

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

INTERACCION DEL CARCINOGENETICO N-HIDROXI-
2-ACETILAMINOFUORENO CON EL ACIDO RIBONU-
CLEICO DEL HIGADO DE LA RATA, "IN VITRO"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

MARIA ELENA SANDOVAL BERNAL

MEXICO, D. F.

1967



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES.

A MIS HERMANOS

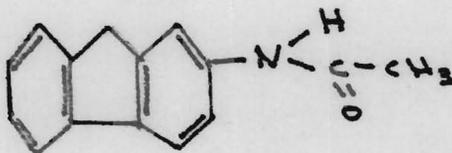
CON AGRADECIMIENTO AL DR.
FERNANDO MARROQUIN Y A ELISA.

INTERACCION DEL CARCINOGENETICO N-HIDROXI-
2-ACETILAMINOFLUORENO CON EL ACIDO RIBONUCLEI
CO DEL HIGADO DE LA RATA, "IN VITRO" .

INTRODUCCION .

Actualmente se considera que un carcinógeno es un agente que incrementa la producción de neoplasmas malignos en una población y se sabe que muchos agentes químicos, físicos y biológicos pueden producir neoplasias. Entre los agentes químicos -- conocidos como carcinogénicos, se encuentra el 2-acetilamino - fluoreno (N-2-fluorenilacetamida, 2-acetamidofluoreno, 2-AAF, -- AAF) una amina aromática ampliamente estudiada desde el punto de vista experimental.

En 1941, Wilson, De Eds y Cox (1) señalaron que la --- 2-fluorenilacetamida, acetyl derivado del acetilaminofluoreno -- patentado como insecticida por Claborn y Smith (2), era tóxico - en ratas y ratones. De la serie de experimentos que llevaron a - cabo, el descubrimiento más importante se hizo en la autopsia de - animales sobrevivientes a 100 días de dieta con cantidades varia - bles de 2-fluorenilacetamida, en los que se observó que los hí - gados presentaban características peculiares, tales como aumento de volumen, color amarillento y aspecto nodular, además de notarse que numerosos tumores afectaban gran variedad de órganos y tejidos. A partir de este descubrimiento, numerosos investigadores han estudiado la carcinogenicidad, metabolismo e interacción - con macromoléculas del acetilaminofluoreno, tratando de dilucidar el proceso por medio del cual se llega a la formación de neoplasmas después de su aplicación.



N-2-FLUORENILACETAMIDA

ACCION CARCINOGENETICA.-

El acetilaminofluoreno (AAF) produce tumores en diferentes órganos y tejidos; su efecto es dependiente de la especie y de la dieta y se ha observado que es susceptible de modificación por el sexo.

Su efecto carcinogénico ha sido estudiado en varias especies: pollo, ratón, gato, perro, mono, hamster, cuyo, conejo, y rata, presentando la mayoría una cierta susceptibilidad. Existen datos en la literatura (4, 8, 12, 19) que han demostrado que el cuy y la rata algodонера son refractarios, en tanto-- que en conejos solamente se presentan tumores en vejiga, uretra y pelvis (9, 10) y la rata es la especie más sensible (4).

La rata desarrolla tumores en el hígado, conducto auditivo, estómago anterior y pulmón. Respecto a tumores hepáticos, son considerablemente más sensibles los machos que las --

hembras, las que presentan un mayor tiempo de latencia; además, las hembras desarrollan tumores en las glándulas mamarias dependiendo de la edad a la que se les trata con el carcinógeno. Cuando maduras, los tumores aparecen después de 5 1/2 meses --- como nódulos subcutáneos (5), presentándose con una incidencia muy alta en ratas jóvenes y decreciendo cuando se aplica a ratas viejas (6, 7).

En contacto con los tejidos, los carcinógenos, como otros compuestos, son atacados por enzimas u otros constituyentes de los tejidos del huésped. En la mayoría de los casos, --- gran parte del metabolismo parece llevar a la formación de compuestos de carcinógenos y éstos constituir rutas de detoxificación; sin embargo, una o más rutas pueden resultar en la formación de metabolitos con actividad carcinogénica igual o mayor que la del compuesto administrado. Los productos de este metabolismo han sido llamados metabolitos carcinogénicos próximos.

En el caso del AAF han sido citados como metabolitos urinarios, en rata, derivados hidroxilados en los carbonos 1, - 3, 5, 7, y 8, tanto en forma conjugada (como glucurónidos o conjugados con el ácido sulfúrico) como libre (4, 17), además del derivado N-hidroxilado N-hidroxi-acetilaminofluoreno (N-CH-AAF) que aparece como glucurónido (13), y cuya cantidad excretada se incrementa a medida que la alimentación con el carcinógeno progresa.

En trabajos recientes sobre la acción carcinogénica de los metabolitos hidroxilados, se ha demostrado que la N-hidroxilación de aminas y amidas aromáticas es frecuente y que los N-hidroxi-metabolitos de las aminas aromáticas carcinógenas, son más activos y frecuentemente más carcinógenos que el compuesto de origen, produciendo tumores en sitios donde éste es inactivo (3); así, Miller y Miller (14) han encontrado que el N-hidroxi-acetilaminofluoreno (N-OH-AAF), es más activo como carcinógeno en la rata, observándose que si se administran dosis equimolares de AAF y N-OH-AAF en la dieta, el derivado N-hidroxilado es más tóxico que el AAF, manifestándose esta toxicidad por una gran pérdida de peso a los 30 días, incrementada al tercer mes; además se presenta un alto porcentaje de mortalidad entre las ratas tratadas. A los tres meses de dieta, observaron grandes tumores en 3 de las ratas alimentadas con N-OH-AAF, mientras que no encontraron ninguno en las ratas alimentadas con AAF; asimismo, el metabolito N-hidroxilado produjo más carcinomas del conducto auditivo, adenocarcinomas del intestino delgado e indujo neoplasias en sitios donde el AAF es inactivo (estómago y peritoneo).

Estudios comparativos del metabolismo del AAF en rata, conejo y cuyo (7, 15, 16), sugieren una posible importancia de los mecanismos de N-hidroxilación del AAF durante el metabolismo, en el proceso de carcinogénesis inducida por este

agente. Orinas hidrolizadas con glucoronidasa, revelan diferencias notables entre los metabolitos producidos por ratas y cuyos después de una sola dosis de 914 C-AAF, mientras que la rata -- convierte el carcinógeno a N-, 1-, 3-, 5-, 7- y 8- hidroxiderivados, sólo los tres últimos pueden ser detectados en la orina del conejo. La hidroxilación en la posición para (carbono 7) ocurre en ambas especies, sin embargo el conejo excreta del 70 al 90% de la dosis como ácido glucorónico del 7-OH-AAF, lo que sugiere que este metabolito sea, principalmente, una vía de detoxificación, debido a que el conejo es resistente a los efectos -- carcinogénicos del AAF.

En relación a la dosis ingerida de AAF, podemos considerar que existe mayor excreción del derivado N-hidroxilado en el conejo que en la rata (10). Por otra parte, el conejo excreta los 3- y 7 - hidroximetabolitos en menor cantidad.

Los conejos son altamente refractarios a los efectos -- carcinogénicos del AAF (4) y ha sido demostrado (15) que no es -- metabolizado, en esta especie, al derivado N-hidroxilado correspondiente, sin embargo, Miller et al (16) han encontrado que en conejos tratados con N-OH-AAF se producen adenocarcinomas en el -- intestino delgado, después de 28-32 meses de aplicación continua, sin encontrar daño en hígado. Observaron asimismo que la -- administración de este agente produce una excreción del 3 % del derivado N-hidroxilado, aproximadamente, a diferencia del meta-

bolito 7-hidroxilado que se excreta en grandes cantidades.

Confirmando la actividad carcinogénica del N-OH-AAF observada en otras especies, Irving y col. (11) encontraron, en conejos inyectados subcutáneamente con dicho agente, sarcomas - en el sitio de inyección, así como una alta incidencia de tumores intraperitoneales cuando se administró intraperitonealmente, siendo más carcinógeno que el AAF. Sin embargo, cuando se proporcionó oralmente, esta mayor actividad no fue apreciada.

Estas investigaciones demuestran que los metabolitos-hidroxilados en el sistema aromático (los derivados 1-, 3-, 5-, 7- y 8 - hidroxilados), son productos de detoxificación (15, 16, 17), mientras que el derivado hidroxilado en el N-(N-OH-AAF) es un metabolito carcinógeno próximo (14).

INTERACCION CON MACROMOLECULAS.-

Recientemente se ha descubierto que los carcinógenos-químicos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos de los tejidos del huésped; la relación de estas macromoléculas -- con la herencia celular, hace suponer que tal interacción pueda ser importante en el mecanismo de formación de tumores.

UNION A PROTEINAS.-

La evidencia de una interacción directa entre un carcinógeno y proteínas tisulares, fue presentada por primera vez por Miller y Miller en 1947 (18). En sus estudios sobre los colorantes azoados carcinogénicos notaron que en ratas tratadas con N,N-dimetil-p-fenilazoanilina (4-dimetilaminoazobenceno), - una fracción del colorante se encontraba firmemente unida al -- hígado, no pudiendo separarse aún cuando se emplearon varios métodos de extracción, sólo la hidrólisis de las proteínas hepá - ticas deshacía la unión. Observaron, además, que el colorante - sólo se unía al tejido de ataque, principalmente hígado de ra - tas, del compuesto carcinogénico y no al mismo órgano de espe - cies resistentes.

En estudios posteriores se demostró que diversos agen - tes carcinogénicos se unían a proteínas tisulares. Diversos -- autores han encontrado que la administración de 9^{14} -C-AFF o su derivado 9^{14} C-N-hidroxilado, a ratas, se traduce en una incor -

poración del isótopo a las proteínas de todos los órganos examinados; generalmente el órgano al que se incorporó mayor radiactividad fue el hígado (R). Por otra parte, Miller y col. (8) observaron que el nivel más alto de 9^{14}C -AAF estaba unido a proteínas hepáticas en las especies susceptibles y era menor en aquellas refractarias. De una manera semejante, la administración del N^{15} -AAF resulta en el enriquecimiento de ^{15}N de la proteína hepática.

Debe hacerse notar que siendo el AAF resistente a la acción carcinogénica del AAF, se ha observado que si es sensible al metabolito carcinógeno próximo (N-OH-AAF), aún cuando no presenta tumores hepáticos. Se ha demostrado que cuando se administra 9^{14}C -AAF, la unión a proteína es mínima (19, 20) además, se ha notado un incremento en el porcentaje de unión cuando el compuesto administrado es el derivado N-hidroxilado-marcado con ^{14}C . Este incremento también ha sido observado en rata. Por otra parte, Dyer (21) ha demostrado que el AAF presenta un menor aumento en el contenido en ^{15}N de proteínas hepáticas después de la administración de ^{15}N -AAF, con respecto a la rata.

Estudios del efecto del tiempo sobre la unión del carcinógeno a proteínas en ratas alimentadas con 9^{14}C -AAF han demostrado que después de una sola dosis, la radiactividad en proteínas aumenta conforme pasa el tiempo (22). Por otra parte,

se ha demostrado que a diferentes dosis, la radiactividad del - carcinogénico se encuentra firmemente unida a proteínas (19).

En párrafos anteriores se ha mencionado la influencia ejercida por el sexo en la incidencia y período de latencia en la inducción de cáncer hepático por AAF en rata, siendo las hembras las que presentan menor incidencia y mayor tiempo de latencia. También se han observado diferencias en ambos sexos con respecto a la unión del carcinógeno o proteínas; se encontró que los machos alimentados con 9^{14}C -AAF, unían más carcinógeno (o un metabolito) a la proteína hepática que las hembras tratadas en las mismas condiciones. Datos consistentes con la diferente susceptibilidad, en ambos sexos, a la carcinogénesis por AAF.

Weisburger (22) ha sugerido que la reacción que conduce a la unión del carcinógeno radiactivo a las proteínas hepáticas es probablemente un proceso metabólico, sobre las bases de que si se homogeneiza el hígado de rata con 9^{14}C -AAF o su derivado $\text{N-OH-}9^{14}\text{C}$ -AAF, no se encuentra radiactividad en las proteínas. Esta hipótesis se apoya en los datos de Sorof et al. (23) que demuestran que los colorantes azoados carcinógenos unidos a proteínas solubles de hígado, emigran en un campo electroforético con una subclase de proteínas (clasificadas como h_2 "lentas", con un peso molecular aproximado de 49,000) que aumentan en los estados primarios de carcinogénesis por AAF y -

colorantes azoados carcinogénicos , mientras que no aparecen cambios en dichas proteínas en ratas a las que se ha administrado colorantes azoados no carcinogénico .

Recientemente De Baun y col. (34) han encontrado que el N-acetoxi-AAF, éster del N-OH-AAF, y con mayor actividad -- carcinogénica (35, 36), reacciona con proteínas, "in vitro", a través de algunos de sus constituyentes, tales como metionina, tirosina, triptofano y cisteína (35), mientras que el AAF y el N-OH-AAF son inactivos. Sin embargo, "in vitro", la forma de unión del AAF a proteínas, incluye AAF unido en la posición 3, al azufre de un residuo de metionina; y después de dosis orales de AAF o N-OH-AAF la proteína de hígado de rata, previo -- tratamiento alcalino, produce 3-metil-mercapto-acetilaminofluoreno ($3-S-CH_3-AAF$), producto encontrado después de la reacción, "in vitro", del N-acetoxi-AAF con proteínas hepáticas. Después de la administración subcutánea de AAF, N-OH-AAF o N-acetoxi-AAF a ratas, e hidrólisis de la proteína subcutánea, se obtuvo $3-CH_3-S-AAF$ en cantidades variables, de acuerdo con la potencia del carcinógeno administrado, siendo menor en las ratas -- tratadas con AAF y mayor en los casos de la administración --- de N-acetoxi-AAF.

Se ha sugerido que la unión a proteínas puede tener un papel importante en la inducción de cáncer por agentes químicos (3), sin embargo, el mecanismo de carcinogénesis química

no ha sido elucidado hasta ahora. Todos los carcinógenos químicos que se han estudiado, se unen a proteínas del tejido del hueso -- ped, pero otras sustancias, no carcinógenas, lo hacen. Es posible que el fenómeno pueda ser un estado esencial en el proceso carcinogénico, sin embargo se requiere mayor evidencia experimental para demostrar dicha posibilidad.

INTERACCION CON LOS ACIDOS NUCLEICOS.-

Actualmente se considera que la carcinogénesis química puede estar relacionada, de algún modo, a alteraciones en la estructura de los ácidos nucleicos. Los primeros estudios para investigar esta posibilidad fracasaron, porque la sensibilidad de los métodos no era apropiada. El uso de carcinógenos marcados con isótopos y las modernas técnicas para el aislamiento -- de los ácidos nucleicos, abrieron un nuevo campo en la investigación de la interacción de carcinógenos químicos con los ácidos nucleicos u. otras macromoléculas, así como posibles efectos de tales compuestos.

Heidelberger y Davenport (24), Farber y Magge (25) -- y Stekal et. al. (26), fueron los primeros investigadores que -- presentaron evidencia experimental de la interacción de carcinógenos químicos con ácidos nucleicos, con la idea de que tal -- interacción pueda ser un paso en la carcinogénesis. Weisburger y col. (4) habían sugerido la posibilidad de interacción del -- AAF "in vivo" , con los ácidos nucleicos, lo que fue confirmado por Marroquín y Farber (27), quienes observaron que el 2-9¹⁴ - C-AAF se une al ácido ribonucleico (RNA) hepático de la rata, - "in vivo" , en cantidades iguales o ligeramente menores que a -- proteína; demostrando que se trata de una unión real y firme, -- ya que en condiciones de reflujo a ebullición en una mezcla de cloroformo-metanol por 6 horas, no se desprende el material ---

radiactivo; además, la incubación con el RNA marcado, con ribonucleasa extrajo una tercera parte de la radiactividad en una firma dializable. En favor de que la reacción no representa una simple combinación entre RNA y AAF no alterado, está el hecho de que, aunque el AAF es más soluble en éter que en medio acuoso, el material radiactivo en el RNA permanece en la fase acuosa, después de la hidrólisis con HCl, aún cuando se extraiga repetidamente con éter. Se anuló la posibilidad de una contaminación con proteína de elevada actividad específica, ya que la de terminación de proteína de las muestras de RNA indicó un contenido proteico máximo de 0.8%, y muy pocas cuentas fueron desprendidas del RNA marcado se incubó con tripsina. Esta interacción ha sido estudiada, comparativamente, en varias especies, (17, 28, 29) y se ha observado que puede correlacionarse a la diferente susceptibilidad presentada al carcinogénico y con la potencia del mismo.

En el caso del N-OH-AAF, se ha encontrado siempre que la unión es considerablemente mayor que cuando se administra 9^{14} C-AAF, en rata. En cuyos tratados con 9^{14} C-AAF se observó una unión mínima a RNA, incrementándose en aquellos a los que se había administrado 9^{14} C-N-OH-AAF. Sin embargo, Irving (29) demuestra que el 9^{14} C-AAF administrado a conejos, también se une al RNA hepático, a pesar de que esta especie no es susceptible a los efectos hepatotóxicos ocasionados por este agen -

te .

Estos datos apoyan la hipótesis de que la interacción con ácidos nucleicos y los procesos de N-hidroxilación sean de interés en la carcinogénesis por agentes químicos.

En las investigaciones que se han efectuado para dilucidar el tipo de unión entre los carcinógenos AAF y N-OH-AAF (o uno de sus metabolitos) con los ácidos nucleicos, se han encontrado varios derivados, tales como los ésteres fosfatados o sulfonatados del N-OH-AAF, y los N-acetoxi-derivados, que llevan a cabo una interacción con la guanosina del RNA y del DNA.

Estudios realizados por Kriek (31), demuestran que -- el N-OH-aminofluoreno (N-OH-AAF) reacciona, "in vitro", a pH -- menor de 6, con RNA y DNA de levadura, cuyo producto tiene un espectro de absorción diferente al observado para el ácido ---- nucleico puro; encontrando después de la hidrólisis del producto, un decremento considerable en el contenido de ácido guaní - lico. Por otra parte, Miller y Miller (32) y Kriek et. al. (33) han observado la reacción "in vitro" , no enzimática, del N-ace toxi-AAF con la guanina del RNA y del DNA de esperma de salmón - (reacción que produce la alteración del espectro de absorción - del ácido nucleico, así como del contenido en guanina), en tan to que el AAF y el N-OH-AAF fueron inactivos. Este producto --- ha sido identificado como 8(N-2 fluorenilacetamida) guanosina,-

el cual también se obtiene al interaccionar el N-acetoxi-derivado con guanosina, "in vitro". El espectro de absorción -- de este compuesto demuestra que tiene tanto la base como el -- núcleoaminofluoreno (la ribosa y de-oxi-ribosa fueron separadas durante la hidrólisis drástica, por lo que probablemente -- no intervienen en la reacción.

Lotlikar y col. (35) han encontrado que el N-acetoxi AAF reacciona con el carbono 8 de la guanosina, en tanto que -- no lo hace con timina, citosina y uracilo; la reacción con --- adenosina es, aproximadamente, un 4 % de aquella de la guanosina. AAF y N-OH-AAF no reaccionaron con ninguna base.

De Baun y col. (34) observaron que después de la inyección intraperitoneal de 9^{14} C N-OH-AAF, y digestión del RNA hepático con fosfatasa alcalina y diesterasa, la cromatografía de los nucleótidos radiactivos reveló un Rf para éstos, semejante al de N(8-guanosinil)AAF.

Aparentemente, "in vitro" , la unión de AAF y N-OH - AAF a proteína y RNA, ocurre por una vía metabólica de ésteres del N-OH-AAF. Correspondientemente, algunos N-acetoxi-derivados son carcinógenos subcutáneos más fuertes que el compuesto -- de origen N-hidroxilado (34,36). Es de interés hacer notar -- que estudios realizados por Dyer (21) con 15 N, e Irving (29) -- con 9^{14} C-N-OH-AAF (marcado en el anillo aromático) y con --- 9^{14} C-N-OH-AAF (marcado en el grupo acetilo) indica que, du -



rante la acción con macromoléculas, se conserva el grupo acetilo, así como el sistema aromático, cuando se administra a ratas AAF o uno de sus derivados carcinógenos.

Por la posible importancia de la unión "in vivo" del N-OH-AAF al RNA hepático de la rata y su probable relación con el mecanismo de formación de tumores, se consideró de interés conocer si existen sistemas que lleven a cabo tales reacciones, "in vitro", en el hígado de la rata.

MATERIAL Y METODOS. _

En el desarrollo de este trabajo se emplearon ratas-macho (Wistar) de la colonia del Instituto de Biología, y además cuyos y conejos (machos) de procedencia no controlada, mantenidos con dieta "ad libitum" con Purina Laboratory Chow.

Las sustancias radiactivas usadas, N-OH-AAF (actividad específica 2.9 m/mM), AAF (3.1 m/mM) y Fluoreno (F, 14.47 m/mM), marcados en la posición 9 con C¹⁴ se adquirieron en --- Tracer Lab. Co.

Los animales fueron sacrificados por decapitación -- y se extrajo el hígado rápidamente, se pesaron 2.65 g y se homogeneizaron inmediatamente, en frío, en 8 ml. de buffer de -- maleato 0.5 M a pH 7.5, que contenía 0.08 mM de 2-mercapto etanol y 0.08 mM de cloruro de manganeso. Dependiendo del experimento se tomaron diferentes alícuotas del homogeneizado y se -- llevaron a los frascos de incubación, mezclándose con 15 mg de RNA por muestra (Las determinaciones se llevaron a cabo por -- duplicado). El compuesto carcinogénico (N-OH-AAF o AAF) o el fluoreno, se añadió en amortiguador de maleato 0.5 M a pH -- 7.5. La incubación se hizo a 37 °C en atmósfera de aire y -- agitación constante. Para medir la unión del carcinógeno al RNA éste se extrajo por una modificación al método de Kirby (19, -- 37), para lo cual se tomaron muestras de 10 ml de la mezcla de

incubación, por duplicado, y se detuvo la reacción con 5 ml de una solución fría de naftalen sulfonato disódico al 1.5 % y -- 15 ml de una solución de fenol (500 g de fenol, 55 ml de agua, 0.5 g de 8-quinolinol), agitando durante 15 minutos y centri - fugando a 12,000 rpm durante 20 minutos. Se obtuvo la capa --- acuosa y se precipitó con 2 volúmenes de alcohol al 96%, ---- frío, permaneciendo en el congelador durante toda la noche. El precipitado se disolvió en 3 ml de agua, 3 ml de buffer de fosfatos, 2.5 M a pH 7.5 y 3 ml de metil celosolve; se centri - fugó por 15 minutos a 2,000 rpm y se obtuvo la capa acuosa. Se precipitó con 10 volúmenes de ácido acético glacial, frío, - y se mantuvo en el congelador durante una hora. El precipitado se lavó dos veces con dos volúmenes de etanol y 2 veces con 2 - volúmenes de éter, se secó, y muestras de 1 mg se colocaron -- en un papel filtro, midiéndose la radiactividad en un Contador de flujo continuo (Nuclear Chicago, Mod. 151 A)

Después de los experimentos preliminares, cuyos re - sultados indicaron que el homogeneizado de hígado de rata ---- unía la radiactividad del carcinogénico 9^{14}C N-OH-AAF al --- RNA, se efectuaron diversos experimentos en los que se vió --- la influencia del tiempo, de la concentración del homogeneiza - do y la concentración del carcinogénico, en dicha incorpora - ción.

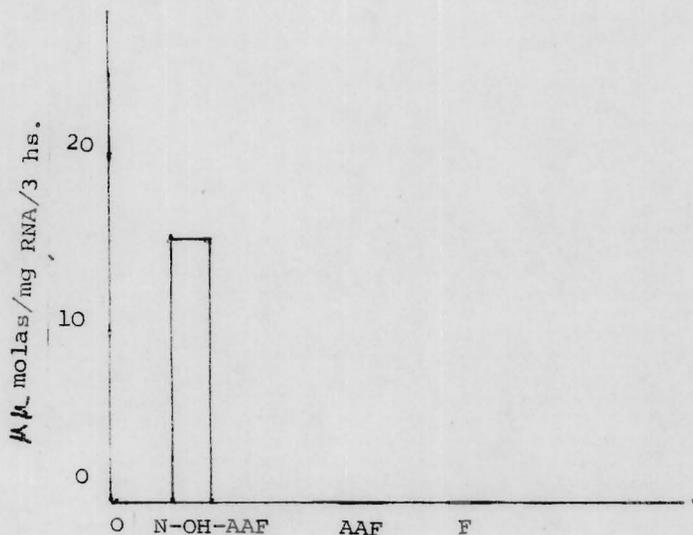
RESULTADOS. _

UNION DEL N-OH-AAF-914 C AL RNA EN PRESENCIA DE HOMOGENEIZADO DE HIGADO DE RATA. _

2.65 g de tejido hepático se homogeneizaron en 8 ml de buffer de maleato 0.5 M a pH 7.5, con 0.08 mM de 2-mercapto-etanol y 0.08 mM de MnCl₂, y se incubaron en presencia de 30 mg de RNA y 2 μ C de N-OH-AAF 9¹⁴C, en un volumen de 20 ml de buffer de maleato 0.5 M a pH 7.5; se tomaron alícuotas de la mezcla de incubación a tiempo cero y a las 3 horas se llevó a cabo la extracción de RNA como se indicó anteriormente, no detectándose radiactividad en las muestras obtenidas al tiempo cero, -- mientras que en las que se incubaron durante 3 horas, se encontraron 15 μ molas del carcinogénico unidas al RNA (fig. I).

EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION. _

Se incubaron 150 mg de RNA y 10 μ C de 9¹⁴C-N-OH-AAF, en presencia del homogeneizado de 2.65 g de hígado en un volumen final de 100 ml en buffer de maleato 0.5 M a pH 7.5; alícuotas de 10 ml, por duplicado, se tomaron a diferentes tiempos: 0, 10, 20, 40 y 80 minutos. Como se observa, en la figura II, la unión del carcinógeno al RNA se incrementa, de una manera lineal, conforme pasa el tiempo.



molécula radiactiva

FIG. I.- Unión del N-OH-AAF al RNA en presencia de homogeneizado de hígado de rata.

EFECTOS DE LA CONCENTRACION DEL HOMOGENEIZADO.-

150 mg de RNA y 10 μ C de 9 ¹⁴ C-N-OH-AFF se incubaron en un volumen final de 100 ml en buffer de maleato 0.5 M, a pH 7.5, en presencia de concentraciones variables de homogeneizado hepático (288 mg/ml). Este homogeneizado se diluyó 1:10, -- en otro caso la dilución fue de 1:20, y en otro más, se tomó-- una alícuota de la primera dilución y se hirvió; en estas condiciones se añadieron a los frascos de incubación. Las reacciones se pararon a los 0, 10, 20, 40 y 80 minutos. En la figura II, se muestra la magnitud de la incorporación del carcinogénico al RNA; se puede observar que a mayor concentración del homogeneizado, se presenta un aumento de la radiactividad unida al RNA, mientras que cuando se hirvió previamente, no se detectó el carcinogénico unido al RNA. En esta figura también puede observarse que las dos concentraciones mantienen una relación directa del grado de unión del carcinogénico con respecto al tiempo.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL CARCINOGENETICO.-

Diferentes concentraciones de 9 ¹⁴ CN-OH-AAF (0.5, 1, y 1.5 molas) en presencia de homogeneizado hepático, 30 mg de RNA en 20 ml de buffer de maleato 0.5 M a pH 7.5, se incubaron durante 20'. En la figura III se presentan los resultados de este experimento; como puede verse, la unión del carcinoge-

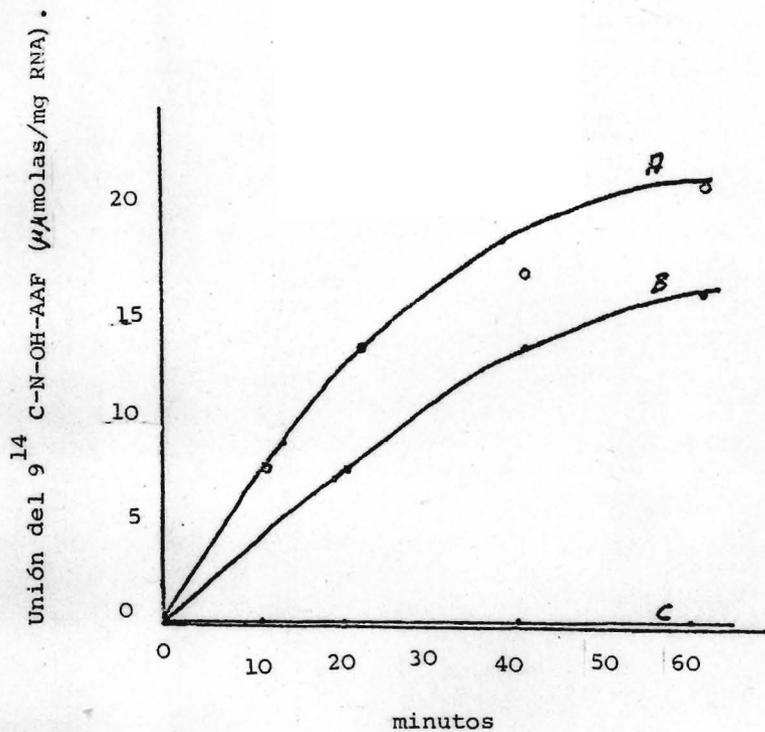


FIG. II.- Efecto del tiempo de incubación y concentración del homogeneizado en la unión del 9^{14} C-N-OH-AAF al RNA. Curva A dilución 1:10. Curva B, dilución 1:20. Curva C, dilución 1:10, con homogeneizado hervido.

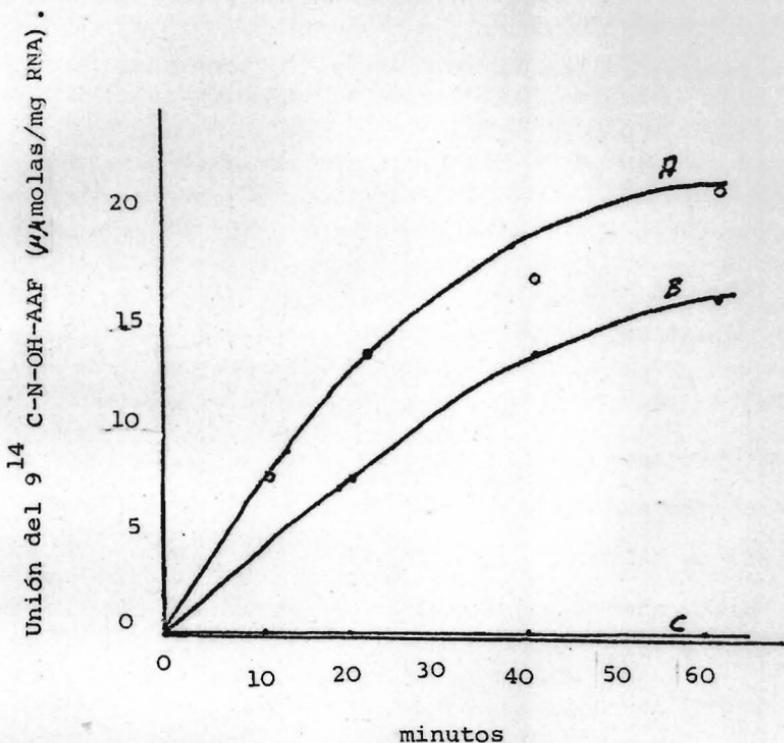


FIG. II.- Efecto del tiempo de incubación y concentración del homogeneizado en la unión del 9^{14} C-N-OH-AAF al RNA. Curva A dilución 1:10. Curva B, dilución 1:20. Curva C, dilución 1:10, con homogeneizado hervido.

nético al RNA hepático, aumenta en relación directa a su concentración (la unión fué de 20, 26 y 38 μ molas, respectivamente).

Después de tratamiento energético con una mezcla de -- cloroformo-etanol y a ebullición, la radiactividad del carci -- nógeno unida al RNA no se perdió. Esto indica que se trata de una unión real y no de un simple proceso de adsorción.

EFEECTO DE LA INCUBACION CON 9^{14} C-AAF O 9^{14} C-F.-

Experimentos en que se incubó el homogeneizado de -- hígado de rata con 9^{14} C-F, en iguales condiciones que los ex -- perimentos anteriores, no se encontró radiactividad en el RNA -- extraído después de 3 horas de incubación. Por otra parte, --- cuando 2.65 g de tejido hepático se homogeneizaron en buffer -- Tris-maleato 0.2 M a pH 8.0 y 0.08 mM de 2-mercapto etanol y -- 0.08 mM de MnCl, se incubaron con 150 mg de RNA y 10 C de 9 C AAF en un volumen final de 100 ml con buffer Tris-maleato 0.2- M a pH 8.0, y se tomaron muestras para determinación de radiac -- tividad en RNA a diferentes intervalos (9, 30, 60, 120 y 240 -- minutos) ésta no se detectó en ninguno. (fig. 1) .

UNION "IN VITRO" DEL 9^{14} -C-N-OH-AAF EN DIFERENTES -- ESPECIES. _

Se llevó a cabo un experimento con tejido hepático -- (576 mg de tejido) correspondiente a cada una de las especies

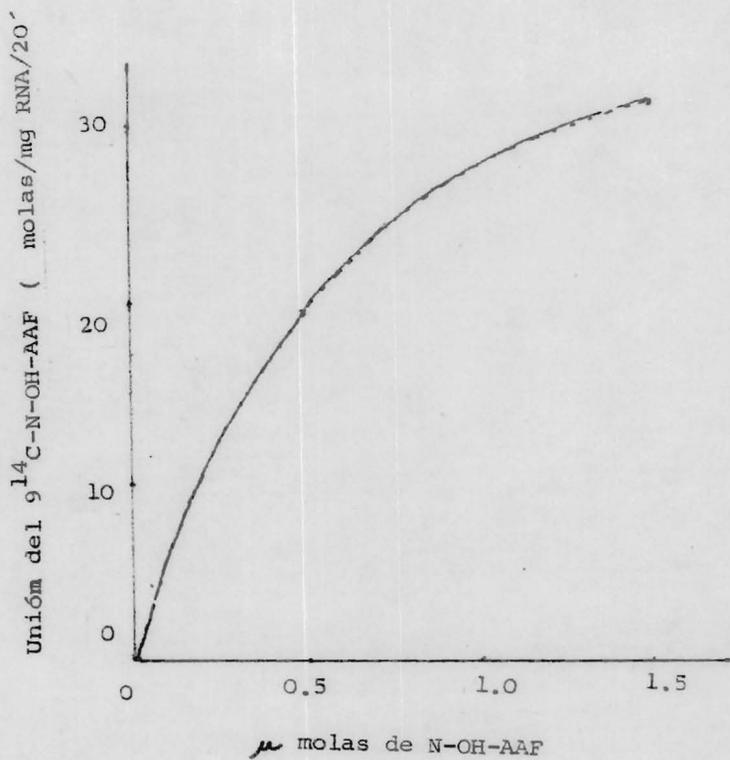


FIG. III.- Efecto de la concentración del 9^{14}C N-OH-AAF, en su unión al RNA.

(rata, cuyo y conejo). El homogeneizado se hizo en buffer de maleato 0.5 M pH 7.5, con 0.08 mM de 2-mercapto etanol y 0.08 mM de MnCl. Estos se incubaron durante 20' con 30 mg de RNA y 2μ C de $^9\text{C-N-OH-AAF}^{14}$ en un volumen final de 20 ml con buffer de maleato 0.5 M a pH 7.5.

En otro experimento, los animales se mantuvieron en ayuno durante 24 horas, tiempo después del que se sacrificaron. Se pesaron 2.65 g de hígado, en cada caso, y se homogeneizaron en 8 ml de buffer Tris-maleato 0.2 M, a pH 8.0 (conteniendo 0.08 mM de 2-mercapto etanol y 0.08 mM de MnCl), y se incubaron 576 mg de tejido con 30 mg de RNA y 2μ C de $^9\text{C-N-OH-AAF}^{14}$ en un volumen de 20 ml de buffer Tris-maleato 0.2 M a pH 8.0.

Los resultados en la tabla 1 muestran la unión del carcinogénico con el RNA en tejido hepático de rata, cuyo y conejo, "in vitro". Puede observarse que la unión del $^9\text{C-N-OH-AAF}^{14}$ al RNA, se lleva a cabo en presencia de dos soluciones amortiguadoras diferentes a pH distintos y en animales en ayuno comparados con aquellos alimentados "ad libitum".

TABLA I

UNION DEL ^{14}C -N-OH-AAF AL RNA DEL HIGADO
 "IN VITRO" , EN 3 ESPECIES DE ROEDORES

ESPECIE	EXPERIMENTO	$\mu\text{molas/mg RNA}$
RATA	I*	16.4
CUYO		12.7
CONEJO		7.0
<hr/>		
RATA	II*	127.8
CUYO		36.0
CONEJO		197.0

* Incubación en buffer de maleato 0.5 M a pH B 7.5

**En este experimento se incubó en amortiguador Tris-maleato 0.2 M, a pH 8.0. Los animales se mantuvieron en ayuno de 24 horas antes del sacrificio.

DISCUSION.-

Actualmente se considera que en la producción de neoplasias un carcinógeno químico, o un metabolito carcinogénico, debe reaccionar en una forma relativamente específica con los constituyentes celulares. Recientemente se ha llegado al conocimiento de una gran variedad de agentes químicos carcinogénicos que llevan a cabo interacciones con macromoléculas celulares, tales interacciones parecen ser importantes porque su magnitud se relaciona con la potencia del carcinógeno (3), como ha sido demostrado "in vivo", con el potente carcinógeno N-hidroxi-acetilaminofluoreno. respecto al compuesto de origen, acetilaminofluoreno. Los resultados obtenidos en este trabajo observan, "in vitro", una relación paralela respecto al comportamiento "in vivo", del carcinógeno AAF y su derivado N-hidroxilado, en cuanto a unión a ácidos nucleicos se refiere. Estos datos demuestran la interacción "in vitro", del N-OH-AAF con el ácido ribonucleico del hígado de la rata; y sugieren la presencia de un sistema enzimático que lleva a cabo esta reacción directa que guarda la cantidad del carcinogénico unido al RNA, respecto al tiempo, a la concentración de uno de los sustratos (N-OH-AAF) y la concentración del homogeneizado (fig. 2 y 3). Por otra parte, este sistema, aparentemente enzimático, es termolábil, lo cual se manifiesta al no efectuarse la unión del carcinógeno al RNA cuando se hierve el homogeneizado;

esto sería índice de que la reacción depende de un constituyente del homogeneizado que es sensible al calor. Estos resultados son consistentes con la idea de la presencia de un sistema enzimático en el hígado de la rata, que lleva a cabo la unión del N-OH-AAF o uno de sus metabolitos, con el RNA, "in vitro". Además, se desprende que este sistema es específico, al no detectarse radiactividad en el RNA cuando se incubaba homogeneizado de hígado de rata con 9 C-AAF ó 9 C-Fluoreno ; en tanto que con $9\text{ }^{14}\text{C-N-OH-AAF}$ la reacción se efectúa. Esto podría indicar que el N-OH-AAF puede ser activado "in vitro", a un metabolito capaz de reaccionar con el RNA, en contraste con el AAF y el fluoreno que no serían activados, hipótesis que se vería apoyada por el hecho de que el fluoreno no es un agente carcinógeno, por el efecto carcinogénico presentado por el N-OH-AAF en varias especies y en general, por la mayor actividad de los derivados N-hidroxilados de las animas aromáticas carcinógenas.

Basándonos en los trabajos de Kriek, Miller y col. (31, 32, 33) que demuestran que el AAF y el N-OH-AAF son inactivos en tanto el N-acetoxi-AAF es capaz de interaccionar, no enzimáticamente, "in vitro", con la guanosina aislada o con la presente en los ácidos nucleicos, podemos pensar que el N-OH-AAF sería activado por un sistema enzimático "in vitro", a un metabolito, tal como un éster acetilado o un compuesto relacionado con las propiedades reactivas del N-acetoxi-AAF , que

reacciona con la guanosina. del RNA. En tanto que los ésteres- del N-OH-AAF no han sido identificados como metabolitos, su -- interacción con proteínas y ácidos nucleicos, así como con algunos de sus constituyentes (metionina, tirosina, triptofano, -cisteína y guanosina), y su carcinogenicidad en la rata, sugieren que pueden reaccionar con una o más macromoléculas para inducir neoplasia.

No obstante la importancia que se ha dado a la inter acción de macromoléculas con agentes químicos carcinogenéti--cos y su posible relación con el mecanismo de acción de estos- compuestos, ésta aún no es muy clara. En algunos casos, como - en la rata, el grado de unión observado se correlaciona con la incidencia de cáncer producido en el hígado después de la admi nistración del agente carcinogenético; sin embargo, en el caso del cuyo y del conejo, ambos refractarios a la acción hepatotó xica del AAF y su derivado N-hidroxilado, no se ha podido es--tablecer el mismo criterio, ya que el N-OH-AAF (o un metaboli- to) se une "in vivo" (19) al hígado del cuyo, en tanto el AAF- es inactivo. Por otra parte, en el conejo se ha encontrado que "in vivo" se efectúa la interacción del AAF con el RNA hepáti- co (29). Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este traba- jo, podemos pensar que existe un sistema aparentemente enzimá- tico, que une "in vitro" al N-OH-AAF (o uno de sus metabolitos) con el RNA hepático del cuyo o del conejo.

Estos resultados apoyan la importancia de los mecanismos de N-hidroxilación en la carcinogenesis por AAF.

Además la presencia de un sistema enzimático que lleve a cabo la unión de un carcinógeno químico (o uno de sus metabolitos) al RNA, puede ser de interés para el conocimiento -- del mecanismo de formación de tumores, por la posible importancia de dicha molécula en la transmisión de un estado neoplásico a través de muchas generaciones celulares.

RESUMEN.-

El N-OH-AAF es un agente carcinogénico en rata, -- mientras que el cuyo y el conejo son refractarios a sus efectos hepatotóxicos. Recientemente se ha demostrado que el N-OH-AAF -- lleva a cabo una interacción "in vivo" , con los ácidos nucleicos y proteínas hepáticas después de su administración a ratas y cuyos. En el presente trabajo se describe la unión del ---- N-OH-AAF al RNA, " in vitro" , en presencia de un sistema, aparentemente enzimático, presente en el homogeneizado de hígado -- de rata, cuyo y conejo y se discute la posible importancia del sistema en la carcinogénesis por AAF.

BIBLIOGRAFIA.

- 1).- Wilson, R. H., De Eds, F. and Cox J. Jr. Te toxicity and carcinogenic activity of 2-acetylaminofluorene. Can. Res 1:595-608, 1941.
- 2).- Claborn, H. O., and Smith, C. E. U. S. patent - 2, 197, 249, 1940.
- 3) Miller, C. E., and Miller, J. A. The mechanisms of Chemical carcinogenesis: Nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. B Pharm.Re. 18:805-838, 1966.
- 4).- Weisburger, E. K., and Ewisburger, J. H. Chemistry, carcinobeniricity and metabolism of 2-fluorenaminã and related compuonds. Adv. Can. Res. 5:331-431, 1958
- 5).- Ross, R. C., Scorf, R. F., and Skoryna. S. C. -- Arch. Pathol. 55:173-180, 1953.
- 6).- Wilson, R. H., De Eds, F., and Cox, A. J. Can. - Res. 7:450-452, 1947.
- 7).- Bielschowsky, F. Brit. Med. Bull. 4:382-385, --- 1947.

- 8).- Miller, E. C., Miller, J. A., Enomoto M. The Comparative carcinogenicities of 2-acetylaminofluorene and N-OH-metabolite in mice, hansters and guinea pigs. Can. Res. 24:2(18, ---- 1964.
- 9).- Bonser, G. M., and Green, H. N. Epithelial neoplastic changes in the urinary tract of rabbits induced by feeding -- with 2-fluorenylacetaide. J. Pathol. Bacteriol. 62:531-539, 1950.
- 10).- Irving, C. C. N-hydroxilation of 2-acetyl-amino-fluorene in the rabbit. Can Res. . 22:867, 1962.
- 11).- Irving, C. C., Wiseman, R. Young J. M. Carcinogenicity of 2-acetylaminofluorene and N-OH-acetylaminofluorene -- in the rabbit. Can. Res. 27: 838, 1967.
- 12).- Miller, E. C., and Miller, J. A. J. Matl. Cancer Inst. 15:1571, 1955.
- 13).- Cramer, J. W., Miller. J. A., and Miller. E. C. N-hydroxylation: a new metablic reaction observed in the carcinogen 2-acetylaminofluorene. J. Biol. Chem . 235:884, 1960.
- 14).- Miller. E. C., Miller J. A., and Hartmann, H. A. N-OH-2-acetylaminofluorene: a metabolite of 2-acetylaminofluore-

ne with increased carcinogenic activity in the rat. Can Res. 21: 815, 1961.

15).- Weisburger, J. H., Weisburger, E. K. and Morris-
H. P. Differences in the metabolism of NB2fluorenylacetylamide in --
the guinea pig and the rat. Can. Res. 18:1039. 1958.

16).- Miller, C. E., Miller, J. A., Enomoto, M. The--
Comparative carcinogenicities of 2-Acetylaminofluorene and N-OH-me-
tabolite in mice, hamsters and guinea pigs Can. Res. 24:2018 , --
1964.

17).- Miller, J. A., Cramer J. W., and Miller, E. C. --
The ring and N hydroxylation of 2-acetylaminofluorene during car-
cinogenesis in rat. Can. Res. 20, 950. 1960.

18).- Miller, E. C., and Miller, J. A. Can. Res 25:
468-480, 1947.

19).- Marroquin, F., Farber, E. The binding of 2-ace-
tylaminofluorene to ratliver ribonucleic acid" in vivo" Can. Res
25:1962, 1965.

20).- Williard, R. F., and Irving, C. C. On the bin--
ding of the Carcinogen 2-fluorenylacetylamide to rat liver RNA and

DNA. Federation Proc. 23:167, 1964..

21).- Dyer, M. H. and Morris, H. P. Studies on the --- protein binding of 2-fluorenylacetamide. J. Natl. Can. Inst. 17: 677, 1956.

22).- Weisburger, J. A., Grantham, P. H., Morris, H. - P. and Weisburger. E. K. On the "in vitro" and " in vivo " pro - tein binding of N-2-fluorenylacetamide and related compounds. J. - Natl.Can. Inst. 27: 153, 1961.

23).- Sorof, S., Young E. M and Knospe, D. E. Proc. Am. Assoc. Cancer Research. 2:251, 1967.

24).- Heidelberger, C. and Dovenport. H. R. Local func - tional components et carcinogenesis. Acta Unión Intertl. Contre le Cancer. 17:55, 1961.

25).- Farber, E., and Magee, P. N., The probable alky - lation of liver Ribonucleic acid by the hepatic carcinogens dime - thyl nitrosamine and ethionine. Biochem J. 76: 58. 1960.

26).- Stekal, J. A., Mody, U. and Perry, J. Incorpora - tion of the carbon of the ethyl group of ethione into liver nu -- cleic acids and the effect of ethioninefeeding on the content of-

the content of nucleic acids in the rat liver. J.B.C.: 235, PC59, 1960.

27).- Marroquín. R. F., and Farber, E. The apparent - binding of radioactive 2-acetylaminofluorene to rat liver ribonucleic acid "in vivo". Biochem, biophysc. Acta. 55:403, 1962.

28).- Irving , C. C., Veazey, R. A. and Williard. R. - F. On the significance and mechanism of the binding of 2-acetyla - minofluorene to rat liver ribonucleic acid "in vivo" Can. Res. - 27:720, 1967.

29).- Sporn, M. B., and Dingman, C. W. 2-acetylamido - fluorene and 3 methyl colanthrene: differences in the binding -- to rat liver deoxyribonucleic acid "in vivo" Nature 210: 531, 1966.

30).- Kriek, E. On the interaction of N-2-fluorenyl - hydroxylamine with nucleic acids "in vitro". Biochem biophys -- Res. Commun . 20: 793, 1965.

31).- Kriek, E., Miller, J. A., JUHL V. and Miller, - E. C. 8-(NB2-fluorenylacetylamido) guanosina, an arylamidation reac - tion product of guanosina and the carcinogen N-acety-N-2-fluo - renylacetylamide in neutral solution. Biochemistry 6: 177, 1967.

32).- Miller, E. C. Juhl, V., and Miller J. A., Nucleic acid guanine: reaction with the carcinogen N-acetoxy-2-acetylaminofluorene. Science 153: 1125, 1966.

33).- De Baun, J. R., Miller, E. C., and Miller, J. -- A. Structures of protein and RNA bound forms of 2-acetylaminofluorene in the rat. Proc. Am. Assoc. Cancer Res . 8: 12, 1967.

34).- Lotlikar, P. D., Irving, C. C., Miller, E. C. -- and Miller, J. A. Reactions of esters of carcinogenic aromatic-hydroxamic acids with amino acids and nucleotids. Proc. Am. Assoc. Cancer Res 8:42, 1967.

35).- Miller, E. C., Miller, J. A. and Irving, C. C. - Can. Res , 27: 1600, 1967.

36).- Kirby, K. S. Fractionation of Counter current -- Distribution of Ribonucleic acid. Biochem. Biophys. Acta 40: 193, 1960.