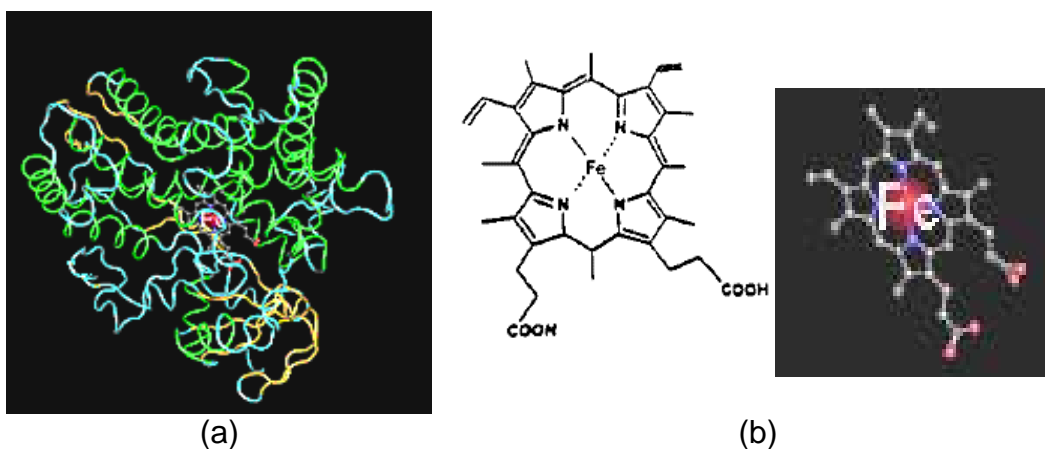


Figura.1. (a) Estructura tridimensional del Citocromo P450, se visualiza la parte apoproteica y señalando el grupo prostético, (b) con su átomo de hierro (Fe).
(Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

La estructura primaria del CYP cuenta con alrededor de 410 aminoácidos, con los cuales se realiza el alineamiento de regiones homologas, en donde se pueden obtener cuatro regiones de importancia estructural o funcional. La estructura terciaria esta conservada, y el alineamiento de secuencias puede reflejar cambios estructurales en el sitio activo, por lo tanto, en su especificidad por el sustrato.

Las cuatro regiones importantes y que son conservadas en el alineamiento de secuencia son: La región N-terminal, dos regiones con aminoácidos característicos en la parte media y una región C-terminal.

En la región N-terminal, se encuentra una secuencia responsable de la inserción de la proteína en la membrana, por lo que con esta secuencia se puede diferenciar

los citocromos microsomales, mitocondriales y solubles. En la parte media se conserva la Treonina de la posición 302(Thr³⁰²), la cual es común en todas las enzimas CYP y se asume que entra en contacto directo con oxígeno molecular. Una segunda región conservada en la parte media, son los residuos 402-413, la cual se caracteriza por tener un aminoácido aromático, y terminar con Fenilalanina (Phe) en las proteínas CYP microsomales y con Triptófano (Trp) en los citocromos mitocondriales; el cambio en el aminoácido aromático se relaciona con la interacción de la proteína con su donador de electrones. Por último, en la región C-terminal se encuentran de cinco a diez posiciones comunes para todos los citocromos P450 de vertebrados, la más importante es la Cisteína de la posición 436(Cys⁴³⁶), la cual se encuentra unida al grupo hemo (Ruckpaul, 1989).

Esta bien identificada la estructura terciaria de tres CYPs bacterianos: P450cam (CYP101), P450temp (CYP108) y el dominio que contiene el grupo hemo de P450BM-3 (CYP102). Diversos experimentos físicos, químicos y bioquímicos, así como la comparación de secuencias de aminoácidos, hacen suponer que la estructura de los CYP eucariontes (de membrana) es similar a estos CYPs procariontes. La estructura de los citocromos P450 microsomales está relacionada con CYP101 y con CYP102.

Para que la proteína sea catalítica necesitan asociarse 6-8 monómeros de CYP. La implicación funcional de esta estructura es relevante por el abastecimiento de electrones para las moléculas asociadas, compensando la estequiometría fisiológica desfavorable de 1:20 para reductasa y CYP. (Ruckpaul, 1989)

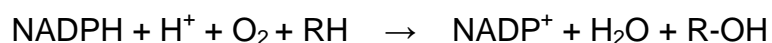
3.4 Función

Se piensa que 3 de las familias de genes (CYP1, CYP2 y CYP3) son las responsables de la mayoría del metabolismo de xenobióticos. A pesar de que muchas de estas familias comparten substratos específicos, en ciertas condiciones una única enzima del P450 interviene en la detoxificación o biotransformación de un compuesto en particular. Los CYPs están bajo influencia de varios factores como edad, sexo, temperatura, ambiente químico, medicamentos, enfermedades y dieta.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la principal función del CYP es transformar compuestos xenobióticos lipofílicos a compuestos polares, reduciendo la velocidad de difusión en el organismo, y facilitando su excreción. La distribución celular definida de estas enzimas sugiere su importancia y funciones endógenas específicas, donde actúa sobre el metabolismo de esteroides, ácidos grasos y sales biliares, entre otros. También está involucrado en la síntesis de óxido nítrico gaseoso simple, usado, entre otras funciones, como toxina anti-patógeno.

Dependiendo del tipo de sustrato y las condiciones del medio, como es la concentración de oxígeno, las enzimas CYP pueden catalizar al menos 3 diferentes actividades: actividad monooxigenasa, actividad oxidativa y actividad reductasa. (Vermeulen, 1996).

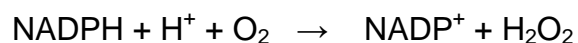
Los CYP's son hemoproteínas con actividad monooxigenasas porque catalizan reacciones en donde un átomo de oxígeno molecular (di) oxígeno es insertado dentro del sustrato, y el otro es reducido a agua (Josephy, 1997). La reacción general es la siguiente:



Dentro de las reacciones que pueden llevar a cabo estas enzimas CYP se encuentran la hidroxilación; N-, O- y S- dealquilación; deaminación, desulfuración, dehalogenación oxidativa, así como la epoxidación, donde se añade un oxígeno a una unión π carbono-carbono. La dehalogenación oxidativa, deaminación y la oxidación de un heteroátomo (adición de un oxígeno a un electrón desapareado en un nitrógeno, azufre o en otro átomo) son formas especiales de hidroxilación ya que en la mayoría de los casos comienza como una hidroxilación de carbono (Vermeulen, 1996).

La segunda actividad del sistema CYP es liberar especies de oxígeno reducido, la cual se conoce como actividad oxidativa, ésta involucra la transferencia de electrones de CYP reducido al oxígeno molecular con la formación de radicales

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta actividad se relaciona con la oxidación microsomal de catecol y la oxigenación microsomal de xenobióticos como la anilina y benceno (Vermeulen, 1996). La reacción global es:



La mayor contribución de las enzimas CYP es la activación del oxígeno molecular a especies lo suficientemente reactivas para atacar a sitios inertes, como las uniones carbono-hidrógeno inactivos y los anillos aromáticos.

La actividad reductasa generalmente sólo se observa cuando el suministro de oxígeno molecular es limitado o si un aceptor de electrones está disponible, esta actividad produce radicales libres intermediarios. Estas reacciones se producen bajo condiciones subcelulares de baja tensión de oxígeno, en presencia de NADPH. Las reacciones de reducción más comunes son la transformación de nitroderivados aromáticos a aminas, la azoreducción de aminas primarias y la deshalogenación reductiva (Vermeulen 1996, Peña 2001).

3.5 Mecanismo de acción.

La estructura de las enzimas CYP poseen dos sitios para atrapar moléculas: uno para el oxígeno (O_2) en el sitio hemo y otro para el sustrato, que se une justo sobre el grupo hemo. La conversión de una sustancia a una especie más polar se realiza mediante la incorporación de oxígeno molecular en la molécula blanco. La enzima Citocromo P-450 químicamente oxida o reduce usando un anillo hemo reactivo como receptor fundamental o donador de electrones, y con NADPH-CYP reductasa como cofactor (Galli, 2002;Hukkanen, 2000).

El ciclo de la reacción de oxidación del xenobiótico catalizada por Citocromo P450, en términos generales es el siguiente (figura 2):

1. Se inicia cuando el sustrato se une al citocromo férrico (Fe^{3+}).
2. Un electrón es transferido al átomo Fe^{3+} , pasando a su estado ferroso (Fe^{2+}), esta transferencia es realizada en ocasiones por la proteína citocromo b_5 .
3. La forma ferrosa se une a una molécula de O_2 .
4. Se vuelve a realizar una reducción agregándose un electrón y además un protón.
5. Se Pierde una molécula de agua dejando un complejo $(\text{FeO})^{3+}$.
6. El complejo $(\text{FeO})^{3+}$ en forma directa oxida el sustrato.

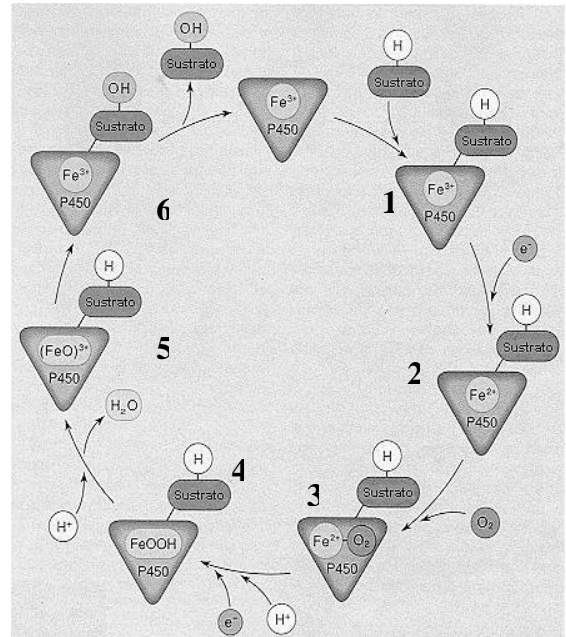


Figura.2. Mecanismo de oxidación de CYP. Los números corresponden a los pasos explicados en el texto.

Si la concentración de oxígeno en la célula es muy baja, entonces la reacción catalizada por el CYP es una reducción en la que el NADPH actúa como donador de iones hidruro (Peña et al, 2001).

Las enzimas citocromo P450 pueden tener ciclos de oxidación - reducción durante el metabolismo de endobióticos y xenobióticos, sin apreciable daño estructural.

La participación del CYP se termina en un proceso que se clasifica como inactivación "suicida". Hasta el momento se han caracterizado tres mecanismos distintos de inactivación:

- Destrucción del grupo prostético vía N-alquil-arilación,
- Alquilación de la parte apoproteica, por un reactivo intermedio, y

- Destrucción del grupo hemo por productos que se unen irreversiblemente a la apoproteína (Maya, 1995).

3.6 Polimorfismo Genético

La actividad del CYP difiere en distintas personas y poblaciones. Las diferencias interindividuales en los niveles enzimáticos de CYP se deben principalmente al polimorfismo genético y a que son enzimas fácilmente inducibles por diferentes estímulos. La variación genética en una población es conocida como polimorfismo cuando existen genes variantes con una frecuencia mayor a 1%. Dichas diferencias en actividad pueden tener consecuencias importantes, principalmente de carácter clínico, aún cuando también le confiere a la población cierta susceptibilidad para el desarrollo de cáncer. Los factores genéticos pueden variar entre poblaciones e individuos y causar grandes diferencias en los niveles de las enzimas CYP, y alterar así su habilidad para metabolizar xenobióticos específicos. Las diferencias en los niveles de CYP influyen en la habilidad individual para oxidar medicamentos particulares, y esto es importante al considerar el régimen apropiado de medicamentos para un individuo determinado. Una mutación en el gen que codifica para una enzima metabolizadora de un medicamento específico puede dar como resultado una proteína con alta, baja o nula actividad o la ausencia de la enzima. Los polimorfismos con implicaciones clínicas importantes relacionados con la oxidación de medicamentos, son los encontrados para CYP2D6 y CYP2C19. Se sabe que el nivel de CYP2D6 es menor en la población caucásica (de 5 a 10% de la población), representando a metabolizadores lentos del medicamento antihipertensivo debrisoquina. A diferencia de la población asiática de metabolizadores rápidos (Josephy, 1997; Lin, 1998).

La variabilidad genética en la activación metabólica de carcinógenos está asociada con predisposición a diferentes tipos de cáncer (Guengerich, 2000). El riesgo relativo de desarrollar cáncer está determinado por el fenotipo y el genotipo, así como por el nivel de exposición al carcinógeno. Para identificar a individuos susceptibles, es importante estimar el riesgo de exposición ambiental para poblaciones con diferentes polimorfismos, y así definir la influencia del metabolismo en el binomio. La relación dosis-respuesta en la determinación de

predisposición genética puede proveer información decisiva para este problema (Kawajiri y Hayashi, 1996).

La alteración en la expresión de una enzima también puede ser el resultado de la exposición a compuestos que inducen o reprimen las enzimas de manera individual, el hecho de que existan CYPs con diferentes formas de regulación y de especificidad, conduce al concepto de variabilidad y función del cociente metabólico sustrato / productos (tóxicos o no tóxicos) (González y Nebert, 1990).

3.7 Inducción

Desde el punto de vista biológico, la inducción de enzimas CYP es una respuesta adaptativa para proteger a las células de xenobióticos tóxicos, por medio del incremento de la detoxificación. En la inducción se incrementa la concentración de enzimas CYP en uno o más tejidos, aumentando así la actividad metabólica y disminuyendo la concentración del xenobiótico en plasma.

La actividad que tenemos de estas proteínas puede incrementarse de dos hasta cientos de veces la actividad basal. El aumento en la concentración puede tomar horas o días hasta llegar al máximo. Esta elevación depende de la continuidad de la exposición y de la presencia del agente inductor. Si el agente inductor es retirado, la actividad enzimática regresa lentamente a su estado basal, debido a la degradación y producción normal de la proteína. La inducción de enzimas generalmente exhibe una típica relación dosis-respuesta (Josephy, 1997; Guengerich, 2002).

La inducción de las enzimas CYP está relacionado con propiedades físicas y estructurales de los xenobióticos a los que nos encontramos expuestos, particularmente de lipofilidad y persistencia. Los inductores de enzimas CYP presentan dos características importantes: (i) son sustratos de las enzimas que inducen, y (ii) esta inducción de enzimas frecuentemente aumenta la detoxificación. Por lo tanto, en la mayoría de los casos las enzimas CYP inducidas son capaces de unirse y oxidar al agente causante de su aumento (Josephy, 1997; González-Jasso, 2003).

Aunque la inducción de enzimas CYP puede ser ventajosa, en muchos de los casos tiene una variedad de consecuencias farmacológicas adversas, incluyendo

alteraciones en la eficacia de medicamentos, interacción medicamento-medicamento, e incremento en la activación metabólica de procarcinógenos o toxinas (Guengerich, 2002).

El incremento en los niveles de enzima metabólica es regulado mediante diferentes mecanismos: incremento en la velocidad de transcripción del gen, estabilización del RNA mensajero (mRNA) derivado de la transcripción, o por la estabilización de la proteína y aunque hay pocas excepciones los inductores de enzimas CYP pueden presentar una estimulación de síntesis de novo (Josephy, 1997).

El aumento en la concentración del mensajero específico se relaciona con el aumento en la actividad transcripcional, la degradación del RNAm es relativamente lento, por lo tanto, se acumula, por lo que los niveles se quedan elevados después de una recuperación de la actividad transcripcional a niveles basales (Guengerich, 2002).

3.7.1 Mecanismos de inducción

Diversos receptores son los responsables de la activación transcripcional de los genes correspondientes de enzimas CYP. El mejor caracterizado es el receptor Aril hidrocarburo, el cual es el mediador de la inducción de los genes de la enzima CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. Los receptores nucleares son factores dependientes del ligando y regulan la transcripción de genes de proteínas CYP y otros genes que generan respuestas celulares específicas a ligandos. Estos ligandos son degradados por enzimas específicas CYP. Los ligandos pueden ser xenobióticos, endobióticos o sus productos. En ausencia de un ligando, el receptor nuclear esta asociados en un complejo receptor nuclear co-represor, resultando en la inhibición de actividad de transcripción basal del promotor asociado. Después de la exposición a un xenobiótico o ligando, los receptores nucleares sufren un cambio conformacional que libera el complejo co-represor y refuerza la co-activación. Los receptores nucleares son dependientes de ligandos y factores de respuesta a elementos específicos en el ADN, como XRE (Josephy, 1997; Honkakoski, 2000).

Receptor Aryl hidrocarburo (AhR)

El mecanismo molecular de inducción mejor estudiado en mamíferos y otros organismos es el receptor Aryl hidrocarburo, este regula enzimas de la familia CYP1A y CYP1B, e involucra un aumento en la velocidad de transcripción al exponer roedores con el compuesto 2, 3, 7, 8 - Tetraclorodibenzo - p - dioxina (TCDD), éste constituye el ligando más potente del receptor AhR y pertenece a los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La inducción parece estar relacionada con el mecanismo de toxicidad de TCDD, a través de la inducción de CYP1A1, aunque por sí solo, no está ligado a efectos tóxicos (Josephy, 1997).

El proceso de inducción de la enzima CYP1A1, por la exposición a TCDD se visualiza en la Fig.3. El receptor AhR, en ausencia del ligando o inductor, existe en el citosol en un complejo dimérico con una proteína chaperona Hsp90. La unión de un agente inductor (TCDD) al receptor disocia este complejo llevando a la activación de un segundo heterodímero con el receptor transportador AhR nuclear (ARNT). Este heterodímero (TCDD-AhR-ARNT) es translocado dentro del núcleo donde se une a un elemento de respuesta a xenobióticos XRE en el ADN, activando y estimulando así la transcripción del gen, aumentando el RNA mensajero para esta proteína (Guengerich, 2002; Miao, 2004).

Este esquema es aceptado en general para explicar la inducción de los miembros de la familia CYP1, el mecanismo de inducción puede ser mucho más complejo bajo una variedad de condiciones. Se sabe que el mecanismo de inducción de enzimas de otras familias CYP es mediante un mecanismo similar con receptores y regiones XRE diferentes.

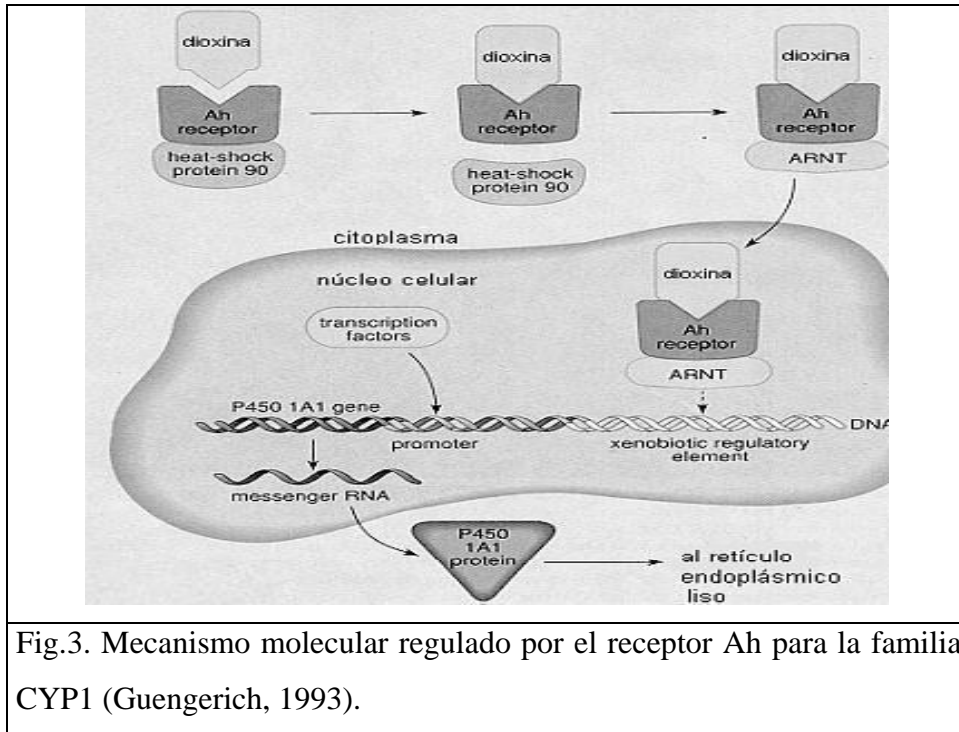


Fig.3. Mecanismo molecular regulado por el receptor Ah para la familia CYP1 (Guengerich, 1993).

Receptor nuclear del pregnano (PXR)

El Receptor nuclear del pregnano, también llamado PXR o PAR, es un receptor de los conocidos como “orphan” (Kliewer *et al*, 1998). Sus ligandos o inductores incluyen una gran variedad de compuestos químicos endógenos y exógenos de diversas estructuras, como son hormonas y metabolitos esteroideos (progesterona, estrógeno, corticosterona, adrostanol), compuestos dietéticos como los carotenoides y medicamentos como la rifampicina, clotrimazol y fenobarbital. El ligando se une al receptor PXR, para formar un heterodímero con el receptor α retinoide X (RXR α), este complejo se transloca al núcleo uniéndose al elemento ER6, activando y estimulando así la transcripción de los genes CYP3A4 Y CYP3A7 (Pascussi *et al*, 2000).

Receptor constitutivamente activo (CAR)

El receptor constitutivamente activo, también llamado receptor constitutivo de androstenona CAR se expresa constitutivamente en hígado y participa en la inducción del CYP2B6 principalmente, y en menor medida de CYP3A4, CYP2C8 Y

CYP2C9. CAR actúa en forma diferente a los receptores tradicionales, debido a que CAR es constitutivamente activo sin ligando. La inducción de CYP2B6 con fenobarbital es mediada por CAR, aún cuando el fenobarbital no es su ligando. El mecanismo exacto de inducción por el fenobarbital se desconoce, pero en recientes publicaciones se sugiere que el fenobarbital no sólo facilita la translocación de CAR al núcleo, sino que además activa a CAR en el núcleo (Sueyoshi *et al*, 1999). Estos pasos son dependientes de fosforilación, mientras que la translocación y activación son inhibidas las proteínas fosfatasas (PP) y CaM kinasa. Este modelo se sustenta en resultados obtenidos con cultivos de hepatocitos primarios. CAR se localiza en el citoplasma y se transloca al núcleo después del tratamiento con el inductor.

Receptor glucocorticoide (GR)

Los glucocorticoides, de los cuales la dexametasona es la más ampliamente estudiada, influyen en varios aspectos en la inducción de CYP. Sin embargo, al parecer dicha inducción no depende de la unión de GR a genes CYP, más bien GR interactúa de alguna forma con otros receptores para que se lleve a cabo la inducción. Por ejemplo, se ha visto que la dexametasona incrementa la inducción de CYP1A1 por TCDD (Honkakoski y Negishi, 2000). En humanos, el gen CYP inducido directamente por GR es CYP3A5.

3.8 Familias CYP metabolizadoras de xenobióticos

Las enzimas CYP, particularmente las familias génicas *CYP1*, *CYP2* y *CYP3*, catalizan la biotransformación de una amplia variedad de xenobióticos incluyendo contaminantes ambientales, carcinógenos, fármacos y componentes dietéticos, mientras que las otras familias tienen funciones endógenas importantes. En la Tabla.1, se muestran las familias CYP encontradas en humanos y su principal función. (Hukkanen, 2000).

Tabla.1. Familias CYP en Humanos y su principal función. (Tomada de Hukkanen, 2000)	
Familia	Función
CYP1	Metabolismo de Xenobióticos
CYP2	Metabolismo de Xenobióticos. Metabolismo de Ácido Araquidónico
CYP3	Metabolismo de Xenobióticos
CYP4	Hidroxilación de Ácidos Grasos
CYP5	Síntesis de Tromboxano
CYP7	7 α -Hidroxilación de Colesterol
CYP8	Síntesis de Prostaciclina
CYP11	Rompimiento de un sitio de unión del colesterol. Hidroxilación 7 β de esteroides Síntesis de aldosterona
CYP17	Hidroxilación 17 α de esteroide
CYP19	Aromatización de andrógeno
CYP21	21-Hidroxilación de esteroide
CYP24	24 -Hidroxilación esteroídica
CYP26	Hidroxilación del ácido retinoico
CYP27	27-Hidroxilación esteroídica
CYP39	Se desconoce
CYP46	24-Hidroxilación del Colesterol
CYP51	Biosíntesis de esteroles

3.8.1 Familia CYP1

La familia CYP1, es probablemente la familia más importante desde el punto de vista toxicológico, pues es la responsable de la bioactivación de muchos carcinógenos medioambientales, incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos, aflatoxina B1 y aminas heterocíclicas. Los miembros de la familia CYP1 contienen dos subfamilias, CYP1A y CYP1B y 3 genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1. Los 3 son controlados transcripcionalmente por el receptor AhR. Estos CYPs son inducidos por hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y humo de tabaco. La familia CYP1 esta involucrada en la bioactivación de PAH, generando metabolitos altamente reactivos capaces de unirse covalentemente con macromoléculas, produciendo mutaciones involucradas en el proceso neoplásico (Kawary y Hayashi, 1996).

Subfamilia CYP1A: CYP1A1 y CYP1A2

Los genes CYP1A1 y CYP1A2 parecen estar localizados en conjunto en el cromosoma 9 en ratón, en el cromosoma 8 en rata, en el cromosoma 4 en hámster

y en el cromosoma 15 de humano. Las secuencias del CYP1A1/2 están codificadas completamente en humano, perro, conejo, ratón, rata y hámster. Los dos miembros poseen una alta similitud en su estructura primaria así como en sus propiedades fisicoquímicas, pero hay una clara diferencia en sus sustratos específicos. Los ejemplos típicos de metabolismo de sustratos específicos para CYP1A1 y CYP1A2 son benzo [a] pireno (B[a]P) y acetanilida, respectivamente.

La subfamilia CYP1A1, representa a la enzima extrahepática más importante. Sus niveles de expresión en hígado humano son muy bajos al igual que en tejidos extrahepáticos, pero es sumamente inducible por ligandos AHR en casi todos los tejidos estudiados, incluyendo pulmón, linfocitos, glándula mamaria y placenta. El CYP1A1 es altamente inducible por PAH y por los componentes del humo del tabaco, contribuye significativamente en la bioactivación de un gran número de procarcinógenos, especialmente PAH, por lo que ésta subfamilia también ha sido involucrada con la susceptibilidad individual para desarrollar neoplasias. El polimorfismo del *gen CYP1A1*, se ha asociado principalmente con cáncer de pulmón (Anttila *et al*, 1992).

Al parecer, CYP1A2 se expresa exclusivamente en hígado, ya que esta proteína no ha sido detectada en ningún otro tejido. El CYP1A2 constituye cerca del 13% del contenido total de CYP hepático. Esta proteína activa PAH, nitrosaminas, aflatoxina B₁, y especialmente aril aminas, a metabolitos reactivos capaces de unirse al ADN y producir mutaciones. La regulación de CYP1A2 es a través de AhR-ARNT dependiente e independiente se induce *in vivo* por humo de cigarrillo, carne cocida directamente al fuego y algunos vegetales. CYP1A2 es uno de los CYPs que participa activamente en el metabolismo de medicamentos (Landi *et al*, 1999).

3.8.2 Familia CYP2

La familia CYP2, es una de las más numerosas dentro de las enzimas de P450, comprende un gran número de subfamilias y tiene un importante papel en el metabolismo de medicamentos. La principal característica de esta familia es que

es propensa a generar especies reactivas de oxígeno. La familia CYP2 en humano es un grupo heterogéneo de enzimas, contiene a las subfamilias CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP2F y CYP2J. Con un solo miembro funcional las subfamilias: CYP2B6, CYP2D6 CYP2E1, CYP2F1 Y CYP2J2, mientras que las subfamilias CYP2A y CYP2C contienen dos y cuatro respectivamente. Procarcinógenos como nitrosaminas en el humo de tabaco y mutágenos en alimentos, son metabólicamente activados por los miembros de la familia CYP2. El polimorfismo genético de estos genes se ha relacionado con la susceptibilidad para desarrollar cáncer de pulmón, vejiga y colon (McManus *et al*, 1989).

Subfamilia CYP2B: CYP2B1 y CYP2B2

La subfamilia CYP2B esta constituida por los miembros CYP2B1 y CYP2B2 en rata, el homologo de CYP2B1 es CYP2B6 en humano y presenta un 78% de similitud. Los genes de CYP2B, en humano, están localizados en el cromosoma 19 en la región 19q13.1-q13.2 y están constituidos por 9 exones y 377 aminoácidos. Las enzimas CYP2B1 y CYP2B2 tienen un 97% de homología entre ellas y a pesar de esto muestran propiedades electroforética y cromatográficas distintas. Ambas enzimas comparten sustratos, aunque su afinidad y actividad son diferentes. (Asteinza *et al*, 2000)

El inductor prototipo de la subfamilia CYP2B en rata es el fenobarbital (Fb). La inducción está mediada por el receptor nuclear CAR y probablemente por PXR. La subfamilia CYP2B puede ser inducida por xenobióticos de diversas estructuras, como son los pesticidas halogenados, medicamentos, sustancias producidas por plantas, hidrocarburos volátiles como la acetona, xileno y piridina, y varios bifenilos poli-halogenados (Nims, 1996; Hukkanen, 2000).

La subfamilia CYP2B se encuentra constitutivamente expresada en pulmón, glándula adrenal, testículos y en ciertas regiones del cerebro. La inducción de estas isoformas por Fb ha sido reconocida en hígado y en cerebelo. La inducción de CYP2B2 por Fb ha sido detectada en hígado y en glándula adrenal. (Nims y Lubet, 1996).

Subfamilia CYP2E: CYP2E1

El CYP2E1 es el único gen de esta subfamilia. La enzima CYP2E1 ha sido extensamente estudiada debido a su participación en el metabolismo del etanol y como un activador de carcinógenos químicos de algunas nitrosaminas específicas del tabaco (Lieber, 1997). Muchos sustratos, como la acetona, el etanol y la piridina son a la vez agentes inductores de esta enzima. Se ha reportado que la isoenzima CYP2E1 se encuentra en altas concentraciones en retículo endoplásmico y también esta presenta en membrana celular y vesículas lisosomales. La expresión de CYP2E1 constituye el 5% de la actividad total en el hígado con su mayor expresión en la región perivenosa, también está presente en riñón, donde se encuentra principalmente en la corteza. Existen niveles bajos de expresión del CYP2E1 en muchos otros tejidos, incluyendo mucosa nasal, pulmón, testículos y ovarios, intestino delgado, colon, células endoteliales de la vena umbilical y linfocitos, así como en cerebelo y cerebro, específicamente en hipocampo y corteza. El mRNA de CYP2E1 ha sido detectado en el sistema nervioso central del humano y de la rata (Ronis *et al*, 1996).

Se han descrito varios polimorfismos genéticos que afectan al gen CYP2E1; el primero de ellos se localiza en la región anterior del extremo 5' del gen dando lugar a dos alelos, uno frecuente que se le conoce como c1 y otro raro llamado c2. El alelo mutante c2 tiene una tasa transcripcional mayor que el alelo c1, lo que parece estar relacionado con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Sin embargo, parece que es el genotipo c1/c1 el factor que marca una susceptibilidad en el desarrollo de cáncer de esófago con una aparente asociación al hábito de fumar, y en el desarrollo de otros tipos de cáncer en tracto aero-digestivo en alcohólicos crónicos (Santiago *et al*, 2002).

La regulación de CYP2E1 es altamente compleja, y ocurre a nivel transcripcional o post-transcripcional, en hígado o en otros órganos y tejidos. La máxima inducción de CYP2E1 es alcanzada en forma coordinada por la combinación de diferentes mecanismos transcripcional, pre-transcripcional, de traducción y post-traducción.

Se han hecho estudios en los cuales se demuestra que existe regulación transcripcional durante el desarrollo humano y animal, y regulación post-transcripcional en diabetes e inanición. La exposición a xenobióticos incrementa la eficiencia transcripcional, la acetona regula la inducción por un mecanismo de post-transcripción a través de la interacción con la serina de la posición 129 (Ser¹²⁹) afectando la fosforilación y degradación, por lo que se estabiliza la proteína; el benceno estabiliza la proteína CYP2E1 por la inhibición en la degradación de ésta, y a pesar de ello se ha demostrado que la estabilización post-traducción de CYP2E1 es el principal mecanismo para la inducción de muchos xenobióticos. Así mismo otros sustratos como el etanol y la isoniazida, protegen contra la fosforilación y estabilizan la proteína CYP2E1, previniendo su degradación (Ronis, 1996; González-Jasso, 2003).

3.8.3 Familia CYP3

La familia CYP3 contiene a una única subfamilia CYP3A, y los genes, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *CYP3A7*. El patrón de distribución en los tejidos de esta subfamilia difiere, el CYP3A4 se expresa principalmente en hígado, CYP3A5 en tejidos extrahepáticos y CYP3A7 en hígado fetal (Thummel y Wilkinson, 1998). CYP3A4 y CYP3A7 esta regulado por PXR, mientras CYP3A5 es controlado por el receptor a glucocorticoides. La familia 3, representa una de las principales familias metabolizadoras de xenobióticos expresada constitutivamente en hígado y constituye el principal contenido del porcentaje total de P450. Esta familia es muy activa en el metabolismo y desactivación de medicamentos de elevado peso molecular como son la triacetilolendomicina, la eritromicina, la etilmorfina y las ciclosporinas. Se ha reportado una inducción importante de esta enzima por el consumo de rifampicina y clotrimazol.

Subfamilia CYP3A: CYP3A2

La enzima CYP3A4 tiene su homóloga en rata llamada CYP3A2. La enzima CYP3A4 hepática, es la más importante metabolizadora de medicamentos y constituye del 30 al 40% del contenido hepático total; también se expresa

constitutivamente en intestino delgado. El CYP3A4 además de metabolizar medicamentos, activa procarcinógenos incluyendo aflatoxina B₁, PAH Y NNK. La inducción de CYP3A4 está principalmente regulada por el receptor PXR. (Galli y Feijoo, 2002).

La enzima CYP3A7 se expresa en etapa fetal y es reemplazada rápidamente después del nacimiento los CYP3A3, CYP3A4 y CYP3A5. Estas subfamilias tienen una secuencia de aminoácidos y una función muy similar por lo que son generalmente nombradas como una sola enzima: CYP3A4. Su gen está localizado en el cromosoma 7 (Galli, 2002).

El gen CYP3A2, también llamado testosterona-6-β-hidroxilasa, abarca alrededor de 25kb y contiene 13 exones, el cual es el mayor número reportado para genes CYP.

La enzima CYP3A2 cataliza el metabolismo oxidativo de gran variedad de sustancias con marcadas diferencias estructurales. Está implicado en el metabolismo de más de 60% de los medicamentos en uso entre los que se incluyen agentes inmunosupresores (ciclosporina), antimicóticos (clotrimazol) y antibióticos macrolidos (eritromicina). Actúa en la hidroxilación de algunos esteroides como la testosterona, la progesterona y el cortisol. Los medicamentos antiepilépticos son generalmente inductores de este Cyp y pueden reducir particularmente la eficacia de los anticonceptivos orales (Santiago, 2002).

En el hígado, se han observado grandes variaciones interindividuales en la expresión de esta enzima, además de variaciones en el metabolismo de los distintos sustratos. El CYP3A4 es inducido en hepatocitos humanos por rifampicina, dexametasona y fenobarbital entre otros. *In vivo*, la rifampicina y los barbitúricos inducen a CYP3A4 en el hígado y en intestino delgado. Todo esto, pone de manifiesto una de las bases en la interacción de fármacos en pacientes con terapias en las que se combinan varios de ellos, y afecta a la propia eficacia y toxicidad del medicamento (Santiago, 2002).

La variabilidad en expresión de CYP3A se debe a múltiples factores entre los que se encuentra la inducción por drogas, compuestos ambientales, y los factores

genéticos. En los últimos años, se han descrito varios polimorfismos genéticos que afectan a este gen, sin embargo, no hay reportes de la evidencia definitiva de que el polimorfismo genético tenga relación con su actividad catalítica (Guengerich, 1999; Santiago, 2002).

3.9 CYP extrahepático

Los niveles y patrones de expresión de isoenzimas CYP varían en los diferentes tejidos. Los más altos niveles se encuentran en hígado, el principal órgano metabolizador de xenobióticos, que expresa a las familias 1-3 (Galli, et al 2002). En muchos otros tejidos, los niveles de enzimas CYP son significativamente bajos (100-1000 veces) y el patrón de isoformas es generalmente distinto del contenido hepático de CYPs. A diferencia del hígado, diversos tejidos extrahepáticos están constituidos de múltiples tipos celulares y los CYPs en estos órganos están comúnmente expresados en células específicas. La distribución de CYP's, en células y tejidos específicos pueden jugar un papel importante en la respuesta a compuestos xenobióticos y su toxicidad. Además de que, altas concentraciones de CYP's en subpoblaciones celulares en tejidos extrahepáticos pueden influir en el metabolismo *in situ* de compuestos endógenos y exógenos.

Es importante destacar que la localización de CYP's en tejidos extrahepáticos principalmente en los que son la puerta de entrada de compuestos exógenos, como son los sistemas respiratorio y gastrointestinal, tienen un papel decisivo en el destino de los compuestos xenobióticos y en la biodisponibilidad de agentes terapéuticos. La toxicidad química en tejidos extrahepáticos frecuentemente es el resultado de una activación *in situ* mediada por CYPs en el órgano blanco (Ding y Kaqminaski, 2003). Se ha calculado que el 90% de los xenobióticos con los que el humano está en contacto atraviesan el tubo digestivo.

3.9.1 Expresión de CYP en estómago

La evidencia de expresión de CYP en el estómago humano es muy limitada, principalmente porque sería difícil de explicar el significado biológico de la presencia de CYP en un órgano cuya función es secretoria más que absorbente, y porque en condiciones normales, la superficie del estómago esta cubierta con una

barrera mucosa que impide el contacto de las células epiteliales con posibles agentes genotóxicos presentes en el alimento.

En la mucosa gástrica normal de ratón, solo se han encontrado niveles de mRNA de CYP1A1 inducida por 3-MC (Dey *et al*, 1999). La aplicación de diferentes métodos (inmunohistoquímica, inmunodetección y RT-PCR) han permitido identificar al CYP3A en el epitelio gástrico normal. Sin embargo, en condiciones patológicas de metaplasia intestinal y de adenocarcinoma gástrico, se ha evidenciado la inducción, principalmente de los CYP's 1A Y 3A. Esto hace suponer la participación de los CYP's en el proceso de carcinogénesis gástrica. Además, durante el proceso de carcinogénesis, la mucosa gástrica sufre una serie de alteraciones histológicas haciendo permeable la superficie de la misma al transporte y penetración de xenobióticos lipofílicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas y aminos heterocíclicas; mismos que podrían ser bioactivados si se expresan y son funcionales los CYP's en mucosa gástrica (Tatemichi, 1999).

4. Cáncer Gástrico

El denominado cáncer gástrico (CG), engloba a 2 entidades clínico-patológicas distintas. Una llamada de tipo "intestinal" o "expansiva" que predomina en poblaciones de alto riesgo y es precedido por un prolongado proceso precanceroso. La otra entidad, llamada de tipo "difuso" o "infiltrativo", es relativamente más frecuente en poblaciones de bajo riesgo y no es precedida por lesiones precancerosas bien definidas. El CG intestinal está más asociado a variaciones geográficas, ambientales y epidémicas, mientras que el CG difuso a áreas endémicas.

Hipotéticamente, el proceso de CG de tipo intestinal abarca una serie de cambios histológicos secuenciales bien definidos, que parten de una mucosa gástrica normal y desembocan en adenocarcinoma gástrico; dichos cambios están acompañados con cambios químicos gástricos, en especial con los niveles de pH, nitrato y nitritos entre otros. La lesión más precoz aunque reversible sería la gastritis superficial originada por un factor irritante, que conllevaría posteriormente a una gastritis crónica atrófica. La disminución de la secreción ácida favorecería la

proliferación bacteriana que actuaría sobre nitratos originando nitritos, que combinados con aminas y amidas producirían nitrosaminas y nitrosamidas carcinogénicas. Estas últimas producirían una metaplasia intestinal (de tipo intestino delgado o colónica) que podría desembocar en una displasia leve, moderada o grave, ésta última prácticamente sinónima de carcinoma *in-situ*. A pesar de que la incidencia del carcinoma gástrico en los países industrializados ha disminuido, continúa siendo el segundo cáncer en el mundo (Parkin *et al*, 1993).

4.1 Frecuencia y distribución geográfica

El adenocarcinoma gástrico constituye una de las principales causas de mortalidad por cáncer en el mundo, a pesar de que en la última década ha venido descendiendo en los países occidentales. El CG sigue siendo el de mayor incidencia a escala mundial, con más de 680.000 casos nuevos anuales. Su distribución mundial es variable, pudiendo clasificarse en países con ALTO RIESGO con una prevalencia media $> 45/1000000$ como Japón, China, y algunas regiones de América y Sudamérica, como Chile, Colombia y Venezuela, entre otros; y países de BAJO RIESGO con una prevalencia media $< 15/1000000$ como USA, Australia y Nueva Zelanda.

La distribución geográfica del CG de tipo difuso es prácticamente el mismo en todas las zonas geográficas, en cambio el cáncer de tipo intestinal es el responsable de las diferencias en el número y frecuencia de CG entre los distintos países. Es decir, que en aquellos países con elevado riesgo de cáncer gástrico, predomina el tipo intestinal y en los países considerados de bajo riesgo, predomina el cáncer de tipo difuso (Haenszwl *et al*, 1972).

4.2 Etiología

La etiología del CG se desconoce, no obstante se ha investigado su relación con diversos factores etiológicos incluyendo factores genéticos, agentes químicos exógenos, agentes infecciosos, síntesis intragástrica, composición de la dieta y condiciones patológicas en el estómago.

- Factores genéticos

El CG ha sido probablemente de los más estudiados desde el punto de vista hereditario, y se ha demostrado una evidente influencia hereditaria en los individuos pertenecientes al grupo sanguíneo A. Aunque, en un estudio realizado por el Centro Nacional del Cáncer en Tokio, no se encontraron diferencias significativas sobre la frecuencia de CG entre los diversos grupos sanguíneos, en una revisión que abarcó 1.002 casos (Balanzo, J. 1979).

El riesgo de CG es 2-3 veces mayor en los familiares de los pacientes con CG, que el resto de la población. Esta mayor concentración en familias tiene una raíz genética, ya que las esposas o esposos de las mismos no tienen la misma incidencia de neoplasias.

- Factores exógenos

Los estudios epidemiológicos basados en migración de poblaciones han aportado datos interesantes sobre la influencia de los factores exógenos en la incidencia de CG. Así la migración de japoneses a USA, ha demostrado que si bien la primera generación sigue siendo de “alto riesgo”, en cuanto a frecuencia de cáncer gástrico, a partir de la 2ª y 3ª generaciones pasan a ser poblaciones de “bajo riesgo” (Balanzo, J. 1979).

- Agentes infecciosos

Un medioambiente ácido es necesario para la adecuada digestión proteínica que ocurre en el estómago así como para el control del crecimiento de microorganismos invasores. La pérdida de acidez gástrica (aclorhidria) incrementa el Ph del mismo y permite la invasión de bacterias provenientes de las regiones nasal, faríngea e intestinal, para establecerse como flora en el estómago. Sin embargo, en presencia de ácido gástrico sólo las bacterias que toleran el pH bajo del jugo gástrico pueden sobrevivir.

Helicobacter pylori

A principio de la década de 1980, fue aislada una bacteria de biopsias de pacientes con gastritis y úlcera péptica, nombrada en aquel momento como *Campylobacter pyloridis* (Marshall *et al*,1984), actualmente denominada *Helicobacter pylori*. Esta bacteria de forma espiral y Gram negativa utiliza una gran variedad de estrategias para sobrevivir en el medioambiente ácido del estómago, como es el utilizar la enzima ureasa para neutralizar la acidez gástrica e inducir inflamación. La motilidad de esta bacteria le permite invadir y adherirse al epitelio gástrico y la producción de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa por *H. pylori* le hace resistente a la fagocitosis (Forman D, 1998).

Existe consenso acerca de que el adenocarcinoma gástrico es precedido por una secuencia de cambios biológicos que incluyen: gastritis atrófica crónica, metaplasia intestinal tipo 1 y displasia, que según su intensidad y persistencia incrementan el riesgo de contraer cáncer gástrico. Estos mismos cambios se han observado en pacientes infectados por *H. pylori*, aunque no se ha podido demostrar una relación causa-efecto.

En la actualidad, diversos trabajos tratan de relacionar y asociar la infección por *H. pylori* con el cáncer de estómago a partir de evidencias epidemiológicas, anatomopatológicas y fisiopatológicas, que han permitido crear varias hipótesis para explicar los mecanismos mediante los cuales la infección crónica del epitelio gástrico por esta bacteria evoluciona hacia el cáncer gástrico. La más aceptada es la planteada por Correa, quien sugiere que la bacteria, al infectar la mucosa gástrica, provoca una gastritis crónica atrófica multifocal, asociada a hiperclorhidria, lo cual facilita el sobrecrecimiento bacteriano, y el aumento de nitrosaminas y nitrosamidas, que tienen alta capacidad mutagénica, por lo cual son las responsables de las lesiones premalignas.

La infección con *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica y de úlcera gástrica. Se ha estimado que del 6-20% de infecciones con *H. pylori* resultan en ulceración péptica, y <1% desarrolla cáncer gástrico (Pisani *et al*, 1997).

Helicobacter pylori fue clasificado recientemente por la IARC (International Agency for Research on Cancer) como carcinógeno de tipo 1, a pesar de no existir una

demostración absoluta de la capacidad genotóxica o mutagénica de la bacteria (IARC, 1994).

Virus de Epstein-Barr (virus EB)

Los carcinomas gástricos y el virus EB han sido asociados en varias regiones del mundo, incluyendo Japón, China, Francia y USA (Tokunaga M, 1993) (Fukayama M, 1994). El virus EB ha sido identificado en adenocarcinomas tanto de tipo intestinal como de tipo difuso. Sin embargo, el mecanismo por el cual el virus EB induciría carcinogénesis gástrica permanece desconocido.

- N-Nitrosocompuestos

Los N-Nitrosocompuestos son agentes teratógenos, mutágenos y probables carcinógenos, altamente peligrosos para la salud humana. Los N-Nitrosocompuestos pueden tener dos orígenes diferentes: formación endógena, que es una formación natural de N-nitrosocompuestos en el estómago, y los N-Nitrosocompuestos exógenos, presentes en los alimentos y en los fármacos, debidos a las técnicas de fabricación o tratamiento.

La formación endógena de N-Nitrosocompuestos, como son las nitrosaminas, comienza cuando los nitratos (presente en los alimentos o en el agua potable) son reducidos a nitritos por los microorganismos de la cavidad bucal y estos nitritos se transforman después en óxido nítrico en el estómago debido a las condiciones allí existentes. Bajo circunstancias específicas como la gastritis crónica, los nitritos pueden oxidarse en el estómago a agentes nitrosantes (N_2O_3 , N_2O_4) y reaccionar para formar N-nitrosocompuestos. Esta reacción se produce con precursores nitrosables, que incluyen una gran variedad de componentes de la dieta tales como: aminas secundarias (carnes, pescado, huevo, quesos...), precursores naturales en los alimentos (como ciertos aminoácidos) y otros precursores que aparecen en los alimentos como contaminantes (plaguicidas, aditivos o medicamentos) (Balanzo, 1979).

Se ha propuesto que estos agentes mutagénicos son sintetizados *in vivo* en el estómago por la acción de los nitritos sobre los compuestos orgánicos que

contienen nitrógeno. Los nitritos son abundantes en la cavidad gástrica de sujetos con gastritis atrófica, como resultado de la reducción bacteriana de nitratos. Además, nitratos y nitritos pueden ser producidos por macrófagos, que también están presentes en la gastritis crónica (Fontham *et al*, 1986).

- Dieta

Basados en estudios epidemiológicos se ha mostrado que los factores dietéticos constituyen una pieza importante en el entorno medioambiental y que existe una relación muy estrecha entre los distintos patrones dietéticos y el desarrollo de CG. Los componentes dietéticos más importantes en las poblaciones de alto riesgo son los cereales, arroz, alimentos salados, aceites de soya, jamón curado, pescado salado (Balanzo 1979, Graham 1990).

En especial, se ha considerado que el elevado consumo de sal es el responsable primario de la alta incidencia y mortalidad de cáncer de estómago observado en países Asiáticos. La ingestión a largo plazo de elevadas concentraciones de alimentos salados ha sido estrechamente relacionada con un mayor riesgo de desarrollo de CG. El elevado consumo de sal (NaCl) provoca irritación de la mucosa gástrica, y que de continuarse puede llegar a desarrollar gastritis atrófica. La sal también provoca un incremento importante en la replicación celular e incrementa la mutagenicidad de alimentos nitrogenados (Christian *et al*, 1999). Además la sal puede intervenir en otros estadios del proceso, ya que se ha demostrado que aumenta la efectividad de carcinógenos conocidos como la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (Ishii *et al*, 1999; Sorbye *et al*, 1994).

III. JUSTIFICACIÓN

Se desconoce si la inducción de las enzimas P450 en mucosa gástrica en estados patológicos como metaplasia gástrica y cáncer gástrico es el resultado del mismo proceso carcinogénico o si la inducción de las enzimas CYP se da en forma temprana y participan en el proceso de cáncer gástrico. Es por ello que en este trabajo se desarrolló experimentalmente el proceso precarcinogénico gástrico en ratas con el uso de dietas con elevadas concentraciones de sal, y de esta forma se evaluaron las alteraciones histopatológicas que sufrió la mucosa gástrica y se evidenció la modulación de las principales enzimas CYP metabolizadoras de xenobióticos.

IV. HIPÓTESIS

La inducción de enzimas CYP en mucosa gástrica es un evento temprano en el proceso de carcinogénesis gástrica, participando así activamente en la transformación del tejido.

V. OBJETIVO GENERAL

Explorar la modulación de enzimas CYP durante el proceso que precede al cáncer gástrico inducido por el consumo de elevadas concentraciones de sal.

1. Objetivos particulares

- Desarrollar el modelo de lesiones precancerosas en ratas por el consumo de concentraciones elevadas de sal en la dieta.
- Evaluar los cambios histológicos de la mucosa gástrica ante diferentes concentraciones de sal en la dieta.
- Evidenciar la expresión constitutiva de enzimas CYP en mucosa gástrica normal y la inducción de éstas en cada tipo de alteración gástrica.
- Evaluar la funcionalidad de enzimas CYP en mucosa gástrica por medio del análisis de actividades enzimáticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos utilizados

Pentoxiresorufina, benciloxiresorufina, metoxiresorufina, β - NADPH, diaminobencidina y portaobjetos (POLY-PREP) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Etoxiresorufina y resorufina utilizados fueron de Molecula Probes (Eugene, Oregon, USA). 4-nitrofenol y 4-nitrocatecol se obtuvieron de Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, Wisconsin, USA). El complejo avidina-biotina-peroxidasa y el reactivo de recuperación antigénica fueron de Dako Ltd (High Wycombe, Bucks). Pepstatin fue de Boehringer Mannheim Mannheim, Germany). Los reactivos para electroforesis fueron de Bio- Rad Laboratories (Hercules, California, USA).

2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron policlonales contra CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 de rata, desarrollados en cabra, obtenidos por el laboratorio Daiichi Pure Chemicals; y el segundo anticuerpo anti IgG de cabra (monoclonal) desarrollado en conejo, unido a una peroxidasa de rábano, purificado por Sigma Chemical Co.

3. Procedimiento experimental

Se utilizaron un total de 60 ratas macho de la cepa Wistar, provenientes de madres primíparas y de camadas no mayores a 8 crías, las cuales fueron alojadas en un ambiente convencional de Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría. Los animales fueron destetados a los 21 días de edad y distribuidos en 6 grupos de 10 animales cada uno a los cuales se les proporcionó agua y alimento peletizado a libre acceso durante 12 semanas. El alimento contenía las siguientes concentraciones de sal: 0.6% (grupo testigo), 6%, 12%, 18% y 24%. Se determinó individualmente el peso corporal y el consumo de agua y alimento semanalmente.

Veinticuatro horas después de terminar las doce semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, con un ayuno previo de 12hrs. Posteriormente los animales fueron perfundidos por vía intracardíaca, con una solución de 0.9% de cloruro de sodio (NaCl), y enseguida, se extrajeron los estómagos, mismos que fueron abiertos a lo largo de la gran curvatura, obteniendo así de cada estómago las 2 mitades longitudinales, una de ellas se fijó en una solución de formalina al 10% amortiguada con fosfatos pH 7.4, para su posterior inclusión en parafina. La otra mitad de los estómagos fueron procesados para la obtención de microsomas gástricos.

4. Análisis histopatológico

De cada una de las muestras de estómago incluidas en parafina se realizaron cortes de 5 μm de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos cubiertos con el adhesivo Poli-L-lisina. La tinción de Hematoxilina y eosina (H&E), se empleó para el diagnóstico histopatológico utilizando como base la clasificación del sistema de Sydney (Dixon, 1996), sin que los evaluadores conocieran la procedencia de la laminilla. Se determinó el grado de reacción inflamatoria y de atrofia glandular, la metaplasia intestinal y la displasia celular. Para corroborar el diagnóstico de metaplasia intestinal se evidenció el tipo de mucina presente, para lo cual algunas laminillas adicionales fueron teñidas con azul alciano y ácido peryódico de Schiff (PAS) pH 2.5.

5. Inmunohistoquímica

De cada uno de las muestras de estómago incluidas en parafina se realizaron cortes de 4 μm de grosor, los cuales fueron montados en portaobjetos cubiertos con el adhesivo Poli-L-lisina, mismos que se expusieron a calor en un horno a 55°C por 60 min. Posteriormente las laminillas fueron desparafinadas y rehidratadas. La actividad de peroxidasa endógena fue inhibida mediante la incubación de los cortes en 3% H_2O_2 en metanol (20 min) a temperatura ambiente). Con el objeto de incrementar la inmunoreacción las secciones de estómago se utilizó una solución de recuperación antigénica (10mM de ácido

cítrico monohidratado, pH 6.0, ajustado con 2 M de NaOH) y se calentaron en un horno de microondas por 5 min. Finalmente, las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo apropiado por 60 min. a temperatura ambiente. Los anticuerpos policlonales de cabra anti-rata utilizados fueron: antiCYP1A (1:250) que reconoce tanto a la subfamilia CYP1A1 como a la CYP1A2; antiCYP2B (1:500) que reconoce CYP2B1 y CYP2B2 de rata; antiCYP2E1 (1:500) que reconoce principalmente al CYP2E1 de rata y con una menor reacción cruzada para CYP2C11 y CYP2C13; Finalmente, antiCYP3A2 que reconoce al CYP3A1 y al CYP3A2 de rata (Genetest Corporation, 1999). Se incluyó controles positivos y negativos. Los controles negativos se trataron con TBS en lugar del anticuerpo primario. Se utilizaron cortes histológicos de hígado de rata como controles positivos. La inmunoreacción fue visualizada usando la técnica de avidina-biotina inmunoperoxidasa, y la utilización del anticuerpo secundario anti IgG de cabra (monoclonal) (1:1200) desarrollado en conejo, unido a una peroxidasa de rábano. El sustrato para la marca se desarrolló con 3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada, y 0.3% H₂O₂ disuelto en 50mM Tris-HCl (pH7.6). Posterior a lavados con 0.01 M PBS, las secciones fueron contrastadas con hematoxilina. Las laminillas fueron analizadas bajo un microscopio de transmisión de luz para evaluar la ausencia o presencia de inmunotinción así como su distribución en el tejido.

6. Preparación de fracción S9 y microsomal

Las muestras longitudinales de estómago por grupo se homogenizó en medio con amortiguador de fosfato de potasio frío (0.1M, pH 7.4), sacarosa (0.25M), 20% glicerina (V/V), inhibidor de tripsina (5mg/ml) y heparina (3U/m).

Las fracciones microsomales gástricas se prepararon de acuerdo a lo descrito por Maron y Ames (1983). Las fracciones se homogeneizaron en KCl (150mM) (3ml/g de tejido). Los homogenizados se centrifugaron a 9,000g por 10 minutos y el sobrenadante (fracción S9) se centrifugó nuevamente a 105,000g por 60 minutos. Posteriormente se resuspendieron los botones obtenidos en una solución de: 67.5mM de K₂HPO₄ y 32.5mM de KH₂PO₄ (PH7.4), y se centrifugaron a 100,000g

por 60 minutos. Finalmente, las fracciones microsomales se resuspendieron en amortiguador de fosfato de potasio con 1mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% glicerol e inhibidor de tripsina (1 μ M) (Pepstatin, Boehringer Mannheim), en un volumen de 1.5 ml/gm de tejido. Los microsomas que se obtuvieron se distribuyeron en alícuotas de 100 μ l y se congelaron a -70°C, hasta su uso.

7. Contenido de proteínas totales

Se determinó la concentración de proteína total en cada una de las fracciones microsomales de cada grupo por el método de Lowry (1951).

8. Actividad Enzimática

• Alkoxyresorufina- O-dealquilasas (AROD)

La determinación de las actividades de monooxigenasa de los microsomas gástricos mediante la formación de resorufina que fue medida en un espectrofluorómetro de acuerdo con el método de Burke (12). Se utilizó una mezcla de solución amortiguadora Tris-HCl 50mM; cloruro de magnesio (MgCl₂) 25mM (pH 7.6), el sustrato específico disuelto en dimetilsulfoxido (DMSO): ethoxyresorufina 50 μ M (1A1); methoxyresorufina, 0.5 mM (1A2); pentoxyresorufina 1.0 mM (2B1); y benzyloxyresorufina, 1.0 mM(2B2), la proteína microsomal gástrica de cada grupo (10 μ l-EROD; 20 μ l-MROD; 40 μ l-PROD; 30 μ l-BROD), obteniendo un volumen final de 2ml. Las actividades catalíticas se calcularon a partir de una curva estándar de resorufina (2.5-50 pmol/ml).

• Eritromicina N-demetilasa (END)

La actividad de la familia 3A2 se determinó mediante la N-demetilación de eritromicina y la formación de formaldehído (Alexidis, 1996). Se incubó una mezcla (1ml de volumen final) de: eritromicina 10 mM, 1 mg de proteína microsomal y amortiguador (10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl). La mezcla se preincubó por 3 min. a 37°C y la reacción se inició con la adición de

NADPH 10 mM y una incubación adicional de 30 minutos. Se mezcló un mililitro del sobrenadante se mezcló con 1 ml del reactivo de Nash, se calentó a 50°C por 30 min. Finalmente, se midió la producción de formaldehído en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU650 a una $\lambda = 412\text{nm}$. Los resultados se obtuvieron por la interpolación de datos de una curva estándar de formaldehído con concentraciones entre 0-160nM y son expresados como nM de formaldehído /mg de proteína /min.

- **4- nitrofenol hidrolasa (4-NPH)**

La actividad de 2E1 se evaluó mediante la hidroxilación del substrato p-nitrofenol y la formación de 4-p-nitrocatecol por el método descrito por Koop (1986). Se disolvió 4-Nitrofenol (0.2mM) en amortiguador (50 mM Tris-HCl-25mM MgCl_2 pH 7.4). Se incubaron 930 μl de esta solución y 50 μl de proteínas microsomales a 37°C por 5 min. La reacción se inició con la adición de 20 μl de 50 mM NADPH y su posterior centrifugación. La formación de 4-Nitrocatecol se midió en 1 ml del sobrenadante más 0.1 ml de NaOH (10 N), en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU650 a una λ de 510nm. Los datos se obtuvieron interpolando los resultados en una curva de 4-nitrocatecol de la concentración 0 a 50nM y los resultados son expresados en nM de 4-nitrocatecol/mg de proteína /min.

9. Electroforesis y análisis de inmunodetección (Western Blot).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida a temperatura ambiente en presencia de duodecilsulfato de sodio (SDS) utilizando un sistema de amortiguador discontinuo. Se utilizó un peine de 10 pozos en el gel concentrador (2X8X0.075cm) al 4% de acrilamida, y se utilizó un gel separador (7X8X0.075cm) con una concentración de acrilamida al 7.5% y bis-acrilamida al 0.2% (Laemmli, 1970). Las muestras microsomales fueron teñidas con pironina Y, como indicador de migración limite. En cada pozo se colocaron las muestras teñidas de fracción microsomal gástrica (30 μg) de cada grupo y 1 μg de microsomas de hígado inducidos específicamente para cada familia como testigo positivo.

Una vez colocada la muestra, se realizó la electroforesis a 100v durante 40min, con una solución amortiguadora Tris-HCl 0.05M, glicina 0.38M y SDS al 0.1%, pH 8.3. Enseguida, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 8X6cm (Towbin, 1979). La transferencia se realizó a 200v por 60min. Posteriormente, los sitios inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos salino (PBS), durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.3% por 10min cada lavado, y se incubaron con agitación con el primer anticuerpo CYP cabra anti-rata específico diluido 1:2000 con PBS-BSA al 1.5%, por 2hrs a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo conjugado de conejo anti-cabra, diluido 1:2000 con PBS, por 60min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS, de 10min cada uno y las bandas fueron reveladas con 3-3'diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las actividades catalíticas se realizaron mediante la prueba de ANOVA y T-student a una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

1. Consumo de agua y alimento, y peso corporal

Los animales alimentados con dietas conteniendo 12%, 18% y 24% de NaCl tuvieron un decremento significativo en la ganancia de peso corporal comparado con el grupo control (0.6% NaCl) (tabla 1). El promedio de consumo de alimento por animal a las 12 semanas de tratamiento fue significativamente menor en los grupos alimentados con 18% y 24% de NaCl comparado con el grupo control. El consumo de agua se incremento a medida que aumento la cantidad de sal en el alimento, llegando a ser 5 veces mayor el consumo de agua de los animales expuestos a la dieta de 24% de NaCl (tabla 1).

Tabla I. Promedio del peso corporal y del consumo de alimento y agua de ratas Wistar alimentadas durante 12 semanas con diferentes concentraciones de NaCl

Grupo y porcentaje de NaCl	Promedio corporal de la rata (g)	Consumo de alimento (g /rata/día)	Consumo de agua (ml/rata/día)
Grupo1 (0.6%NaCl)	354.2±19.3	16.3±1.2	27.8±4.2
Grupo 2 (6%NaCl)	349.3±12.3	18.3±3.3	62.2±11.2*
Grupo3 (12%NaCl)	292.8±21.5*	17.5±5.4	84.5±21.5*
Grupo4 (18%NaCl)	247.3±25.3*	10.2±1.4*	87.3±12.2*
Grupo5 (24%NaCl)	213.7±14.2*	10.6±2.1*	131.9±23.5*

*P<0.05

2. Análisis histológico

A medida que se incrementó la concentración de sal en el alimento, se fueron desarrollando lesiones secuenciales en la mucosa gástrica (tabla 2). Se detectaron focos de gastritis moderada e intensa principalmente en los animales expuestos a dietas con 18% y 24% NaCl, respectivamente (figura 1A y 1B). En el 90% de los casos junto con la inflamación del tejido se desarrollaron zonas de hiperplasia regenerativa caracterizada por el aumento en el tamaño de la mucosa gástrica y la formación de glándulas pseudopilóricas. Se detectaron casos de metaplasia intestinal caracterizada por la presencia de células caliciformes en faveolas y glándulas gástricas (figuras 2A-C) alrededor de la hiperplasia regenerativa en 2 animales de los grupos de 12% y 18% NaCl en la dieta, respectivamente, y en 4 animales expuestos a 24% NaCl en la dieta. No se detectó en ninguno de los grupos casos de adenocarcinoma gástrico.

3. Inmunohistoquímica

Ninguna de las familias CYP evaluadas en este estudio fue detectada en la mucosa gástrica de ratas del grupo control. La proteína inmunoreactiva para anti CYP1A fue detectada en tejido gástrico de animales con hiperplasia regenerativa asociada a metaplasia intestinal (fig.3A). El CYP3A fue detectado en el epitelio gástrico de ratas con gastritis crónica y metaplasia intestinal (fig.3B). No se detectó la presencia ni del CYP2B ni del CYP2E1 en ninguno de los tejidos analizados.

4. Western blot

Al analizar los resultados de la inmunodetección (fig.4) se pudo apreciar la expresión de las familias CYP1A y CYP3A en microsomas gástricos de ratas con hiperplasia regenerativa asociada a metaplasia intestinal de los animales tratados con 12%, 18% y 24% NaCl. En el inmunoblot no se apreció expresión constitutiva de ninguna de las proteínas evaluadas en la mucosa gástrica del grupo control.

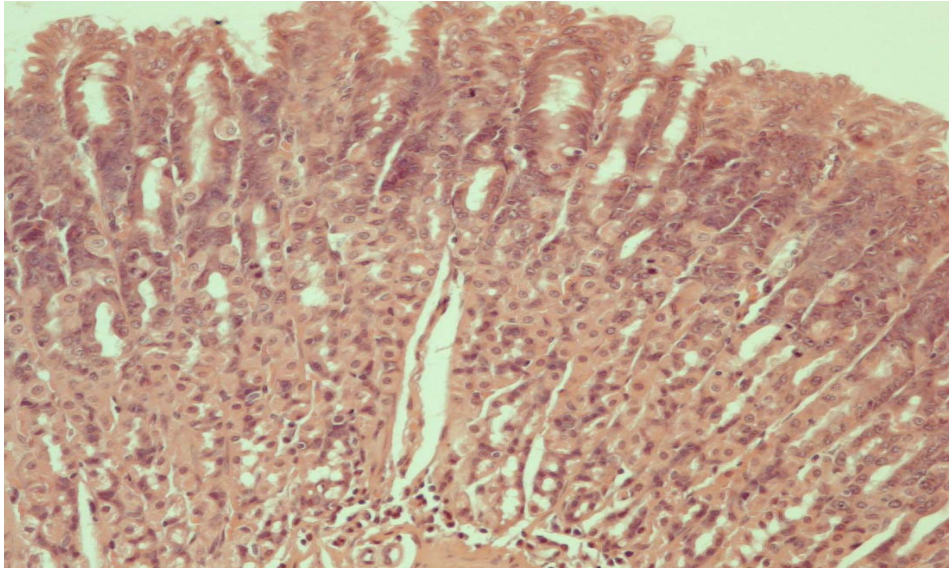
Tabla II. Cambios histopatológicos en el estómago glandular de ratas Wistar tratadas con diferentes concentraciones de NaCl en la dieta

<i>Grupo y tratamiento</i>	<i>Grupo 1</i> <i>0.6%NaCl</i>	<i>Grupo 2</i> <i>6%NaCl</i>	<i>Grupo 3</i> <i>12%NaCl</i>	<i>Grupo 4</i> <i>18%NaCl</i>	<i>Grupo 5</i> <i>24%NaCl</i>
Mucosa gástrica normal	7/10(70)	2/10(20)	0	0	0
G o o no					
Gastritis activa crónica					
Leve	3/10(30)	7/10(70)	9/10(90)	3/10(30)	3/10(30)
Moderada	0	0	1/10(10)	6/10(60)	5/10(50)
Intensa	0	0	0	0	1/10(10)
Hiperplasia regenerativa					
Leve	0	2/10(20)	3/10(30)	3/10(30)	4/10(40)
Moderada	0	0	2/10(20)	6/10(60)	5/10(40)
Intensa	0	0	0	0	0
Metaplasia intestinal					
Leve	0	0	1/10(10)	1/10(30)	4/10(40)
Moderada	0	0	0	0	0
Intensa	0	0	0	0	0

No. de animales examinados por grupo: 10.

Incidencia en porcentaje en paréntesis.

(A)



(B)

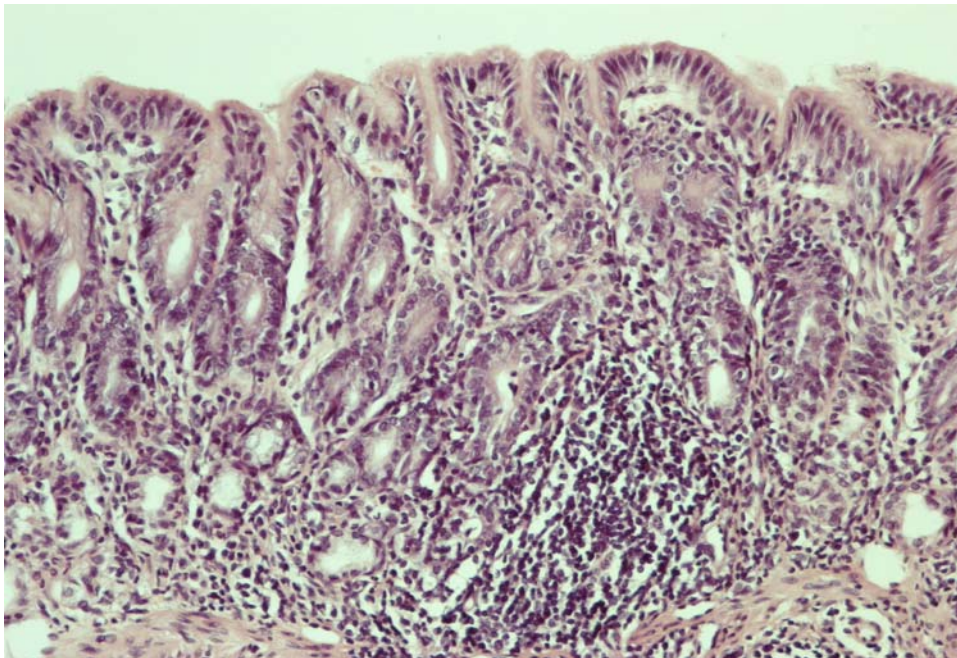
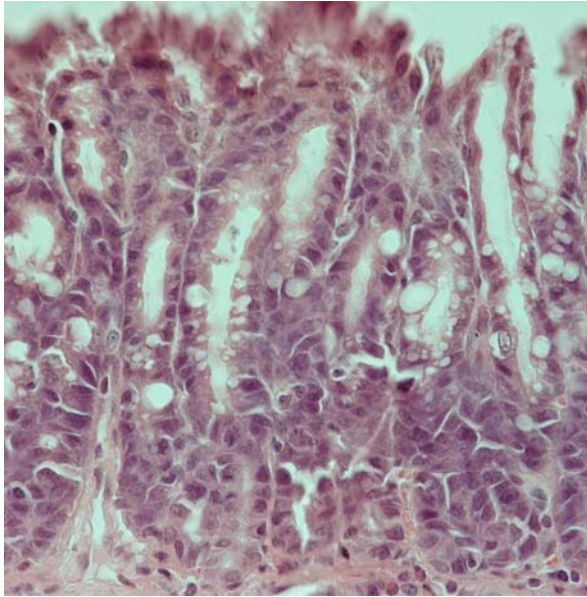
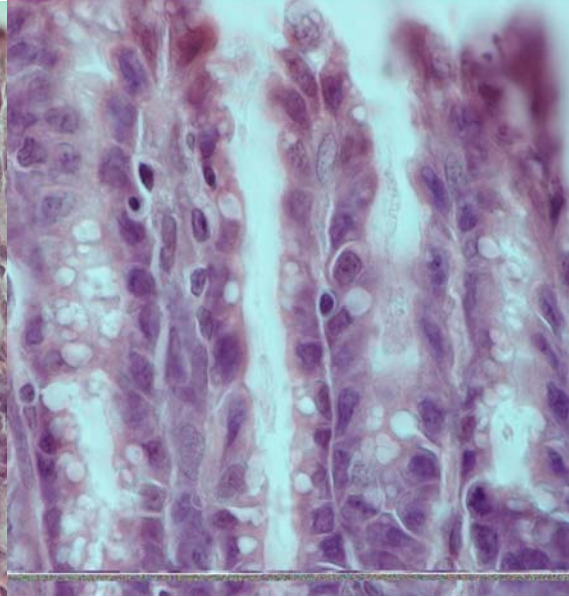


Fig.1. (A) Escaso infiltrado inflamatorio en la lámina propia en el cuerpo gástrico de una rata expuesta a 18%NaCl y (B) Moderado infiltrado linfoide crónico de una rata expuesta a 24%NaCl (H&E; Ampliación original 600X).

(A)



(B)



(C)

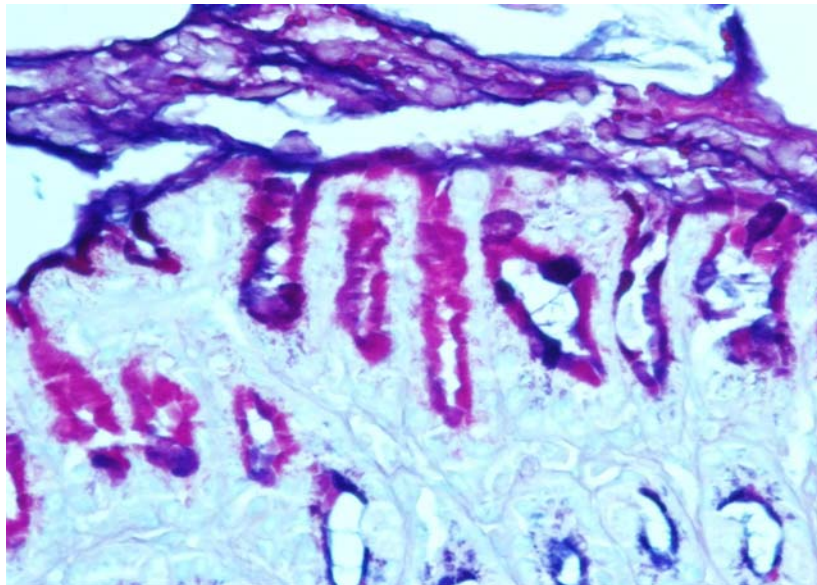
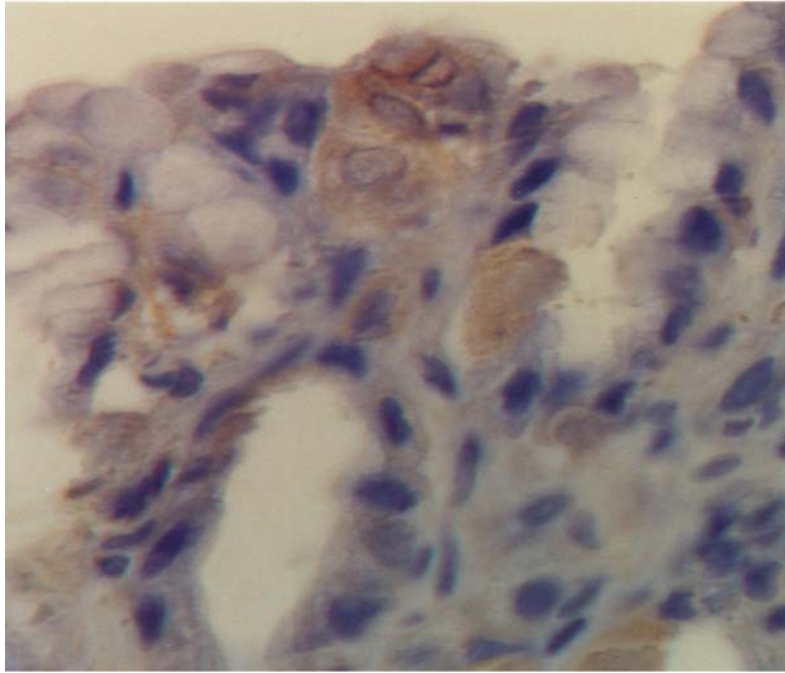


Figure 2. (A) Metaplasia Intestinal en glándulas y (b) en faveolas de la mucosa gástrica de ratas tratadas con 18% NaCl y 24% NaCl, respectivamente (H&E; Ampliación original 960X). (C) Las células epiteliales mucosecretoras de mucina neutra (vacuolas magenta) son sustituidas por células caliciformes secretoras de mucinas ácidas (vacuolas azules) (PAS/AB).

(A)



(B)

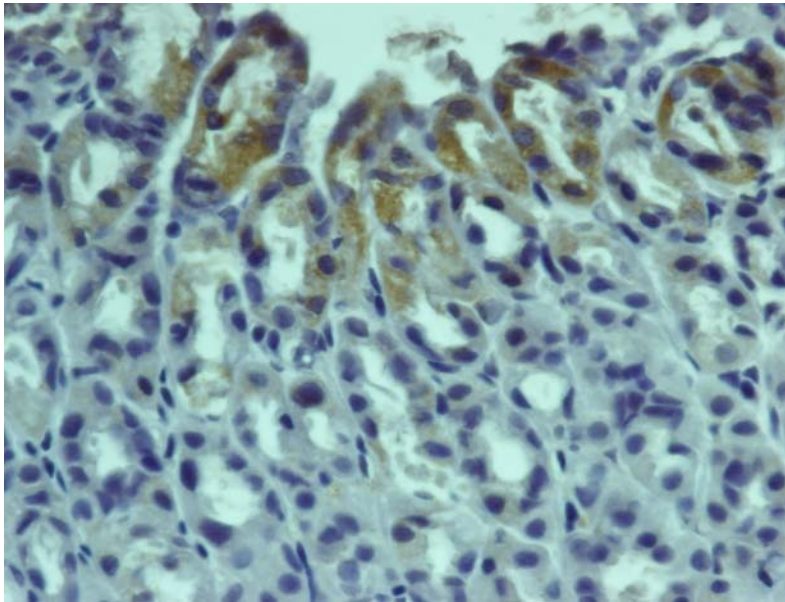


Figure 3. (A) Distribución de P450 1A en las células epiteliales de la superficie y de la faveola en mucosa gástrica de ratas alimentadas con NaCl. (B) Proteína inmunoreactiva de anti P450 3A2 detectada en epitelio gástrico de rata con gastritis crónica resultado del consumo de dieta con 18% NaCl.

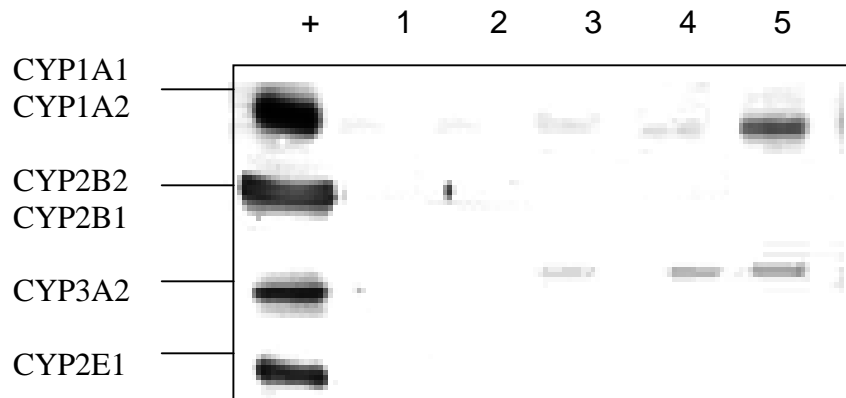


Fig. 4. Inmunoblot compuesto donde se detectan las diferentes proteínas CYP en microsomas gástricos de ratas tratadas con: línea 1, 0.6%NaCl; línea 2, 6%NaCl; línea 3, 12%NaCl, línea 4, 18%NaCl y línea 5, 24%NaCl. Se emplearon homogenados de la mucosa gástrica de cada grupo experimental. La línea 1 contiene microsomas hepáticos estándar de ratas tratadas con inductores para cada CYP.

5. Actividad Enzimática

Los resultados de las actividades catalíticas de los CYPs encontradas en microsomas gástricos se muestran en la Tabla 3. Hubo un incrementó significativo en la dealquilación de Etoxiresorufina- asociada a CYP1A1-en los grupos tratados con 12%, 18% y 24% NaCl. También la actividad dependiente de CYP3A2 aumentó significativamente en microsomas gástricos de ratas alimentadas con 18% y 24% de NaCl. La actividad de CYP1A2, CYP2B1/2 y CYP2E1 en microsomas gástricos no se modificaron por el tratamiento con sal con respecto a lo encontrado en el grupo control.

Tabla III. Efecto del tratamiento con NaCl sobre las actividades AROD^a, 4-NPH^b y END^c en microsomas gástricos de ratas (los valores representan el promedio \pm SD por triplicado)

<i>Actividad Enzimática (CYP asociado)</i>	<i>Group 1 0.6%NaCl</i>	<i>Grupo 2 6%NaCl</i>	<i>Grupo 3 12%NaCl</i>	<i>Grupo 4 18%NaCl</i>	<i>Grupo 5 24%NaCl</i>
EROD (1A1)	50.3 \pm 9.5	43.6 \pm 4.7	168.2 \pm 21.6*	267.6 \pm 29.1*	306.5 \pm 29.5*
MROD (1A2)	36.4 \pm 11.2	32.3 \pm 7.9	35.3 \pm 5.1	30.6 \pm 2.7	31.6 \pm 7.6
PROD (2B1)	18.6 \pm 4.1	13.5 \pm 3.1	15.8 \pm 5.2	16.1 \pm 4.5	17.7 \pm 4.5
BROD (2B2)	37.4 \pm 4.3	36.9 \pm 12.2	22.1 \pm 7.6	29.8 \pm 6.4	28.3 \pm 6.4
END (3A2)	0.19 \pm 0.04	0.23 \pm .03	0.33 \pm 0.1	0.37 \pm 0.1*	0.49 \pm .06*
4-NPH (2E1)	0.56 \pm 0.1	0.65 \pm .09	0.62 \pm 0.1	0.55 \pm .52	0.73 \pm .13

^a Expresado en pmol de resorufina/mg de proteína x min

^b Expresado en nmol de 4-nitrocatecol/mg de proteína x min

^c Expresad en nmol de formaldehído/mg de proteína x min

*p<0.05

VIII. DISCUSIÓN

El modelo de carcinogénesis gástrica propuesto por Correa (1992), implica una serie de pasos secuenciales identificados por alteraciones histológicas en la mucosa gástrica. Uno de las primeras manifestaciones en este proceso es la presencia de gastritis crónica, caracterizada por la presencia de agregado linfoide en la lámina propia, de continuar este proceso se desarrollaría la gastritis atrófica en la cual zonas glandulares de la mucosa gástrica sufren atrofia y son sustituidas por focos con metaplasia intestinal; la metaplasia es una etapa que precede al adenocarcinoma gástrico. El elevado consumo de sal reproduce los cambios histológicos del proceso de carcinogénesis gástrica. Un fenómeno que hay que considerar en dicho modelo es que también se contempla la presencia de mutágenos en la mucosa gástrica, ya sea los originados en él en forma endógena (nitrosaminas, óxido nítrico) o a las moléculas preexistentes en el agua y alimento. El metabolismo de xenobióticos tiene un papel esencial en la carcinogénesis química (Hursting y Kari, 1999). El potencial carcinogénico de muchos de estos agentes químicos es dependiente de la biotransformación y activación metabólica a productos intermediarios altamente electrofílicos (Badawi et al; 1996). Entre las enzimas responsables de la activación metabólica de xenobióticos se encuentra el citocromo P450 (CYP) (Parke et al, 1991; Hursting y Kaari, 1999). El CYP es una gran familia de enzimas que participan en la activación redox de compuestos endógenos y xenobióticos. La biotransformación por enzimas CYP puede resultar en la generación de entidades tóxicas potenciales como radicales hidroxilo y superóxido (Guengerich and Shimada, 1991). Existe evidencia de que algunas isoformas de CYP son sobreexpresadas en diferentes tipos de tumores malignos tales como esófago (Murray et al, 1994) y colon (Mckay et al, 1993). Hasta el momento se desconoce si los cambios en la expresión de CYP son previos o posteriores a que se desarrolle la neoplasia. Por lo que el objetivo de este estudio fue explorar la posible relación entre los cambios histológicos inducidos por el elevado consumo de NaCl y la modulación de las familias CYP involucradas en el metabolismo de xenobióticos relacionados con el cáncer gástrico.

Nuestros resultados de inmunohistoquímica mostraron que en la mucosa gástrica normal del grupo control, no se expresan ninguna de las familias CYP consideradas en este estudio. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Murray y cols (1998), en este caso describen que en mucosa gástrica normal de humanos no hay o es muy baja la expresión de CYP's. En los casos de gastritis crónica o metaplasia intestinal inducidas por la ingestión de dietas suplementadas con 18% y 24% de NaCl estuvieron relacionadas con una inducción en la expresión y la actividad del CYP3A2. Además, en los casos de hiperplasia regenerativa y metaplasia intestinal desarrolladas con las mismas concentraciones de sal encontramos inmunoreacción positiva para la familia CYP1A, de igual forma la actividad catalítica asociada a esta familia se incrementó significativamente. La tinción Inmunohistoquímica para ambas familias se localizaron en el citoplasma de las células epiteliales.

Nuestros datos sugieren que fue la isoforma CYP1A1 más que la enzima CYP1A2 inducida en este trabajo, ya que la actividad EROD fue la que se incrementó en microsomas gástricos de animales tratados con elevadas concentraciones de sal en la dieta.

La inducción de CYP1A y CYP3A en tejido neoplásico ha sido reportada por otros autores, incluyendo el cáncer de estómago (Murray et al, 1998), cáncer de páncreas (Foster et al, 1993), cáncer de mama (Murray et al, 1993), cáncer de pulmón (Kivisto et al, 1995) y cáncer de esófago (Nakajima et al, 1996); sin embargo se desconoce el momento dentro del proceso de carcinogénesis, cuando son inducidos dichos CYP. Con los datos reportados en este estudio y también por lo reportado anteriormente por Tatemichi et al. (1999), tenemos evidencia para creer que la sobreexpresión o inducción de enzimas CYP en el tejido es un paso previo y determinante para completar el proceso de carcinogénesis, ya que el establecimiento de CYP funcionales en el tejido preneoplásico puede promover la activación de precarcinógenos endógenos o exógenos *in situ*, lo que puede constituir un evento importante para la consolidación del proceso maligno.

La formación endógena de 3 N-nitrosaminas ha sido frecuentemente implicada en la carcinogénesis gástrica (Kono y Hirohata, 1996). La proteína CYP2E1 es la

encargada del metabolismo de compuestos de bajo peso molecular, como son el etanol, 1-3- butadieno, N- nitrosodimetilamina, N-nitrosodietilamina y del potente carcinógeno específico del tabaco, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1- butanona (Yang et al, 1990). Debido a que en nuestros resultados se muestran que el CYP2E1 no es inducido en la transformación de la mucosa gástrica, los compuestos de bajo peso molecular mencionados tendrían poca influencia en el proceso de carcinogénesis gástrica (Rubin et al, 1967). Estudios epidemiológicos han tratado de relacionar el polimorfismo del CYP2E1 con cáncer de estómago así también han intentado correlacionar la exposición a nitrosaminas con mortalidad por cáncer gástrico y han arrojado datos inconclusos o negativos (Tsukino et al, 2002; Straif et al, 2000).

Por otra parte, la bioactivación de entidades químicas que constituyen substratos potenciales del CYP1A, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pueden tener un papel más relevante en la inducción del cáncer. Los resultados de Lee et al. (1998), quienes investigaron aductos en ADN por diol-epóxidos (BPDE-1-ADN) en tejido gástrico de pacientes con adenocarcinoma gástrico, indican un mayor número de aductos BPDE-1-ADN en tejido neoplásico que en tejido normal, esta es una evidencia más de soporte para la hipótesis mencionada. Además, gran cantidad de carcinógenos incluidos en las dietas humanas como son las aminas aromáticas PhIP, IQ, MeIQ y MeIQx requieren de activación metabólica por la subfamilia CYP1A (McManus et al, 1990; Tatemichi et al, 1999). También, en presencia de flavonoides, miembros de la subfamilia CYP3A son capaces de activar el MeIQ a un mutágeno, esto ha sido determinado mediante la prueba de AMES (McKinnon et al, 1992).

Por otro lado, Nakamura et al. (1990) reportaron que el estrés por restricción alimenticia, definida como la supresión diaria de alimento por 23 h por 5 días, induce úlceras gástricas acompañadas de un incremento en los niveles de cortisol y catecolaminas en plasma de ratones. Adicionalmente, Chou et al. (1993) reportó un incremento en la actividad hepática de CYP1A1 en ratas Wistar sujetas a una disminución del 40% en el consumo de alimento. En el caso de nuestro estudio y considerando los datos mencionados, existiría la posibilidad de que la reducción

en el consumo de alimento observado en los grupos expuestos a 18% y 24% de sal influyeran en las alteraciones histológicas y la modulación observada del CYP en mucosa gástrica. Sin embargo, dichos cambios también se produjeron en el grupo 3, en el cual no hubo disminución en el alimento consumido. Además, algunos otros reportes científicos han mostrado que la reducción en el consumo de alimento de hasta un 35%, correspondiente al consumo de los animales del grupo 5, tienen efectos benéficos como retardo en el envejecimiento, alargamiento del periodo de vida, y disminución en la incidencia de tumores espontáneos y de los inducidos químicamente en ratas y ratones (Masoro, 1985; Holehan y Merry, 1986; Turturro y Hart, 1992).

Podemos concluir que las lesiones de la mucosa gástrica como gastritis crónica, hiperplasia regenerativa y metaplasia intestinal están acompañadas por una inducción de las subfamilias CYP1A y CYP3A funcionales, lo que incrementa la posibilidad de que se permita la activación *in situ* de carcinógenos provenientes de la dieta y que sea un factor que promueva la neoplasia gástrica, propuesta incluida en la figura 5 del modelo de carcinogénesis gástrica.

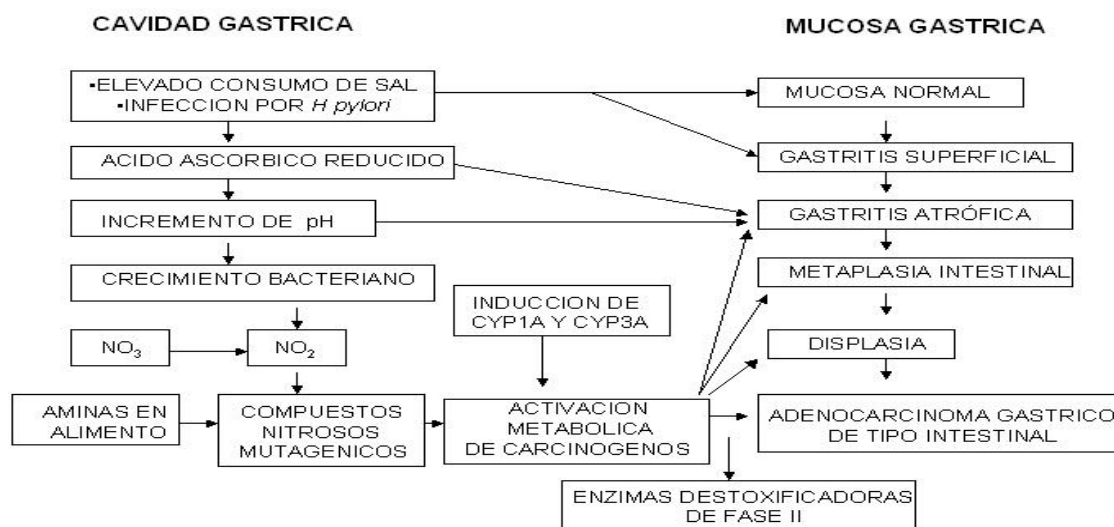


FIGURA 5. Diagrama hipotético de la secuencia de eventos en el proceso de carcinogénesis gástrica. (Esquema de Correa 1988 y Stemmermann 1994, modificado).

XI. REFERENCIAS

- Alexidis AN. (1996). Commandeur JN, Rekka EA. Novel piperidine derivatives inhibitory properties towards cytochrome P450 isoforms, and cytoprotective and cytotoxic characteristics. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1,81-88.
- Anttila S, Hietanen E, Vainio H, Gelboin HV, Park SS, Heikkila L, Karjalainen A and Bartsch H. (1991). Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P4501A in lung cancer patients. *Int J Cancer.* 47: 681-685.
- Asteinza J, Camacho-Carranza- R, Reyes-Reyes RE, Dorado-González V. and Espinosa-Aguirre JJ.(2000). Induction of Cytochrome P-450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Enviromental Toxicology and Pharmacology* 9: 31-37.
- Badawi AF, Stern SJ, Lang NP, Kadlubar FF (1996). Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res.* 395: 109-140
- Balanzo Tintore, J. (1979). Epidemiología del cáncer gástrico. *Gastrum*:12-15.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T and Mayer RT. (1985). Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem Pharmacol*, 34:3337.
- Chou MW, Kong J, Chung K, Hart RW. (1993). Effect of caloric restriction on the metabolic activation of xenobiotics. *Mutat. Res.* 295, 223.
- Christian TK, Stadtländer H and Waterbor J. (1999). Molecular epidemiology pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 20: 2195-2207.
- Correa P. (1988). A human model of gastric carcinogénesis. *Cancer Res.* 48: 3554-3560.
- Correa P. (1992). Human gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 52: 6735-6740.
- Dey A, Jones JE, and Nevert DW. (1999). Tissue and cell type -specific expression of Cytochrome P450 1A1 and Cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized in situ hybridization. *Biochemical Pharmacology* 58: 525-537.
- Ding X and Kaqminski L. (2003). Human Extrahepatic Cytochrome P450: Function in Xenobiotic Metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 149-173.

- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH and Correa P. (1996). Classification and Grading of Gastritis. The updated Sydney System. *Am J Surg Pathol.* 20:1161-1181.
- Estabrook RW. (1996). Cytochrome P450: From a single protein to a family of proteins- with some personal reflections. *Cytochrome P450 Metabolic and Toxicological Aspects.* Edit. Ioannides, C. New York, CRC Press: 3-28.
- Ferris TJ, García CJ y Berbel TO. (2001). Dieta y Cáncer Pediátrico. *Rev Esp Pediatr* 57(1):75-92.
- Fontham E, Zavala D, Correa P, Rodriguez E, Hunter F, Haenzel W and Tannenbaum S. (1986). Diet and chronic atrophic gastritis: a case control study. *J Natl Cancer Inst* 76: 621-627.
- Forman D. (1998). *Helicobacter pylori* infection and cancer. *Br Med Bull*; 54: 71-78.
- Foster JR, Idle JR, Hardwick JP, Bars R, Scott P, Braganza JM (1993). Induction of drug-metabolizing enzymes in human pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J. Pathol.* 169: 457-463.
- Fukayama M, Hayashi Y, Igasaki Y, Chong J, Ooba T, Takizawa T, Koike M, Mizutani S and Hirai K. (1994). Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma and Epstein- Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* 71: 73-81.
- Galli E and Feijoo L (2002). Citocromo P-450 y su importancia clínica: Revisión Actualizada. *Revista de Neuro-Psiquiatría.* 65; 187-201.
- González FJ and Nebert DW. (1990). Evolution of the P-450 gene superfamily: animal-plants “warfare”, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends in Genetics* 6: 182-186.
- González F and Gelboin H (1994). Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev.* 26: 165-183.
- González-Jasso E, López T, Lucas D, Berthou F, Manno M, Ortega A and Albores A. (2003). CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicology letters.* 144, 55-67.
- Graham, S., Haughey, B., Marshall, J., Brasure, J., Zielezny, M., and Freudenheim J. (1990). Diet in the epidemiology of gastric cancer. *Nutr. Cancer.* 13, 19-34.
- Guengerich FP and Shimada T (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 4: 391-407.
- Guengerich FP (1993). Cytochrome P-450 enzymes. *American Scientist.* 81(5): 440-447.
- Guengerich FP (1999). Cytochrome P-450 3A4: Regulation an role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 39: 1-17.
- Guengerich FP (2000). Metabolism of Chemical Carcinogens. *Carcinogenesis.* 21,345-351.

- Guengerich FP. (2002). Update information on human P450s. *Drug Metabolism Reviews*, 34 (1&2), 7-15.
- Haenszel W, Kurihara M, Segi M and Lee R. (1972). Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *J Natl Cancer Inst.* 49:969-988.
- Holehan AM, Merry BJ (1986). The experimental manipulation of aging by diet. *Biol. Rev.* 61, 329.
- Honkakoski P and Negishi M. (2000). Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* 347:321-337.
- Hukkanen J. (2000). Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. Oulu University Press. D621: 1-68. Disponible en: <http://herkules oulu.fi/isbn9514258649/pdf> (citado Abril, 2004)
- Hursting SD, Kari FW (1999). The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future directions. *Mutat Res.* 443: 235-249.
- International Agency for Research on Cancer. Infection with *Helicobacter pylori*. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1994). 61: 177-240.
- Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Hirasawa R, Sakai N, Yano H, Uehara H, and Nakaizumi A. (1999). Low-protein diet promotes sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Lett.* 141, 117-122.
- Josephy PD. (1997). Cytochrome P-450. En: *Molecular Toxicology*. Editado por: Josephy, PD, Mannervik, B y Ortiz de Montellano, P. New York: Oxford University Press: 209-252.
- Kawajari K and Hayashi S. (1996). The CYP1 family. En: *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides, C. New York, CRC Press: 77-97.
- Kivisto KT, Fritz P, Linder A, Friedel G, Beaune P, Kroemer HK (1995). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 3A in human pulmonary carcinomas and normal bronchial tissue. *Histochem. Cell Biol.* 103: 25-29.
- Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, et al. (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid-signaling pathway. *Cell* 92: 73-82.
- Kono S and Hinohata T. (1996). Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes and control* 7,41-55.
- Koop DR (1986). Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme. *3ª Mol Pharmacol.* 29: 399.
- Laemmli U.K (1970). Maturation of the head of bacteriophage T4I DNA packaging events. *Nature* 227,680.
- Landi MT, Sinha R, Lang NP and Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. In: Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J and Boffetta P (EDS). *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer: 173-195*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon.

- Lee BM, Jang JJ, Kim HS (1998). Benzo[a]pyrene diol-epoxide-I-DNA and oxidative DNA adducts associated with gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 125: 61-68.
- Lewis DFP, Eddershaw PJ, Dickins M, Tarbit MH, Goldfarb PS (1998). Structural determinants of Cytochrome P450 substrate specificity, binding affinity and catalytic ray. *Chem Biol Interact* 115: 175-199.
- Lieber CS. (1997). Cytochrome P-450E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 77: 517-544
- Lin JH y Lu AY. (1998). Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* Nov; 35 (5): 361-390
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RA. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Marshall BJ, Royce H, Annear DI, Goodwin CS, Pearman JW, Warren JR and Armstrong JA (1984). Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. *Microbios Lett* 25: 83-88.
- Maron DM and Ames BN. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Masoro E. (1985). Nutrition and aging-a current assessment. *J. Nutr.* 115, 842.
- Maya JF. (1995). Citocromo P-450 2E1 y diabetes. *Colombia Med* 26: 26-29.
- Mckay J, Murray G, Weaver R, Ewen SWB, Melvin W and Burke MD. (1993). Xenobiotic metabolizing enzyme expression in colonic neoplasia. *Gut.* 34,1234-1239.
- McManus ME, Felton JS, Knize G, Burgess SM, Roberts-Thomson S, Pon M, Stupans I and Veronese E. (1989). Activation of the food-derived mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b)pyridine by rabbit and human liver microsomes and purified forms of cytochrome P-450. *Carcinogenesis* 10 (2):357-363.
- McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Abdul-Aziz Z, McManus ME (1992) Metabolism of food-derived heterocyclic amines in human and rabbit tissues by P4503A proteins in the presence of flavonoids. *Cancer Res.* 52: 2108s-2113s.
- Miao W, Hu L, Kandouz M, Hamilton D, Batist G. 2004. A cell-based system to identify and characterize the molecular mechanism of drug-metabolising enzyme (DME) modulators. *Biochemical Pharmacology.*
- Minamoto T, Mai M and Ronai Z (1999). Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis* 20(4): 519-527.
- Murray GI, Weaver RJ, Paterson PJ, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD (1993) Expression of xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer. *J. Pathol.*169: 347-353.
- Murray G, Shaw D, Weaver R, Mckay J, Ewen SWB., Melvin W and Burke MD (1994). Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut.* 35, 599-603.

- Murray GI, Taylor MC, Burke MD, Melvin WT (1998). Enhanced expression of cytochrome P450 in stomach cancer. *Br. J. Cancer*. 77:1040-1044.
- Nakajima T, Wang RS, Nimura Y, Pin YM, He M, Vainio H, Murayama N, Aoyama T, Iida F (1996). Expression of cytochrome P450s and glutathione S-transferases in human esophagus with squamous-cell carcinomas. *Carcinogenesis* 17: 1477-1481.
- Nakamura K, Aoike A, Hosokawa T, Rokutan K, Koyama K, Nishi Y, Yoshida A. (1990). Effect of food-restriction stress on immune response in mice. *J. Neuroimmunol.* 30, 23.
- Nelson DR. 1998. Cytochrome P450 Nomenclature. En: *Methods in Molecular Biology, Vol 107: Cytochrome P450 Protocols*. Editado por: Phillips, IR y Shephard, EA. New Jersey: Humana Press Inc.: 15-24.
- Nims RA and Lubet RA. The CYP2B subfamily. *Cytochrome P450 Metabolic and Toxicological aspects*. Edit. Ioannides, C. New York, CRC press: 135-160.
- Parke DV, Ioannides C, Lewis DF (1991). The 1990 Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada keynote lecture. The role of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Can J Physiol Pharmacol.* 69: 537-549.
- Parkin D.M, Pisani P, Fearly J (1993). Estimates of worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*, 54: 594-606.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-García, Daujat M, Fabre JM, Maurel P and Vilare MJ (2000). Interleukin -6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 707-713.
- Peña C, Carter D y Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distribuido en Internet por Southwest Hazardous Waste Programa en el sitio <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>. (Citado Abril, 2004)
- Pisani P, Maxwell P, Muñoz N and Ferlay J (1997). Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 387-400.
- Ronis, MJJ., Lindros, KO. and Ingelman-Sundberg, M. (1996). The CYP2E Subfamily. En: *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides, C. New York, CRC Press: 211-39.
- Rubin W, Ross L, Jeffries G and Sleisenger M.(1967). Some physiologic properties of heterotopic intestinal epithelium. Its role in transporting lipid into the gastric mucosa. *Lab Invest.* 16,813-827.
- Ruckpaul K. 1989. Structural Aspects of cytochrome P-450, an introduction. En: *Cytochrome P-450*. Editado por: Shuster, I. Inglaterra: Taylor & Francis Printers: 21-29.
- Santiago C, Bandrés F y Gómez-Gallego F. (2002). Polimorfismos de Citocromo P450: Papel como Marcador Biológico. *Medicina del Trabajo*, Mayo-Junio, 11(3): 130-140.

- Sorbye H, Kvinnsland S and Svanes K (1994). Effect of salt-induced mucosal damage and healing on penetration of N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine to proliferative cells in the gastric mucosa of rats. *Carcinogenesis*. 15, 673-679.
- Stemmermann GN. (1994). Intestinal metaplasia of the stomach. *Cancer* 74: 556-564.
- Straif K, Keil U, Taeger D, Holthenrich D, Sun Y, Bungers M, Weiland SK (2000). Exposure to nitrosamines, carbon black, asbestos, and talc and mortality from stomach, lung, and laryngeal cancer in a cohort of rubber workers. *Am. J. Epidemiol.* 152: 297-306.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P and Negishi M (1999). The repressed nuclear receptor CAR responds to Phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem* 274: 6043-6046.
- Sugimura T (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000, 21: 387-395.
- Tatemichi M, Nomura S, Ogura T, Sone H, Nagata H, Esumi H (1999). Mutagenic activation of environmental carcinogens by microsomes of gastric mucosa with intestinal metaplasia. *Cancer Res* 59: 3893-3898.
- Thummel KE and Wilkinson GR (1998). In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 38: 398-430.
- Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S and Sato E.(1993). Epstein- Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 143: 1250-1254.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76,4350.
- Tsukino H, Kuroda Y, Qiu D, Nakao H, Imai H, Katoh T (2002). Effects of cytochrome P450 (CYP) 2A6 gene deletion and CYP2E1 genotypes on gastric adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 100: 425-428.
- Turturro A and Hart RW (1992). Dietary alteration in the rates of cancer and aging. *Exp Gerontol.* 27, 583.
- Vermeulen NPE (1996). Role of Metabolism in Chemical Toxicity. En: *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Edited por: Ioannides, C. New York, CRC Press: 29-53.
- Yang CS, Yoo JS, Ishizaki H, Hong JY (1990). Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug. Metab. Rev.* 22: 147-159.