

00361
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA MEZCLA DEL CICLOHEXANOL Y EL
ALBENDAZOL COMO INDUCTORA DE LOS
CITOCROMOS P450 EN HIGADO DE ROEDORES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A:
DIANA MARÍA ESCOBAR GARCÍA**

**DIRECTOR:
DR. J. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2003.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de noviembre de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Escobar García Diana María**, con número de cuenta 99809669, y número de expediente 3991053, con la tesis titulada: "**La mezcla del ciclohexanol y el albedazol como inductora del citocorno P450.**", bajo la dirección de la **Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre**.

Presidente:	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Vocal:	Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
Secretario:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Suplente:	Dr. Rolando Hernández Muñoz
Suplente:	Dra. Judith Guzmán Rincón

Sin otro particular, quedo de usted.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de febrero de 2003

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

Debo agradecer el importante apoyo que significaron para mí la disposición y las recomendaciones que me ofrecieron en distintos momentos de la investigación los miembros de mi Comité Tutorial: la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez, el Dr. Rolando Hernández Muñoz y en particular, a mi asesor el Dr. J. Javier Espinosa Aguirre. Debo reconocer al Dr. Espinosa todo la confianza que ha depositado en mi trabajo y esta investigación es una buena muestra de trabajo conjunto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

*A Danita,
Mateo y Simón*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**LA MEZCLA DEL CICLOHEXANOL Y EL ALBENDAZOL
COMO INDUCTORA DE LOS CITOCROMOS P450 EN
HÍGADO DE RATA**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El ciclohexanol es un disolvente industrial que ha mostrado propiedades para inducir la expresión de las subfamilias 2E y 2B del citocromo P450 (CYP). La fracción post-mitocondrial hepática (S9) de ratas tratadas con ciclohexanol, puede biotransformar *in vitro* varias *N*-nitrosaminas produciendo metabolitos mutagénicos. Por otro lado, el antihelmíntico albendazol es un potente inductor de la subfamilia 1A que se encarga de la biotransformación de contaminantes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos. El uso de S9 provenientes de roedores, es una estrategia ampliamente usada como fuente de metabolismo en las pruebas de mutagénesis *in vitro*. Las principales familias de los CYP's implicadas en dicho metabolismo son: 1A, 2B y 2E; por tal motivo, en este trabajo exploramos la posibilidad de inducir estas familias con la aplicación conjunta del ciclohexanol y el albendazol a la rata. El resultado del tratamiento combinado se evaluó mediante la inducción de mutaciones por mutágenos estándar en *S. typhimurium*, midiendo la actividad enzimática presente en microsomas hepáticos, y por inmunodetección con anticuerpos policlonales. Los resultados de actividad enzimática e inmunoblots muestran que el tratamiento con albendazol/ciclohexanol inducen los CYP1A1/2, CYP2B1/2 y 2E1 lo cual se traduce en una buena activación metabólica *in vitro* de los siguientes mutágenos: benzo[a]pireno y 3-metilcolantreno (metabolizado por el CYP1A1), 2-aminofluoreno (CYP1A2), *N*-nitrosodipropilamina y ciclofosfamida (CYP2B1), *N*-nitrosodimetilamina y *N*-nitrosopirrolidina (CYP2E1). El uso de inductores del CYP para pruebas de mutagénesis con un menor potencial tóxico que los usados comúnmente como bifenilos policlorados, naftoflavona y fenobarbital, es una aportación útil en el campo de la toxicología genética.

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	8
Citocromo P450	8
Subfamilias de interés	14
Subfamilia 1A	14
Subfamilia 2B	16
Subfamilia 2E	19
Subfamilia 3A	20
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
General	30
Particular	30
MATERIALES Y METODOS	31
Preparación de las fracciones S9 y microsómica	33
Ensayos de mutagenicidad	34
Determinación del citocromo P450	36
Determinación de actividad enzimática	37
Determinación inmunoespecífica del CYP	40

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS	41
Determinación del citocromo P450	42
Determinación de actividad enzimática	43
Ensayos de mutagenesis	47
Inmunodetecciones	55
Análisis densitométrico	56
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS	65

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla I Actividad enzimática	41
Tabla II Resultados de pruebas de mutagenicidad	49
Tabla III Potencias mutagénicas	54
Tabla IV Valores de absorbancias de análisis densitométrico.	56

FIGURAS

Figura 1 Determinación de CYP total	42
Figura 2 Actividad enzimática del CYP 1A1	44
Figura 3 Actividad enzimática del CYP 1A2	44
Figura 4 Actividad enzimática del CYP 2B1	45
Figura 5 Actividad enzimática del CYP 2B2	45
Figura 6 Actividad enzimática del CYP 2E1	46
Figura 7 Actividad enzimática del CYP 3A	46
Figura 8 Mutagenicidad del B[a]P	50
Figura 9 mutagenicidad del 3-MC	50
Figura 10 mutagenicidad del 2-AF	51
Figura 11 mutagenicidad del N-NDPA	51
Figura 12 mutagenicidad del N-NPYR	52
Figura 13 Mutagenicidad del N-NDMA	52
Figura 14 Mutagenicidad del CP	53
Figura 15 Inmunoblots	55
Figura 16 Análisis densitométrico de los CYP1A1/2	57

Figura 17 Análisis densitométrico de los CYP2B1/2	57
Figura 18 Análisis densitométrico de los CYP2E1	58
Figura 19 Análisis densitométrico de los CYP3A	58

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Los citocromos P450 (CYP's) son una superfamilia de hemoproteínas presentes tanto en procariontes como en eucariontes. Los CYP's actúan como mono-oxigenasas ya que incorporan sólo un átomo de O₂ molecular en el sustrato y tienen funciones específicas en la síntesis y degradación de compuestos endógenos (endobióticos) tales como hormonas esteroideas, vitaminas y ácidos grasos; igualmente, estos citocromos participan en el metabolismo de compuestos exógenos tales como fármacos, contaminantes ambientales y carcinógenos (xenobióticos)¹. Los CYP's encargados del metabolismo de sustancias exógenas se encuentran localizados en la membrana del retículo endoplásmico, los cuales están unidos por la porción amino-terminal. Por tanto, los xenobióticos que son metabolizados por estas enzimas son generalmente hidrofóbicos y los CYP's los transforman en moléculas hidrofílicas para facilitar su eliminación.

Los CYP's desempeñan un papel importante en la desintoxicación de medicamentos, carcinógenos químicos y otros agentes tóxicos. Los CYP's también participan en la conversión metabólica de algunos sustratos a radicales-libres, los cuales son altamente reactivos².

La biotransformación ha sido dividida en dos fases:

Fase I o de funcionalización:

En esta fase se incorporan grupos funcionales específicos que pueden provocar la oxidación, la reducción o la hidrólisis de xenobióticos que generalmente son moléculas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lipofílicas, transformándolos en moléculas de mayor polaridad, ya que este proceso es requerido para que las enzimas de fase II puedan actuar. Dentro de este grupo de enzimas de fase I se encuentran la flavin-monooxigenasa (FMO) y los CYP's.

Fase II o fase de conjugación:

Esta fase se realiza principalmente en el hígado, aunque hay otros órganos como el riñón y el intestino que tienen esta capacidad. En esta fase de nuevo se incorporan a las sustancias que se están metabolizando, moléculas hidrofílicas lo cual las hace aún más polares y pueden ser fácilmente eliminadas, ya sea por vía urinaria o biliar; en estos ductos (urinario o biliar) se encuentran las transferasas del glutatión y de los grupos acilo, metilo y acetilo. En esta fase II las reacciones más comunes son: glucuronidación, sulfatación, conjugación con glutatión, metilación y acetilación.³

Las reacciones de funcionalización (fase I) y de conjugación (fase II) son frecuentemente coordinadas, de manera que el producto de una reacción es el sustrato de la otra.

Existen ejemplos de compuestos químicos cuya toxicidad depende directamente de la transformación enzimática ya que el metabolito es más tóxico que el compuesto original. La conversión de un compuesto exógeno en metabolitos más tóxicos es lo que se conoce como *activación metabólica*. Por otro lado, también existen sustancias cuyos metabolitos resultan ser menos tóxicos que la molécula parental y, en este contexto, un incremento en la actividad de las enzimas que intervienen en la activación metabólica da como resultado la disminución de la toxicidad de los compuestos biotransformados; de esta manera, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

disminución en la actividad se traduce en un incremento de la toxicidad. La susceptibilidad de un organismo a la toxicidad de un compuesto químico en particular, depende en muchos casos del delicado balance entre la desintoxicación y la activación metabólica existente durante la exposición al xenobiótico.

Los CYP's son importantes en el metabolismo de medicamentos porque pueden favorecer la formación de metabolitos activos a inactivos farmacológicamente, los cuales al pasar por la fase de reacciones de conjugación forman metabolitos más polares los cuales son excretados por vía urinaria o biliar.

Algunos medicamentos (profármacos) se activan después de ser metabolizados por los CYP's u otras enzimas. En este caso, el metabolito activo se va formando gradualmente después de la administración del fármaco dando como resultado una acción prolongada, pudiéndose así mantener una concentración constante del metabolito en sangre. De igual forma que sucede en la activación de otras sustancias químicas, los fármacos como el acetaminofen pueden ser activados por los CYP's formando metabolitos que causan toxicidad hepática^{4, 5}

Muchos carcinógenos requieren ser metabolizados por enzimas de fase I (P450) para llegar a formar compuestos inestables o reactivos intermedios que se unen covalentemente al DNA y contribuyen al proceso canceroso. Estos productos del metabolismo también se pueden unir a la porción hemo de los CYP provocando la inactivación de estas enzimas.^{6, 7, 8}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las reacciones mediadas por los CYP's, éstos se reducen por la transferencia de electrones provenientes del NADPH o NADP a través de la citocromo P450 reductasa y el citocromo b_5 . Esto da como resultado la activación del CYP a un estado de alto espín, la formación de un complejo con oxígeno molecular y el sustrato, y finalmente la inserción de oxígeno en la forma de oxígeno singulete o radical hidroxilo en la molécula del xenobiótico.

Este proceso se lleva a cabo en ciclos durante los cuales el CYP es secuencialmente reducido por la transferencia de electrones del NAPH y el NADH. El hierro (Fe) de la molécula del CYP debe encontrarse en estado ferroso (Fe^{++}) para poder unirse al sustrato, lo que provoca que se oxide a su fase férrica (Fe^{+++}) regresando posteriormente al estado ferroso al ser reducida por los electrones provenientes del NADPH y del NADH, integrándose en esta fase el oxígeno. Después de esta unión, el Fe del CYP queda en estado férrico y el sustrato oxidado es liberado. El CYP es reducido posteriormente hasta llegar al estado ferroso y el ciclo se inicia nuevamente¹⁰.

Debido al gran número de CYP's reportados hasta la fecha, para su clasificación es necesario agruparlos en familias y subfamilias basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos. Una familia está formada por proteínas que comparten más del 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos⁹. Por su parte, en una subfamilia se agrupan proteínas que comparten un porcentaje mayor al 55% de semejanzas en la secuencia de aminoácidos. Con base en lo anterior, para nombrar una enzima se comienza con las siglas CYP (citocromo P450) seguidas por un número arábigo que indica la familia a que pertenece, una letra mayúscula indicando la subfamilia, y si es el caso de que en una subfamilia estén involucrados más de un miembro, esta letra estará seguida por otro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

número¹¹. Como ejemplo podemos citar al CYP1A1 en donde el número 1 representa la familia, la subfamilia está representada por la letra A y el número 1 indica la isoforma respectiva.

La regulación en la expresión de los CYP's puede estar influenciada por varios factores tales como las dependientes de hormonas y aquellas que requieren de la presencia de xenobióticos. En el primer caso, podemos citar al CYP1A2 humano el cual está disminuido en mujeres embarazadas o con tratamiento anticonceptivo oral¹², y en el segundo, al CYP1A1 que responde a la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Adicionalmente, los CYP's son enzimas tejido-específicas, ya que las regiones reguladoras de sus genes no son necesariamente idénticas en diferentes tejidos¹³. Sin embargo, la región 5' de todos los genes del CYP poseen una caja TATA aproximadamente de 20 a 40 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción, al igual que cuentan con un elemento basal de transcripción (EBT).^{14, 15}

Otro aspecto de vital importancia está dado por el polimorfismo genético de las enzimas que metabolizan xenobióticos.¹⁶ Dicho polimorfismo puede ser el responsable de las diferencias interindividuales en la habilidad para activar y desintoxicar agentes xenotóxicos y fármacos de amplio consumo. Todo ello determina la susceptibilidad de los individuos de una población dada a padecer cáncer o a responder adecuadamente a una quimioterapia determinada¹⁷.

La actividad catalítica de los CYP depende de los niveles constitutivos o inducibles, los cuales pueden ser modificados en el proceso de síntesis de proteínas o en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incorporación del grupo hemo para formar la holoenzima¹⁸. La inhibición y la modificación post-transcripcional pueden afectar la habilidad de los CYP para efectuar la oxidación del sustrato¹⁹.

Los niveles de inducción o actividad catalítica pueden estar afectados por una gran variedad de factores tales como inhibición y pobre expresión de los genes debido al polimorfismo genético o variación alélica; además, las modificaciones post-traduccionales pueden proporcionar la disminución de la funcionalidad causada por la pérdida del grupo hemo. De allí, se puede concluir que los sustratos y/o inductores pueden actuar como inhibidores en concentraciones suficientemente altas²⁰. Algunas veces, la expresión de varias de estas enzimas, se da como resultado de la inducción por varios agentes químicos lo cual puede deberse a la organización genética en eucariontes²¹.

Los CYP's se encuentran en mayor proporción en hígado, pero también hay reportes de su existencia en pulmón, riñón, cerebro e intestino.

Las familias de la 5 a la 8, ocupan un papel determinante en la biosíntesis de compuestos endógenos como en la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas. Los CYP's de las familias 11, 17, 19 y 21 son requeridas para la biosíntesis de hormonas esteroideas, mientras que las familias de los CYP's 1, 2 y 3 son las que participan principalmente en el metabolismo de xenobióticos. Estas enzimas tienen la habilidad de metabolizar una amplia variedad de xenobióticos, que al mismo tiempo, además de ser sustratos actúan como agentes inductores⁴.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación describiremos las propiedades de algunas de las subfamilias de mayor importancia respecto al metabolismo de xenobióticos.

SUBFAMILIA 1 A

Dos importantes miembros de esta subfamilia son: el CYP1A1 y el CYP1A2, el porcentaje de similitud de estas enzimas entre humanos y ratas es del 80%.

Los genes de estos dos CYP's han sido encontrados en todos los mamíferos, los cuales tienen una actividad catalítica parecida. La regulación transcripcional de ellos parece estar mediada por mecanismos comunes, los cuales están controlados por 2 proteínas. Una es el receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos que se encuentra ubicado en el citoplasma (AhR) y la otra es un translocador nuclear del AhR (Arnt) que provoca la inducción masiva de estas enzimas. Una vez formado el complejo xenobiótico/receptor/translocador, este se traslada al núcleo uniéndose a la región reguladora del CYP1A favoreciendo la inducción de la proteína.

La unión del xenobiótico al receptor Ah también se asocia a la iniciación de la cascada de la proteína-quinasa C, lo cual desencadena la proliferación celular debido a la interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico.²² La inducción del CYP1A1 sumado a la activación de la cascada de la proteína-quinasa C contribuyen a la evolución del tumor y la hiperplasia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La isoenzima CYP1A2 se expresa constitutivamente mientras que el CYP1A1 es inducible en el hígado de la rata²³; aunque dicha expresión puede tener variaciones dependientes de la especie animal que se trate. La conservación evolutiva observada en la subfamilia 1A sugiere que este CYP desempeña un papel importante en el metabolismo de carcinógenos ambientales. Los dos miembros de la subfamilia 1A comparten una alta similitud en su estructura primaria, al igual que en sus propiedades fisicoquímicas, pero pueden diferenciarse claramente en cuanto a la especificidad por el sustrato. Por ejemplo, el benzo[a]pireno (B[a]P) es un sustrato para el CYP1A1, mientras que la cafeína, la aflatoxina B₁ y los productos de la pirólisis de alimentos y proteínas son sustratos para el CYP1A2.^{24, 25, 26}

El CYP1A1 no sólo se induce en el hígado, sino también en el riñón y el pulmón, en donde su polimorfismo genético se ha asociado con cáncer pulmonar, ya que esta enzima participa en el metabolismo de compuestos presentes en el humo del tabaco como lo es el B[a]P. De igual manera, esta isoforma es inducible principalmente por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPA), por una dieta rica en lípidos y por estrés oxidante. Por su parte la isoforma 1A2 está involucrada en el metabolismo oxidante de aminas heterocíclicas y aminas aromáticas, presentes en alimentos como embutidos y carnes en salmuera. El CYP1A2 es exclusivo del hígado y es inducible por aminas aromáticas, el 3-metilcolantreno y la α -naftoflavona, entre otros. El CYP1A2 también está involucrado en la activación del humo del cigarrillo, en el metabolismo de compuestos que pueden llegar a producir cáncer ocupacional y en la transformación de sustancias químicas utilizadas en la agricultura.^{26, 27, 28}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La presencia de esta subfamilia ha sido reportada en organismos no mamíferos como levaduras, peces, insectos y aves.^{27,28}

SUBFAMILIA 2B

La subfamilia 2B está formada por 8 miembros inducibles por el fenobarbital y otros compuestos xenobióticos. La isoforma que más se expresa en humanos es la 2B6, equivalente a la 2B1 de rata entre las cuales existe una similitud del 78%.²⁹

La subfamilia 2B posee una pobre especificidad por el sustrato en comparación con todas las otras isoformas de P450, pero puede catalizar la oxidación de una amplia variedad de xenobióticos. Los compuestos que son sustratos de esta subfamilia son sustancias globulares y principalmente participan en la desintoxicación de las mismas, aunque también participan en la formación de radicales libres. Se conocen muy pocos mecanismos involucrados en su regulación, ya que ésta es compleja aunque se sabe que es principalmente a nivel transcripcional.³⁰

El CYP2B1 es altamente inducible en hígado por el fenobarbital. En pulmón y testículo es constitutiva y participa en el metabolismo endógeno de la testosterona; además interviene en la formación de la 4-[(metilnitrosamina-1-(3 piridil)-1-butanona] (NNK) que es un componente del tabaco, el cual está involucrado en el desarrollo de tumores en estos órganos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, el CYP2B2 se expresa constitutivamente en hígado y es moderadamente inducible por el fenobarbital por medio de la activación transcripcional de los genes,³⁵ también está presente en testículo y pulmón.

Los compuestos de baja lipofilicidad y vida media corta en plasma, son catalogados como pobres inductores de los CYP's 2B1/2. Entre las sustancias que inducen esta familia de enzimas se encuentran fármacos como: fenobarbital, barbitúricos, succinimidas, clotrimazol, benzodiazepinas y dexametaxona y pesticidas halogenados como: diclorodifenitricloroetano (DDT), bifenilos policlorados (PCB) y 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benceno (TCPOBOP).

La variedad de agentes químicos que pueden inhibir la expresión de esta isoenzima es amplia, entre ellos podemos mencionar el cloranfenicol y varios de sus derivados, el clotrimazol, y los N-bencimidazoles entre otros. El hecho de que muchos inductores del CYP2B son también inhibidores y/o sustratos del P450 da más fuerza a la hipótesis que sostiene que la inducción del CYP2B es consecuencia de la unión de ligandos al sitio activo del P450^{31,32}

Hasta la fecha no se sabe hasta que punto la expresión de esta subfamilia es constitutiva o inducible. El CYP2B1 se expresa constitutivamente en pulmón, testículo, glándulas adrenales y en ciertas regiones del cerebro, y su inducción con fenobarbital se detecta en hígado, intestino delgado y regiones específicas del cerebro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La expresión constitutiva del CYP2B2 ha sido detectada en hígado y en algunas regiones del cerebro. La inducción del CYP2B2 por fenobarbital se ha detectado principalmente en hígado y en glándulas adrenales³³

Entre los procarcinógenos y tóxicos que pueden ser metabolizados por este grupo de enzimas se encuentran la ciclofosfamida, el 6-aminocriceno, la N-nitrosometilbutilamina, la cocaína y el bromobenceno.

La interacción del fenobarbital con otros fármacos ha sido objeto de estudio, de lo cual se ha podido concluir entre otras cosas, que la interacción de este fármaco con anticoagulantes orales como la warfarina provoca una disminución de los niveles del anticoagulante en plasma de pacientes que simultáneamente estén recibiendo terapia anticonvulsivas^{34,35}

Entre los CYP2B1 y CYP2B2 existe una homología del 97%. A pesar de esto, las propiedades cromatográficas y electroforéticas son distinguibles ya que su regulación y su expresión son diferentes.

SUBFAMILIA 2E

El CYP2E1 cataliza la activación de procarcinógenos y protoxinas como la N-nitrosodimetilamina, anilinas, hidrocarburos clorados y fluorados, benceno y alquilformaminas³⁶. Además, participa en el metabolismo de ciertas sustancias como son el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

alcohol, acetaminofen, cloroxazona y algunos antisépticos fluorados³⁷. Su participación en el metabolismo se refleja en la formación de reactivos intermedios que juegan un papel importante en la necrosis; a su vez, esta actividad puede incrementarse por alteración de estados fisiológicos, en ayuno prolongado, dietas ricas en lípidos y por compuestos tales como las acetonas y las isoniazidas. Esta enzima llega a participar en la generación de radicales libres tales como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno.

El CYP2E1 se expresa constitutivamente en una mayor concentración en hígado que en otros tejidos, ya que la expresión tejido-específica está más enfocada a funciones endógenas; este CYP es fuertemente inducido por el etanol. También se ha encontrado en riñón y se expresa en muy pocas cantidades en mucosa nasal³⁸, pulmón, ovario, testículo³⁹, intestino delgado⁴⁰, colon⁴¹ y cordón umbilical⁴², entre otros. La expresión hepática de esta isoenzima está fuertemente influenciada por factores nutricionales como la ingesta elevada de grasa, con dieta baja en proteína y además se encuentra en enfermedades insulino-dependientes. Las condiciones que afectan la circulación de los lípidos sumado al estado nutricional, están asociadas con el aumento de los niveles de cetonas en circulación, las cuales actúan como inductores fisiológicos del CYP2E1.^{43 44}

Esta isoenzima presenta una homología del 75% y 78% con relación a la secuencia de aminoácidos y nucleótidos entre rata y humano, respectivamente lo cual se puede traducir en una importante función endógena de estas enzimas.

La expresión del CYP2E1 puede ser regulada por varios xenobióticos y muchos de ellos son sustratos que inducen su propio metabolismo, como es el caso de la acetona, el

etanol y las izoniazidas, entre otros. El acetaminofen y los imidazoles constituyen una excepción puesto que el primero es sustrato del CYP2E1, pero no induce sus niveles de expresión; mientras que el segundo posee la capacidad de inducción, pero no son sustratos. Después del hígado, la mayor expresión de CYP2E1 posteriormente de la inducción con etanol y anestésicos, es el riñón y la mucosa nasal.^{38,45}

El CYP2E1 cataliza el metabolismo de compuestos de muy diversa estructura química que cuentan con la característica general de poseer un peso molecular bajo entre los cuales se encuentran alcoholes, aldehídos, alcanos, hidrocarburos aromáticos y halogenados, anestésicos halogenados, nitrosaminas y compuestos azo, entre otros. En cuanto a los sustratos endógenos podemos citar los productos de la lipoperoxidación y cuerpos cetónicos.

Por otra parte, la toxicidad asociada a CYP2E1 involucra la producción de radicales libres. La inducción de los radicales libres de oxígeno es fundamental para la capacidad que tiene el CYP2E1 de iniciar la lipoperoxidación dependiente de NADPH⁴⁶ en membranas reconstituídas. Su modo de regulación es complejo incluyendo eventos tanto transcripcionales como postranscripcionales. El gen CYP2E1 presenta polimorfismo que se ha llegado a asociar con cáncer de pulmón en la población japonesa.

SUBFAMILIA 3A:

De todos los CYP's descritos a la fecha la isoforma 3A4 es la que se expresa a mayor concentración en hígado de humanos adultos.^{47, 48} Se expresa en bajas cantidades en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

rifón, duodeno, yeyuno, íleon, colon, esófago y estómago. Al menos tres miembros son constituyentes de esta familia CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7.

El CYP3A4 y CYP3A5 comparten propiedades características y juegan un papel importante en el metabolismo, tanto de medicamentos clínicamente usados, como de carcinógenos como la aflatoxina B₁ y el B[a]P. Esta subfamilia es capaz de oxidar sustratos de pesos moleculares por encima de 300 daltones, al igual que sustratos altamente lipofílicos. Entre las reacciones de oxidación que cataliza, se incluye la deshidrogenación, la N-desalquilación, la sulfoxidación y la epoxidación, las cuales ocurren a través de diferentes mecanismos.⁴⁹

El CYP3A es mediador de la oxidación de muchos compuestos, lo cual representa una vía de desintoxicación. Algunos de los medicamentos anti-cáncer son activados por CYP3A a metabolitos citotóxicos farmacológicamente activos; por lo tanto, se ha sugerido que el incremento de los niveles de CYP3A en pacientes con cáncer, podría incrementar la eficiencia terapéutica de los medicamentos antineoplásicos.

El incremento en la expresión de esta enzima depende en parte del tipo de alimento que se consuma. Los genes CYP3A, al igual que los del CYP1A y CYP2B, son fuertemente inducibles en respuesta a xenobióticos en mamíferos. Algunos de los inductores más conocidos de estas familias son: clotrimazol, dexametasona, carbamacepina, eritromicina, fenobarbital y rifampicina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El hecho de que el gen CYP3A4 sea inducible por dexametasona sugiere que este gen forma parte de una batería de genes que tiene respuesta a glucocorticoides.⁵⁰

Se ha reportado una alta variación interindividual en la expresión de los CYP's 3A. Parte de esta variabilidad puede ser explicada por el polimorfismo del CYP3A5, que ha sido demostrado *in vivo* mediante mediciones de la variación en el metabolismo de nifedipina en población humana. Este polimorfismo está también demostrado por el hecho de que sólo cerca del 20% de la población humana normal expresa el CYP3A5 en hígado.⁵¹

52

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

Los seres humanos estamos expuestos ambientalmente a agentes químicos y físicos como también a las radiaciones usadas en las áreas médicas, clínicas, industriales y de investigación, además de ciertos aditivos usados en los alimentos o la presencia en dichos alimentos de compuestos generados durante su procesamiento. Otros xenobióticos que pueden ser mencionados son los plaguicidas y los fármacos .

La importancia de los estudios mutagénicos radica en el conocimiento que se tiene acerca de una amplia variedad de agentes ambientales que interactúan directamente con el DNA produciendo cambios hereditarios. Al respecto, una de las inquietudes más comunes de investigadores que laboran en esta área del conocimiento, ha sido el diseñar pruebas para la evaluación del potencial genotóxico de los diferentes compuestos químicos, ya que cotidianamente estamos expuestos a ellos, tanto en el aire, en el agua y en los alimentos que consumimos.

En este sentido, la prueba de Ames fue diseñada como una herramienta para dicho análisis. En la que se usan bacterias que están sometidas a una mutación en el operón de histidina (his⁻), lo que les confiere la propiedad de no poder crecer en medios carentes de este aminoácido, a diferencia de la cepa silvestre que sí se desarrolla en medios de cultivo que no lo contengan.. Por lo tanto, las bacteria his⁻ que recobran su fenotipo his⁺ por la acción de un agente mutagénico, pueden ser seleccionadas en medios deficientes en el aminoácido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Desde su propuesta formal a mediados de los 70 la prueba de Ames ha sido sometida a modificaciones adicionales. Una de ellas fue debida al hecho de que muchos agentes químicos requieren ser metabolizados o biotransformados por enzimas para llegar a producir mutaciones.²⁵ Estas enzimas sólo se encuentran en sistemas metabólicos de eucariontes superiores, y la bacteria *S. thyphimurium* no cuenta con dichos sistemas metabólicos. Por lo tanto, en la prueba de Ames se introdujo la utilización de homogeneizados de hígado de mamíferos (fracción S9) para proporcionar las condiciones metabólicas *in vitro* requeridas por algunos compuestos químicos. Para este fin se usan hígados de ratas jóvenes previamente tratadas con inductores de los CYP's necesarios para el metabolismo de compuestos xenobióticos (CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A).

Esta prueba juega un papel importante en el nuevo desarrollo de medicamentos para uso en humanos. La prueba de Ames es ampliamente usada como un método *in vitro* rápido y simple para detectar la mutagenicidad y posible carcinogenicidad de una amplia variedad de compuestos químicos³¹.

Muchos procarcinógenos permanecen inactivos hasta ser transformado por enzimas a especies electrofílicas capaces de unirse covalentemente al DNA produciéndose la mutación⁵⁴.

Los inductores son sustancias requeridas para incrementar la concentración de enzimas que participan en el metabolismo de compuestos exógenos. Debido a que la utilización de los homogeneizados de hígado requieren generalmente del empleo de inductores, su uso plantea varios problemas. Unos de los compuestos más usados en la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inducción de los CYP's es el Aroclor 1254. (bifenilos-policlorados PCB) y la combinación del fenobarbital/ β -naftoflavona(FB/ β -NF).

Frecuentemente los inductores son sustancias que debido a sus propiedades pueden representar un riesgo tóxico para el humano y otras especies⁵⁵.

La naturaleza precisa y el grado de efecto tóxico producido por los diferentes inductores enzimáticos dependen de diversos factores en los que se puede incluir la especie, la cepa, el estado fisiopatológico, el nivel de exposición o la dosis de inducción; además del tipo de P450 que se encuentra involucrado.

El Aroclor 1254 es un compuesto químico usado en procesos industriales debido a que presenta características particulares como la de tener baja conductividad eléctrica y soportar altas temperaturas por prolongados periodos de tiempo. Se usa principalmente en la industria eléctrica y en sistemas de enfriamiento, así como en el sellado de maderas y superficies de cemento. Algunas veces se emplean en los fluidos durante la preparación de insecticidas¹ siendo éste un compuesto muy nocivo tanto para el ambiente como para el personal que lo maneja. En estudios realizados con animales que han sido tratados con Aroclor, se ha demostrado que este compuesto puede cruzar la barrera placentaria y es excretado en la leche materna; además, es capaz de producir abortos tempranos y nacimiento de crías con hiperqueratosis e hiperpigmentación^{56, 57, 58, 59, 60}. El Aroclor 1254 es un inductor efectivo de las isoenzimas de CYP involucradas con el metabolismo de varias sustancias capaces de llegar a ser carcinogénicas o genotóxicas. Sin embargo, se ha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

restringido su comercialización por ser un compuesto altamente tóxico y carcinogénico ⁵⁸ Además de que puede causar problemas ambientales ⁵⁹ por ser un compuesto muy estable, es resistente a la oxidación y su inactivación sólo se logra mediante la incineración de tercer nivel.⁶¹

Debido a las propiedades nocivas del Aroclor1254 algunos investigadores se interesaron en buscar compuestos para ser usados como inductores alternos, entre los cuales cabe mencionar la mezcla del FB/ β -NF. ⁶¹ Con dicha mezcla se han realizado diversos trabajos de investigación en los cuales se ha explorado el mecanismo y la eficiencia de inducción de las enzimas del CYP. En algunos de estos trabajos como los realizados por Guengerich *et al* ²⁵, García-Franco *et al* ⁸³ Callander *et al* ⁸⁴ y, se hicieron estudios comparativos de mutagenicidad con fracción S9 obtenidas de hígado de animales tratados con diferentes inductores enzimáticos, mostrando que esta mezcla es un inductor eficiente de los CYP que participan en el metabolismo de xenobióticos como el CYP1A1/2 y el CYP2B1/2. Sin embargo, dicha mezcla no induce eficientemente el CYP2E1, el cual biotransforma xenobióticos importantes como lo son las nitrosaminas y algunos medicamentos y anestésicos. Por otra parte, el fenobarbital es un medicamento estrictamente controlado por las autoridades sanitarias y su adquisición es difícil.

Por lo tanto, fue nuestro interés plantear una alternativa para la inducción de los CYP's involucrados en la biotransformación de xenobióticos con propiedades mutagénicas. Esta alternativa está constituida por la combinación de ciclohexanol (CH) y albendazol (ALB) en dosis adecuadas, ya que el primero se ha demostrado que induce el CYP2E1 y

CYP2B, mientras que el segundo tiene la propiedad de aumentar la expresión del CYP1A en roedores^{62, 63, 64}.

El CH es un disolvente usado en el procesamiento de lacas, pinturas, una gran variedad de removedores y ceras, y también es un producto intermedio en la fabricación de plásticos y de otros productos químicos. Este alcohol cíclico es capaz de modificar el metabolismo en los mamíferos, al igual que otros disolventes industriales como la ciclohexanona y el ciclohexano, ya que según el estudio realizado por Brondeau *et al*⁶⁵, la exposición de ratas a la ciclohexanona induce un incremento en el contenido de CYP hepático⁶⁵. Este disolvente ha sido probado para inducir enzimas del P450 entre las cuales se encuentran las subfamilias de los CYP's 2E y 2B.^{62, 63}

Por su parte, el albendazol (ABZ) es un antihelmíntico de amplio espectro derivado de los bencimidazoles ampliamente usado tanto en la medicina veterinaria como en la humana.²⁶ Este medicamento es eficiente en el tratamiento de neurocisticercosis⁶⁶ e infecciones por áscaris, entre otras. Los pasos para su biotransformación requieren de una sulfoxidación inicial llevada a cabo por la FMO y el citocromo P450 (CYP3A) produciéndose así sulfóxido de albendazol (ABZSO)⁶⁷ y una segunda sulfoxidación llevada a cabo por el CYP1A1, dando como resultado final la sulfona de albendazol (ABZSO₂).⁶⁸

De estos dos metabolitos resultantes, el ABZSO es al que se le confiere la capacidad de ser antihelmíntico, además de ser embriotóxico en ratas, mientras que el ABZSO₂ no presenta toxicidad.⁶⁹ Estudios previos acerca de las propiedades de inducción de los CYP's

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por el ABZ revelan que la administración de este medicamento por vía oral a una dosis de 10 mg/Kg de peso por 10 días incrementa la actividad catalítica y la concentración de proteínas del CYP 1A1 ⁷⁰ además de aumentar discretamente la de los CYP's 2B1/2 y 2E1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

El tratamiento simultáneo de ratas con albendazol y ciclohexanol induce las subfamilias 1A, 2B y 2E involucradas en el metabolismo hepático de agentes xenobióticos mutagénicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

General:

- Valorar el uso de la mezcla de albendazol y el ciclohexanol como inductora del CYP hepático en roedores.

Metas:

- Tratar grupos de animales con Aroclor, FB/bNF y CH/AB y obtener las fracciones postmitocondrial y microsomal de hígado.
- Medir la concentración y actividad del CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A hepáticos.
- Comparar la potencia de inducción de los diferentes tratamientos.
- Evaluar la capacidad de las diferentes fracciones postmitocondriales para activar mutágenos en la prueba de Ames

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de peso corporal entre 200 y 250 gramos, con las cuales se formaron cuatro grupos de tratamiento (4 animales por grupo), el primero con animales que se trataron con Aroclor 1254, el segundo con fenobarbital/ β -naftoflavona (FB/ β -NF), el tercero con albendazol/ciclohexanol (ALB/CH) y el último correspondió al testigo al cual se le aplicó tres dosis de aceite de maíz.

El esquema de tratamiento con Aroclor consistió de una sola inyección intraperitoneal a dosis de 500 mg/Kg de peso corporal y el sacrificio se efectuó 5 días después de la aplicación.^{23, 71} El FB se administró a dosis de 60 mg/kg los días 1, 2 y 3 y 30 mg/kg de peso el día 4 y la β -naftoflavona se le aplicó a los mismos animales a dosis de 80 mg/kg de peso al tercer día de tratamiento y el sacrificio se efectuó al día 5.⁶¹

El esquema de tratamiento con ALB/CH fue administrar CH en el agua de bebida (2.5% v/v) *ad libitum* durante 4 días, al cabo de los cuales se sacrificaron los animales⁶³ y ALB a dosis de 50 mg/kg de peso a los mismos animales 24 horas antes del sacrificio.⁶⁴ El Aroclor, el FB/ β -NF y el ALB se aplicaron intraperitonealmente y fueron resuspendidas en aceite de maíz. El sacrificio de los animales se hizo por dislocación cervical y se les extrajo el hígado, el cual se homogeneizó y de allí se obtuvieron las fracciones postmitocondrial (S9) y microsómica. Con la fracción S9 se hicieron ensayos de mutagenicidad según el método de Maron y Ames³³ y con la fracción microsómica se realizaron pruebas de

inmunodetección con anticuerpos policlonales contra CYP1A, CYP2B y CYP2E1⁷², de cuantificación de citocromo P450 total⁷³ y de actividad enzimática (O-desalquilación de alkoxi-resorufinas (AROD)⁷⁴ e hidroxilación de 4-nitrofenol. La determinación de proteínas sólo se realizó en la fracción microsómica y se hizo según el método de Bradford⁷⁵ utilizando albúmina bovina para elaborar la curva patrón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PREPARACIÓN DE LAS FRACCIONES S9 Y MICROSÓMICA.

La fracción S9 fue preparada siguiendo el método de Maron y Ames (1983).⁷⁶ Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y, rápidamente, se les extrajo el hígado. Los cuatro hígados de cada grupo de animales se cortaron en pequeñas porciones y se homogeneizaron en KCl (150 mM) a una proporción de 3 ml/g de peso de hígado. Después se centrifugó a 9000 g por 10 minutos, y el sobrenadante (S9) se almacenó en alícuotas de 2 ml a -70 °C hasta que fueron usadas; el resto se procesó para la obtención de microsomas centrifugando a 100000 g por 60 minutos al cabo de los cuales el botón se resuspendió en un volumen igual al inicial con un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.4 y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. El botón final fue resuspendido en un amortiguador de fosfato de potasio pH 7.4, EDTA 1 mM, DTT 1mM y 20% de glicerol, se hicieron alícuotas almacenándose a -70°C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENSAYOS DE MUTAGENICIDAD

Estos ensayos se realizaron con el fin de analizar la capacidad de la fracción S9 para activar promutágenos de los cuales se conoce que son metabolizados por enzimas específicas del CYP. Los promutágenos analizados fueron benzo[a]pireno, 3-metilcolantreno (CYP1A1), 2 aminofluoreno (CYP1A2), *N*-nitrosodipropilamina (CYP2B2), ciclofosfamida (CYP2B) *N*-nitrosopirrolidina (CYP2E1) *N*-nitrosodimetilamina (CYP2E1). La capacidad de activación se cuantificó en términos del número de colonias mutantes de *Salmonella typhimurium* inducida por la acción de los metabolitos generados por una isoenzima específica de CYP.

Las cepas de *Salmonella typhimurium* que se usaron para estas pruebas de mutagénesis fueron la TA1535, TA98 y TA100, las cuales fueron donadas por el Dr. B.N. Ames de la Universidad de California en Berkeley, C.A, USA.

La cepa TA1535 detecta la mutagenicidad de la ciclofosfamida; la TA98 se usó para identificar la mutagenicidad de benzo[a]pireno y 2-aminofluoreno y la mutagenicidad del 3-metilcolantreno, *N*-nitrosodipropilamina, la *N*-nitrosopirrolidina y la *N*-nitrosodimetilamina se detectaron mediante el uso de la cepa TA100.

A un tubo estéril con 2 ml de agar de superficie a 45°C se le agregó 0.1 ml de un cultivo de 16 horas de las cepas TA98, TA100 ó TA1535 de *S. typhimurium*; 0.1 ml de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

solución del mutágeno en diferentes concentraciones y 0.5 ml de la mezcla S9 (10 ó 30% de la fracción S9, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, glucosa-6-fosfato 5mM y amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 7.4). La mezcla se vació en cajas Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner. La incubación se realizó, después de que las cajas se solidificaron, a una temperatura de 37°C por un período de 48 horas, al cabo de las cuales se contó el número de revertantes.

En los experimentos con las nitrosaminas se realizó una modificación que consistió en preincubar durante 60 minutos la mezcla de reacción, antes de ser incorporada al medio mínimo. La incubación se llevó a cabo en un amortiguador de fosfatos con un pH 6.5.

La cantidad de colonias mutantes en las cajas se contó una vez terminado el período de incubación. Después de graficar el número de revertantes por cada una de las concentraciones del mutágeno, se determinó la pendiente, la cual representa la potencia mutagénica, y se expresó como el número de mutantes por µg de mutágeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN DEL CITOCROMO P450 TOTAL:

Se realizó según la metodología de Omura y Sato ⁷³ el cual se basa en la reducción del Fe⁺⁺⁺ con ditionita de sodio y su posterior unión al monóxido de carbono, que provoca la formación de un cromóforo detectable espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Se diluyeron los microsomas con la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M y glicerol al 20% pH 7.4, para tener una concentración de proteína de 1-2 mg/ml en un volumen total de 5 ml, se agregó una pizca de ditionita de sodio. Se tomaron 2.5 ml de esta solución para ser usada como blanco, los otros 2.5 ml se burbujearon con CO durante 30 segundos y el pigmento resultante se leyó en un intervalo de longitudes de onda de 400 nm a 500 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Estas pruebas se basan en la conversión a un metabolito cuantificable de un sustrato específico para cada tipo de citocromo. Las actividades evaluadas fueron la desalquilación de etoxi-resorufina, (EROD) específica para el CYP1A1, metoxi-resorufina (MROD) específica para CYP1A2, pentoxi-resorufina (PROD) específica para CYP2B1 y benziloxi-resorufina (BROD) específica para 2B2, la hidroxilación del 4-nitrofenol a 4-nitrocatecol que es específica para el CYP2E1, la demetilación de la eritromicina a formaldehído que es específica para CYP3A. Las reacciones para cada determinación se realizaron de la siguiente manera:

En una celda para fluorometría se mezcló una solución amortiguadora de tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 25 mM a pH 7.6 (1.91-1.94 ml) el sustrato específico (10-40 µl) (la alcoxi-resorufina correspondiente para cada CYP)^{77 78 79} disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) así: EROD 50 µM, MROD 0.5 mM, PROD 1.0 mM y BROD 1.0 mM, más la suspensión microsómica (10-40 µl). La mezcla se incubó durante tres minutos a 37°C. Posteriormente se inició la reacción con la adición de NADPH 500 µM (20 µl de una solución 50 mM en amortiguador) en un volumen final de reacción de 2 ml. La cinética de aparición de resorufina fue evaluada durante tres minutos a 37°C capturando lecturas cada 15 segundos en un fluorómetro marca Turner modelo 450. La medición se realizó en una longitud de onda de excitación de 520 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para estos ensayos se realizó una curva de calibración de resorufina en donde se evaluaron las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 25 50 100 250 y 500 pmoles/ml. Los resultados de actividad se expresan en pmoles de resorufina/min/mg de proteína.

Para la determinación de CYP2E1 se evaluó la actividad de hidroxilasa de *p*-nitrofenol (HPNF).⁸⁰ Para ello se preparó una mezcla de reacción que contenía 50 μ l de microsomas y 930 μ l de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM y *p*-nitrofenol 0.2 mM a pH 7.4. La mezcla se incubó a 37°C por 3 minutos y la reacción se inició con la adición de 20 μ l de NADPH 50 mM en amortiguador. De cada muestra se corrió un blanco al cual no se le añadió NADPH. Después de 10 minutos de incubación a 37°C, la reacción se detuvo al agregar 500 μ l de HClO₄ 0.6 N. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se tomó 1 ml de sobrenadante, al cual se le añadió 100 μ l de NaOH 10 N. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 510 nm. Se elaboró una curva de calibración con 5, 10, 25, 50 nmoles de *p*-nitrocatecol que es el producto de la hidroxilación del *p*-nitrofenol. Los resultados de la actividad se expresan en nmoles de *p*-nitrocatecol/min/mg de proteína.

La determinación del CYP3A se evaluó mediante el método de Alexidis et al⁸¹, basado en la *N*-demetilación de la eritromicina (END) en la cual se mide la producción de formaldehído. La mezcla de reacción (1 ml de volumen final) contenía eritromicina 10mM, 2 mg de proteína microsómica, MgCl₂ 150 mM (disuelto en amortiguador) y amortiguador

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(K_2HPO_4 50 mM pH 7.25). Esta mezcla se preincubó a 37°C durante 3 minutos, la reacción se inició con la adición de NADPH 10mM (disuelto en una solución de bicarbonato de sodio al 1%), la incubación siguió durante otros 10 minutos. La reacción se detuvo con la adición 0.5 ml de ácido tricloroacético al 12.5%. Las muestras se centrifugaron a 5600 rpm durante 10 minutos. Se recuperó 1 ml de sobrenadante al cual se le agregó 1 ml de reactivo de NASH⁸¹ (acetato de amonio 2 M, ácido acético 0.05 M y acetil acetona 0.02M). Esta mezcla se incubó a 50°C durante un periodo de 30 minutos. La lectura se hizo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm. Se elaboró una curva de calibración con 0, 2.8, 3.7, 4.7, 5.6, 6.6 y 7.5 nmoles de formaldehído, el cual es el producto de la desmetilación de la eritromicina. Los datos se reportan en nmoles de formaldehído/min/mg de proteína.

Todas las determinaciones de las actividades enzimáticas fueron hechas por triplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN INMUNOESPECÍFICA DEL CYP:

Estos ensayos se hicieron utilizando la fracción microsómica mediante la técnica de Western blot.⁷²

Se hizo una separación de proteínas en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS a temperatura ambiente. El gel concentrador se realizó con un 4% de acrilamida, mientras que el separador se preparó al 7.5% de acrilamida y 0.3% de bisacrilamida. Se colocó 1 µg de proteína microsómica en cada carril y la electroforesis se corrió a 200 voltios por 30 minutos a temperatura ambiente. El amortiguador fué Tris-HCl 0.05 M, glicina 0.38 M y dodecilsulfato de sodio al 0.1%, a un pH 8.3.

Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales contra CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 de rata, desarrollados en cabra, de DAIICHI Pure Chemical Co. LTD, Tokio Japón. El segundo anticuerpo (monoclonal) fue un anti IgG de cabra desarrollado en conejo, de Zymed Laboratories, INC. Se usaron como testigos positivos microsomas hepáticos de ratas tratadas con inductores químicos con especificidad para incrementar la actividad enzimática de los CYP's, estos fueron 3-metilcolantreno (1A1), fenobarbital (2B), acetona (2E) y dexametasona (3A) (DAIICHI pure chemical Co. LTD, Tokyo, Japón). Al igual que las determinaciones de CYP total y las actividades enzimáticas, las evaluaciones se hicieron en forma individual.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS:

Las determinaciones bioquímicas de las fracciones hepáticas (microsómica) de ratas inducidas con diferentes tratamientos, se muestran en la tabla I

TABLA I Actividad enzimática en microsomas hepáticos de rata Wistar

Actividad	testigos	ABZ/CH	Aroclor	PB/β-NF
CYP ^a	0.549 ± 0.055	0.480 (87%) ^a ± 0.072	2.571 (468%) ± 0.41	0.669 (122%) ± 0.078
EROD ^b	24.93 ± 3	549.98(2206%) ± 26	4572.1(18340%) ± 179.6	4046.59(16232%) ± 190
MROD ^b	25.41 ± 1.81	250.99(988%) ± 12.98	1407.09(5537%) ± 295.5	479.4 (1887%) ± 95.43
PROD ^b	7.4 ± ±.3.8	86.3 (11662%) ± 6.3	418 (5649%) ± 105.3	1068.36(14437%) ± 116
BROD ^b	33.14 ± ±.9.25	473.96(1430%) ± 114	3611.32(10897%) ± 406	9260.54(27944%) ± 659.7
4-NPH ^c	0.6 ± 0.1	2.45 (408%) ± 0.31	1.4 (233%) ± 0.3	0.9 (150%) ± 0.23
END ^d	1.92 ± 0.079	1.82 (95%) ± 0.65	1.95 (101%) ± 0.18	2.25 (117%) ± 0.34

^a Concentración de CYP total en nm/mg.

^b pmoles de resorufina/mg proteína/min.

^c pmoles de 4-nitrocatecol/mg proteína/min.

^d nmoles de formaldehído/mg proteína/min.

^e Los valores en el paréntesis son el % variación con relación al testigo.

TESIS CON
FOTOCOPIA DE ORIGEN

DETERMINACIÓN DEL CITOCROMO P450 TOTAL

El citocromo P450 total se indujo por el Aroclor 1254 (468%) respecto al testigo, mientras que el tratamiento con el FB/ β -NF sólo se elevó 122% por encima del testigo y con la combinación de ALB/CH, provocó una reducción de un 13% con relación al testigo.

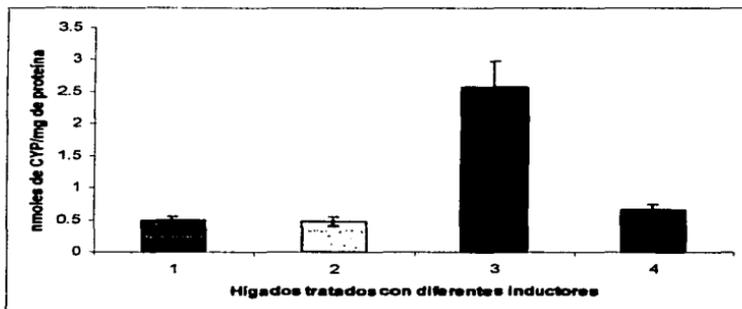


Fig. 1 DETERMINACIÓN DE CYP TOTAL

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se muestra en las figuras de la 2 a la 7 y en la tabla 1. El CYP1A1 (EROD, figura 2) se elevó significativamente en los microsomas de ratas tratadas con Aroclor y FB/ β -NF (183 y 162 veces el testigo, respectivamente), los microsomas hepáticos inducidos con ALB/CH también mostraron un incremento significativo (22 veces respecto al testigo).

La inducción con la combinación de FB/ β -NF fue de 2.5 veces por encima de las muestras tratadas con Aroclor en lo que respecta a PROD (Fig 4) y a BROD (Fig 5), esto comparado con el testigo. Mientras que la actividad de MROD (Fig 3) de las muestras hepáticas tratadas con Aroclor fue 3 veces más efectiva que la combinación de FB/ β -NF (Tab 1). Por otro lado, la combinación de ALB/CH indujo la actividad de EROD 22 veces por arriba del testigo y en cuanto a las actividades de MROD, PROD y BROD este régimen de inducción alcanzó a estar 10 veces por encima de los valores observados en los microsomas control, siendo este esquema de tratamiento el menos efectivo de todos los probados. Sin embargo, una alta inducción en la actividad de la subfamilia 2E1 (4-NPH) (Fig 6) fue obtenida con el régimen de inducción de ALB/CH (408% del testigo) (Tab 1) seguida por las muestras obtenidas de animales tratados con Aroclor y FB/ β -NF (233% y 150% del control, respectivamente). La actividad de CYP3A (END) (Fig 7) no fue inducida por ninguno de los tres regímenes de inducción (Tab.1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

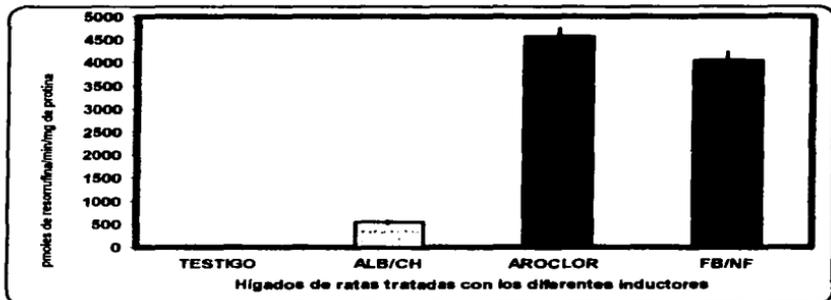


Fig 2 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP1A1

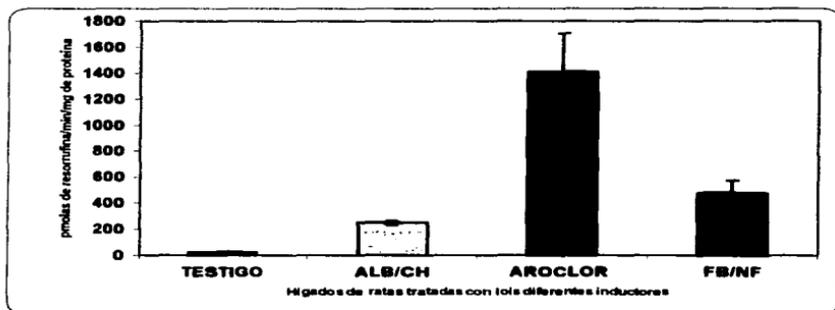


Fig 3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP1A2

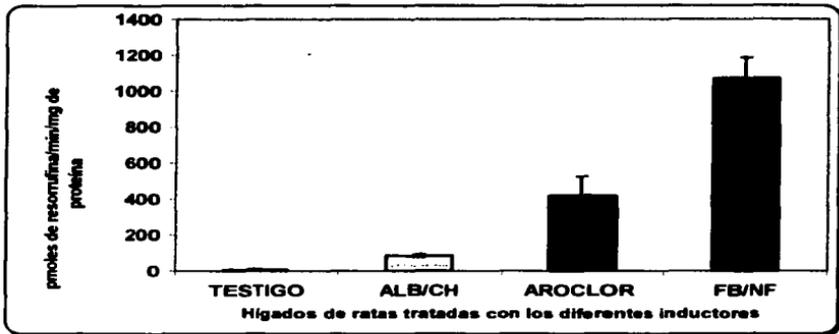


Fig. 4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP 2B1

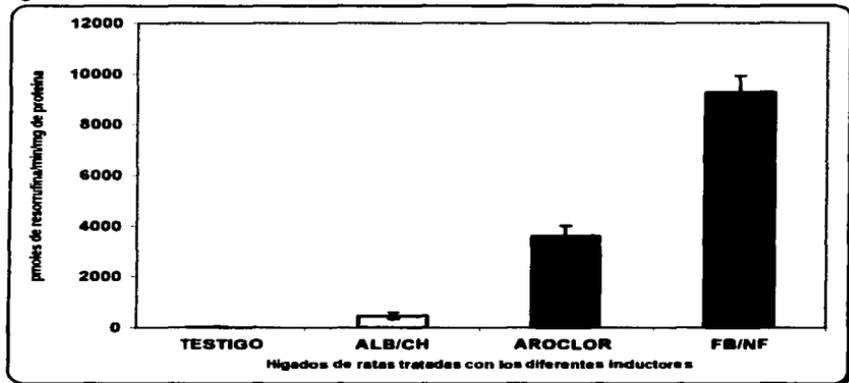


Fig. 5 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP2B2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

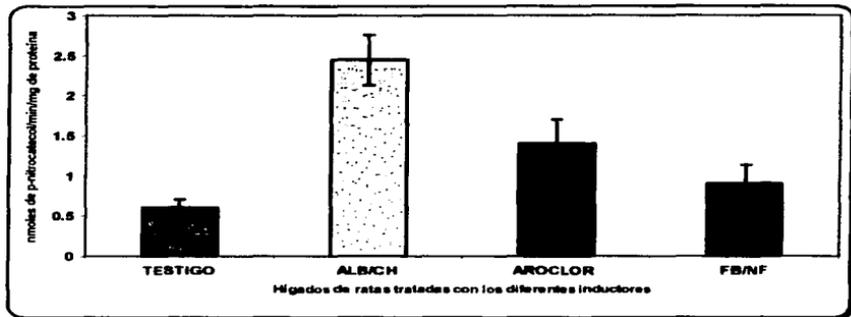


Fig 6 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP 2E1

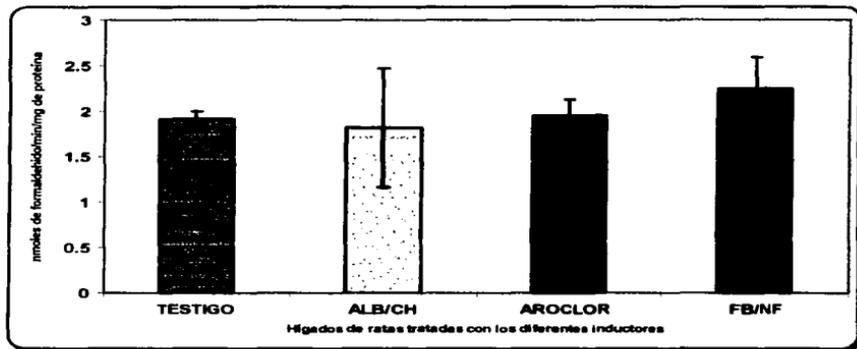


Fig. 7 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL CYP3A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENSAYOS DE MUTAGÉNESIS

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas II y III y en las figuras de la 8 a la 14; estos datos muestran que las fracciones S9 de animales tratados con los tres distintos esquemas de inducción son capaces de activar promutágenos estándares en la prueba de Ames. Los mutágenos que fueron escogidos para ser evaluados son: B[a]P (figura 8) y 3-MC (figura 9) los cuales son metabolizados por el CYP1A1, 2-AF metabolizado por CYP1A2, la *N*-NDPA por el CYP2B, la NPYR, y la *N*-NDMA ambos activados por el CYP2E1 y finalmente la CP por el CYP2B y el CYP3A.

En el análisis que se puede hacer de las pruebas de mutagenicidad a la cual estuvieron sometidos los diferentes S9 se puede observar que los animales tratados con Aroclor y FB/β-NF activaron el B[a]P (Fig 8) de un manera similar produciendo 17 y 12 revertantes por microgramo (rev/μg), respectivamente con relación al S9 testigo que provocó 3 rev/μg (Tab II y III). Adicionalmente, los S9 de Aroclor y FB/β-NF elevaron 13 y 8 veces la potencia mutagénica de 3-MC (Fig 9) con relación al S9 obtenido de ratas testigo (Tab II y III). El S9 de animales tratados con ALB/CH también activó los dos compuestos policíclicos, aunque no con la misma eficiencia, incrementando 2 veces la potencia mutagénica del el B[a]P y 5 veces la del 3-MC respecto al S9 testigo. El 2-AF (Fig 10) fue el único mutágeno activado por el S9 testigo. En presencia de los S9 obtenidos de los animales tratados con FBβ-NF, Aroclor y ALB/CH, la activación de este compuesto se aumentó casi 2 veces sobre el testigo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La *N*-NDPA (Fig 11) presenta un máximo de activación generado por el S9 de animales tratados con FB/β-NF (1.48 rev/μg. ver Tab III), seguida por S9 de Aroclor (0.83 rev/μg Tab III), y por último el S9 de animales inducidos con la mezcla de ALB/CH (0.58 rev/μg Tab III), los cuales están aproximadamente 10 veces por encima del S9 testigo que presentó 0.05 rev/μg.

En cuanto a la NPYR (Fig.12), que es metabolizada por la subfamilia 2E1, se observó que sólo se activó cuando se usó S9 de animales tratados con ALB/CH (8 rev/μg). Los S9 de Aroclor y FBβ-NF fueron incapaces de duplicar la reversión espontánea de la cepa TA100 usada en el experimento (Tab II). La *N*-NDMA también es metabolizada por la subfamilia 2E1, por lo tanto el máximo número de revertantes por μg fue obtenido por el S9 de animales tratados con ALB/CH (323 rev/μg), y el comportamiento de los S9's de Aroclor y FBβ-NF tuvieron una actividad muy pobre con relación al testigo.

Con la CP (figura14), el mayor número de revertantes por μg se obtuvo con los S9 de Aroclor (0.49 rev/μg) y FBβ-NF (0.46 rev/μg) y en menor grado los S9 inducidos con ALB/CH (0.16 Tab III).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA II ACTIVIDAD MUTAGÉNICA EN *S. TYPHIMURIAM* DE MUTÁGENOS ACTIVADOS CON S9'S DE RATAS TRATADAS CON AROCLOR, FB/B-NF Y ALB/CH

COMPUESTO	DOSES ($\mu\text{g}/\text{caja}$)	TESTIGO	AROCLOR	FENOBARBITAL- β - NAFTOFLAVONA	CYCLOHEXANOL/AL BRINDAZOL
B[a]P	0	33.33 \pm 4.1	30.33 \pm 6.5	39 \pm 4.5	46.33 \pm 4
	2.5	59.33 \pm 4.7	276.33 \pm 33.5	173.67 \pm 15.6	134 \pm 6.7
	5.0	56.67 \pm 0.5	313.67 \pm 9	180 \pm 19.5	139 \pm 3
	7.5	67 \pm 4	272.33 \pm 24.3	179 \pm 20.9	128.67 \pm 12.6
	10	69.33 \pm 11.3	268 \pm 26.5	194 \pm 17.3	126.67 \pm 27.7
	rev/ μg ^b	3.18	17.25	12.61	7.81
3-MC	0	212.0 \pm 45.9	116.7 \pm 10.9	157.0 \pm 6.7	139.0 \pm 42
	0.5	192.0 \pm 66.4	153.7 \pm 34.1	199.7 \pm 54.5	204.0 \pm 26.2
	1.0	169.0 \pm 34.5	179.7 \pm 31.5	180.0 \pm 41.9	186.0 \pm 21
	2.5	223.0 \pm 33	277.0 \pm 7.3	397.7 \pm 14.1	339.3 \pm 39.3
	5.0	220.0 \pm 33.5	348.3 \pm 29.6	555.0 \pm 15.8	370.3 \pm 15.6
	rev/ μg	6.2	49.5	82.1	47.2
2-AP	0	22.33 \pm 4.1	26.66 \pm 4.1	26 \pm 1.7	21 \pm 5
	0.5	96.33 \pm 21	66 \pm 5.2	128 \pm 4.3	118 \pm 33.1
	1.0	117 \pm 38.3	94.67 \pm 11.7	181.6 \pm 25.6	241.33 \pm 37.7
	2.5	233 \pm 18	246 \pm 30.6	448.6 \pm 79.7	355.33 \pm 73.2
	5.0	327 \pm 19.15	496 \pm 41.9	728.33 \pm 33.26	507.33 \pm 95.1
	rev/ μg	36.31	95.68	148.25	91.28
A-NDPA	0	95 \pm 12.7	70.33 \pm 8.1	86.67 \pm 8.3	91 \pm 17
	50	95.33 \pm 6.1	148.67 \pm 15.3	180.67 \pm 26.7	137.33 \pm 13
	100	100 \pm 17.5	188 \pm 37.8	257.67 \pm 15.8	201.67 \pm 15.9
	150	103.67 \pm 12.3	209.33 \pm 19.7	296.67 \pm 12.2	186.67 \pm 9
	200	104.67 \pm 7.5	247.67 \pm 7.7	398.67 \pm 5.7	213 \pm 26.6
	rev/ μg	0.855	0.83	1.48	0.58
NPYR	0	146.33 \pm 115.8	148.33 \pm 9	156.33 \pm 18.6	134.67 \pm 12.8
	4.5	154.33 \pm 20.5	195 \pm 10.8	153.33 \pm 17	239.67 \pm 46.1
	9	152 \pm 11.5	182.33 \pm 15.8	209.67 \pm 20.2	254.67 \pm 21.5
	13.5	154 \pm 22.7	194.67 \pm 2	188.67 \pm 16	327.33 \pm 17
	18	174 \pm 10.5	195.67 \pm 14.5	190 \pm 3.4	306 \pm 23.5
	rev/ μg	1.22	2	2.13	9.45
A-NDMA	0	137.33 \pm 115.9	136 \pm 2.6	130.33 \pm 16.5	118.5 \pm 2.5
	20	149 \pm 21.8	135.67 \pm 14.4	151.33 \pm 13.2	2096.33 \pm 861.5
	40	151 \pm 18.3	141.33 \pm 17	167.33 \pm 14.3	4546 \pm 1634.5
	80	149.33 \pm 11.5	131.67 \pm 6.6	148.67 \pm 6.3	2953.33 \pm 699.3
	160	149 \pm 6	180 \pm 30.5	148.67 \pm 15.2	3385 \pm 1055.6
	rev/ μg (4)	0.34	0.83	0.7	118
CP	0	10.0 \pm 2	7.7 \pm 20.5	8.3 \pm 11.5	16.3 \pm 9.4
	100	13.7 \pm 2	146 \pm 43.3	148.3 \pm 4.1	49.7 \pm 16.2
	250	26.7 \pm 0.5	305.7 \pm 24.9	253.0 \pm 4.7	80.0 \pm 20
	500	55.7 \pm 12	367.7 \pm 97.1	446.3 \pm 56.6	103.3 \pm 31.8
	1000	72.3 \pm 5.1	551.0 \pm 62.6	519.0 \pm 64.5	192.3 \pm 75.2
	rev/ μg	0.86	0.49	0.48	0.16

^a. Cada valor representa el promedio de revertantes histidina⁺ encontradas en 3 replicas de cultivo. ^b Pendiente de la porción lineal de la curva dosis respuesta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

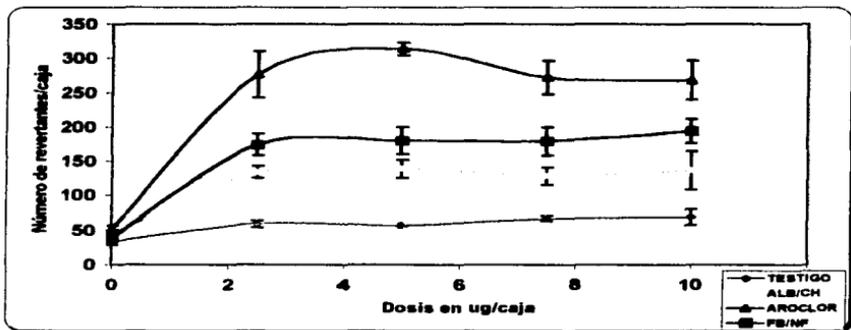


Fig. 8 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DEL B[a]P

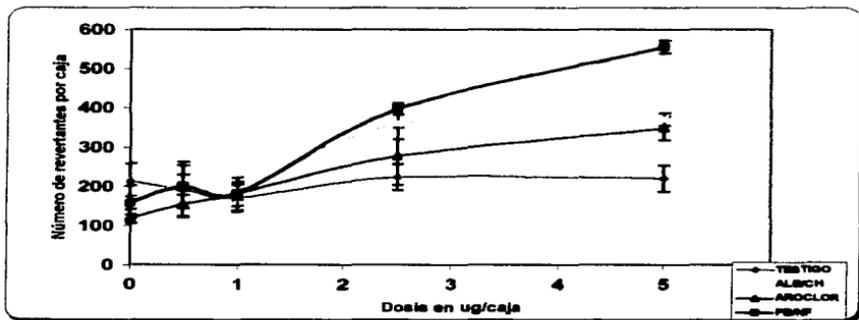


Fig. 9. ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DEL 3-METILCOLANTRENO

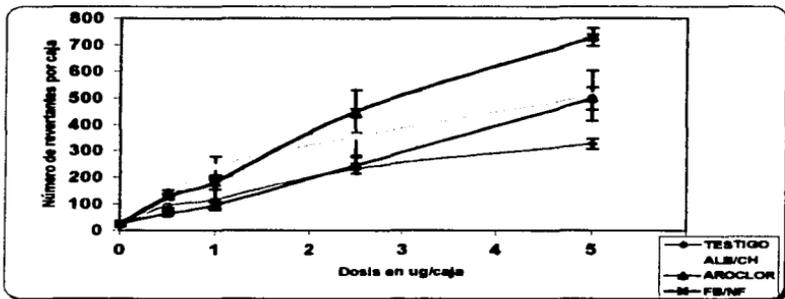


Fig. 10. ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DEL 2-AMINOFLUORENO

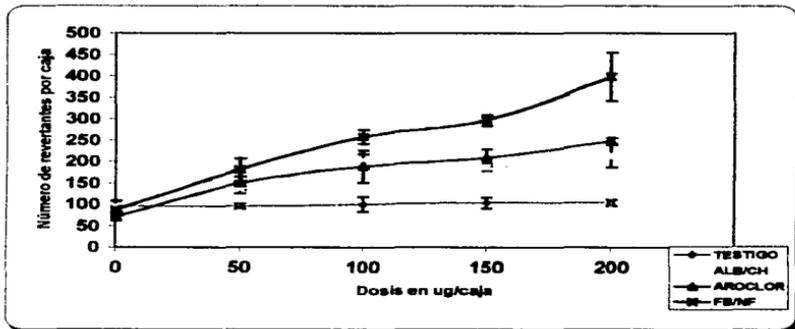


Fig. 11 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA N-NDPA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

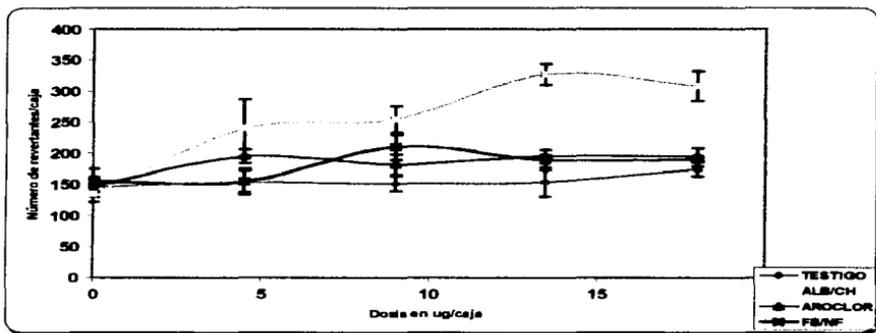


Fig. 12 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA N-NPYR

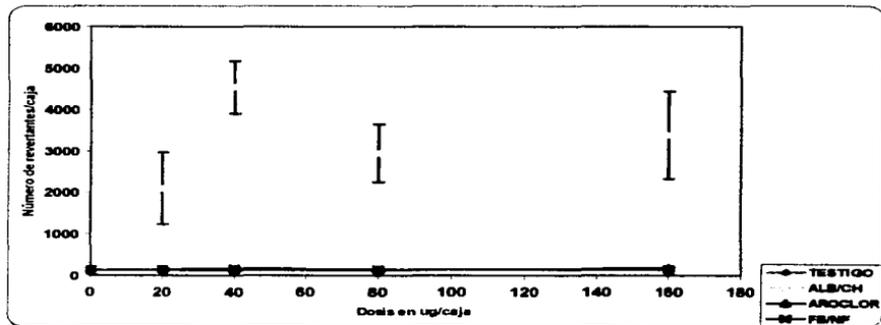


Fig. 13 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA N-NDMA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

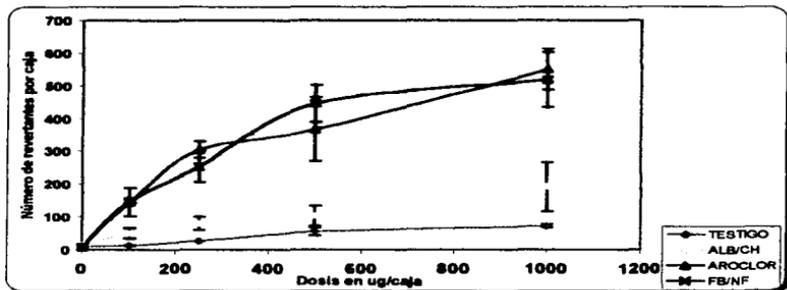


Fig. 14 ACTIVIDAD MUTAGÉNICA DE LA CP

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA III :POTENCIA MUTAGENICA DE CADA PROMUTÁGENO EMPLEADO EN LAS PRUEBAS DE AMES, EVALUADA CON LOS S9 HEPÁTICOS OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES ANIMALES TRATADOS.

	B[a]P	3-MC	2-AF	N-NDPA	NPYR	N-NDMA	CP
TESTIGO	3.18	6.2	58.31	0.055	1.22	0.334	0.06
AROCOR	17.25*	49.5*	95.08*	0.83*	2^{NS}	0.83*	0.49*
FB/β-NF	12.61*	82.1*	140.25*	1.48*	2.13*	0.7^{NS}*	0.48*
ALB/CH	7.01*	47.2*	91.28*	0.58*	9.65*	110*	0.16*

*- $p = < 0.001$, ^{NS} = No significativo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INMUNODETECCIONES

Los patrones de modulación de proteína inmunoreactiva de los CYP's (1A1/2, 2B1/2, 2E1 y 3A) estimulados por los diferentes inductores evaluados, muestra una inducción por encima de los testigo (Fig. 15).

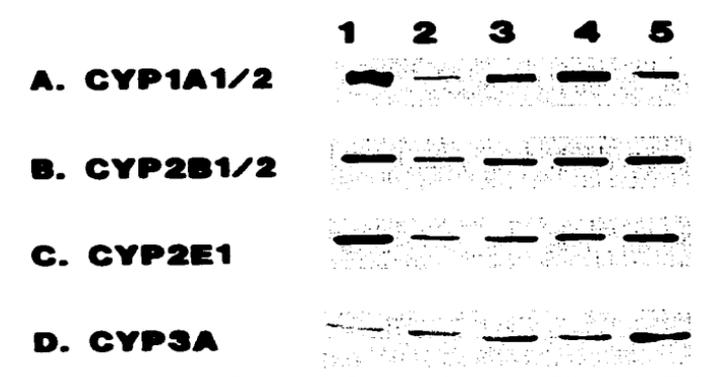


Fig. 15 Análisis del inmunoblot de microsomas hepáticos de ratas machos Wistar sin tratar, y de ratas tratadas con albendazol/ciclohexanol, aroclor y fenobarbital/ β -naftoflavona. Las muestras fueron sometidas a una electroforesis, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa, y expuestas a un anticuerpo policlonal anti-rata desarrollado en cabra contra los CYP's (A) 1A1/2, (B) 2B1/2, (C) 2E1 y (D) 3A. En el carril 1A se observa microsomas que fueron tratados con 3-metilcolantreno, en el carril 1B tratados con fenobarbital, en el carril 1C tratados con acetona y en el carril 1D tratados con dexametasona. El carril 2 corresponde a microsomas de hígados no tratados, el carril 3 a tratados con albendazol/ciclohexanol, el carril 4 a tratados con Aroclor y en el carril 5 hígados de animales tratados con fenobarbital/ β -naftoflavona. En cada carril se colocó 1 μ g de proteína microsómica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.

El análisis densitométrico (tabla IV) también revela que:

En el Western blot del CYP 1A1/2 (figura 16) los hígados inducidos con ALB/CH, Aroclor y FB/NF están 331.5%, 547.9% y 216.2% por encima de los hígados testigo respectivamente, en el CYP 2B1/2 (figura 17) los hígados inducidos con ALB/CH, Aroclor y FB/NF están 213.9%, 265.1% y 256.2% por encima de los hígados v respectivamente, en el CYP 2E1 (figura 18) los hígados inducidos con ALB/CH, Aroclor y FB/NF están 123.3%, 128.8% y 177.8% por encima de los hígados v respectivamente y en el CYP 3A (figura 19) los hígados inducidos con ALB/CH Aroclor y FB/NF están 101.7%, 79.9% y 131% por encima de los hígados testigo respectivamente.

TABLA IV ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LOS INMUNOBLOTS DE MICROSOMAS DE HÍGADOS TRATADOS CON LOS DIFERENTES INDUCTORES.

	TESTIGO	ALB/CH	AROCLOR	FB/NF
CYP1A1/2	370.96	1230.07	2032.82	802.25
CYP2B1/2	498.25	1066.14	1321.21	1276.75
CYP2E1	650.21	860.39	837.89	1156.18
CYP3A	1011.59	1029.03	808.33	1325.83

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

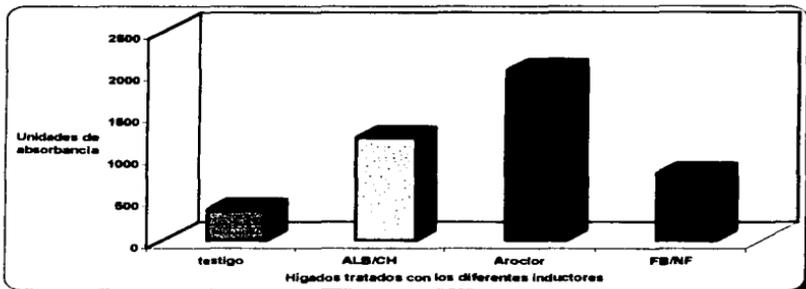


Fig. 16. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA INMUNODETECCIÓN DEL CYP1A1/2

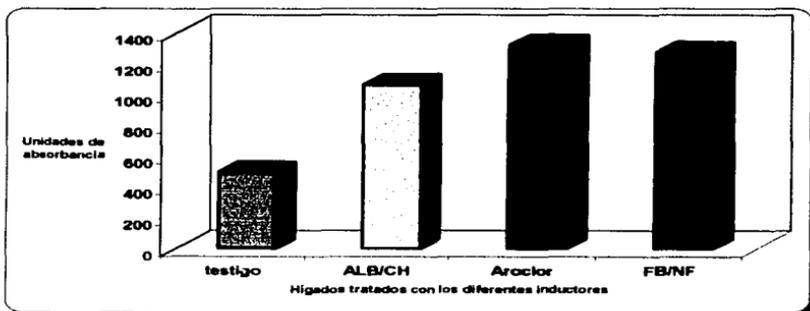


Fig.17 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA INMUNODETECCIÓN DEL CYP2B1/2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

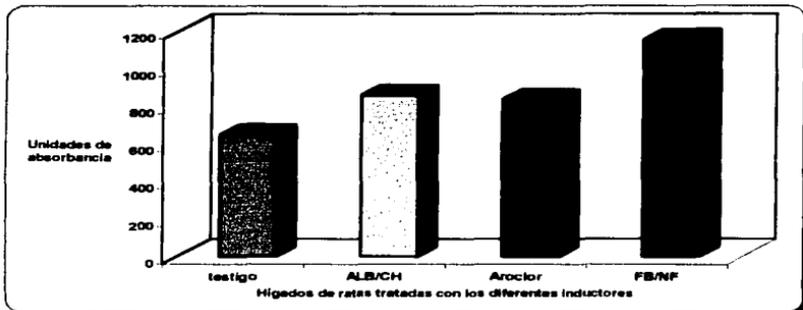


Fig. 18 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA INMUNODETECCIÓN DEL CYP2E1

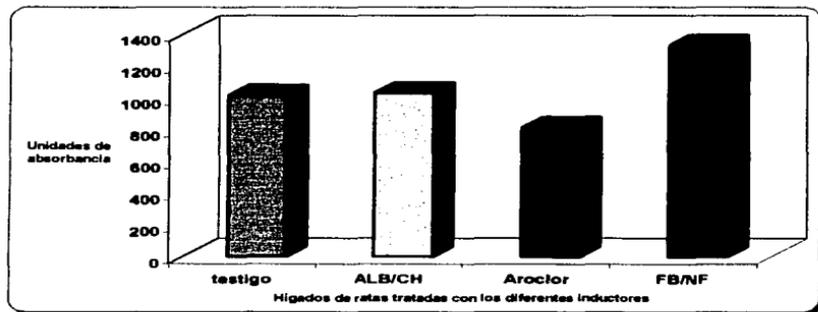


Fig. 19 ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA INMUNODETECCIÓN DEL CYP3A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Estudios anteriores han mostrado que el disolvente industrial CH es un agente antimutagénico *in vitro* y a la vez, es un inductor de citocromos P450 en rata *in vivo*.^{62, 63} La exposición oral de ratas a este agente en el agua de beber, da lugar al aumento en las concentraciones hepáticas de las subfamilias de los CYP2B y CYP2E. Por otro lado, los antihelmínticos ampliamente usados para el control de parasitosis entre los cuales se encuentra el ABZ son inductores potentes de las subfamilias del CYP1A.⁶⁴ El ABZ es más potente que inductores como la 2 naftilamina, naranja de acridina y el aminobifenil,⁶² los cuales a su vez son considerados como inductores efectivos en la literatura especializada.

Los mutágenos y carcinógenos ambientales ejercen su acción genotóxica a través de su conversión metabólica a reactivos intermedios electrofílicos mediada por enzimas de CYP; dichos reactivos son capaces de interactuar covalentemente con macromoléculas importantes como ácidos nucleicos y proteínas. Los CYP1A, 2B y 2E son las principales subfamilias que están involucradas en la "activación" de mutágenos y carcinógenos ambientales y por lo tanto, sus niveles de actividad en los sistemas metabólicos *in vitro* (S9, homogeneizados de roedores) usados para la detección de genotóxicos ambientales es de gran importancia.

Los inductores del CYP son usados en la producción de los S9 empleados en las pruebas de mutagenicidad *in vitro* y son evaluados principalmente en el ensayo de Ames,⁷⁶ sin embargo, recientemente los ensayos enzimáticos asociados a la presencia de enzimas de CYP han ganado importancia con relación a los ensayos microbianos.^{83, 84} Estos

métodos sin embargo, han estado principalmente enfocados a explorar la actividad de las subfamilias, CYP1A y CYP2B.

El CYP 2E1 es una enzima involucrada en la activación metabólica de un importante cantidad de mutágenos ambientales como son la nitrosodimetilamina, la nitrosodietilamina, la nitrosodipropilamina, la nitrosodibutilamina, la nitrosopirrolidina y la nitrosonornicotina entre otros. Sin embargo tanto el Aroclor como la combinación del FB/ β -NF son pobres inductores del CYP2E1, ya que los homogeneizados hepáticos obtenidos de animales tratados con estas mezclas inductoras no son capaces de activar la NDMA a baja concentración.^{84, 85, 86}

El presente trabajo estuvo enfocado en explorar la posibilidad de un efecto complementario entre el ABZ y el CH para inducir las subfamilias de CYP's involucradas en la activación de mutágenos.

En los resultados obtenidos, el Aroclor fue el único compuesto capaz de producir una importante inducción del CYP total (tabla I y Figura 1) confirmando los datos reportados por otros autores,⁸⁴ en contraste a una reducción del 13% observada en los microsomas inducidos con ALB/CH (Tab I y Figura 1); mientras que la combinación del FB/BNF no modifica la concentración final de CYP total con relación a los microsomas testigo. Tomando en cuenta que las subfamilias de los CYP 1A, 2B y 2E representan el 11% del CYP total en hígado de rata,⁸² una inducción del CYP total no necesariamente es un reflejo de la capacidad del S9 para metabolizar mutágenos. Por otro lado, en términos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

generales la reducción en el CYP total puede deberse a una disminución en la expresión de la subfamilia CYP2C que constituye el 65% del total de los CYP en hígado de rata; de este CYP no existe evidencias de que sea un grupo de enzimas implicadas en el metabolismo de mutágenos⁸⁷.

Con los resultados obtenidos de las pruebas de Ames, actividad enzimática e inmunodetección, se demuestra que el tratamiento de ratas con ABZ/CH fue menos eficiente que el tratamiento con Aroclor y FB/βNF para inducir las subfamilias de los CYP's hepáticos 1A y 2B.

Los microsomas obtenidos de hígados de ratas tratadas con Aroclor y FB/βNF presentan una alta actividad de EROD (asociada al CYP1A1) y una elevada concentración de proteínas en el análisis de Western blot (Tab I, Fig. 2 y 15). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la prueba de Ames en la cual las fracciones S9 obtenidas con estos compuestos fueron más efectivas en la activación del B[a]P y el 3MC a mutágenos detectados con la cepas TA98 y TA100, respectivamente (Tab II, Fig. 8 y 9).

A pesar de que el Aroclor fue el mejor inductor del CYP1A2 (Tab I, Fig 3, 15 y 16), el S9 de ratas tratadas con FB/β-NF fue el más efectivo en la activación del 2-AF en la prueba de Ames (Tab II, III y Fig 10). La intervención del Aroclor en la modulación de enzimas de desintoxicación de fase II u otros CYP's, que no fueron analizados en este trabajo, puede ser el responsable de este efecto.

El protocolo de inducción con ABZ/CH también muestra un incremento tanto en la concentración de proteínas como en la actividad del CYP1A1/2 (Tab I, Fig 15 y 16), y los S9 de ratas tratadas con esta mezcla fueron capaces de mediar la mutagenicidad del B[a]P, 3MC y 2-AF (Tab. II, III, Fig. 8, 9 y 10). Adicionalmente, los S9 de Aroclor y ABZ/CH mostraron una eficiencia similar para activar estos dos últimos mutágenos.

La inducción del CYP2B1 y CYP2E1 participa en el aumento de la genotoxicidad mostrada por la NDPA⁸⁸, y los mismos autores al emplear anticuerpos monoclonales contra estas enzimas, demostraron que el CYP2B1 contribuía en un 65% en la despropilación de la NDPA. Nuestros datos coinciden con estos resultados en cuanto a que los S9 de hígado de animales tratados con FB/ β NF y con Aroclor, fueron los más eficientes para activar la NDPA (Tab. II, III, Fig. 11). Por otra parte, los S9 obtenidos de animales tratados con CH/ABZ incrementaron 10 veces la potencia mutagénica de la NDPA comparada con el S9 testigo (Tab. II, III).

Las enzimas inducibles con etanol (CYP2E1) activan en la prueba de Ames a la NDMA a su metabolito mutagénico^{89, 90}. El CYP2E1 está también involucrado en la α -hidroxilación de la NPYR, aumentando su potencia mutagénica cuando se emplean inductores del CYP2E1 en la preparación de la fracción S9.⁷⁴ De toda la mezcla de inductores del CYP usados en este trabajo, la mezcla del ABZ/CH fue la más efectiva para elevar la actividad hepática microsómica de la 4-nitrofenol hidrolasa asociada con el CYP2E1 (Tab. I, Fig. 6), y por lo tanto, la mutagenicidad de la NDMA y la NPYR sólo se detecta claramente cuando se emplea la mezcla de ABZ/CH (Tab. II, III, Fig. 12 y 13). Se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ha reportado que las fracciones S9 de ratas tratadas con Aroclor y PB/ β -NF activan la NDMA en la prueba de Ames, en dosis de hasta 500-5000 μ g/caja.⁸⁴

Las subfamilias CYP2B y en menor grado el CYP3A, están involucradas en la transformación de la ciclofosfamida (CP) en el derivado genotóxico^{91, 92}; por lo tanto, el aumento en la potencia mutagénica de esta profármaco anticanceroso se obtiene con S9 de hígado de ratas tratadas con Aroclor y FB/ β -NF (Tab. II, III, Fig. 14). Puesto que el CYP3A no se modifica con ninguno de los diferentes tratamientos empleados (Tabla I Fig.7 y 15), nuestros datos sugieren que el CYP2B es la principal enzima involucrada en la activación la CP, lo cual esta de acuerdo con reportes previos.^{92,93}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

La combinación de ABZ/CH usado en este trabajo induce las subfamilias 2E y en menor proporción los CYP1A, 2B.

Aún siendo los S9 de hígados de ratas tratadas con ABZ/CH los menos potentes en elevar las actividades del CYP1A, 2B son capaces de activar eficientemente promutágenos metabolizados por estas subfamilias de CYP y consecuentemente representan una buena alternativa para la detección *in vitro* de agentes genotóxicos activados solamente por el CYP2E1.

El Aroclor 1254 es el mejor inductor de los CYP 1A1/2, a la vez que es un buen inductor de los CYP2B1/2.

El FB/NF es un buen inductor de las subfamilias 2B1/2, además de inducir eficientemente a la subfamilia 1A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

CYP	Citocromo P450
FMO	Flavinmonooxigenasa
EBT	Elemento basal de transcripción
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos policíclicos
A _{rr} t	Translocador nuclear del AhR
B [a] P	benzo [a] pireno
HFA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
NNK	4-[(metilnitrosamina-1-(3 piridil)-1-butanona]
DDT	diclorodifeniltricloroetano
PCB	bifenilos policlorados
TCPOBOP	1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benceno
NADHP	Nicotinamida adenina nucleótido fosfato reducido
NADH	Nicotinamida adenina nucleótido reducido
S9	Fracción mitocondrial
FB/β-NF	Fenobarbital β-naftoflavona
CH	Cyclohexanol
ALB	Albendazol
ABZSO	Sulfóxido de albendazol
ABZSO ₂	Sulfona de albendazol
AROD	O-dealkilación de alkoxi-resorruфина
KCl	Cloruro de potasio
EDTA	Acido etilendiamina tetraacetico
DTT	Ditiotreitól
Fe	Hierro
CO	Monóxido de carbono
EROD	O-dietilaza de etoxi-resorruфина
MROD	O-dietilaza de metoxi-resorruфина
PROD	O-dietilaza de pentoxi-resorruфина
BROD	O-dietilaza de benziloxi-resorruфина
nm	Nanómetros
HPNF	Hidroxilasa de p-nitrofenol
HClO ₄	Acido perclorico
NaOH	Hidróxido de sodio
MgCl	Cloruro de magnesio
END	N-demetilación de la eritromicina
rpm	Revoluciones por minuto
amoles	Nanomoles
pmoles	Picomoles
2-AF	2-Aminofluoreno
N-NDPA	Nitrosodipropilamina
NPYR	Nitrosopirrolidina
N-NDMA	Nitrosodimetilamina
3-MC	3-Metilcolantreno
CP	Ciclofosfamida

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- ¹ **Guengerich FP.** 1987. Mammalian cytochromes P450, Vol. 1. Boca Raton, Florida, E.U.A. CRC Press
- ² **Hollemberg Paul f.**1992. Mecanism of cytochrome P450 and peroxidase-catalized xenobiotic metabolism. *FASEB J.* 6 686-691
- ³ **González FJ, Gelboin HV.** 1993. Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *J. Toxicol. Environ. Health* 40:289-308.
- ⁴ **Bourdi M, Larrey D, Nataf J, Bernuan J, Pessayre D, Iwasaki M, Guengerich FP, Beaune PH.** 1990 Anti-liver endoplasmic reticulum autoantibodies are directed against human cytochrome P-450IA2. A specific marker of dihydralazine-induced hepatitis. *J Clin Invest.* 85: 1967-1973.
- ⁵ **Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB** 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism *J. Pharmacol Exp The.* 187: 185-194.
- ⁶ **Kamataki T, Neal RA.** 1976. Metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) by a reconstituted mixed-funcion oxidase enzyme system: studies of the covalent binding of the sulfur atom. *Mol. Pharmacol.* 12: 933-944.
- ⁷ **Ortiz de Montellano PR, Mico BA.** 1981. Destruction of cytochrome P-450 by allylisopropylacetamide is a suicidal process. *Arch Biochem Biophys.* 206:43-50.
- ⁸ **Ortiz de Montellano PR, Mico BA, Mathews JM, Kanaz KL, Miwa GT, Lu AY.** 1981. Selective inactivation of cytochrome P-450 isozymes by suicide substrates. *Arch Biochem Biophys.* 210: 717-728

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

⁹ Nebert DW, Nelson DR. 1991. P450 gene nomenclature based on evolution. *Meth*

Enzymol. 206:3-11

¹⁰ Parke DV, Ioannides C, Lewis FV. 1991. The 1990 Pharmaceutical Manufacturers Association of Canada Reynote Lecture. The role of the cytochrome P450 in the detoxification and activation of drug and other chemicals. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69:537-549

¹¹ Nebert D, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR and Waxman DJ. 1991. The P450 superfamily: update of new sequences, genes mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12 1-51.

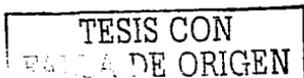
¹² Zaigler M, Rietbrock S, Szymanski J, Dericks-Tan JS, Staib AH, Fahr U. 2000. Variation of CYP1A2-dependent caffeine metabolism during menstrual cycle in healthy women. *Ins J Clin Pharmacol Ther.* 38 :235-244.

¹³ Kemper B. 1993 Mammalian cytochrome P450 genes, *Frontiers in Biotransformation*, 8 :1-58.

¹⁴ Patmanaban G, Nirodi CS.1994. Regulation of phenobarbitone-inducible cytochrome P450 gene expression. *Frontiers in Biotransformation* 9:60-84.

¹⁵ Fulco AJ, 1991, P450_{ind-3} and others inducible bacterial P450 cytochromes: Biochemistry and regulation, *Ann Rev of pharmacol and Toxicol.*31, 177-203.

¹⁶ Paavo Honkakoski y Masahiko Negishi.2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* 347:321-337.(Rev).



- ¹⁷ **Abdel-Rahman SZ, Salama SA, Au WW, Hamada FA.** 2000. Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 genes in NNK-induced Chromosome aberration in cultures human lymphocytes. *Pharmacog* 10 :239-49.
- ¹⁸ **Gibson G G, Skeett P.** 1994. Introduction to drug metabolism, 2^a ed., Chapman and Hall, London.
- ¹⁹ **Murray M.**1992. P450 enzyme: inhibition mechanisms, genetic regulation and effect of liver disease, *Clin Pharmacol. Concep.* 23 132-149.
- ²⁰ **Okey A B.** 1990. Enzyme induction in the cytochrome P450 system, *Pharmacology and Ther.* 45: 241-98.
- ²¹ **Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y (Eds).** 1993. *Cytochrome P-450 2^a ed.* Tokio : Kodansha
- ²² **Ioannides C Parker DV.** 1993. Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis, *Drug metabol Reviews.* 25,485-501.
- ²³ **Kamatani T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R.** 1983. Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. *Arch Biochem Biophys.*225:758-770.
- ²⁴ **Ryan D E, Thomas P E, Reik L M, Livin W.** 1982. Purification, characterization, and regulation of five rat hepatic microsomal cytochrome P450 isoenzymes. *Xenobiotica* 11:727-744.
- ²⁵ **Gueengerich F P, Shimada T.**1991 Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4:391-407.

- ²⁶ Johnson E F, Levitt A S, Muller-Eberhard U, Thorgerirsson S S. 1980. Divergent pathways of carcinogens metabolism: metabolism of 2-acetylaminofluorene by multiple forms of cytochrome P450. *Cancer res.* 40:4456-4460.
- ²⁷ Gonzalez F J. 1989. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40:243-288.
- ²⁸ Pelkonen O, Nebert D W. 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34:189-222.
- ²⁹ Miles J S, Spurr N K, Gough A C, Jowett T J MacLaren A W, Brook J D, Wolf C R. 1988. A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucl. Acids. Res.* 16: 5783-5795.
- ³⁰ Hardwick J P, Gonzalez F J, Kasper CB. 1983. Transcriptional regulation of rat liver epoxide hydratase, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome P450b₁ genes by Phenobarbital. *J. Biol. Chem.* 258:8081-8085
- ³¹ Poland, A., Mak, I., Glover, E., Boatman, R. J., Ebetino, F. H., and Kende, A. S., 1980. 1,4-Bis[2(3,5-dichloropyridyloxy)]-benzene, a potent phenobarbital-like inducer of microsomal monooxygenase activity, *Mol Pharmacol.* 18:571-575
- ³² Ioannides C, Park D V. 1975. Mechanism of induction of hepatic microsomal drug metabolizing enzymes by a series of barbiturates. *J. Pharm Pharmacol.* 27:739-743.
- ³³ Omiecinski C J. 1986. Tissue-specific expression of rat mRNAs homologous to cytochromes P-450b and P-450e. *Nucleic Acids Res.* 14:1525-39.
- ³⁴ Park B K, Breckenridge A M. 1981. Clinical implications of enzyme induction and enzyme inhibition. *Clin. Pharmacokinet.* 6:1-9.

-
- ³⁵ MacDonald M G, Robinson D S, Silvester D, Jaffe J J. 1969. The effects of phenobarbital, chloral betine, and glutethimide administration on warfarin plasma levels and hypoprothrombinemic response in man, *Clin pharmacol. Ther.* 10: 80-83
- ³⁶ Kharsach E D, Hankins DC, Cox K. 1999. Clinical isoflurane metabolism by cytochrome P450 2E1 *Anesthesiology*; 90:766-771.
- ³⁷ Kim HJ, Chun YJ, Park JD, Kim SI, Roh JK, Jeong TC. 1997. Protection of rat liver microsomes against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by red ginseng saponin through cytochrome P450 inhibition. *Planta Med.* 63 :415-418.
- ³⁸ Ding X, Coon M J. 1990. Induction of cytochrome P450 isoenzyme 3a (P450IIE1) in rabbit olfatori mucosa by ethanol and acetona, *Drug. Metab. Disp.* 18:742-746.
- ³⁹ Yang C S, Patten C J, Ishizaki H Yoo J.-S H. 1991. Induction, purification and characterization of cytochrome P450IIE1, *Meth. Enzymol.* 206: 595-600.
- ⁴⁰ Shinizu M, Lasker JT, Satsumi M, Lieber C S. 1990. Immunohistochemical localization of ethanol-inducible P450IIE1 in rat alimentary tract. *Gastroent.* 99:1044-1047
- ⁴¹ Hakkak H, Koraurians S, Ronis S -J J, Ingelman-Sundberg M, Badger T M. 1996. Effect of enteral nutrition and ethanol treatment on the expression and localization of CYP2E1 and CYP2C7 in colon of male rats, *Biochem. Pharmacol.* 51: 61-65.
- ⁴² Farin F M, Pohlman T H, Omiecinski C J. 1994. Expression of cytochrome P450s and microsomal epoxide hydrolase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 124:1-8.
- ⁴³ Song B J., Matsunaga T, Hardwick J P, Pak S S, Veech R L, Yang C S, Gelboin H V, Gozales F J. 1987. Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat, *Mol. Endocrinol.* 1:542-545.

- ⁴⁴ Yoo J-S, Ning S M, Pantuk C B, Pantuk E J, Yang C S. 1991. Regulation of hepatic microsomal cytochrome P450IIE1 levels by dietary lipids and carbohydrates in rat, *J Nutr.* 121:959-1002.
- ⁴⁵ Ronis M J, Huang J, Ingelman-Sundberg M, Badger T M. 1991. Effects of nutrition and ethanol on microsomal monooxygenases in kidney, *FASEB.* 5².
- ⁴⁶ Ekström G, Ingelman-Sundberg M. 1989. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P450. *Biochem. Pharmacol.* 38:1313-1317.
- ⁴⁷ Combalbert J, Fabre I, Fabre G, Dalet I, Derancourt J, Cano J P, Manuel P. 1989. Metabolism of cyclosporin A. IV. Purification and identification of the rifampicin-inducible human liver cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) as a product of P-450 3A gen subfamily, *Drug metab. Dispos.* 17:197-201.
- ⁴⁸ De Waziers I., Cugnenc P H, Yang C S, Leroux J P, Beaune P H.. 1990. Cytochrome P-450 isoenzymes, hepoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 387-391.
- ⁴⁹ Guengerich F P. 1993. Bioactivation and detoxification of toxic and carcinogenic chemical, *Drug. Metab. Dispos.* 21:1-8.
- ⁵⁰ Schuetz E G, Whigton S A, Barwick J, Guzelian P S. 1999. Induction of cytochromes P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 α -carbonitrile regulate the novo synthesis of a common form of cytochrome P450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo, *J. Biol. Chem.* 259: 1984-2000.
- ⁵¹ Gonzales F J, Gelboin H V. 1994. Role of human cytochrome P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev.* 26: 165-183

- ⁵² **Smith G, Stanley L A, Sim E, Strange R C, Wolf C R.** 1995. Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. *Cancer Surv.* 25: 27-65.
- ⁵³ **Maron DM, Ames BN.** 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113:173-215.
- ⁵⁴ **Atsushi H, Satoshi S, Tetsuo S.**1999. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat. Res.* 438:29-36.
- ⁵⁵ **Ioannides C, Lewis D F, Parker D V.** 1995. Mecanism of chemical carcinogenesis and molecular parametric analisis in the safety evaluation of chemicals, in drugs, diet and disease, volume 1 : *mechanistic Approaches to cancer* Ioannides, C. and Lewis, D. F. V. (Eds). 1-46
- ⁵⁶ **Barsotti DA, Marlar RJ, Allen J R.** 1976. Reproductive dysfunction in rhesus monkey exposed of low levels of polychlorinated biphenyls.(Aroclor 1248).*Food Cosmet. Toxicol.*14:99-103.
- ⁵⁷ **Allen JR, Barsotti.**1976. The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant rhesus monkeys. *Toxicology.* 6:331-340.
- ⁵⁸ **Alvaeres AP, Bickens DR, Kappas A.**1973. Polychlorinatedbiphenyls: a new type of inducer of cytochrome P488 in the liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 70, 1321-1325.
- ⁵⁹ **Clare C.** 1989. The stete play for PCBs. *BIBRA Bull* ,28:111-114.
- ⁶⁰ **Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Matsuda N, Ishii K, Kato R.** 1983. A high-spin form of cytochrome P-450 highly purified from polychlorinated biphenyl-treated rats.Catalytic characterization and immunochemical quantitation in liver microsomes. *Mol Pharmacol.*24:146-55.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- ⁶¹ **Matsushima T, Sawamura M, Hara K, Sugimura T.** 1976. In vitro Metabolic Activation in *Mutagenesis Testing* 85-88.
- ⁶² **Espinosa-Aguirre, J J, Rubio J, Cassani M, Nosti R, Caballero S, Gonzales I, Martinez G.** 1996 Induction of microsomal enzymes in liver of rat treated with cyclohexanol. *Mutat. Res.*, 368, 103-107.
- ⁶³ **Espinosa-Aguirre J J, Rubio J, Lopez I, Nosti R, Asteiza J.** 1997. Characterization of the CYP isoenzymes profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis*: 12:159-162.
- ⁶⁴ **Asteiza J, Camacho-Carranza R, Reyes-Reyes R E, Dorado-Gonzales V, Espinosa-Aguirre J J.** 2000. Induction of Cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 9: 31-37.
- ⁶⁵ **Brondeau M T, Ban P, Bonnet JP, Guenier J, De Ceaurriz.** 1989. Acetone compared to other ketones in modifying the hepatotoxicity of inhaled 1,2-dichlorobenzene in rat and mice. *Toxicol. Lett.* 49:69-78.
- ⁶⁶ **Sotelo, J.** 1997. Treatment of brain cysticercosis. *Surg. Neurol.* 48:110-115.
- ⁶⁷ **Moroni P, Buronfosse T, Longin-Sauvageon C, Delatour P, Benoit E.** 1995. Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 23: 160-166.
- ⁶⁸ **Souhaili-ElAmri H, Mothe O, Totis M, Masson C, Batt AM, Delatour P, Siest G.** 1988. Albendazole sulfonation by liver cytochrome P-450c. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 758-763.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⁶⁹ Delatour P, Garnier F, Benoit E, Longin C. 1984. A correlation of toxicity of albendazole and of oxfendazole with their free metabolites and bound residues. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 7: 139-145.
- ⁷⁰ Souhaili-EIAMri H, Fargetton X, Benoit E, Totis M, Batt A M..1988. Inducing effects of albendazole on rat liver-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92:141-145.
- ⁷¹ Ames B M, McCann J, Yamasaki E.1975. *Mutation Res* 31: 347-364.
- ⁷² Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic tranferof protin from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci* 76 :4350-4354
- ⁷³ Omura T y Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microomes. *J. Biol.Chem.*239 :2370-2378
- ⁷⁴ Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 48 923-936.
- ⁷⁵ Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 :248-254.
- ⁷⁶ Matsushima T, Sawamura M, Hara K, SugimuraT. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In DeSerres,F.J., Fouts,J.R., Bend,J.R. and Philpot,R.M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. Elsevier/North-Holland, Amsterdam, pp. 85-88.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⁷⁷ **Burke MD, Mayer RT.** 1985. Inherent specificities of purified cytochromes P450 and P448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxiresorufin deethylation. *Drug. Metab. Dispos.* 3:245-253.
- ⁷⁸ **Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT.** 1985. Ethoxy Pentoxi and benzyloxiphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.* 34:3337-3345.
- ⁷⁹ **Rodrigues AD, Prough RA.** 1991. Induction of cytochromes P5401A1 and P4501A2 and measurement catalytic activities. *Methods Enzymol.* 206:423-431.
- ⁸⁰ **Koop DR.** 1986. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isoenzyme 3A. *Mol. Pharmacol.* 29 :399-404.
- ⁸¹ **Alexandros N Alexidis, Jan NM Commandeur, Eleni A, Rekka De, Groot, Panos N, Kourounakis, Nico PE, Vermeulen.** 1996. Novel piperidine derivatives: inhibitory properties towards cytochrome P450 isoforms, and cytoprotective and cytotoxic characteristics. *Environ Toxicol and Pharm.* 1:81-88
- ⁸² **Lewis D F V.** 1996 P450 substrate specificity and metabolism. In Rubenstein, M.H., Wilson, C. G. (eds), *Cytochrome P450, Structure, Function and Mechanism.* Taylor and Francis, London, pp 115-167
- ⁸³ **García Franco S, Domínguez G, Pico JC.** 1999. Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles. *Mutagenesis.* 14: 323-326.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- ⁸⁴ Callander RD, MacKay JM, Clay P, Elcombe CR, Elliott BM. 1995. Evaluation of Phenobarbital/ β -naphthoflavone as an alternative S9-induction regime to Aroclor 1254 in the rat for use in in vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 10:517-522.
- ⁸⁵ Callander RD, MacKay JM, Clay P, Elcombe CR, Elliott BM. 1995. Evaluation of Phenobarbital/ β -naphthoflavone as an alternative S9-induction regime to Aroclor 1254 in the rat for use in in vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis*. 10: 517-522.
- ⁸⁶ Yoshikawa K, Nohmi T, Miyata R, Ishidate M. 1982. Differences in liver homogenates from Donryu, Fischer, Sprague-Dawley and Wistar strains of rat in the drug-metabolizing enzyme assay and the Salmonella/hepatic S9 activation test. *Mutat. Res.* 96: 167-186.
- ⁸⁷ Lewis D FV. 1996. P450 substrate specificity and metabolism. In Rubenstein, M.H., Wilson, C. G. (eds), *Cytochrome P450, Structure, Function and Mechanism*. Taylor and Francis, London, pp 115-167.
- ⁸⁸ Shuan L, Holeberg P F. Identification of the cytochrome P450 isozyme involent in the metabolism of the N-Nitrosodipropyl-, N-nitrosodibutyl and N-nitroso-n-butyl-n-propylamine. *Carcinogenesis*. 17:839 -848.
- ⁸⁹ Haag S, Sipes G. 1980. Differential effects of acetone or aroclor 1254 pretreatment on the microsomal activation of dimethylnitrosamine to a mutagen. *Mutat. Res.* 74: 431-438.
- ⁹⁰ Garro A J, Seitz HK, Lieber CS. 1981. Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer Res.* 41:120-124.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- ⁹¹ **Chang TKH, Weber GF, Crespi CL, WaxmanDJ.** 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochrome P450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res.*53: 5629-5637.
- ⁹² **Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ.** 1999. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug. Metab. Dispos.* 27:655-667.
- ⁹³ **Ellard S, Mohammed Y, Dogra S, Wolfel C, Doehmer J, Parry JM.** 1991. The use of genetically engineered V79 chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Mutagenesis.* 6:461-470.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

D.Escobar-García¹, R.Camacho-Carranza¹, I.Pérez,²
V.Durazo¹, M.Arraiga-Albás¹ and J.J.Espinosa-Aguirre^{1,2,4}

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas y Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México, D.F., ²Torre de Investigación 'Joaquín Cravioto', Instituto Nacional de Pediatría, Investigaciones Sur, 3700-C, 04530 México, D.F. and ³Hospital Juárez de México, Av. Instituto Politécnico Nacional 5160, 07760 México D.F., México

Cyclohexanol (CH) is an industrial solvent capable of inducing cytochrome P450 (CYP) enzymes including the CYP2E and CYP2B subfamilies. S9 from CH treated rats is able to activate several *N*-nitrosamines that are poorly activated by Aroclor 1254, phenobarbital/ β -naphthoflavone (PB/NF) or 3-methylcholanthrene S9 fractions into mutagens detected by the *Salmonella typhimurium* Ames test. Additionally, albendazole (ABZ) is a widely used anthelmintic drug and a potent inducer of the CYP1A subfamily. Since CYP1A, -2B and -2E subfamilies are implicated in the activation of several environmental mutagens/carcinogens, we studied CYP induction in the rat liver by the combined effect of these two compounds, and used S9 derived from it in the *Salmonella* microsome assay to compare with S9 obtained from Aroclor or PB/NF treated rats. Total CYP content in hepatic microsomes was induced by Aroclor, but not by any of the other chemical combinations. Western blot and enzymatic activity analysis revealed quantitative but not qualitative differences in the CYP subfamilies present in the different microsomal fractions; all of the chemicals used increased the levels of CYP1A1/2, CYP2B1/2 and CYP2E1 with respect to control microsomes. CYP3A was not modified by the different treatments. When tested in the Ames test, Aroclor S9 and PB/NF S9 were the most effective in the activation of benzo[a]pyrene and 3-methylcholanthrene which are metabolized mainly by CYP1A; additionally, the highest mutagenic potency of 2-aminofluorene and *N*-nitrosodipropylamine, which are activated by CYP1A2 and CYP2B1, respectively, were obtained with PB/NF S9. All these compounds were also activated when CH/ABZ S9 was used as the exogenous source of metabolism. Mutagens like *N*-nitrosopyrrolidine and *N*-nitrosodimethylamine, activated by CYP2E1, were detected only when CH/ABZ S9 was used, and the effectiveness of the different S9 fractions in activating cyclophosphamide decreased in the following order: Aroclor = PB/NF > CH/ABZ > control. From these experiments we can conclude that the individual CYP-inducing properties of ABZ and CH complement each other when the two compounds are administered in conjunction and that the resulting S9 fraction is able to activate several known mutagens in the Ames test.

Introduction

Preparation of hepatic S9 fraction, required as an integral part of standard *in vitro* genotoxicity assays, involves pretreatment

of the animals with an inducing agent. A mixture of polychlorinated biphenyls designated Aroclor 1254, has been used for a long time for this purpose, but its detrimental environmental impact (Clare, 1989) has prompted a re-evaluation of the continuing use of Aroclor 1254, and alternatives have been proposed. Matsushima *et al.* (1976) showed that a combination of phenobarbital/ β -naphthoflavone (PB/NF) administered intraperitoneally (i.p.) to rats is a good inducer of hepatic microsomal enzymes, different routes of administration have also been successfully used (Elliott *et al.*, 1992; García Franco *et al.*, 1999). Since the original proposal by Matsushima to replace Aroclor 1254 with the combination of PB/NF, mutagens activated by CYP1A, and to a minor extent CYP2B, as well as enzymatic activities for these two subfamilies, have been used to validate the use of S9 induced by different chemicals in the *in vitro* metabolic systems for genotoxicity assays (Guengerich *et al.*, 1982; Callander *et al.*, 1995; García Franco *et al.*, 1999). Nevertheless, the CYP2E subfamily participates in the activation of environmental nitrosamines (Yang *et al.*, 1991) and is poorly induced, or even suppressed, by Aroclor 1254 or PB/NF (Guengerich *et al.*, 1982; Thomas *et al.*, 1987). Cyclohexanol (CH) is an industrial solvent that induces the CYP2E1 and CYP2B1/2 isozymes (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1996, 1997) and albendazole (ABZ) is an anthelmintic drug with a high potential to induce CYP1A1/2 (Souhaili-El Amri *et al.*, 1988; Asteiza *et al.*, 2000); both compounds display lower toxicity than other P450 inducers, and they are not under regulatory control. Based on the latter advantages, along with the CYP induction properties of these two substances, we compared the mutagenicity induced in the Ames test by reference chemicals activated either by S9 induced with the ABZ/CH combination, or by S9 induced with Aroclor or with PB/NF. Biochemical characterization of the three different S9 fractions, including enzymatic activities and western blot analysis, were included.

Materials and methods

Chemicals

Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP), glucose-6-phosphate (G6P), *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosopyrrolidine (NTPR), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), benzo[a]pyrene (B[a]P), 3-methylcholanthrene (3-MC), 2-aminofluorene (2-AMF), cyclophosphamide (CP), an mouse immunoglobulin IgG peroxidase conjugate, methoxyresorufin, 7-pentoxysorufin, 7-benzoyloxyresorufin, resorufin, ethoxyresorufin, albendazole (β -naphthoflavone (NF), 4-nitrophenol and 4-nitrocatechol were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Cyclohexanol was obtained from J.T.Baker (Phillipsburg, NJ). Goat polyclonal anti-rat CYP1A1/2, CYP2B1/2 and CYP2E1, along with microsome standards for each CYP, were manufactured by Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan) and purchased from Gentest (Woburn, MA). Chemicals for electrophoresis and nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA).

Animal treatment

Male Wistar rats (weighing 200–250 g) were housed in polypropylene cages and kept on a 12 h light/dark cycle in which all animals were allowed unrestricted access to laboratory rodent chow and distilled water.

⁴To whom correspondence should be addressed at: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México. Email: jjea@servidor.unam.mx

Four groups of animals were used (four animals/group). One group was treated with 2.5% (v/v) CH in drinking water for 4 days (Espinosa Aguirre et al., 1997). On the third day of CH treatment, animals were administered a single i.p. dose of ABZ (50 mg/kg) in corn oil and were killed 24 h later (Asteiza et al., 2000). In a second group, rats were injected intraperitoneally with a single dose of Aroclor 1254 (500 mg/kg) and killed on day 5 of induction (Ames et al., 1975). PB/NF induction was done following the scheme proposed by Matsushima et al. (1979) with some modifications; animals received three daily i.p. doses of PH (60 mg/kg) and an additional i.p. injection of 30 mg/kg on day 4. PH was injected i.p. to the same rats at a dose of 80 mg/kg on day 5 and the animals were killed on day 5. The last group, used as a control, received four daily doses of corn oil and were killed on day 5.

Preparation of SV and microsomal fractions

Liver S9 fractions were prepared according to Maron and Ames (1983). Briefly, livers from each group were pooled, minced into small pieces and homogenized in 150 mM KCl (3 ml/g liver wet weight). After centrifugation at 9000 g for 10 min, supernatants were decanted in 2 ml aliquots and stored at -70°C until used. Microsomal fractions were obtained as described was centrifuged at 100 000 g for 60 min; the pellets were resuspended in an equal volume of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged. Microsomal fractions were finally resuspended in 100 mM potassium phosphate (pH 7.4), 1.0 mM EDTA, 0.1 mM DTT and 20% glycerol and stored at -70°C. All solutions and glassware were kept at 4°C. Protein concentrations in microsomal fractions were determined according to Bradford (1976).

Mutagenesis assay

Salmonella typhimurium strains TA1535, TA98 and TA100 donated by Dr H.N. Ames (University of California, Berkeley) were used for mutagenesis assays. TA1535 was used to detect the mutagenicity of CP; TA98 for [Blp]^r and 2-af and TA100 for 3-NC, NfPA, NfPK and NfMA. Pre-incubation was performed according to Yagaki et al. (1977) with some modifications. A 0.1 ml aliquot of overnight bacterial culture in nutrient broth, 0.2 ml S9 mixture (30 or 10% S9 fraction, 8 mM Tris-HCl, 3.5 mM MgCl₂, 4 mM KCl, 5 mM G6P, 100 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5) and 0.1 ml of appropriately diluted chemical solution were added to sterile tubes. This mixture was incubated at 37°C for 60 min, mixed with 2 ml top agar at 45°C and poured onto minimal agar plates. Revertant colonies were counted after a 48 h incubation period at 37°C.

Gel electrophoresis and immunoblot analysis

Polyacrylamide slab gel electrophoresis (PAGE) was carried out at room temperature in the presence of SDS using the discontinuous buffer system described by Laemmli (1970). The running buffer contained SDS at a concentration of 1 μg/ml. The slab separating gel (7.8×8×0.075 cm) contained 7.5% acrylamide with 0.2% bis acrylamide. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membrane using the method described by Towbin et al. (1979). For the detection of CYP1A1/2, -2B1/2 and -2E1, nitrocellulose sheets were treated with 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS, blocking solution) containing 0.2% h at 37°C, followed by incubation with individual anti-rat antibodies diluted 1:700 in the blocking solution for an additional 1 h, washed with PBS containing 0.05% Tween 20 and incubated with rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugated secondary antibody (1:2000 dilution) for 1 h at room temperature. The nitrocellulose sheets were washed as before and the immunocomplexes were detected using 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

Biochemical determinations

Ahlyoxyresorufin O-dealkylase (AROD)

Total cytochrome P450 were measured by the method of Omura and Satoh (1964). Microsomal AROD activity was measured spectrofluorometrically by monitoring the formation of resorufin according to Burke's method (Burke et al., 1985, 1994) with some modifications: excitation and emission wavelengths were set at 525 nm, respectively. Substrate (10–40 μM), 1.91–1.94 ml buffer A (50 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, pH 7.6) and 10–40 μl microsomal sample were placed in a fluorimeter cuvette and incubated at 37°C for 3 min. Reactions were started by the addition of 500 μM NADPH (20 μl from a 50 mM solution in buffer A). With a total reaction volume of 2 ml, the cuvette was then placed in the fluorimeter and the reactions followed for 3 min, recording the fluorescence reading every 15 s. Substrates were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM ethoxyresorufin, 0.5 mM methoxyresorufin, 1.0 mM pentoxyresorufin and 10 mM benzoyloxyresorufin. Catalytic activities were calculated from a standard curve of resorufin (0–50 pmol/ml).

Table 1. Comparison of CYP activities for different induction systems

Activity	Uninduced	ALB/CH-induced	Aroclor-induced	PB/NF-induced
CYP P450	0.55	0.48 (87%)	2.57 (467)	0.67 (122)
EROD	24.93	549.98 (2216)	457.2 (18340)	4064.59 (16232)
MROD ^a	25.41	250.99 (988)	1407.09 (5537)	4704.1 (1887)
PROD ^b	7.4	86.3 (1166)	418 (5649)	1068.36 (14437)
BROD ^c	3.3	47.3 (96 (14.3))	3611.33 (10897)	9260.54 (2784)
4-NfP ^d	0.6	2.45 (408)	1.4 (233)	0.9 (150)
HNfP ^e	1.92	1.82 (95)	1.05 (101)	2.2 (117)

*Protein content (nmM/g); ^bpmol resorufin/h protein/nM; ^cfmol 4-NfP/h protein/nM; ^dfmol benzoyloxyresorufin/h protein/nM; ^efmol methoxyresorufin/h protein/nM. Values in parentheses are shown as percentages of control.

4-Nitrophenol hydroxylase (4-NPH)

Hydroxylation of 4-nitrophenol to 4-nitrocatechol was determined by a modification of the method described by Koop (1986). 4-Nitrophenol (0.2 mM) was dissolved in 50 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, pH 7.4, 930 μl of this solution and 50 μl microsomal samples were incubated at 37°C for 5 min. Reactions were started by adding 20 μl 30 mM NADPH and incubation continued for 10 min more. Reaction mixtures were stopped by the addition of 0.5 ml 0.6 N perchloric acid followed by centrifugation. 4-Nitrocatechol formation was then spectrophotometrically determined in 1 ml supernatant plus 0.1 ml 10 N NaOH at 510 nm. A standard curve with 4-nitrocatechol (5–50 nmol/ml) was used to calculate microsomal activity.

Erythromycin N-demethylase (END)

Erythromycin N-demethylation was assessed spectrophotometrically by measuring the production of formaldehyde according to Alessi et al. (1996). The incubation mixture (1 ml final volume) contained 10 mM erythromycin, 1 mg microsomal protein and buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl). The mixture was pre-incubated 3 min at 37°C, the reactions started by the addition of 10 mM NADPH and incubation was continued for 10 min more. The reaction was stopped by the addition of 0.5 ml 12.5% trichloroacetic acid followed by centrifugation at 5600 rpm. Clear supernatant (1 ml) was mixed with 1 ml 3,3'-diaminobenzidine (0.15%), heated at 50°C for 30 min and measured spectrophotometrically at 412 nm. A standard formaldehyde solution (100 nmol/ml) was used for the calibration curve.

Results

Enzyme activity determinations in hepatic microsomes from rats induced by the different treatments are shown in Table 1. Total CYP was highly induced by Aroclor (up to 468%) but not by PB/NF (up to 122%) or by CH/ABZ, in which a 13% reduction from controls was noted. EROD activity was significantly enhanced in hepatic microsomes from Aroclor- and PB/NF-treated rats (183- and 162-fold over controls, respectively). CH/ABZ pretreatment induced control EROD activity by only 22-fold.

The PB/NF combination induced the PROD and BROD activities seen in control microsomes 2.5-fold more than Aroclor. Conversely, Aroclor was 3-fold more effective than PB/NF to induce MROD activity (Table 1). On the other hand, although CH/ABZ induced EROD activity by 22-fold over control, AROD, PROD and BROD activities reached a 10-fold induction, this regimen was the less effective.

The highest induction of 4-nitrophenolhydroxylase activity was obtained with the CH/ABZ regimen, reaching 408% over the control, followed by Aroclor and PB/NF with 233 and 150%, respectively. CYP3A associated erythromycin-N-demethylase activity was not induced by any of the three regimens tested.

The pattern of modulation of the CYP1A1/2, -2B1/2 and -2E1 immunoreactive proteins stimulated by the different inducers tested paralleled that of the related enzyme activities in that both parameters showed an induction over controls (Figure 1).

RESORUFIN

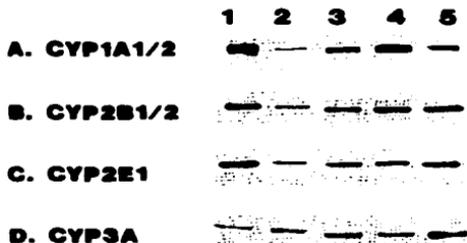


Fig. 1. Immunoblot analysis of microsomal protein (1 μ g) from untreated (lane 2), cyclohexanol-albendazole-treated (lane 3), Aroclor-treated (lane 4) and phenobarbital-treated Wistar rats (lane 5). Samples were subjected to electrophoresis, transferred to nitrocellulose sheets and immunohistochemically examined with polyclonal goat anti-rat cytochrome: (A) 1A1/2, (B) 2B1/2, (C) 2E1, and (D) 3A. Conventional standard microsomes (1 μ g) from 3-methylcholanthrene (lane 1A), phenobarbital-treated (lanes 1B and D) and acetone-treated rats (lane 1C) were used as controls.

The biochemical data described above predict that S9 fractions, obtained from animals treated with either one of the three different inducers, are able to "activate" standard pro-mutagens in the *Salmonella* histamine test. Different S9-dependent mutagens were chosen for this purpose: B[a]P and 3-MC are activated by CYP1A1; 2-AF by CYP1A2; NDPA by CYP2B1; NPYR and NDMA by CYP2E1 and CP by CYP2B and CYP3A. Aroclor and PB/NF S9 activated B[a]P to a similar extent, producing 17 and 12 revertants per microgram (rev/ μ g), respectively, contrasting with control S9 that produced 3 rev/ μ g (Table II). Additionally, PB/NF and Aroclor S9 elevated 13- and 8-fold the mutagenic potency of 3-MC with respect to S9 from control rats (Table II). Although not with the same efficiency, CH/ABZ S9 also activated the two polycyclic compounds inducing a 2-fold (B[a]P) and 5-fold (3-MC) increase in their mutagenic potency over controls. 2-Aminofluorene was the only mutagen activated by control S9 and when tested in the presence of S9 mixtures prepared from PB/NF, Aroclor and CH/ABZ treated rats, the activation was enhanced approximately 2-fold over control. Control S9 was unable to activate NDPA but the three inducing mixtures used allowed its detection as a mutagen in the Ames test (Table II). The mutagenic potencies obtained were 0.58, 0.83 and 1.48 rev/ μ g from CH/ABZ, Aroclor and PB/NF S9, respectively.

Mutagenicity by NPYR and NDMA was achieved only with CH/ABZ S9. In the presence of Aroclor or PB/NF S9, these promutagens were unable to duplicate the spontaneous reversion of TA100 tester strain contrasting with an 8-fold (for NPYR) and 323-fold (for NDMA) enhancement over the control when CH/ABZ S9 was used (Table II). Finally, the mutagenic potency of CP was 0.5 rev/ μ g when activated with either Aroclor or PB/NF S9, 0.16 rev/ μ g with CH/ABZ S9 and 0.06 rev/ μ g with control S9 (Table II).

Discussion

Previous studies in our laboratory have shown that the industrial solvent CH acts as an antimutagenic agent when assayed *in vitro* and is an *in vivo* inducer of cytochrome P450 in the

rat (Espinoza-Aguirre *et al.*, 1996, 1997). Exposure of rats to this agent in drinking water gives rise to increased hepatic concentrations of the CYP2B and CYP2E subfamilies. On the other hand, the widely used antihelminthic drug ABZ is a potent inducer of the CYP1A subfamily (Asteiza *et al.*, 2000).

CYP1A, -2B and -2E subfamilies constitute the main groups of enzymes involved in the activation of environmental mutagens/carcinogens and, therefore, their level of activity in *in vitro* metabolic systems (hepatic S9 fractions from rodents) used for the detection of environmental genotoxins is of great importance.

The potential of inducers to be used in the production of S9 for *in vitro* genotoxicity assays has usually been evaluated using the Ames assay (Matsushima *et al.*, 1976), but recently, enzymatic assays associated with the presence of CYP enzymes have gained importance in addition to microbial assays (Callander *et al.*, 1995; Garcia Franco *et al.*, 1999). However, these methods have been mainly focused at exploring the activity of CYP1A and CYP2B subfamilies, even though the CYP2E1 enzyme is also involved in the metabolic activation of important environmental mutagens belonging to the nitrosamine family of chemicals, such as nitrosodimethylamine, nitrosodiethylamine, nitrosodipropylamine, nitrosodibutylamine, nitrosopyrrolidine and nitrosomocitine among others. Since Aroclor 1254 and the combination of PB/NF are poor inducers of CYP2E1, hepatic S9 fractions obtained from animals treated with these inducing mixtures fail to activate NDMA at low concentrations (Matsushima *et al.*, 1976; Yoshikawa *et al.*, 1982; Callander *et al.*, 1995).

The present work was designed to explore the possibility of a complementary effect between ABZ and CH to induce the three CYP subfamilies involved in mutagen activation. Our results showed that Aroclor was the only compound that produced a 5-fold induction of total CYP, confirming the data produced by others (Callander *et al.*, 1995), in contrast to a 13% reduction observed in CH/ABZ microsomes (Table I). PB/NF treatment did not modify the total CYP content seen in control microsomes (Table I). Taking into account that CYP1A, -2B and -2E subfamilies represent just 11% of the

Table II. Mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* of mutagens activated by the liver S9 fraction from Aroclor, phenobarbital/ β -naphthoflavone and cyclohexanol/albendazole-treated rats

Compound	Dose (μ g/plate)	Control S9	Aroclor S9	Phenobarbital/ β -naphthoflavone S9	Cyclohexanol/albendazole S9
B[a]P	0	33.3 ^a	50.3	39.0	46.3
	2.5	59.3	276.3	173.7	134.0
	3.0	56.7	313.7	180.0	139.0
	7.5	67.0	272.3	179.0	128.7
	10	69.3	268.0	194.0	136.7
3MC	rev/plate ^b	3.2	17.3	12.6	7.0
	0	212.0	116.7	157.0	159.0
	0.5	192.0	153.7	196.7	204.0
	1.0	199.0	179.7	180.0	186.0
	2.5	223.0	277.0	397.7	359.3
2-AF ¹	3.0	220.0	348.3	355.0	370.3
	rev/plate	6.2	49.8	82.1	67.2
	0	22.3	26.6	26.0	21.0
	0.5	96.3	66.0	128.0	118.0
	1.0	117.0	94.7	181.6	241.3
NDPA	2.5	233.0	246.0	448.6	355.3
	3.0	327.0	496.0	728.3	507.3
	rev/plate	58.3	95.1	140.2	91.3
	0	95.0	70.3	86.7	91.0
	50	95.3	148.7	180.7	137.3
NBPYR	100	100.0	188.0	257.7	201.7
	150	103.7	209.3	296.7	186.7
	200	104.8	247.7	398.7	213.0
	rev/plate	0.83	0.83	1.48	0.58
	4.5	146.3	148.3	156.3	134.7
NDMA	9	152.0	182.3	209.7	254.7
	13.5	154.0	194.7	188.7	327.3
	18	174.0	193.7	190.0	308.0
	rev/plate	1.22	2.00	2.13	9.65
	0	137.3	136.0	137.3	118.5
CP ¹	20	149.0	135.7	151.3	2096.3
	40	151.0	141.3	167.3	4546.0
	80	149.3	131.7	148.7	2953.3
	160	149.0	180.0	148.7	3385.0
	rev/plate	0.34	0.83	0.7	110
CYP	0	10.0	7.7	8.3	16.3
	100	13.7	146.0	148.3	49.7
	250	26.7	305.3	253.0	80.0
	500	55.7	367.7	446.3	103.3
	1000	72.3	591.0	519.0	192.1
rev/plate	0.06	0.49	0.48	0.16	

^aEach value represents the mean of histidine⁺ revertants found in three replicated plates.

^bSlope from the linear portion of the dose-response curve.

total CYP in rat liver (Lewis, 1996), an inducer of total CYP does not necessarily constitute a good S9 inducer for mutagenicity tests. On the other hand, a reduction in total CYP could be due to a reduced expression of the CYP2C subfamily that accounts for 65% of total CYP in rat liver, and there is no evidence of its implication in mutagen activation.

Results obtained from the Ames test, western blots and enzymatic activities showed that treatment of rats with CH/ABZ was less efficient than Aroclor and PB/NF in inducing the hepatic CYP1A and CYP2B subfamilies (Tables I and II; Figure 1).

Mitosomes from Aroclor- and PB/NF-treated rats displayed a high EROD activity (associated with CYP1A1) and the highest protein concentration in western blot analysis (Table I; Figure 1). These results agreed with the Ames test in which S9 fractions obtained with these chemicals were more effective in activating B[a]P and 3-MC to mutagens as detected with the strains TA98 and TA100, respectively (Table II).

Although Aroclor was the best inducer of CYP1A2 (Table I; Figure 1), S9 from rats treated with PB/NF was the most effective in activating 2-AF in the Ames test (Table II). Modulation by Aroclor of phase II detoxifying enzymes, or other CYPs not measured in this work, could be responsible for this effect.

The protocol for CH/ABZ induction also produced an increment in CYP1A1/2 proteins and activities (Table I; Figure 1) and S9 from rats treated with this mixture was able to mediate the mutagenicity of B[a]P, 3-MC and 2-AF (Table II). Moreover, Aroclor and CH/ABZ S9 have equally activated the last two mutagens.

Induction of CYP2B1 and CYP2E1 mediated the enhanced genotoxicity elicited by NDPA (Shu and Hollenberg, 1990) and by using inhibitory monoclonal antibodies against these enzymes, the same authors (Shu and Hollenberg, 1996) had demonstrated a 65% contribution of CYP2B1 in the deprotection of NDPA. Our data fit well these results in that

81.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

S9 from PB/NF- and Aroclor-treated rats were the most effective in activating the NDA (Table II). On the other hand, CH/ABZ S9 treated 10-fold the mutagenic potency of NDPA as seen with control S9 (Table II).

The ethanol-inducible enzyme CYP2E1 activated NDMA into their mutagenic metabolites in the Ames test (Haag and Sipes, 1980; Garro *et al.*, 1981). CYP 2E1 is also involved in the α -hydroxylation of NPYR, enhancing its mutagenic potency when CYP2E1 inducers were used in the production of the S9 fraction (Burke *et al.*, 1994). Of all the CYP-inducing mixtures used in this work, the CH/ABZ mixture was the most effective in elevating the hepatic microsomal 4-NPH activity associated with CYP2E1 (Table I) and, hence, the mutagenicity of NDMA and NPYR were clearly detected only when CH/ABZ S9 was used. Aroclor and PB/NF S9 were reported to activate NDMA in the Ames test at doses up to 500–5000 μ g/plate (Callander *et al.*, 1995).

CYP2B, and to a minor extent CYP3A, subfamilies are involved in cyclophosphamide transformation to its 4-hydroxylated genotoxic derivative (Chang *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 1999); therefore, the higher mutagenic potency of this anticancer prodrug was obtained with S9 from Aroclor- and PB/NF-treated rats (Table II). Since CYP3A was not modified by the different treatments (Figure 1, Table I), our data suggest that CYP2B is the major enzyme involved in the mutagenic activation of CP according to previous reports by Ellard *et al.* (1991) and Roy *et al.* (1999).

It is now well established that a wide variety of foods, particularly cured meat products, smoked fish, dried nut and alcoholic beverages, contain trace levels of carcinogenic nitrosamines (Scalari, 1983; Havery and Fazio, 1985; Osterdahl, 1991). The detection of these chemicals in environmental samples using microbial mutagenicity tests depends on an effective metabolic system enriched with CYP2E1. For this purpose, the combination of CH/ABZ to induce hepatic CYP in rats provides a better option than Aroclor and PB/NF.

In conclusion, the CH/ABZ regime used in this work results in the induction of CYP1A, -2B and -2E subfamilies. Hepatic S9 from CH/ABZ-treated rats efficiently activates promutagens metabolized by these CYP subfamilies and, consequently, represents a good alternative for the *in vitro* detection of genotoxic agents activated mainly by CYP2E1.

Acknowledgements

The authors would like to express their appreciation to Dr Regina Montero Monroya for critically reviewing the manuscript and to M.S. Clementina Castro Hernández for her excellent technical assistance.

References

Ameo, H.N., McAnn, J. and Yamasaki, E. (1975) Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mutagenicity* microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347–364.
 Alexiadou, A.N., Commandeur, N. and Rekkas, E.A. (1996) Novel piperidine derivatives: inhibitory properties towards cytochrome P450 isoforms, and cytoprotective and cytotoxic characteristics. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **1**, 81–88.
 Asteiza-Ja, Camacho-Carranza, R., Reyes-Reyes, J.E., Pardo, González, V. and Espinosa-Aguirre, J.S. (2000) Induction of cytochrome P450 enzymes by alendazole treatment in the rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **9**, 31–37.
 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halper, J., Haaparanta, T. and Magee, E. (1985) Furoxy-, peroxy-, and benzyloxyisoprenozoles and nitrobenzoxazines of substituted benzoxazines between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3337–3345.

Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R. and Mayer, R.T. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkylresorcinol O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 923–936.
 Callander, R.D., MacKay, J.M., Clay, P., Elcombe, C.R. and Elliott, B.M. (1995) Evaluation of phenobarbital-naphthoflavone as an alternative S9 induction regime to Aroclor 1254 in the rat for use in *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, **10**, 517–524.
 Chang, C. (1989) The state of play for PCBs. *BIBRA Bull.*, **28**, 111–114.
 Chang, T.K.H., Weber, G.P., Crespi, C.I. and Waxman, D.J. (1993) Differential activation of cyclophosphamide and isophosphamide by cytochrome P450 2B subfamily in human liver microsomes. *Cancer Res.*, **53**, 5628–5637.
 Ellard, S., Mohammed, Y., Dogra, S., Wolfe, C., Doehmer, J. and Pary, J.M. (1991) The use of genetically engineered V79 chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in microcosm assays. *Mutagenesis*, **6**, 461–470.
 Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., MacKay, J.M. and Wolf, R.C. (1992) Report of the UK Environmental Monitoring Section on the genotoxicity of Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, **7**, 175–177.
 Espinosa-Aguirre, J., Rubio, J., Casani, M., Nosti, R., Caballero, S., González, I. and Martínez, G. (1996) Induction of microsomal cytochromes in liver of rats treated with cyclohexanol. *Mutat. Res.*, **388**, 103–107.
 Espinosa-Aguirre, J., Rubio, J., López, L., Novil, R. and Asteiza-Ja. (1997) Characterization of the CYP isozyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis*, **12**, 159–162.
 García Franco, S., Domínguez, G. and Picot, C. (1999) Alternatives in the induction and preparation of microsomal cytochrome-induced S9 and their activation profiles. *Mutagenesis*, **14**, 321–326.
 Garro, A.J., Serr, H.K. and Lieber, C.S. (1981) Enhancement of directly-acting mutagenic metabolism and activation to a mutagen following strong ethanol consumption. *Cancer Res.*, **41**, 1318–1322.
 Guengerich, F.P., Dannan, G.A., Wright, S.T., Martin, M.V. and Kaminsky, S. (1982) Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: E1A, E1B, E1C, E1D, E1E, E1F, E1G, E1H, E1I, E1J, E1K, E1L, E1M, E1N, E1O, E1P, E1Q, E1R, E1S, E1T, E1U, E1V, E1W, E1X, E1Y, E1Z, E1AA, E1AB, E1AC, E1AD, E1AE, E1AF, E1AG, E1AH, E1AI, E1AJ, E1AK, E1AL, E1AM, E1AN, E1AO, E1AP, E1AQ, E1AR, E1AS, E1AT, E1AU, E1AV, E1AW, E1AX, E1AY, E1AZ, E1BA, E1BB, E1BC, E1BD, E1BE, E1BF, E1BG, E1BH, E1BI, E1BJ, E1BK, E1BL, E1BM, E1BN, E1BO, E1BP, E1BQ, E1BR, E1BS, E1BT, E1BU, E1BV, E1BW, E1BX, E1BY, E1BZ, E1CA, E1CB, E1CC, E1CD, E1CE, E1CF, E1CG, E1CH, E1CI, E1CJ, E1CK, E1CL, E1CM, E1CN, E1CO, E1CP, E1CQ, E1CR, E1CS, E1CT, E1CU, E1CV, E1CW, E1CX, E1CY, E1CZ, E1DA, E1DB, E1DC, E1DD, E1DE, E1DF, E1DG, E1DH, E1DI, E1DJ, E1DK, E1DL, E1DM, E1DN, E1DO, E1DP, E1DQ, E1DR, E1DS, E1DT, E1DU, E1DV, E1DW, E1DX, E1DY, E1DZ, E1EA, E1EB, E1EC, E1ED, E1EE, E1EF, E1EG, E1EH, E1EI, E1EJ, E1EK, E1EL, E1EM, E1EN, E1EO, E1EP, E1EQ, E1ER, E1ES, E1ET, E1EU, E1EV, E1EW, E1EX, E1EY, E1EZ, E1FA, E1FB, E1FC, E1FD, E1FE, E1FF, E1FG, E1FH, E1FI, E1FJ, E1FK, E1FL, E1FM, E1FN, E1FO, E1FP, E1FQ, E1FR, E1FS, E1FT, E1FU, E1FV, E1FW, E1FX, E1FY, E1FZ, E1GA, E1GB, E1GC, E1GD, E1GE, E1GF, E1GG, E1GH, E1GI, E1GJ, E1GK, E1GL, E1GM, E1GN, E1GO, E1GP, E1GQ, E1GR, E1GS, E1GT, E1GU, E1GV, E1GW, E1GX, E1GY, E1GZ, E1HA, E1HB, E1HC, E1HD, E1HE, E1HF, E1HG, E1HH, E1HI, E1HJ, E1HK, E1HL, E1HM, E1HN, E1HO, E1HP, E1HQ, E1HR, E1HS, E1HT, E1HU, E1HV, E1HW, E1HX, E1HY, E1HZ, E1IA, E1IB, E1IC, E1ID, E1IE, E1IF, E1IG, E1IH, E1II, E1IJ, E1IK, E1IL, E1IM, E1IN, E1IO, E1IP, E1IQ, E1IR, E1IS, E1IT, E1IU, E1IV, E1IW, E1IX, E1IY, E1IZ, E1JA, E1JB, E1JC, E1JD, E1JE, E1JF, E1JG, E1JH, E1JI, E1JJ, E1JK, E1JL, E1JM, E1JN, E1JO, E1JP, E1JQ, E1JR, E1JS, E1JT, E1JU, E1JV, E1JW, E1JX, E1JY, E1JZ, E1KA, E1KB, E1KC, E1KD, E1KE, E1KF, E1KG, E1KH, E1KI, E1KJ, E1KL, E1KM, E1KN, E1KO, E1KP, E1KQ, E1KR, E1KS, E1KT, E1KU, E1KV, E1KW, E1KX, E1KY, E1KZ, E1LA, E1LB, E1LC, E1LD, E1LE, E1LF, E1LG, E1LH, E1LI, E1LJ, E1LK, E1LL, E1LM, E1LN, E1LO, E1LP, E1LQ, E1LR, E1LS, E1LT, E1LU, E1LV, E1LW, E1LX, E1LY, E1LZ, E1MA, E1MB, E1MC, E1MD, E1ME, E1MF, E1MG, E1MH, E1MI, E1MJ, E1MK, E1ML, E1MN, E1MO, E1MP, E1MQ, E1MR, E1MS, E1MT, E1MU, E1MV, E1MW, E1MX, E1MY, E1MZ, E1NA, E1NB, E1NC, E1ND, E1NE, E1NF, E1NG, E1NH, E1NI, E1NJ, E1NK, E1NL, E1NM, E1NO, E1NP, E1NQ, E1NR, E1NS, E1NT, E1NU, E1NV, E1NW, E1NX, E1NY, E1NZ, E1OA, E1OB, E1OC, E1OD, E1OE, E1OF, E1OG, E1OH, E1OI, E1OJ, E1OK, E1OL, E1OM, E1ON, E1OO, E1OP, E1OQ, E1OR, E1OS, E1OT, E1OU, E1OV, E1OW, E1OX, E1OY, E1OZ, E1PA, E1PB, E1PC, E1PD, E1PE, E1PF, E1PG, E1PH, E1PI, E1PJ, E1PK, E1PL, E1PM, E1PN, E1PO, E1PP, E1PQ, E1PR, E1PS, E1PT, E1PU, E1PV, E1PW, E1PX, E1PY, E1PZ, E1QA, E1QB, E1QC, E1QD, E1QE, E1QF, E1QG, E1QH, E1QI, E1QJ, E1QK, E1QL, E1QM, E1QN, E1QO, E1QP, E1QQ, E1QR, E1QS, E1QT, E1QU, E1QV, E1QW, E1QX, E1QY, E1QZ, E1RA, E1RB, E1RC, E1RD, E1RE, E1RF, E1RG, E1RH, E1RI, E1RJ, E1RK, E1RL, E1RM, E1RN, E1RO, E1RP, E1RQ, E1RR, E1RS, E1RT, E1RU, E1RV, E1RW, E1RX, E1RY, E1RZ, E1SA, E1SB, E1SC, E1SD, E1SE, E1SF, E1SG, E1SH, E1SI, E1SJ, E1SK, E1SL, E1SM, E1SN, E1SO, E1SP, E1SQ, E1SR, E1SS, E1ST, E1SU, E1SV, E1SW, E1SX, E1SY, E1SZ, E1TA, E1TB, E1TC, E1TD, E1TE, E1TF, E1TG, E1TH, E1TI, E1TJ, E1TK, E1TL, E1TM, E1TN, E1TO, E1TP, E1TQ, E1TR, E1TS, E1TT, E1TU, E1TV, E1TW, E1TX, E1TY, E1TZ, E1UA, E1UB, E1UC, E1UD, E1UE, E1UF, E1UG, E1UH, E1UI, E1UJ, E1UK, E1UL, E1UM, E1UN, E1UO, E1UP, E1UQ, E1UR, E1US, E1UT, E1UU, E1UV, E1UW, E1UX, E1UY, E1UZ, E1VA, E1VB, E1VC, E1VD, E1VE, E1VF, E1VG, E1VH, E1VI, E1VJ, E1VK, E1VL, E1VM, E1VN, E1VO, E1VP, E1VQ, E1VR, E1VS, E1VT, E1VU, E1VV, E1VW, E1VX, E1VY, E1VZ, E1WA, E1WB, E1WC, E1WD, E1WE, E1WF, E1WG, E1WH, E1WI, E1WJ, E1WK, E1WL, E1WM, E1WN, E1WO, E1WP, E1WQ, E1WR, E1WS, E1WT, E1WU, E1WV, E1WW, E1WX, E1WY, E1WZ, E1XA, E1XB, E1XC, E1XD, E1XE, E1XF, E1XG, E1XH, E1XI, E1XJ, E1XK, E1XL, E1XM, E1XN, E1XO, E1XP, E1XQ, E1XR, E1XS, E1XT, E1XU, E1XV, E1XW, E1XX, E1XY, E1XZ, E1YA, E1YB, E1YC, E1YD, E1YE, E1YF, E1YG, E1YH, E1YI, E1YJ, E1YK, E1YL, E1YM, E1YN, E1YO, E1YP, E1YQ, E1YR, E1YS, E1YT, E1YU, E1YV, E1YW, E1YX, E1YY, E1YZ, E1ZA, E1ZB, E1ZC, E1ZD, E1ZE, E1ZF, E1ZG, E1ZH, E1ZI, E1ZJ, E1ZK, E1ZL, E1ZM, E1ZN, E1ZO, E1ZP, E1ZQ, E1ZR, E1ZS, E1ZT, E1ZU, E1ZV, E1ZW, E1ZX, E1ZY, E1ZZ.

- Souhaili-El Amri,H., Fargetton,K., Benoit,L., Toth,M. and Bat,A.M. (1988) Inducing effects of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolic pharmacokinetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **92**, 141-149.
- Thomas,P.E., Bandiera,F., Maines,S.L., Ryan,D.F. and Levin,W. (1987) Regulation of cytochrome P450j, a high affinity N-nitrosodimethylamine demethylase, in rat hepatic micronomes. *Biochemistry*, **26**, 2280-2289.
- Towhin,H., Stachelin,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**, 4350-4354.
- Yahagi,Y., Nagan,M., Seino,Y., Matsushima,T., Sugimura,T. and Okada,M. (1977) Mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130.
- Yang,C.S., Smith,T., Ishizaki,H. and Hung,J.Y. (1991) Enzyme mechanism in the metabolism of nitrosamines. In O'Neill,I.K., Chen,J. and Bartsch,H. (eds) *Relevance to Human Cancer of N-Nitroso Compounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*. IARC Scientific Publications No. 105, IARC, Lyon, pp. 265-274.
- Yoshikawa,K., Nohmi,T., Miyata,R. and Ishidate,M. (1982) Differences in liver homogenates from Dornry, Fischer, Sprague-Dawley and Wistar strains of rat in the drug-metabolizing enzyme assay and the *Salmonella* hepatic S9 activation test. *Mutat. Res.*, **96**, 167-186.

Received on July 3, 2001; accepted on July 10, 2001

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN