

Tesis de Posgrado

Interacciones del radical libre triclorometilo con componentes celulares y su participación en los efectos tóxicos y potencialmente carcinogénicos del tetracloruro de carbono

Castro, Gerardo Daniel

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Castro, Gerardo Daniel. (1990). Interacciones del radical libre triclorometilo con componentes celulares y su participación en los efectos tóxicos y potencialmente carcinogénicos del tetracloruro de carbono. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2354_Castro.pdf

Cita tipo Chicago:

Castro, Gerardo Daniel. "Interacciones del radical libre triclorometilo con componentes celulares y su participación en los efectos tóxicos y potencialmente carcinogénicos del tetracloruro de carbono". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2354_Castro.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES

INTERACCIONES DEL RADICAL LIBRE TRICLOROMETILO CON
COMPONENTES CELULARES Y SU PARTICIPACION EN LOS EFECTOS
TOXICOS Y POTENCIALMENTE CARCINOGENICOS DEL
TETRACLORURO DE CARBONO

Gerardo Daniel Castro

Director de tesis: Dra. María Isabel Díaz Gómez

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Toxicológicas
CEITOX (CITEFA - CONICET)
Instituto de Investigaciones Científicas y
Técnicas de las Fuerzas Armadas
Zufriategui 4380. 1603 Villa Martelli
Provincia de Buenos Aires
Argentina

Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Ciencias Químicas.

1990

- 2354 -
y 2

Desearía agradecer:

A la Dra. María I. Díaz Gómez, por permitirme realizar la tesis bajo su dirección y por ofrecerme su experiencia y colaboración en todo momento.

A mis compañeros del CEITOX y del Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA).

A la Dra. Inge M.E. Thiel, mi consejero de estudios, por su permanente buena voluntad y disposición para solucionar los pequeños inconvenientes que se presentaron durante estos años como tesista, así como también por sus oportunos consejos en la preparación de seminarios y de este manuscrito.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, por mi formación de grado y de post grado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por acordarme oportunamente una beca doctoral que me permitió trabajar en mi tesis.

EL TETRACLORURO DE CARBONO COMO TOXICO AMBIENTAL.

Usos y producción.....	16
Presencia en el medio ambiente.....	17
Captación de CCl_4 por el hombre y contribución relativa de las distintas fuentes de contaminación.....	18
Generalidades sobre los efectos tóxicos de CCl_4 en el hombre y en animales de laboratorio.....	19
Absorción, distribución y excreción de CCl_4	20

CORRELACION ENTRE LOS EFECTOS TOXICOS DE CCl_4 Y SU BIOTRANSFORMACION..... 21

Biotransformación de sustancias extrañas al organismo.....	23
Biotransformación y activación de CCl_4	32

DAÑO CELULAR HEPATICO POR CCl_4 . IMPORTANCIA DE LAS INTERAC- CIONES DE METABOLITOS REACTIVOS DE CCl_4 CON COMPONENTES CELULARES Y DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS EN EL PROCESO..... 35

Interacciones de radicales libres triclorometilo con componentes celulares.....	38
Estimulación de procesos de peroxidación de lípidos celulares por CCl_4	42

CANCER Y CARCINOGENESIS QUIMICA..... 50

El tetracloruro de carbono como un carcinógeno.....	57
Expresión genética de las células eucariotas.	
Relevancia de las proteínas nucleares en el proceso.....	60

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A MACROMOLECULAS CELULARES

Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con ADN hepático de distintas especies animales.....	68
Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con proteínas nucleares de hígado de distintas especies animales.....	68
Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con ADN de distintas especies animales.....	71

Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con proteínas nucleares en distintas especies animales.....	71
Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con diversas fracciones de proteínas nucleares de diferentes especies animales.....	74
Relación entre los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl_4 y los distintos parámetros analizados.....	82

ESTUDIOS SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS PROMOVIDA POR CCl_4

Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales.....	82
Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de ratón C3H.....	85
Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en cortes de hígado de diferentes especies animales.....	87

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON BASES DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO.

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con bases del ADN.....	89
--	----

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON AMINOACIDOS.

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con aminoácidos.....	94
Contenido de aminoácidos en proteínas microsomas hepáticas de animales intoxicados con CCl_4	97

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON METIONINA.

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con metionina.....	100
Activación microsomal de CCl_4 . Interacción de radicales $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina.....	102
Biotransformación de dimetildisulfuro por microsomas hepáticos....	102

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON FENILALANINA.

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con fenilalanina.....	106
Activación microsomal de CCl_4 . Interacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con fenilalanina.....	110

DISCUSION

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A MACROMOLECULAS CELULARES.....	112
ESTUDIOS SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS PROMOVIDA POR CCl_4	117
INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON BASES DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO.....	120
INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON AMINOACIDOS.....	121
INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON METIONINA.....	124
INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON FENILALANINA.....	126
CONCLUSIONES.....	129

PARTE EXPERIMENTAL

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A
MACROMOLECULAS CELULARES.

Unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a ADN y proteínas nucleares totales. Estudios "in vivo".....	137
Animales y tratamientos.....	137
Obtención de ADN de hígado de distintas especies.....	137
Determinación de la concentración de ADN.....	139
Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ al ADN.....	139
Determinación del grado de contaminación del ADN con proteínas.....	139
Obtención de nucleos purificados.....	140
Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a proteínas nucleares.....	141
Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a ADN y proteínas nucleares.....	142
Obtención de ADN desde preparados nucleares Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$	143
Obtención de proteínas nucleares totales desde preparados nucleares.....	143
Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado.....	143

**ESTUDIOS "IN VITRO" SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS
PROMOVIDA POR CCl₄.**

Animales y tratamientos.....	147
Incubaciones "in vitro" para estudiar la capacidad biotransformadora de CCl ₄ a CHCl ₃ y la actividad peroxidativa de preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales.....	147
Preparación de cortes delgados ("slices") de hígado.....	148
Incubaciones "in vitro" para estudiar la capacidad biotransformadora de CCl ₄ a CHCl ₃ y la actividad peroxidativa de cortes de hígado de diferentes especies animales.....	149

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON BASES DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO.**

Sistema modelo de generación de radicales libres ·CCl ₃ . Reacción con bases del ADN.....	150
---	-----

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON AMINOACIDOS.**

Sistema modelo de generación de radicales libres ·CCl ₃ . Reacción con aminoácidos.....	151
Obtención de microsomas de hígado de rata.....	152
Composición de aminoácidos de proteínas microsomales de animales intoxicados con CCl ₄	152

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON METIONINA.**

Sistema modelo de generación de radicales triclorometilo. Reacción con metionina.....	154
Estudios "in vitro" para la formación de productos de interacción de radicales libres ·CCl ₃ y metionina. Animales y tratamientos.....	155
Incubaciones "in vitro" para estudiar las interacciones de radicales libres ·CCl ₃ con metionina.....	156
Biotransformación microsomal de dimetildisulfuro. Incubaciones "in vitro".....	157

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON FENILALANINA.**

Sistema modelo de generación de radicales libres ·CCl ₃ . Reacción con fenilalanina.....	158
Estudios "in vitro" para la formación de productos de interacción de radicales libres ·CCl ₃ con fenilalanina. Animales y tratamientos.....	159
Incubaciones "in vitro" para estudiar las interacciones de radicales libres ·CCl ₃ con fenilalanina. Medición de benceno.....	159

	pág.
	161
RESUMEN.....	172
APENDICE	
Trabajos publicados.....	178
Presentaciones en congresos.....	179

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	pág.
Tabla I. Reacciones más importantes de la fase I.....	25
Tabla II. Reacciones más importantes de la fase II.....	27
Figura 1. Ciclo catalítico propuesto para la oxidación de un xenobiótico por el citocromo P450.....	30
Tabla III. Factores que modifican la biotransformación de xenobióticos P450 dependiente.....	31
Figura 2. Vías de biotransformación del tetracloruro de carbono.....	33
Figura 3. Daño celular hepático por CCl ₄ . Hipótesis de trabajo.....	39
Tabla IV. Especies químicas reactivas involucradas en la peroxidación de lípidos.....	43
Figura 4. Peroxidación de ácidos grasos polinosaturados. Principales vías de degradación.....	44
Tabla V. Defensas celulares contra la peroxidación de lípidos.....	48
Tabla VI. Carcinógenos directos e indirectos. Ejemplos.....	53
Tabla VII. Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de ¹⁴ CCl ₄ con ADN de hígado de distintas especies animales.....	69
Tabla VIII. Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de ¹⁴ CCl ₄ con proteínas nucleares de hígado de distintas especies animales.....	70
Tabla IX. Activación nuclear de ¹⁴ CCl ₄ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN de distintas especies animales.....	72
Tabla X. Activación nuclear de ¹⁴ CCl ₄ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a proteínas nucleares de distintas especies animales.....	73

Tabla XI. Activación nuclear de $^{14}\text{CCl}_4$ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a las diversas fracciones de proteínas nucleares de distintas especies animales....	76
Figura 5. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de hamster con marca de $^{14}\text{CCl}_4$ unida covalentemente.....	78
Figura 6. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de ratón con marca de $^{14}\text{CCl}_4$ unida covalentemente.....	79
Figura 7. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata con marca de $^{14}\text{CCl}_4$ unida covalentemente.....	80
Tabla XII. Comparación entre los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl_4 y los distintos parámetros analizados en las tablas VII a XI.....	81
Tabla XIII. Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales.....	83
Tabla XIV. Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de ratón C3H.....	86
Tabla XV. Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en cortes delgados de hígado de diferentes especies animales.....	88
Figura 8. Interacción de radicales libres triclorometilo con adenina.....	90
Figura 9. Interacción de radicales libres triclorometilo con guanina.....	91
Figura 10. Interacción de radicales libres triclorometilo con citosina.....	92
Figura 11. Interacción de radicales libres triclorometilo con timina.....	93
Tabla XVI. Interacción de radicales libres triclorometilo con aminoácidos.....	96
Figura 12. Espectro de masas del aducto de tirosina.....	98
Tabla XVII. Contenido de aminoácidos de proteínas microsomales hepáticas de ratas intoxicadas con CCl_4	99
Figura 13. Reacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina.....	101

	pág.
Figura 14. Activación microsomal de CCl_4 . Interacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina.....	103
Tabla XVIII. Degradación de dimetildisulfuro.....	104
Figura 15. Interacción de radicales libres triclorometilo con fenilalanina.....	107
Figura 16. Espectro de masas del pico 14.....	108
Figura 17. Espectro de masas del pico 15.....	109

PARTE EXPERIMENTAL.

Figura 18. Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado.....	145
--	-----

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosil trifosfato
BSTFA	bis-(trimetilsilil)-trifluor- acetamida
ca.	circa
CE	captura de electrones
\CGL	cromatografía gas líquido
\D.I.	diámetro interno
DPPD	N,N'-difenil-p-fenilen diamina
\dpm	desintegraciones por minuto
EDTA	etiléndiaminotetraacetato
EM	espectrometría de masas
\eV	electrón volt
FAD	flavina adenina dinucleótido
FID	ionización de llama
FMN	flavina adenina mononucleótido
\g	gramo
GSH	glutación (forma reducida)
\h	hora
HMG	high mobility group
hn RNP	ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
\i.p.	intraperitoneal
\kg	kilogramo
kPa	kilopascal
\m	metro

\ M	molar
m-ARN	ácido ribonucleico mensajero
\ mm	milímetro
\ mM	milimolar
\ MFOS	sistema de la oxidasa de función mixta
\ mg	miligramo
\ min	minuto
\ ml	mililitro
mmol	milimol
\ mseg	milisegundo
uCi	microcurie
ug	microgramo
\ ul	microlitro
um	micrometro
N	normal
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
\ NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
\ nm	nanometro
\ nmol	nanomol
\ p.a.	para análisis
\ PL	peroxidación de lípidos
pmol	picomol
PPO	2,5-difenil oxazol
P450	citocromo P450
psi	pounds per square inch
PUFA	ácidos grasos polinosaturados
\ RER	retículo endoplásmico rugoso
RNAsa	ribonucleasa

\ SD	desviación estandar
seg	segundo
\ SER	retículo endoplásmico liso
\ SIM	monitoreo selectivo de iones
SKF 525 A	2,2-difenil valerato de 2-dietilamino etilo.HCl
TCA	ácido tricloroacético
TFA	trifluoracetil
TIC	corriente iónica total
\ UC	unión covalente
u.m.a.	unidades de masa atómica
UV	ultravioleta

INTRODUCCION

EL TETRACLORURO DE CARBONO COMO TOXICO AMBIENTAL

Usos y producción:

En el pasado, el tetracloruro de carbono fue utilizado intensamente como solvente en gran variedad de industrias; como antihelmíntico en veterinaria y aún en seres humanos; como solvente para lavado en seco y en extinguidores (1-5). Muchos de esos usos disminuyeron drásticamente debido a problemas toxicológicos.

Más recientemente y en la actualidad, el uso mayor es en la síntesis de clorofluorhidrocarburos (freones). Esta aplicación involucró en 1975 el 91% de la producción de USA. Otros usos, incluyendo el de servir como fumigante agrícola o de edificios e instalaciones o como solvente, sólo consumieron el 9% de lo fabricado (1-8). En Europa también el uso mayor es en la síntesis de clorofluorhidrocarburos (el 90%) o como solvente (10%). En Japón en 1977 el 87% se empleó en fabricación de freones y el 13% como solvente.

Las cantidades producidas mundialmente son considerables y en 1977 fueron de 390 millones de kg en USA; 320 millones de kg en Europa Occidental y 51,5 millones de kg en Japón; en Europa Oriental entre 5-100 millones de kg y en el resto del mundo se estimó en alrededor de cien mil kg. (4).

Se prevee una marcada disminución de su producción en el futuro debido a la tendencia a reemplazar los freones por otros productos como propelentes en aerosoles ya que afectan la capa de ozono atmosférica (1-9).

Presencia en el medio ambiente:

Como resultado de la gran producción y amplio uso del CCl_4 , éste ha evidenciado estar frecuentemente presente en el medio ambiente humano. Esas emisiones o pasajes al medio ambiente se producen durante la producción, transporte, almacenamiento, consumo, dispersión y al ser usado (5). Se ha estimado en 1973 que un 7,3% de todo lo producido se escapaba al medio ambiente, siendo la causa mayor las pérdidas dispersivas durante su uso (5). La volatilidad facilita esas pérdidas. Las fuentes no atmosféricas de CCl_4 ambiental no son significativas frente a las derivadas de la actividad del hombre (5).

Como consecuencia de esas pérdidas, la presencia de CCl_4 en distintos compartimientos del medio ambiente es una constante. Se lo encontró en aguas de mar en concentraciones entre 0,17 y 0,72 ug/litro (5). También fue evidenciado en agua de lluvia; nieve y en reservorios de agua no tratada en concentraciones del orden de los ug/litro (5). Aún en aguas para consumo humano se lo encontró en concentraciones del orden de los ug/litro. Su presencia no se debe a efectos del proceso de cloración sobre la materia orgánica como sucede en el caso de otros haloalcanos y cloroformo (5). También evidenció estar presente en atmósferas "de interiores" en concentraciones entre 122 y 459 partes por trillón (v/v), y en locales tan variados como restaurantes; negocios de ventas de distintos productos; teatros; oficinas; escuelas; aviones; salones de belleza; casas de alfombras; farmacias; negocios de radio y televisión; alimentos; lavaderos; departamentos; etc. (5). Si bien esas cantidades no son grandes, su presencia en atmósferas interiores es sistemática. También se encontró CCl_4 en atmósferas exteriores tanto

urbanas, como en zonas cercanas a la costa y aún en zonas claramente continentales. Las concentraciones informadas son nítidamente más altas en zonas urbanas, donde los valores oscilan entre 120 y 18.000 partes por trillón (5). Ello es lógico a la luz del origen antropogénico de su presencia ambiental.

El alimento también reveló poder estar contaminado con CCl_4 . Ello incluye productos de granja; carne; aceites y grasas; bebidas; frutas y verduras; pan, etc. (5). Las concentraciones halladas son heterogéneas pero oscilan entre 0,2 y 19,7 ug/kg (5). No existe evidencia que el CCl_4 se acumule en la cadena trófica hacia niveles superiores (5). Parte de esta contaminación proviene del uso del CCl_4 en prácticas agrícolas como fumigante (5).

Captación de CCl_4 por el hombre y contribución relativa de las distintas fuentes de contaminación:

Sabido que el agua que se bebe, el aire que se respira y el alimento que se ingiere contienen determinados valores máximos, mínimos y promedios de CCl_4 , es factible estimar la incorporación de CCl_4 por parte del hombre en su vida diaria. Ello se hace recurriendo a tablas efectuadas para el "hombre de referencia" del cual se estableció su volumen respiratorio, su ingesta de fluidos y de alimentos. Incluso es factible obtener de tablas, ingestas con contenidos de distintos tipos de alimentos en distintas partes del mundo y considerar los mínimos, máximos y promedios de composición de cada ingrediente de la alimentación (5). Con este tipo de cálculos fue posible establecer que la mayor fuente de captación de CCl_4 por el hombre deriva del presente en la

atmósfera (5). La captación del CCl_4 proveniente de ingesta de fluidos o de la alimentación es mucho menor (5).

Generalidades sobre los efectos tóxicos del CCl_4 en el hombre y en animales de laboratorio:

Como en el caso de todos los hidrocarburos clorados alifáticos, el CCl_4 tiene acción depresora sobre el sistema nervioso central, la circulación y la respiración (1-9). En el caso de intoxicaciones crónicas se observó aumento de la fragilidad de los glóbulos rojos y anemia (1-9). La bioquímica sanguínea se encuentra alterada observándose hipoglucemia, aumento del contenido de ácido láctico y disminución del contenido de albúmina (1-9). Existe una alteración marcada en el hepatograma y aumento de enzimas en sangre vinculadas a daño hepático (1-9).

Los estudios patológicos en animales revelan particular capacidad del CCl_4 para dañar al hígado y su función (1-9).

Se produce degeneración grasa y necrosis (1-9). La administración repetida de CCl_4 da lugar a cirrosis hepática y en ciertas especies de animales como el ratón produce tumores hepáticos (1-9). Se han descrito también lesiones de cierta importancia pero mucho menos severas en riñón, adrenales, testículos, bazo, pulmón, corazón, tracto gastrointestinal, etc. (1-9). El efecto sobre el hígado siempre es el dominante.

En el caso de intoxicaciones humanas fatales con CCl_4 siempre el efecto más notable es sobre hígado y riñón (1-9). Los efectos en el hígado son similares a los observados en la rata: necrosis e hígado graso (1-9).

En términos generales puede considerarse al CCl_4 como un

compuesto básicamente hepatotóxico y así será analizado en detalle aquí, con particular referencia a dos efectos:

- a) Producción de daño y muerte celular hepáticas y la consecuente necrosis.
- b) Producción de tumores hepáticos.

Absorción, distribución y excreción del CCl₄:

El CCl₄ se absorbe fácilmente por los pulmones, piel, por vía oral y desde todos los sitios de administración parenteral en estudios experimentales. Ello no resulta extraño por cuanto es sabido que la velocidad de absorción de los xenobióticos depende fuertemente de la liposolubilidad, puesto que esa propiedad le permite fácilmente atravesar membranas biológicas (1-9) y el CCl₄ tiene un alto coeficiente de partición sangre/aire y aceite/agua (1-9).

Una vez absorbido se distribuye ampliamente en los tejidos siendo su concentración mayor en tejido adiposo, médula ósea e hígado que en otros órganos (1-9). No hay correlación entre la concentración de CCl₄ que se encuentra en un tejido dado y el efecto tóxico del CCl₄ en ese órgano (1-9).

Como es de esperar de un tóxico con razonable grado de volatilidad y baja velocidad de metabolización, la mayor parte del CCl₄ es excretada por los pulmones. Por ejemplo, en un estudio en el cual se le administró 2 ml/kg oral a ratas, se observó que el 80% de la dosis administrada se excretaba por los pulmones dentro de las 10 horas iniciales (1-9). En otro estudio se informó que la velocidad de eliminación en el hígado era de 7,6% por hora y 2,5% por hora en sangre (1-9).

Cantidades más pequeñas y no especificadas detalladamente de CCl₄ también se eliminan por orina y materia fecal (1-9).

CORRELACION ENTRE LOS EFECTOS TOXICOS DEL CCl₄ Y SU BIOTRANSFORMACION

Los efectos tóxicos agudos y crónicos más destacados del CCl₄ se observaron en el hígado. También se han señalado efectos tóxicos de cierta intensidad en riñón y en adrenales.

Daños menores que éstos fueron observados en otros órganos (ej: testículo, páncreas, etc.) (1-9). Básicamente el CCl₄ ha sido considerado como hepatotoxina y como tal se ha constituido en el tóxico por excelencia en estudios mecanísticos. El CCl₄ es capaz de producir en el hígado alteraciones bioquímicas y ultraestructurales, acumulación de grasa, muerte celular y la posterior necrosis hepática, cirrosis y cáncer hepático (1-15). En esta parte se analizará la muerte celular y necrosis hepática.

Existen varias razones para pensar que el CCl₄ requiere un proceso de biotransformación para producir daño celular. Una deriva como necesidad lógica para poder explicar la gran susceptibilidad hepática si bien concentraciones iguales o mayores del tóxico se localizan en otros órganos como cerebro o médula ósea sin que se observen en ellos daños equivalentes (1). Otra proviene de la observación que el CCl₄ produce daño preferentemente en la región centrolobulillar hepática a pesar que se distribuye uniformemente en todo el lobulillo (10-15). Más aún, esa localización centrolobulillar del daño también se mantiene en estudios en hígado perfundido, en los cuales se invierte el flujo de entrada del líquido de perfusión conteniendo el CCl₄, desde la vía portal a la vena central (10). Una razón fundamental para pensar que la biotransformación del CCl₄ es necesaria para producir daño proviene del hecho que el hígado de la rata recién nacida y

el de la gallina no son susceptibles al efecto necrogénico del CCl_4 aunque concentraciones iguales o mayores del tóxico lleguen a él (10).

En alguna época se pensó que el efecto solvente del CCl_4 era responsable de todas esas acciones pero bajo esa hipótesis es imposible explicar las observaciones precedentes. Tampoco podría explicarse porqué otros compuestos halogenados que son tan buenos solventes como el CCl_4 no son equivalentemente necrogénicos o no tienen efecto alguno. Tal es el caso del cloroformo, el diclorometano o el CF_4 (10-15). La selectividad en los efectos, independiente de la concentración local, también se observa a nivel subcelular hepático. Por ejemplo, las alteraciones tempranas en el hepatocito expuesto a CCl_4 se observan en el retículo endoplásmico a pesar de que el tóxico llega a todas las organelas (10-15).

En definitiva, todo indica que alguna biotransformación es requerida para su toxicidad. El hígado se dañaría más porque allí es donde ocurre más intensamente su transformación (1-15). Esa biotransformación es menos intensa en el recién nacido y en la gallina, verificándose fundamentalmente en el retículo endoplásmico hepático (10-17). Durante la biotransformación del CCl_4 se produce la ruptura de una unión C-Cl y se generan radicales $\cdot\text{CCl}_3$ (10-17). Hoy se cree que la hepatotoxicidad del CCl_4 está ligada a la producción de $\cdot\text{CCl}_3$ y a las reacciones posteriores de los mismos con componentes celulares.

Básicamente, son dos los tipos de reacciones que hasta ahora han merecido atención al respecto. Uno se refiere a las reacciones de abstracción de hidrógeno desde los ácidos grasos polinosaturados de las membranas celulares (PUFA). Otro se relaciona con las reacciones de adición de $\cdot\text{CCl}_3$ a lípidos, aminoácidos, ácidos nucleicos y hemo. Hoy en día se

creo que ambos procesos tienen algún grado de responsabilidad en los efectos observados, sólo es tema de debate la incidencia relativa de cada efecto en distintas alteraciones moleculares o ultraestructurales o a los daños observados. Se pueden ampliar considerablemente estas informaciones y conceptos en revisiones detalladas sobre el tema (10-15).

Biotransformación de sustancias extrañas al organismo:

Las sustancias extrañas a los seres vivos (xenobióticos) sufren intensas y variadas transformaciones cuando interaccionan con éstos. Como resultado de esas interacciones frecuentemente resultan productos con menor toxicidad, pero ocasionalmente se generan especies más reactivas o tóxicas que el compuesto original (18-22). El conocimiento de estas biotransformaciones, qué reacciones pueden ocurrir, las enzimas involucradas y la reactividad de los productos formados son un tema básico en toxicología. En efecto, estos conocimientos permiten no sólo entender la duración de los efectos tóxicos sino también su localización y también predecir otros aún no establecidos.

En el hombre y otros animales, el hígado es el órgano con mayor capacidad global para biotransformar xenobióticos, pero cierta capacidad también existe en otros órganos como riñón, intestino, adrenales, testículo, ovario, piel, placenta, etc. (20). La resultante global del proceso de biotransformación hepática es transformar xenobióticos liposolubles en otros más polares y por lo tanto más hidrosolubles y fácilmente excretables por los riñones (18-22). Ello se logra en el hígado provocando una serie de transformaciones químicas catalizadas por enzimas que

introducen grupos polares en distintas partes de la molécula del xenobiótico. Se ha señalado que ese proceso puede ocurrir en dos etapas (18-22). En la primera (fase I), se verifican las reacciones que convierten grupos funcionales determinados en otros nuevos. Por ejemplo: un alcohol se puede transformar en un aldehído o un éster se hidroliza para dar un ácido y un alcohol, o un resto no polar de un hidrocarburo alifático o aromático se hidroxila para dar un alcohol o un fenol, etc.. En la segunda etapa (fase II), se verifican las reacciones denominadas de conjugación (18-22). En éstas, el organismo se vale de un grupo de enzimas distintas de las que intervienen en la fase I y que tienen la propiedad de combinar los compuestos extraños al organismo, o sus metabolitos provenientes de la etapa I, con otras moléculas endógenas de bajo peso molecular, como el sulfato, el ácido glucurónico, la glicina, el agua, grupos metilo, etc. (18-22). Es importante la existencia de estas dos etapas, ya que no siempre la biotransformación que ocurre en la etapa I resulta en la pérdida de la actividad biológica indeseable para el organismo o en la suficiente hidrosolubilidad que permita la excreción rápida. Los productos de estas reacciones de conjugación son en general más polares y menos activos biológicamente. Estas reacciones de conjugación ocurren sobre un grupo funcional del xenobiótico o de sus metabolitos, por ejemplo, un hidroxilo alcohólico o fenólico, el resto carboxilo de un ácido, un amino, etc. (18-22).

En la fase I se verifican oxidaciones, reducciones e hidrólisis, ejemplos de las cuales se muestran en la Tabla I. En la etapa II se verifican conjugaciones, acetilaciones, metilaciones, formación de ácidos hipúricos y ácidos mercaptúricos o 1,2-dioles, etc., ejemplos de las cuales se describen en la Tabla II (20).

Tabla I

Reacciones más importantes de la fase I.

OXIDACIONES		EJEMPLOS
Carbonos alifáticos	$RR'CH_2 \rightarrow RR'CHOH$	Pentobarbital, tolbutamida, tolueno, amfetamina.
Carbonos aromáticos	$R-C_6H_5 \rightarrow R-C_6H_4OH$	Benceno, anilina, benzopireno, amfetamina, difenil hidantoina.
O-desalquilación	$ROCH_2R' \rightarrow ROH + R'CHO$	Acetofenetidina, codeína.
N-desalquilación	$RR_1NCHR_2 \rightarrow RR_1NH + R_2CHO$	Morfina, aminopirina, atropina, metadona, clorfeniramina.
inación	$RR_1CHNHR_2 \rightarrow RR_1CO + R_2NH_2$	Amfetamina, metanfetamina, efedrina, norefedrina.
S-desalquilación	$RSCH_2R' \rightarrow$	Dimetilsulfuro, metiltiopurina, metiltiobenzotiazol.
N-oxidación	$RNH_2 \rightarrow RNHOH$ $R_1R_2R_3N: \rightarrow R_1R_2R_3NO$	Naftilamina, aminobifenilo, anilina, acetamidofluoreno. Clorpromazina, imipramina, trimetilamina, nicotinamida.
S-oxidación	$R-S-R' \rightarrow RR'SO$	Clorpromazina, tioacetamida.
Desulfuración	$RR'CS \rightarrow RR'CO$ $R_1R_2R_3PS \rightarrow R_1R_2R_3PO$	Tiobarbituratos. Paratión, malatión, diazinón.
Epoxidación	$R-CH=CH-R' \rightarrow R-\underset{\text{O}}{\text{C}}-CH-R'$	Naftaleno, cloruro de vinilo, benzopireno, aflatoxina B ₁ .
Alcoholes	$\rightarrow RR'CO$	Metanol, etanol, meprobendiol.
Aldehídos	$\rightarrow RCOOH$	Metanal, etanal, benzaldehído.

Tabla I

Reacciones más importantes de la fase I (continuación).

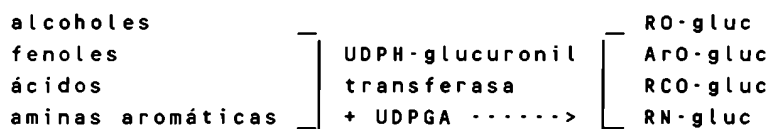
REDUCCIONES		EJEMPLOS
Grupos azo	$R-N=N-R' \rightarrow RNH_2 + R'NH_2$	Prontosil, dimetilaminoazobenceno, colorantes azoicos.
Grupos nitro o nitroso	$RNO_2 \rightarrow RNO \rightarrow RNHOH \rightarrow RNH_2$	Nitrobenzono, cloranfenicol, nitrofurazona, metronidazol.
Deshalogenación	$RCH_2X \rightarrow RCH_3$	Halotano, CCl_4 , DDT.
HIDROLISIS		
Esteres carboxílicos	$RCOOR' \rightarrow RCOOH + R'OH$	Acido acetilsalicílico, procaína, cocaína.
Esteres fosfóricos	$RR'POX \rightarrow RR'POOH$	Insecticidas fosforados.
Esteres nítricos	$RONO_2 \rightarrow NO_3 + ROH$	Nitroglicerina, tetranitrato de pentaeritritol.
Halogenuros de alquilo	RX	DDT, tricloroetileno.
amidas	$RCONHR' \rightarrow RCOOH + R'NH_2$	Procainamida, fenacetina, lidocaína.

Tabla II

Reacciones más importantes de la fase II.

CONJUGACION A GLUCURONIDO

EJEMPLOS



fenol, ac. benzoico, ani-
lina, oxazepan, morfina,
codeína, paracetamol.

CONJUGACION A SULFATO



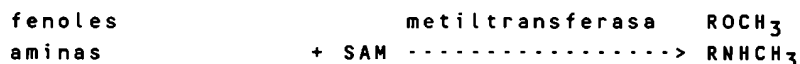
fenol, paracetamol, morfina
isoprenalina.

ACETILACION



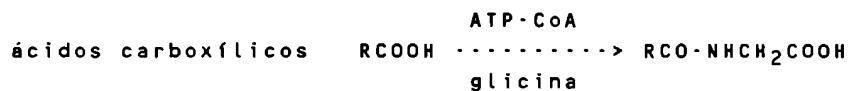
sulfanilamida, ac. p-amino
benzoico, isoniazida, sulfa
metazina.

METILACION



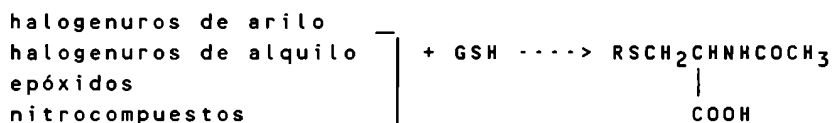
morfina, noradrenalina.

ACIDOS HIPURICOS



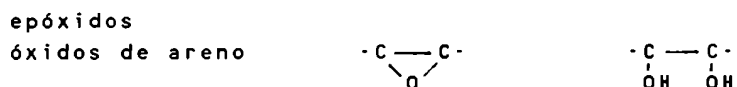
benzoico, salicílico.

ACIDOS MERCAPTURICOS



paracetamol, naftaleno,
bezopireno, pentacloro-
nitrobenzeno.

1,2-DIOLES



benceno, benzopireno,
bromobenceno, naftaleno.

Intracelularmente existe a su vez una localización preferencial de cada uno de los procesos de biotransformación descrito. Por ejemplo, la mayor parte de las reacciones correspondientes a la etapa I, se verifican en el retículo endoplásmico, tanto en su componente rugoso como en el liso, pero con cierto predominio en este último. Una proporción menor de esos procesos se verifica en la membrana externa de la envoltura nuclear. La localización intracelular de las enzimas que catalizan los procesos de la etapa II es más heterogénea, por ejemplo, la glucuronil transferasa y la epóxido hidratasa están localizadas en el retículo endoplásmico. En cambio, las enzimas que catalizan la formación de fosfoadenosina fosfosulfato (PAPS), así como las sulfoquinasas que permiten la reacción de éste con los fenoles están en el citoplasma. Otro tanto ocurre con la enzima que metila fenoles y con la que conduce a la formación de ácidos mercaptúricos. En el caso de las acetilaciones, la situación es diferente porque se verifican en las células de Kupffer del hígado y no en los hepatocitos (18-22).

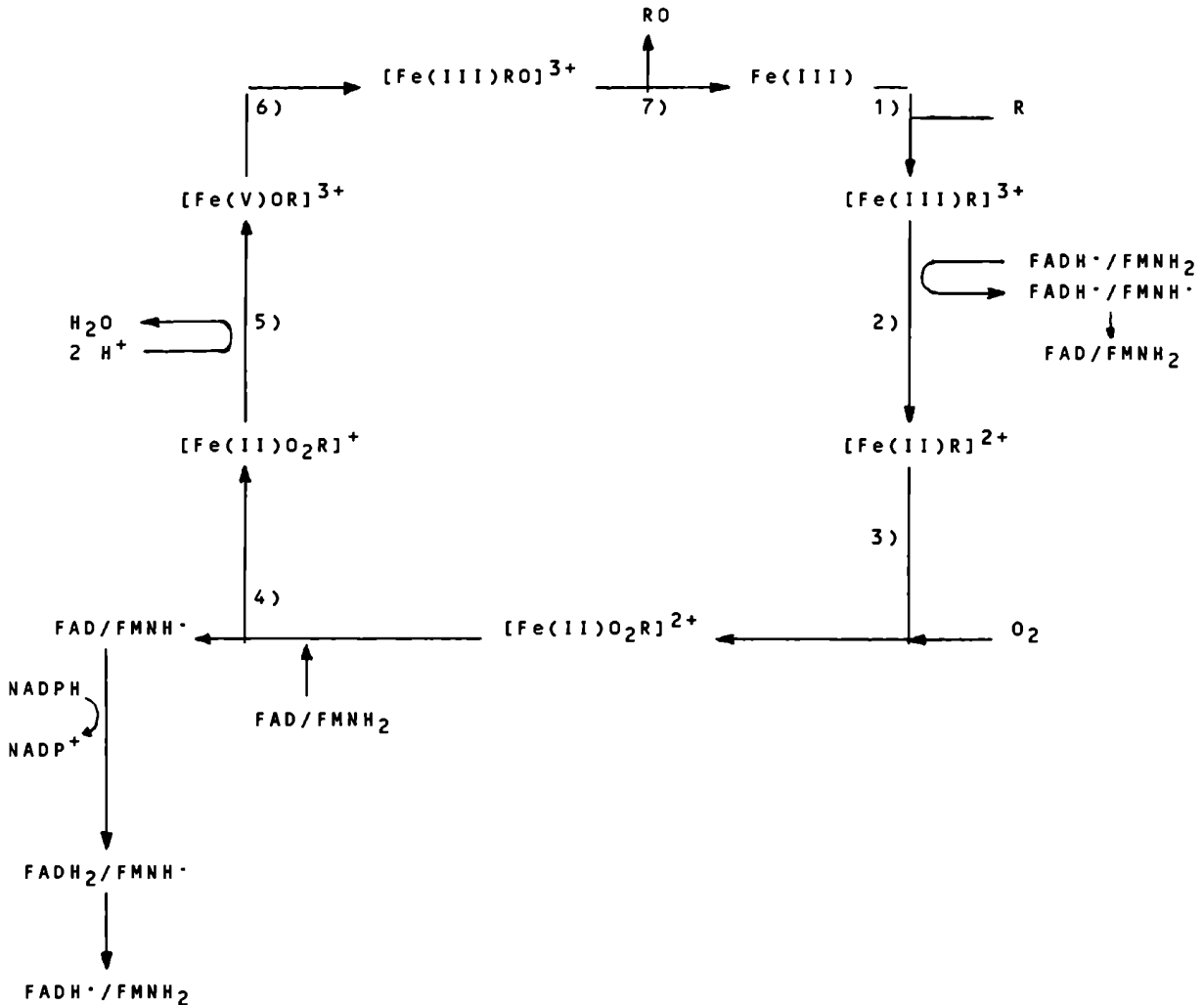
De todos los procesos que ocurren en la etapa I, los mejor conocidos y más relevantes al problema toxicológico que aquí se analiza son las biotransformaciones mediadas por la oxidasa de función mixta (MFOS) y que tienen al citocromo P450 (P450) como componente fundamental. La MFOS tiene la característica poco usual de requerir un reductor (NADPH) y un oxidante (O_2) a la vez y posee tres componentes: un fosfolípido (básicamente fosfatidilcolina); el P450 y la NADPH P450 reductasa. El P450 es una hemoproteína que contiene un átomo de hierro en estado reducido por mol y que es capaz de combinarse en su forma reducida con monóxido de carbono, para dar una banda de absorción característica a 450 nm, de la cual deriva su nombre (18-22). La fracción P450 hoy se la sabe constituida por varias isoenzimas, cada una de las

cuales ha sido purificada hasta ser homogénea. Este sistema es capaz de procesar una gran variedad de xenobióticos, cuyo único factor común aparente es cierto grado de lipofilia.

Los sustratos se combinan con la forma oxidada del P450 para dar complejos que son posteriormente procesados. La formación de estos complejos va acompañada de una perturbación en el espectro de absorción del P450. Se han descrito tres tipos de cambios espectrales. Los de tipo I evidencian un pico de absorción a 385-390 nm y un valle de absorción a 420 nm. Los sustratos que producen este cambio se denominan de tipo I (ej. CCl_4 , etilmorfina, hexobarbital, aminopirina, etc.). Los de tipo II, presentan una curva de absorción que es casi la imagen especular de la anterior, puesto que genera un valle de absorción a 390 nm y un pico a 430 nm. Hay también descrita una clase de cambio espectral denominada tipo II modificado, en el cual el máximo de absorción está a 420 nm. Los compuestos que dan estos cambios espectrales reflejan interacciones de los mismos con distintas partes del P450. Los compuestos tipo I interaccionan con la apoproteína y los del tipo II con su hierro hémico (anilina, piridina, etc.). Otro componente del MFOS es la NADPH P450 reductasa. Se estableció que es una flavoenzima. Posee en su grupo prostético 1 mol de FMN y uno de FAD por mol de enzima. En el retículo endoplásmico hepático hay una molécula de P450 reductasa por cada 10-20 moléculas de P450. Se cree que el fosfolípido facilitaría la transferencia de electrones al P450 y aumentaría la afinidad de los sustratos por el P450 (18-22). El proceso de óxido-reducción cíclica del P450 durante los procesos de hidroxilación de sustratos y la participación de los componentes mencionados en él, se representan en la Figura 1. En ella se muestran los componentes obligados del sistema. Se sabe, no obstante, que el citocromo b5, también presente en

Figura 1

Ciclo catalítico propuesto para la oxidación de un xenobiótico por el citocromo P450.



- 1) La unión del sustrato R a la enzima férrica es rápida y estequiométrica.
- 2) El complejo enzima-sustrato acepta un electrón de la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, que contiene una molécula de FMN y una molécula de FAD como complejo $FADH^-/FMNH_2$.
- 3) El complejo enzima ferrosa-sustrato se une con una molécula de oxígeno rápidamente.
- 4) El complejo oxigenado recibe un electrón desde la flavoproteína o alternativamente desde el sistema citocromo $b_5/cit. b_5$ reductasa/NADH.
- 5) Uno de los átomos de oxígeno es convertido en agua, dejando al restante en un estado muy reactivo (oxenoide) como ligando del hierro, en un estado formal de oxidación +5.
- 6) El átomo de oxígeno es transferido del hierro hémico al sustrato.
- 7) El sustrato oxidado se separa del complejo regenerando la enzima férrica.

el retículo endoplásmico, puede modular la velocidad de reacción de hidroxilación interactuando con éste. Este efecto depende del sustrato empleado, del tipo de reacción estudiada y de la forma de P450 bajo ensayo. En los casos en que participa, lo haría proveyendo el segundo electrón en lugar de la NADPH P450 reductasa. El mismo le sería transferido al P450 desde el NADH a través de la NADH citocromo b5 reductasa. Los sustratos del tipo I frecuentemente aumentan la velocidad de reducción del P450 por la P450 reductasa. Los sustratos tipo II la retardan (18-22).

Es fundamental tener en cuenta que una gran variedad de factores modulan la capacidad de biotransformación por la MFOS. Un resumen de éstos se muestra en la Tabla III. En el presente trabajo se hace particular aprovechamiento del hecho de que la variabilidad en la capacidad de biotransformar CCl_4 a $\cdot\text{CCl}_3$ en distintas especies podría estar vinculado a la distinta respuesta que tienen las mismas para generar cáncer por exposición repetida al CCl_4 .

Se puede encontrar mucho mayor detalle de lo aquí expuesto en una serie de revisiones sobre el tema (18-22).

Tabla III

Factores que modifican la biotransformación de xenobióticos P450 dependiente.

Inhibidores	Dieta	Adrenalectomía
Inductores	Ayuno	Tiroidectomía
Especie	Hora del día	Diabetes
Cepa	Epoca del año	Castración
Individuales	Embarazo	Hepatitis
Edad	Estrés	Cirrosis
Hipofisectomía	Hepatomas	Sexo

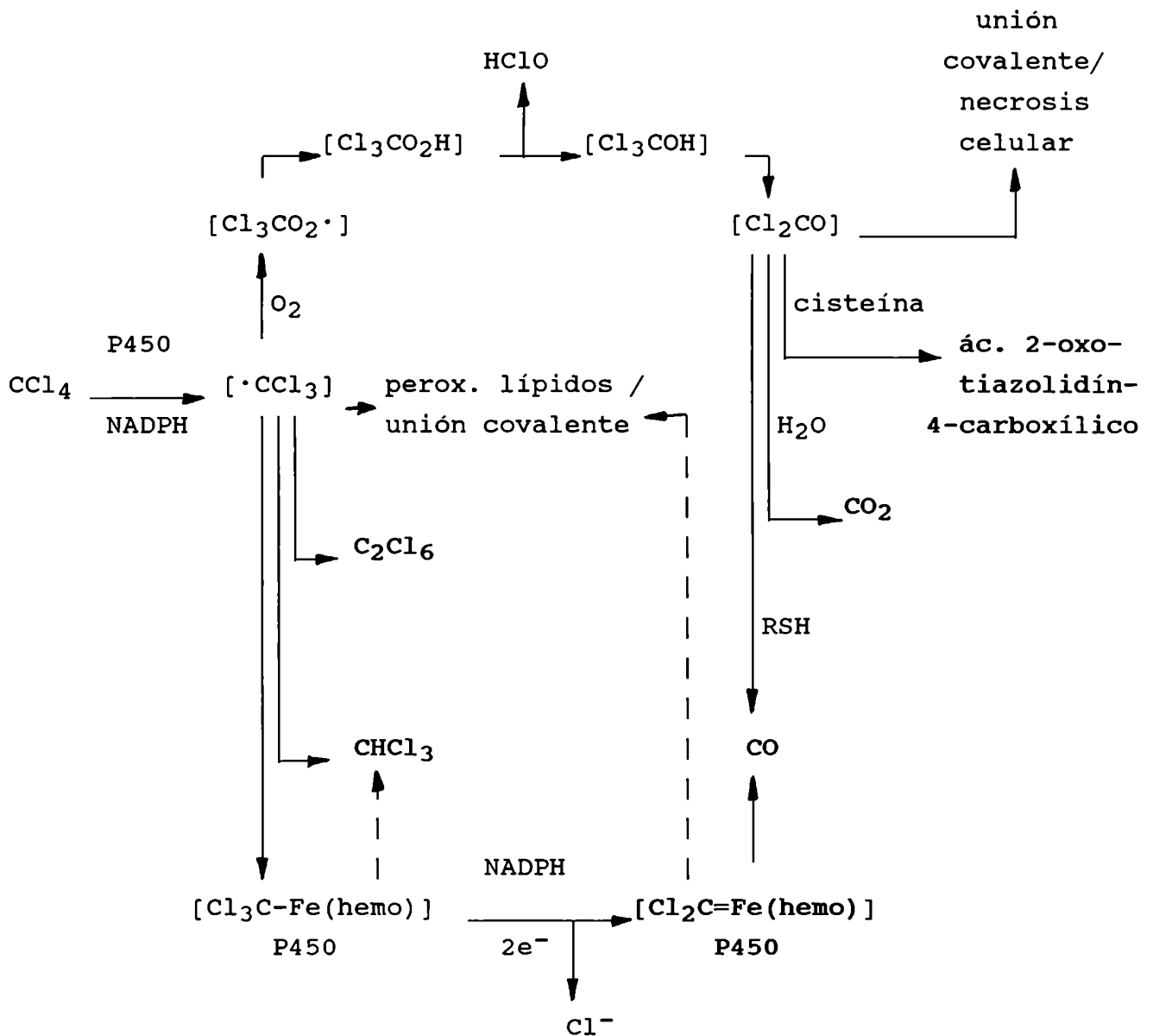
Biotransformación y activación del CCl₄:

Existen dos aspectos importantes en la biotransformación del CCl₄. Uno concierne a qué productos se forman y cuál es su reactividad química. El otro está relacionado a los procesos bioquímicos, los sitios celulares y los órganos donde esas biotransformaciones ocurren.

Se han podido detectar productos estables y reactivos durante el metabolismo del CCl₄. Entre los más estables se pudo demostrar que se producían CO₂, CHCl₃, hexacloroetano y monóxido de carbono (23-27). Mediante distintos métodos que incluyen "spin trapping" y resonancia paramagnética electrónica, estudio estructural de conjugados con glutatión, interacciones con aminoácidos como cisteína y otros, atrapado con tetrametiletileno y estudio de los productos resultantes, etc., se pudo establecer que durante la biotransformación del CCl₄ se generaban además especies reactivas como radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$, $:\text{CCl}_2$ (diclorocarbeno), fosgeno y ácido hipocloroso (23-27). Todos estos productos reactivos son capaces potencialmente de interaccionar con componentes celulares y consecuentemente producir efectos indeseables.

↳ Los caminos metabólicos por los cuales se forman estos productos y cómo ellos se vinculan entre sí pueden verse en la Figura 2. Existen revisiones bibliográficas específicas en las cuales se puede encontrar mayor detalle sobre los productos de biotransformación del CCl₄ (23-27). El órgano más activo en su metabolización es el hígado pero cierta actividad también se observó en otros órganos como adrenales, riñón, pulmón, testículo, placenta, páncreas, etc. (28-31). Intracelularmente se ha verificado que la capacidad hepática de bioactivar al CCl₄ es mayor en el retículo endoplásmico liso (SER) que en el rugoso (RER) (32) y que la

Figura 2. Vías de biotransformación del CCl₄



Mecanismos postulados para la biotransformación reductiva de CCl₄ catalizada por el citocromo P450. Se han destacado los metabolitos aislados ya fuera "in vitro" o "in vivo".

membrana externa nuclear también puede biotransformarlo (33). Existe también una activación mitocondrial hepática del CCl_4 de naturaleza enzimática y otra no enzimática, siendo la primera sólo parcialmente dependiente del citocromo P450 (P450) (34;35). En órganos donde el contenido de P450 es alto (tanto en retículo endoplásmico como en mitocondria) como es el caso de las glándulas adrenales, la activación del CCl_4 es relevante en ambas organelas (29).

Respecto a la naturaleza del sistema enzimático microsomal hepático que metaboliza y activa el CCl_4 a metabolitos reactivos (básicamente al $\cdot\text{CCl}_3$) diremos que ya en 1967 se anticipó la posibilidad de que tuviese una participación en ello el P450, debido a los cambios espectrales característicos que produce el CCl_4 al interaccionar con este citocromo (36;37). Fue recién en 1972-1973 que nuestro laboratorio y otros demostraron que el metabolismo de CCl_4 a CHCl_3 y la bioactivación a $\cdot\text{CCl}_3$ eran procesos reductivos NADPH dependientes y que requerían P450 y la participación de la P450 reductasa (38-44). Posteriormente esto fue confirmado con sistemas reconstituidos "in vitro" empleando P450 purificado (45). La forma de P450 inducible por fenobarbital es la responsable de biotransformar al CCl_4 (23-27). Varios sustratos e inhibidores que dan cambios espectrales tipo II con el P450 (ej.: pirazol, DPPD, cistamina) pueden inhibir el proceso de activación del CCl_4 , en tanto que los sustratos que dan cambios espectrales tipo I (aminopirina, SKF 525 A, etc.) no modifican o incluso aumentan la intensidad de la activación (38-43).

DAÑO CELULAR HEPATICO POR CCl₄ - IMPORTANCIA DE LAS INTERACCIONES DE METABOLITOS REACTIVOS DE CCl₄ CON COMPONENTES CELULARES Y DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS EN EL PROCESO

Comenzaremos por definir qué es daño celular ("cell injury" en la literatura de habla inglesa). Se denomina daño celular, a toda alteración que aparte a la célula del equilibrio que caracteriza la homeostasis de la célula normal. El daño celular puede ser reversible o irreversible, y compatible con la vida de la célula o no. Es reversible cuando la cesación de exposición a la noxa conduce a un retorno a la condición inicial normal. Es irreversible cuando ese retorno no ocurre. Un daño irreversible no necesariamente es letal. Depende de su naturaleza, intensidad y de la jerarquía del componente dañado para la vida celular. En el curso de un daño irreversible puede lograrse un punto de equilibrio homeostático distinto del original pero aún compatible con la vida celular. Una célula está viva cuando aún es capaz de llevar a cabo por lo menos dos funciones básicas: autoreparar lesiones y duplicarse (este último concepto por supuesto es sólo válido para células que normalmente se duplican). Cuando los daños celulares son tales que superan el umbral más allá del cual la célula indefectiblemente morirá por más que cese su exposición a la noxa, se dice que pasó "el punto de no-retorno". Estos conceptos básicos de la patología celular, que son también puestos en juego cuando la noxa es un agente tóxico, fueron claramente expuestos en distintas revisiones (46-48). Retornando ahora al caso del daño celular hepático por CCl₄ diremos que en efecto este compuesto es capaz de producirlo,

y ésto es evidenciable química y bioquímicamente y observable por microscopía electrónica o histológicamente (49-52). La muerte del hepatocito expuesto a CCl_4 "in vitro" o "in vivo" no es instantánea, lleva cierto tiempo para que ocurra. Durante el mismo se verifican una serie de daños celulares secuenciales y paralelos que la preceden y entre los cuales hay que discriminar en relevantes a la muerte celular o no y hay que establecer cuáles son causa y cuáles son consecuencia de un efecto anterior. Para desentrañar esta compleja maraña de alteraciones observables en el hepatocito después de su exposición a CCl_4 y establecer causas y consecuencias, ayuda mucho el seguir la secuencia temporal de las alteraciones bioquímicas y ultraestructurales. La idea básica que guía este tipo de enfoques es que una reacción química entre el tóxico y componentes celulares podrá generar una alteración funcional revelable bioquímicamente o evidenciable por microscopía electrónica, pero podrá ser causa de esta última sólo si ocurre antes que ella y si cuando se la impide de modo exclusivo, esa alteración funcional o ultraestructural no ocurre.

Pocos minutos después de administrado CCl_4 al animal, ej.: rata, ya se observa que ocurren interacciones covalentes de metabolitos reactivos (unión covalente = UC) con los lípidos y proteínas del retículo endoplásmico hepático y peroxidación de sus lípidos (15,50,53-58). La peroxidación de lípidos (PL) se verifica con intensidad máxima entre los 30 min y 60 min iniciales y cesa completamente a las 3 horas. La mayor parte del proceso total ocurre en esa primera hora (49,50,53-58). La UC se verifica en su mayor parte en las primeras 6 horas aunque en este caso es más difícil ser preciso puesto que la metodología de medición de la UC no permite detectar la fracción de ella que se ha "exportado" del retículo endoplásmico a otras organelas (35). Suponiendo

que estas 3-6 horas son aquellas en las cuales se verificaron los fenómenos químicos más específicos de la acción del CCl_4 , veamos ahora qué alteraciones bioquímicas y ultraestructurales ocurren en esos tiempos. Ya en 1-3 horas de administrado el CCl_4 se observa desgranulación del RER y dilatación del SER, RER, membrana perinuclear y aparato de Golgi (51,52,59), inhibición de la síntesis de proteínas, depresión de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6P-asa) y de la bomba de calcio y disminución del contenido de P450 y de ATP (49,42,59). En este período no se observan alteraciones revelables por microscopía electrónica en otras organelas (51,52,59). Posteriormente se van involucrando las mitocondrias y lisosomas y se acumula calcio (8-10 horas) y finalmente toda la célula se daña y ello es seguido de una estimulación de procesos degradativos y de necrosis, visible al microscopio (51,52,35).

La etapa que se verifica en las primeras 6 horas de la intoxicación es la que llamamos **etapa temprana** y la que va desde las 6 a las 24 horas se denomina **etapa tardía**. Mediante el empleo de antioxidantes como la vitamina E, la prometazina o la difenil-p-fenilendiamina, que inhiben los procesos de PL y no afectan las UC, y con compuestos como el pirazol y la cistamina que disminuyen la UC sin afectar PL, fue posible visualizar las responsabilidades relativas de ambos procesos en las alteraciones hepáticas producidas por el CCl_4 "in vivo" (15). También se efectuaron estudios equivalentes "in vitro" empleando hepatocitos aislados y los resultados no fueron exactamente iguales (57). En principio, todos los autores están de acuerdo en que ambos procesos de UC y PL son responsables de las alteraciones que se observan durante la etapa temprana de la intoxicación. No hay acuerdo, en cambio, sobre la importancia relativa de cada uno. Respecto a la etapa tardía de la intoxicación también se efectuaron

estudios "in vivo" sobre prevención de necrosis inducida por CCl_4 empleando quelantes de calcio, anticalmodulinas, inhibidores de procesos de degradación de fosfolípidos y proteínas o agentes capaces de estimular su síntesis (64-71). De todos esos estudios surge la posibilidad que en la etapa tardía de la intoxicación, el daño transcurra vía una acumulación intracelular de calcio, la cual en un mecanismo dependiente de calmodulina estimule procesos degradativos de proteínas y fosfolípidos de las membranas celulares que lleven a la muerte celular y a la necrosis posterior. Un esquema que visualiza todas las hipótesis de trabajo aquí mencionadas se presenta en la Figura 3.

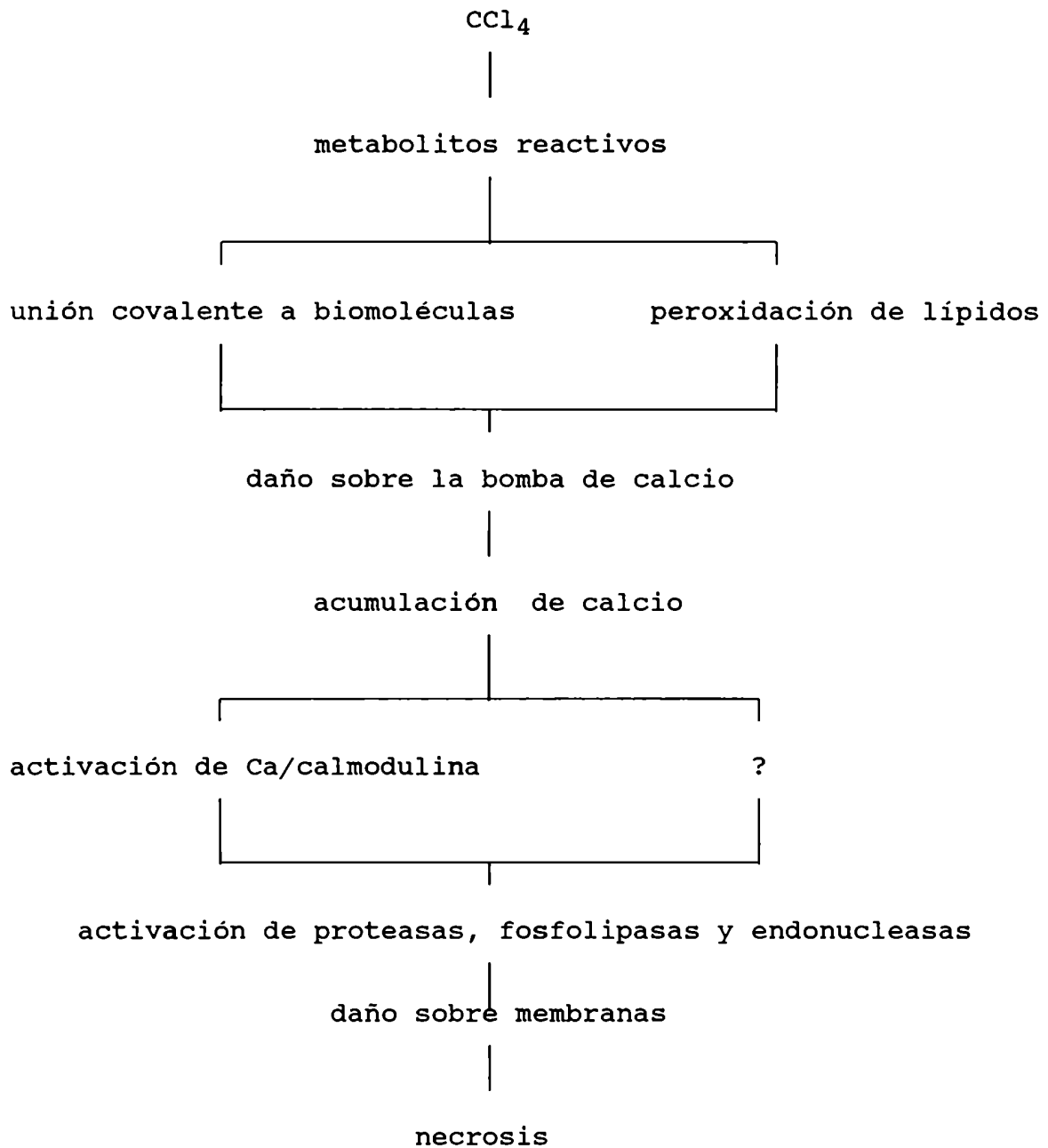
Interacciones de radicales $\cdot\text{CCl}_3$ producidos por biotransformación de CCl_4 con componentes celulares:

Los primeros antecedentes acerca de interacciones de metabolitos reactivos de CCl_4 con componentes celulares (lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) datan de 1966 y 1967 (15). Posteriormente ellos fueron estudiados en mayor detalle tanto desde el punto de vista bioquímico como estructural. No obstante es aún mucho lo que falta hacer para completar su caracterización.

El caso de los productos de interacción covalente con lípidos es el área en la cual se avanzó más. Por ejemplo, se pudo verificar que la intensidad y localización (tanto intracelular como en distintos tejidos) de las interacciones con lípidos se corresponde con la de la intensidad y distribución del sistema P450 dependiente que requiere NADPH y activa el CCl_4 a $\cdot\text{CCl}_3$ (15). Las interacciones observadas con los lípidos microsomales hepáticos corresponden

Figura 3.

Daño celular hepático por CCl₄. Hipótesis de trabajo.



fundamentalmente a fosfolípidos, ésteres de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos (72-74). La mayor parte de la interacción es con los fosfolípidos y dentro de ellos con fosfatidilcolina. No obstante también hay interacción con lisofosfatidilcolina, esfingomiélin y fosfatidilglicerol (72-74). El ataque de los metabolitos reactivos del CCl_4 es sobre los ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos pero fundamentalmente sobre los PUFA (72-74). Los productos de reacción que pudieron ser aislados son los esperados de una reacción de $\cdot\text{CCl}_3$ sobre los PUFA (73-75). Algunos de ellos fueron identificados por Trudell y col. (45) y por Frank y col. (75).

También se pudo evidenciar la formación de colesterol triclorometilado durante la interacción de los $\cdot\text{CCl}_3$ con el colesterol (76). En general, la unión covalente de metabolitos reactivos de CCl_4 a proteínas celulares se correlaciona bien en distribución celular y tisular así como en su respuesta a inhibidores e inductores con la de la oxidasa de función mixta P450 dependiente (38,41). Respecto a cuáles son los aminoácidos involucrados en la interacción, la información disponible es menos abundante que para el caso de los ácidos grasos. Cessi y col. (77) sugirieron una interacción con grupos ϵ -amino de la lisina pero sin ofrecer evidencia alguna de ello. Posteriormente Reynolds sugirió que todo el ataque ocurre sobre la metionina para dar el sulfóxido (78) pero tampoco efectuó demostración estructural alguna. Nuestro laboratorio verificó que $\cdot\text{CCl}_3$ generados químicamente (catálisis por peróxido de benzoílo) eran capaces de unirse covalentemente con todos los aminoácidos excepto glicina, leucina, lisina y metionina (79). La reacción era más intensa con cisteína, tirosina y triptofano. Durante el estudio de la interacción con metionina, se observó la formación de productos volátiles de descomposición (79).

Ningún otro estudio posterior avanzó en la determinación estructural de los aductos formados.

Para las interacciones covalentes con ácidos nucleicos de los metabolitos reactivos de CCl_4 la literatura es mucho menos abundante. Un problema que explica ello, es que su intensidad respecto a la que ocurre para el caso de lípidos o proteínas es mucho menor. Ese factor y la dificultad de obtener preparados de nucleicos altamente purificados y libres (o con sólo trazas) de proteínas, hicieron que existieran dudas acerca de si estas interacciones ocurrían o no. Obteniendo preparados muy purificados de ADN y ARN nuestro laboratorio evidenció que existen interacciones de metabolitos de CCl_4 con el ADN pero no con el ARN (80). Los estudios realizados por otros autores no arrojaban resultados definidos (81). Posteriormente se estudió en nuestro laboratorio la interacción de los $\cdot\text{CCl}_3$ con ADN y con las cuatro bases que lo componen (82). Se verificó que guanina y adenina eran las bases favoritas de la interacción, pero todas las bases fueron capaces de reaccionar con alguna intensidad (82). Se efectuó una separación por cromatografía en columna de los aductos formados y se pudo separar más de 20 aductos diferentes (82). No se realizó hasta el presente ningún estudio estructural de los aductos formados. Existen también estudios aislados sobre formación de aductos entre $\cdot\text{CCl}_3$ y el hemo y sus productos de descomposición provenientes del P450 microsomal (83) y estudios sobre interacciones covalentes de $\cdot\text{CCl}_3$ con nucleótidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) (84). En ninguno de estos dos trabajos se efectuaron los estudios estructurales correspondientes.

Estimulación de procesos de peroxidación de lípidos celulares por el CCl₄:

Antes de analizar el efecto estimulante del CCl₄ sobre los procesos de peroxidación de lípidos celulares, describiremos brevemente estos últimos con el propósito de facilitar la tarea.

La peroxidación de lípidos (PL) es un proceso de degradación oxidativa de los lípidos. Involucra fundamentalmente a los ácidos grasos polinosaturados (PUFA) de las membranas celulares. La PL genera durante esa degradación una gran cantidad de productos de menor peso molecular (85-92). En la Tabla IV se presenta un breve listado de las especies químicas involucradas en la PL. Básicamente se identifican tres etapas en este proceso: a) Iniciación; b) Propagación; c) Terminación. (Figura 4).

En la etapa de iniciación un radical libre que posee la suficiente energía abstrae un hidrógeno de la molécula de PUFA. Como resultado de esa reacción se genera un radical libre lipídico. Este sufre luego un proceso de reordenamiento de configuración cis-cis a cis-trans que va acompañado de una mayor conjugación de sus dobles enlaces (Figura 4). El proceso conduce a un aumento en la absorción en el UV a 234 nm que suele aprovecharse para verificar que la PL está ocurriendo. Con posterioridad, la reacción con una molécula de oxígeno da lugar a un radical lipoperoxilo (Figura 4) (85-92).

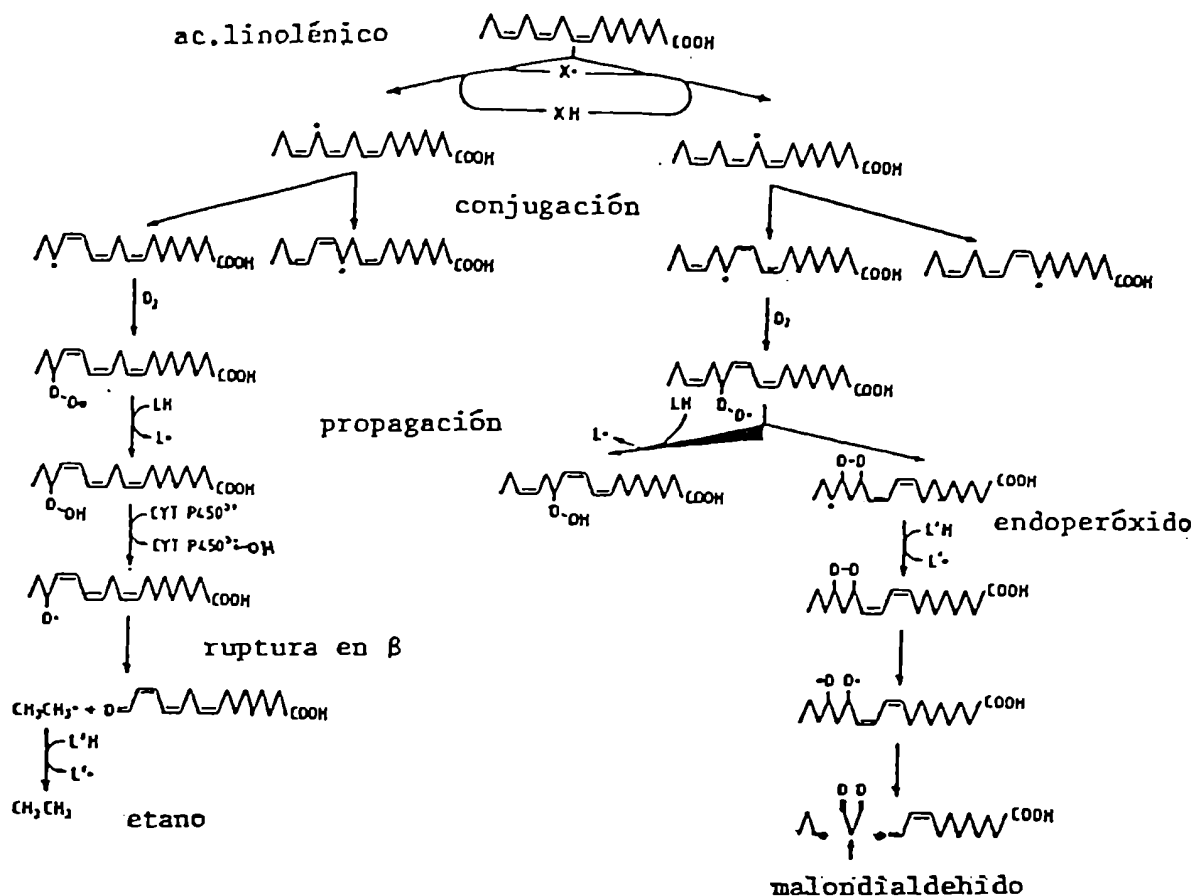
En la etapa de propagación es cuando se produce la verdadera amplificación del efecto inicial. Ello se debe a que ahora el radical libre lipoperoxilo efectúa otra abstracción de hidrógeno de un PUFA para generar un nuevo radical lipídico que repetirá también el proceso. Como

Tabla IV

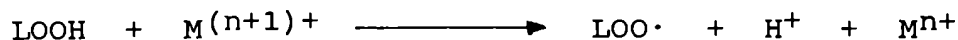
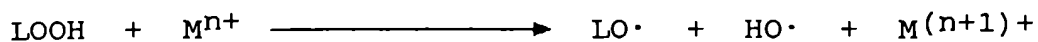
Especies químicas reactivas involucradas en la peroxidación de lípidos

O_2^{\bullet}	Generado en la biotransformación de ciertos xenobióticos por un ciclo redox. No es iniciador "per se" pero puede producir HO^{\bullet} por reacción con H_2O_2 .
H_2O_2	Producto de dismutación de O_2^{\bullet} . En presencia de trazas de hierro o cobre se descompone a HO^{\bullet} . Altamente reactivo e iniciador de la peroxidación. Se generaría por descomposición de H_2O_2 (reacción tipo Fenton).
1O_2	Se forma por descomposición de radicales lipoperóxido, dismutación de O_2^{\bullet} , etc.. Iniciador cuantitativamente poco relevante. Reactivo hacia enlaces
$[FeO_2]^{2+}$	Iniciador de peroxidación, importante en aquellos procesos hierro dependientes.
radicales lipoperóxido	Producto de la reacción de radicales lipídicos con O_2 . Responsables de la propagación de la peroxidación.
hidroperóxidos	Se generan por abstracción de H sobre los PUFA. Se degradan produciendo más radicales libres.
radicales alcoxilo	Proviene de la descomposición de hidroperóxidos catalizada por hierro (III) o cobre (II).
compuestos carbonílicos	Se producen por degradación de hidroperóxidos, etc.. Reactivos hacia nucleófilos (aminoácidos, GSH).

Figura 4. Peroxidación de ácidos grasos polinsaturados. Principales vías de degradación.



La descomposición de los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación es catalizada por metales de transición (hierro y cobre) de acuerdo con las siguientes reacciones:



resultado de esa abstracción también se genera un hidroperóxido del lípido en cuestión (Figura 4). Paralelamente los radicales lipoperoxilo pueden conducir a la formación de endoperóxidos. Esta última vía es la que genera malondialdehído, producto cuya detección da lugar a uno de los modos más difundidos de medir PL (Figura 4). También se ha aprovechado que el malondialdehído es capaz de reaccionar con grupos amino de aminoácidos, proteínas, fosfatidiletanolamina, ácidos nucleicos, etc. para dar bases de Schiff que tienen una fluorescencia característica. La vía de los hidroperóxidos también continúa hacia una mayor degradación y en un proceso de descomposición que es catalizado por metales de transición (particularmente hierro y cobre) genera radicales alcoxilo. La posterior escisión en β de los alcoxilos conduce a la formación de radicales libres alquilo. Estos a su vez generan por abstracción de hidrógeno, hidrocarburos volátiles (ej.: etano a partir de linolénico y pentano a partir de araquidónico). La medición de estos hidrocarburos volátiles constituye otro modo adicional de seguir los procesos de PL (85-92).

Entre la variedad de reacciones adicionales que ocurren conviene destacar algunas que dan fundamento a procedimientos adicionales a los descritos hasta ahora para detectar y cuantificar la PL, o que se han vinculado con sus efectos tóxicos. Una de ellas es la que genera 1O_2 a partir de la dismutación de dos radicales peroxilo. Cuando 1O_2 pasa al estado fundamental emite una luminiscencia característica cuyas bandas en 634 y 703 nm fueron aprovechadas para efectuar mediciones de PL (85-92). Otras reacciones adicionales son las que conducen a aldehídos y compuestos carbonílicos. Los más relevantes desde el punto de vista toxicológico son los 4-hidroxi-alquenos y entre ellos el 4-hidroxi-2-nonenal al cual se le atribuyen los efectos

tóxicos "a distancia" de la PL. La determinación de estos aldehídos previa formación de las correspondientes 2,4-dinitrofenilhidrazonas también dió lugar a un método para medir y detectar PL (85-92).

Finalmente mencionaremos que existe una etapa de terminación en la cual dos radicales involucrados en el proceso se combinan entre sí para dar un producto de tipo no radical (Figura 4)(85-92).

Existen revisiones detalladas acerca de la química de la peroxidación de lípidos y los modos de medirla (85-92).

El organismo posee una serie de defensas para controlar el proceso de PL y así evitar sus consecuencias potencialmente dañinas (87-94). Uno de ellos proviene de la presencia en la célula de antioxidantes poderosos. Los antioxidantes son sustancias de las cuales los radicales libres abstraen hidrógeno en vez de hacerlo desde los PUFA y con ello interrumpen la reacción en cadena de la PL. Uno de los antioxidantes más importantes es la vitamina E, la cual ejerce esa acción tanto in vitro como in vivo. Es capaz de reducir radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$); hidroxilos; lipoperoxilos; hidroperóxidos; $Cl_3CO_2^{\cdot}$ y de desactivar al 1O_2 . La vitamina C tiene una acción cooperativa con la vitamina E. Otros antioxidantes liposolubles son el β -caroteno, la ubiquinona y el ubiquinol. Existen también antioxidantes hidrosolubles muy eficaces. Uno de ellos es el glutathion reducido (GSH). Este es capaz de atrapar radicales libres y conjugarse con intermediarios electrofílicos que pueden generar peroxidación de lípidos. El ácido úrico es otro ejemplo de antioxidante hidrosoluble (87-94).

Otra defensa contra la PL la constituye un grupo de procesos enzimáticos que controlan la formación de radicales libres fuertemente dañinos como los HO^{\cdot} . Estos pueden producirse a partir de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ en una reacción catalizada

por Fe (III). Por lo tanto constituyen defensas contra la formación de HO· y la PL un grupo de enzimas como la catalasa y la GSH peroxidasa que ayudan a controlar los niveles de H₂O₂ o la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta O₂⁻ en H₂O₂ y oxígeno molecular.

Un grupo de proteínas mantienen ligado al hierro para que no esté libre y actúe (87-94). Son ejemplos la transferrina, la ceruloplasmina y la albúmina. Contra los hidroxialquenos proveen protección el GSH, la cisteína (mediante la formación de aductos) y la alcohol deshidrogenasa que los transforma en alcoholes, en una reacción que requiere NADH o NADPH.

En la Tabla V se resumen algunos dispositivos de defensa contra la PL. En distintas revisiones se analizan estos aspectos en mucho mayor detalle (87-94).

Después de esta breve introducción sobre la PL, su detección y las defensas contra ella, la siguiente pregunta es: ¿Hay evidencia de que el CCl₄ estimule un proceso de PL?. Existe abundante bibliografía que documenta la estimulación de PL por parte del CCl₄ tanto in vivo como in vitro. Ella se resume a continuación.

Se pudo evidenciar la producción de malondialdehído en preparados microsomales u homogenatos de hígado en condiciones donde había biotransformación de CCl₄ (10-15,90,94-97). También pudo establecerse que los lípidos microsomales hepáticos de animales intoxicados por CCl₄ evidenciaban una mayor conjugación de dienos (10-15,90,94-97). Se observó un mayor consumo de los PUFA y en particular de ácido araquidónico en los lípidos microsomales de animales intoxicados (98) . No fue evidenciada sistemáticamente una mayor fluorescencia derivada de pigmentos lipofuscínicos producidos por condensación del malondialdehído con grupos amino celulares (99). Ello puede deberse a que buena parte

Tabla V

Defensas celulares contra la peroxidación de lípidos.

ESTRUCTURALES:

Doble capa lipídica	Evita el contacto de los PUFA con $O_2^{\cdot -}$ o $[FeO_2]^{2+}$, no liposolubles.
Acople de reacciones redox secuenciales	Impide la fuga de metabolitos reactivos al medio.
Estabilizadores de membrana	Proveen estabilización estructural y defensas "in situ" contra agentes peroxidantes (colesterol, vitamina E).

ANTIOXIDANTES:

Liposolubles	Atrapan radicales libres, interrumpiendo la propagación. Tienen fácil acceso al interior de la membrana.
Hidrosolubles	Reaccionan con radicales libres, en solución.

ENZIMAS:

Catalasa	Metaboliza H_2O_2 producido en los peroxisomas.
GSH peroxidasas	Reducen al H_2O_2 e hidroperóxidos en citosol y matriz mitocondrial.
Superóxido dismutasas	Destruyen el anión superóxido, en citosol, matriz mitocondrial, hematíes, etc..
Aldehído deshidrogenasa	Oxidación de hidroxialquenes.

TRANSFERRINA, CERULO-
PLASMINA, ALBUMINA

Fijan hierro y cobre en plasma, impidiendo los efectos catalíticos en la formación de HO^{\cdot} .

GLUTATION (GSH)

Además de su efecto antioxidante, es un buen nucleófilo hacia, ej. los hidroxialquenes.

del malondialdehído se biotransforma rápidamente (11). Se pudo observar que tanto "in vitro" como "in vivo" el CCl_4 estimula la producción de hidrocarburos volátiles como etano, propano, pentano, etc. (94-97). La formación de hidroperóxidos de lípidos fue demostrada fehacientemente por cromatografía gaseosa y por HPLC. Su estructura fue confirmada por espectrometría de masas (56). También pudo evidenciarse tanto "in vitro" como "in vivo" que el CCl_4 estimula la emisión de luminiscencia característica de $^1\text{O}_2$ (97) y la producción de hidroxialquenos en general y 4-hidroxi-2-nonenal en especial (90).

En resumen, está perfectamente documentado que el CCl_4 estimula la PL. Existen revisiones exhaustivas sobre el tema (10-15,90,94-97).

CANCER Y CARCINOGENESIS QUIMICA

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento celular progresivo, infiltrante y metastásico. En los países desarrollados la incidencia del cáncer como causa de mortalidad y morbilidad ha ido aumentando sostenidamente y es hoy en ellos la segunda causa de muerte, siendo superado solamente por las enfermedades de origen cardiovascular (98). En los países subdesarrollados el cáncer es menos relevante en su peso que otras enfermedades bacterianas o parasitarias.

Se han reconocido como posibles agentes etiológicos del cáncer humano o animal a distintos tipos de virus, diferentes calidades de radiaciones y sustancias químicas variadas.

En la década del 60 comienza el desarrollo explosivo de los estudios epidemiológicos de los cánceres humanos. Se efectuaron gran cantidad de estudios sobre variación geográfica del cáncer, de variación de incidencia en poblaciones a lo largo del tiempo y en relación a exposición a diferentes sustancias químicas o fármacos o tareas o alimentos o contaminantes o hábitos (ej. fumar, beber, etc) (98). De estos innumerables estudios surge clara evidencia que el cáncer que padece el hombre tiene origen de modo predominante en el medio ambiente humano. Se entiende por medio ambiente humano todo aquello que hace y constituye la vida del hombre: el aire que respira, el agua que bebe, los alimentos que ingiere, sus hábitos, la ocupación que desempeña, los fármacos y otros productos químicos a que está expuesto a diario, etc. Como corolario de todos estos estudios se estima que el 80-90% de los cánceres son prevenibles (98, 99).

Es decir, la mayor parte de los cánceres humanos tienen origen en la exposición a productos químicos presentes en el medio ambiente humano y sólo una minoría de ellos se debería a otros factores como radiaciones o virus y en algunos casos tanto virus como productos químicos jugarían roles complementarios (98, 99). Respecto a cuales son esos productos químicos presentes en el medio ambiente responsables de los cánceres que sufre el hombre, se pueden decir varias cosas. Una es que el hombre introdujo al medio ambiente humano como productos de síntesis una enorme cantidad de sustancias químicas. Otra es que ya había en ese medio ambiente una gran variedad de productos naturales. Se ha podido establecer fehacientemente la carcinogenicidad para el hombre de sólo unas pocas sustancias pero a su vez otras a las que él se halla potencialmente expuesto también revelaron ser carcinogénicas en animales de experimentación. En el caso de estas últimas, la carcinogenicidad para el hombre es altamente probable. No son muchas las sustancias que por su ubicuidad, potencia carcinogénica y cantidad encontrada en el medio y asociadas a determinados cánceres humanos, puedan explicar los cánceres que más víctimas cobran a la humanidad. Se destacan entre esos candidatos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, la aflatoxina B₁, los productos de pirólisis de aminoácidos y las nitrosaminas (99-106). Algunos de estos tipos de carcinógenos son capaces de producir cáncer en condiciones adecuadas de experimentación, después de una única exposición. Estas sustancias que son capaces de producir cáncer en alta incidencia después de una sola exposición o que lo hacen luego de muchas pero en cantidades muy pequeñas, se denominan carcinógenos fuertes.

Aquellos que requieren una exposición repetida o permanente a cantidades importantes del carcinógeno o que conducen a baja incidencia de cáncer se consideran

carcinógenos débiles. Por supuesto existe una gradación de potencias entre estos extremos. Un problema adicional lo constituye el poder explicar en términos de estos pocos carcinógenos potentes y ubicuos detectados en el ambiente, la gran variedad de tipos y localizaciones de los cánceres humanos. Por ejemplo, la aflatoxina B₁ es un carcinógeno hepático, los productos de pirólisis de aminoácidos producen cáncer hepático y en intestino, los policíclicos en piel, pulmón y sólo raramente en otras localizaciones. Solamente las nitrosaminas y otros compuestos N-nitrosados (como familia) tienen capacidad de generar cánceres en prácticamente todos los órganos y esto lo han evidenciado en todas las especies animales que se han ensayado (98, 106).

De no poder responsabilizar a algunos de estos compuestos (o a todos ellos) de ser los causantes de los cánceres más críticos para el ser humano, lo que podría ocurrir es que: a) falte detectar otros carcinógenos ubicuos y presentes en concentraciones razonables, b) la carcinogénesis humana pueda ocurrir por exposición a múltiples factores carcinogénicos presentes en el medio ambiente o c) se deba a una suma de todo lo anterior e incluyendo a los carcinógenos violentos y ubicuos hoy conocidos (98, 106).

Un punto fundamental dentro de la carcinogénesis química fue el comprender que muchos carcinógenos (y virtualmente todos los carcinógenos más relevantes y potentes) requieren un proceso de biotransformación para poder llevar a cabo las reacciones químicas con los componentes celulares que finalmente llevan a la carcinogénesis. Es que es un axioma en toxicología que para que una sustancia sea tóxica en relación a una célula debe existir algún tipo de interacción con la misma que resulte nociva para ella. Los carcinógenos que no requieren biotransformación previa para actuar se llaman

carcinógenos directos y los que sí la requieren se denominan indirectos. En la Tabla VI se ilustran ejemplos de ambos tipos.

Tabla VI

Carcinógenos directos e indirectos. Ejemplos.

Directos	Indirectos
β -propiolactona	3-metil colantreno
sulfato de metilo	benzo-[a]-pireno
iperita	2-naftilamina
ciclofosfamida	bencidina
trietilenmelamina	4-dimetilamino azobenceno
bis-(clorometil) eter	dimetil nitrosamina
ioduro de metilo	N-nitroso prolina
	cloruro de vinilo
	aflatoxina B ₁
	actinomicinas
	adriamicina
	alcal. pirrolizidínicos
	safrol, estragol

Otro aspecto relevante en carcinogénesis química fue el desentrañar que tenían en común sustancias químicas de estructura tan dispar que las convertía en carcinogénicas.

Cuando se comprendió que gran cantidad de los carcinógenos requería biotransformación previa, el estudio de sus procesos de metabolización permitió entender que en muchos casos el factor común no eran sus estructuras sino sus modos de interaccionar con los componentes celulares. Todos los carcinógenos químicos son ellos en sí (caso de los carcinógenos directos) o algunos de sus productos de biotransformación (para el caso de los indirectos) fuertemente electrofílicos (capaces de interaccionar con centros ricos en electrones) y ello es lo que les permite reaccionar con componentes celulares críticos para el desarrollo del cáncer (107). La necesidad de un paso de biotransformación en el caso de muchos carcinógenos también permitió entender las distintas localizaciones de los cánceres producidos por sustancias químicas, en especial los que ocurrían en sitios distantes a los de contacto o aplicación con el carcinógeno (106,107).

Un aspecto importante del proceso de producción de tumores por sustancias químicas, es el relacionado al largo tiempo que lleva su desarrollo en relación al de vida. Ello es válido tanto en el hombre como en animales de experimentación (98) y se debe a que el desarrollo de cánceres ocurre en etapas. Esto pudo comprobarse muy claramente en animales de experimentación mediante el empleo de carcinógenos violentos capaces de producir tumores después de una sola exposición y el uso adicional de otras sustancias que por sí mismas no son capaces de conducir a tumores pero sí en cambio pueden promover su producción si el animal estuvo previamente expuesto a una o pocas dosis del carcinógeno fuerte. Simplificó mucho la experimentación el

que estos estudios se efectuaran en piel, permitiendo seguir visualmente paso a paso el proceso. En los primeros estudios se identificaron por lo menos dos etapas definidas, una denominada "iniciación" y otra de "promoción". La iniciación es un proceso muy rápido en relación al necesario para la aparición de tumores. Es en ese breve tiempo de exposición de la célula dada al carcinógeno que ocurren las interacciones entre él o sus productos de biotransformación y componentes celulares (ej. ADN y proteínas celulares). Los compuestos capaces de efectuar la iniciación y conducir a tumores por adecuada promoción se denominan "iniciadores". El proceso de iniciación ha sido considerado "irreversible" aunque a la luz del conocimiento actual sería más correcto decir "poco reversible" o de muy larga persistencia (98). En efecto, hoy se cree que la interacción crítica durante ese proceso de iniciación sería un ataque a las bases del ADN para dar aductos. Si bien esos aductos (o por lo menos algunos de ellos) pueden ser muy estables, también es cierto que existen procesos de reparación que permiten eliminar a muchos de ellos (98). La promoción en cambio es un fenómeno reversible y que requiere ser efectuada sostenidamente por un tiempo suficiente para que el tumor se desarrolle. Si se interrumpe antes de ese tiempo el tratamiento, se revierte el proceso hasta el de la célula "iniciada" o célula tumoral en estado latente (98). Las sustancias promotoras no son básicamente capaces de producir tumores por sí mismas (98).

Existen dos tipos de carcinógenos, los denominados "completos" y los "incompletos". Los "completos" son aquellos que poseen actividad "iniciadora" y "promotora" y por ello son capaces de producir cáncer por sí solos. La mayor parte de los carcinógenos y de hecho todos los carcinógenos fuertes son "completos". Un caso de iniciador puro es el del etil uretano. Son ejemplos clásicos de promotores los ésteres de

forbol presentes en el aceite de croton y otros compuestos (98). Posteriormente se descubrió que en la etapa inicialmente denominada de "promoción" podía discriminarse una fase tardía de la misma en la cual era factible reemplazar al "promotor" (ej., aceite de croton) por otros compuestos que en sí no eran promotores, como el aceite de trementina. A esa nueva etapa se la denominó "progresión" (98). En la promoción, el crecimiento celular conduce hacia la formación de neoplasias pero las células todavía pueden permanecer bajo control de mecanismos homeostáticos de las células normales vecinas. En la progresión ocurrirían cambios en esas células de los neoplasmas que permitirían la transición del comportamiento celular de benigno a maligno (98). Un hecho que permitió adjudicar gran relevancia al ataque al ADN en la "iniciación" fue el que la mayor parte de los carcinógenos fuesen también mutágenos en distintos sistemas de evaluación de mutagenicidad, o que se verificara químicamente su capacidad de generar aductos con el ADN (98). A estos carcinógenos se los denomina "genotóxicos". Pero también es cierto que se encontró que una pequeña fracción de los carcinógenos conocidos no eran mutágenos o que su mutagenicidad no se correspondía con sus efectos carcinogénicos. A estos carcinógenos se los denominó "epigenéticos" (98). Su mecanismo de acción es desconocido pero sí se cree que de algún modo el proceso involucra cambios en la expresión genética más que en el material genético mismo (98). A esta categoría pertenecen algunos haloalcanos como el tetracloruro de carbono, el cloroformo, plaguicidas clorados, la sacarina, hormonas, etc.(98, 106). La distinción entre "genotóxicos" y "epigenéticos" no sólo no es materia semántica o de curiosidad mecanística sino que tiene importantes consecuencias legislativas y por ende económicas. Los niveles de tolerancia que se establecen para

carcinógenos genotóxicos son cero o deben forzosamente tender a cero, mientras que se considera que en el caso de los epigenéticos es factible establecer algún nivel distinto de cero (98, 106). Hacerlo permite no tener que prohibir un compuesto o cerrar una fábrica o cambiar un proceso por otro.

En este trabajo se analiza el caso del mecanismo de acción carcinogénica del tetracloruro de carbono.

EL TETRACLORURO DE CARBONO COMO UN CARCINOGENO

El tetracloruro de carbono es un tóxico hepático de respuesta heterogénea entre diferentes especies y cepas de animales de experimentación. Este hecho es válido no solamente en lo que se refiere a los efectos agudos sobre hígado, tales como necrosis e hígado graso (9,11,50,17,34,59) sino también para efectos a largo plazo como la producción de cancer hepático (4,9,108-112).

En estudios previos de nuestro laboratorio y de otros, el problema fue considerado en relación con la necrosis hepática por CCl_4 , analizando la capacidad de este órgano para biotransformar CCl_4 a radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$, y la forma en que ese metabolismo conduciría a unión covalente a componentes celulares y/o promovería peroxidación lipídica.

Hasta el presente, no existen estudios mecanísticos detallados equivalentes para el caso del cáncer hepático inducido por CCl_4 . Nosotros creemos que, dada la respuesta heterogénea que presenta entre diferentes especies, este compuesto ofrece una oportunidad única para dilucidar el mecanismo por el cual provoca este daño a largo plazo.

En efecto, el CCl_4 no resultó carcinogénico en todas las especies animales ensayadas (108-112). Por ejemplo, el

hamster fue muy susceptible, presentando tumores solamente en hígado. Otra especie afectada fue el ratón, del cual se ensayaron varias cepas con distinto grado de respuesta. Entre ellas está la cepa C3H, que resultó muy susceptible. Otra cepa de ratón, la B6C3F1 (híbrida) también desarrolló tumores, esta vez localizados en hígado y adrenales. La rata en general es muy poco o nada susceptible al efecto hepatocarcinogénico del CCl_4 (111). La cepa Sprague Dawley en particular no genera cáncer por exposición repetida al tóxico de por vida. Las ratas Japonesa y Osborne Mendel, en cambio sí responden, con localización no sólo hepática sino también en riñón y en tiroides (111).

Por otra parte, aún para los casos de necrosis hepática e hígado graso, los estudios de correlación con unión covalente a componentes celulares nunca consideraron al ADN o a las proteínas nucleares como posibles blancos de interacción. La peroxidación de lípidos fue estudiada "in vivo" o en cortes de hígado o en microsomas, pero no en preparados nucleares o estableciendo si su ocurrencia implicaba alteraciones en el ADN o en las proteínas nucleares. Tener esta información es crítico para entender los efectos carcinogénicos de CCl_4 , aunque la relevancia de estos resultados no se limitaría solamente a los efectos a largo plazo.

El tetracloruro de carbono pertenece a un grupo de sustancias químicas carcinogénicas que no parecen actuar a través de mecanismos genotóxicos. No existe en la actualidad una hipótesis general para explicar el comportamiento de este conjunto heterogéneo de carcinógenos pero se ha postulado que afectarían la expresión de los genes más que el material genético en sí. Existirían razones para clasificar al CCl_4 como un carcinógeno no genotóxico (epigenético). Una de ellas es la falta de evidencia clara de efectos mutagénicos.

Varios estudios de genotoxicidad han dado resultados negativos o débilmente positivos (84,113-128). Para algunos de ellos, entendemos que los resultados pueden ser cuestionables debido a condiciones experimentales inadecuadas (se analizan detalladamente en la discusión de los resultados).

Otra razón concierne a la característica de carcinógeno débil que tiene este compuesto: Los efectos carcinogénicos sólo se han observado luego de una exposición repetida (tiempo de vida del animal) y a dosis relativamente altas de CCl_4 (necrogénicas). Este comportamiento es más frecuente en un carcinógeno epigenético que en uno genotóxico.

Si el tetracloruro de carbono no actuara por mecanismos genotóxicos entonces necesitaríamos explicaciones alternativas para su efecto carcinogénico. Algunas de las hipótesis postuladas para entender la carcinogénesis química por mecanismos no genotóxicos plantean como la causa fundamental, cambios en el modo de expresión genética durante el proceso carcinogénico. Además se sabe que las proteínas nucleares juegan un rol principal en el control de la expresión de los genes y en la estructura de los cromosomas (129-132).

Es justamente en relación con este hecho que nosotros consideramos importante realizar el estudio de las interacciones entre metabolitos reactivos provenientes de la biotransformación de CCl_4 con las bases del ADN y con los aminoácidos componentes de las proteínas nucleares. También analizamos directamente "in vivo" e "in vitro" la correlación entre la alteración del ADN y de las proteínas nucleares y la diferente susceptibilidad a la carcinogénesis por CCl_4 en tres especies animales: hamster sirio dorado, ratón C3H y rata Sprague Dawley. Se realizaron estudios comparativos de unión covalente a ADN y proteínas nucleares

"in vivo" e "in vitro" y de capacidad biotransformadora y de peroxidación nuclear "in vitro".

Por otra parte se analizó la capacidad de reacción de cada base del ADN con radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ en un sistema "in vitro". Lo mismo se hizo con los aminoácidos, componentes de las proteínas nucleares.

EXPRESION GENETICA DE LAS CELULAS EUCARIOTAS. RELEVANCIA DE LAS PROTEINAS NUCLEARES EN EL PROCESO

El entendimiento en términos moleculares de cómo una célula eucariota es capaz de efectuar el control de su actividad genética y de ese modo ser parte de las actividades coordinadas que dan lugar a una planta o a un animal, es uno de los desafíos más interesantes y a su vez una de las áreas más intensamente encaradas de la biología celular. Si bien es cierto que se ignoran muchos aspectos básicos del problema, también es cierto que el avance que se ha operado en estos temas es notable. Aquí sólo nos referiremos a conceptos muy generales que permitan visualizar el porqué del interés del toxicólogo en incursionar en este tema. La idea que guía este interés es que las sustancias químicas que perturben esa expresión de la regulación genética pueden dar lugar a efectos tóxicos muy graves, ej. cáncer, trastornos en el desarrollo, etc., aún sin haber alterado el material genético en sí, sino sólo la expresión del mismo.

Han existido en el pasado postulaciones de este tipo en la literatura toxicológica vinculada a carcinogénesis (106) pero no es mucha la experimentación concreta disponible en apoyo a esa hipótesis. Existen revisiones muy completas y profundas sobre este tema, desde el punto de vista de la biología molecular (129-132).

El primer punto que es necesario analizar se refiere a la mayor complejidad de una célula eucariota superior respecto a una procariota y como ello determina una mayor complejidad en los mecanismos de la regulación de su expresión genética.

Las células de eucariotas superiores son mucho más grandes que las de procariotas. El mayor tamaño requiere modos de transporte de los productos finales e intermedios de la expresión genética a distancias relativamente más largas en términos celulares. A su vez tienen una membrana nuclear que produce la segregación del proceso de transcripción de aquel de traducción. Una de las características más notables de las células eucariotas superiores provenientes de tejidos de organismos multicelulares es que, conteniendo todas ellas el mismo ADN en un organismo dado, cada una tiene una función diferente. Esa diferencia reside en que cada tipo de célula fabrica y acumula distintos tipos de proteínas y ello a la vez requiere que se transcriban y/o que no se transcriban o lo hagan en diferente intensidad, distintos grupos de genes. Para ilustrar esto diremos que en una célula eucariota superior sólo se está expresando en un momento dado alrededor del 1% de su genoma y sólo un promedio de alrededor del 7% del mismo será copiado alguna vez en ARN. A su vez esos pequeños porcentajes de expresión del material genético se deben a expresiones de señales de diferentes grupos de genes.

Existe cierta superposición de expresión en el material genético en células diferentes del mismo organismo. Ello se debe a que ciertas proteínas son fundamentales para todas las células de un organismo y otras lo son sólo para algunas de ellas. En una célula eucariota superior sucede que distintos grupos de genes se expresan en distintas circunstancias y en distintas etapas de la vida del organismo multicelular. Esto quedó muy claramente visualizado morfológicamente en estudios

efectuados en cromosomas politénicos de células gigantes de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* bajo la influencia de la hormona de insectos denominada "ecdysone" o por el efecto de un shock térmico. El grupo de genes que permanecen activos o son potencialmente activables en una célula eucariota superior se va determinando gradualmente durante el desarrollo pero una vez que queda establecido no parece ser modificado por cambios en el medio externo y constituye una característica del tipo celular dado dentro del organismo multicelular en cuestión.

Para controlar las necesidades de distintas calidades y cantidades de distintas proteínas existentes en los diferentes tipos de células eucariotas superiores de un organismo multicelular, existen varias posibilidades que incluyen: 1) transcripción diferencial, 2) procesamiento diferencial de los ARN que fueron transcritos, 3) estabilización diferencial del ARN mensajero (m-ARN) en el citoplasma, 4) traducción diferencial del m-ARN en proteína.

De todas estas posibilidades, la transcripción diferencial es la que habitualmente conduce a una diferente síntesis de proteínas en las células eucariotas superiores y es por ello que nos referiremos fundamentalmente a ella. Es decir, trataremos de analizar los factores que determinan la transcripción diferencial del material genético.

Comenzaremos por señalar que el ADN de los eucariotas no está en forma libre sino que está por así decir "empacado" a través de una asociación con proteínas en la cromatina. Esta última es por lo tanto un complejo firme entre el ADN eucariota y proteínas nucleares específicas.

La cromatina tal cual se la ve por microscopía electrónica tiene apariencia de cuentas de un rosario. Estas "cuentas" son los nucleosomas y en el ADN asociado a ellos hay entre 150 y 250 pares de bases de ácido nucleico. Entre

los nucleosomas se encuentra el ADN vinculante ("linker DNA")

Se ha podido determinar que el ADN inactivo se halla en forma condensada en la denominada heterocromatina. La heterocromatina es la parte de la cromatina muy compactada, que por esa condición llega a ser visible aún por microscopía óptica durante la interfase celular. El ADN que está en la heterocromatina no se transcribe en ARN en tanto que la forma más abierta (menos compactada) de la cromatina (eucromatina) sí lo hace. Se han descrito casos de genes activos presentes en la eucromatina que se volvieron inactivos durante un reordenamiento cromosómico que los translocó a la heterocromatina. Existen dos subclases de heterocromatina, la constitutiva y la facultativa. La primera es la que está presente en todas las células de un mismo organismo. La segunda es la que está como tal en algunas células de un organismo dado pero no en otras.

Respecto a la naturaleza y necesidad de ese empacamiento del ADN y al distinto grado de compactación del mismo es conveniente efectuar algunos comentarios. Por ejemplo, la necesidad del empacamiento surge como obvia si se considera que la molécula de ADN es tan larga que de no tener algún tipo de "empacamiento" y "doblado" simplemente no podría estar contenida en un núcleo celular del tamaño que éste posee. Se ha podido determinar que aún pequeñas diferencias en el grado de "empacamiento" y "doblado" de distintas zonas del genoma parecen tener una participación significativa para determinar que genes estarán activos en una célula eucariota dada.

Ahora bien, ese grado de empacamiento y doblado del ADN es una función propia de las proteínas nucleares específicas. Dentro de éstas son críticas para determinar el "doblado" del ADN las histonas. Estas proteínas son de peso molecular relativamente bajo y tienen un alto contenido de aminoácidos

básicos (ej. lisina y arginina). Esta característica es la que les confiere capacidad para asociarse con alta afinidad al ADN, que posee carga negativa. Las células eucariotas poseen cantidades importantes de histonas cuya masa llega a ser aproximadamente igual a la del ADN celular. Hay cinco clases de histonas y se las conoce como H1, H2A, H2B, H3 y H4. Están presentes en igual proporción entre sí excepto H1 que está en la mitad del contenido de las otras.

Una diferencia entre cromatina activa e inactiva reside en la composición proteica de los nucleosomas y además en ciertas modificaciones químicas de las proteínas histónicas. Se ha visto, por ejemplo, que los nucleosomas recuperados de regiones transcripcionalmente activas son deficientes en histona H1 y que frecuentemente contienen en cambio las muy abundantes proteínas no-histónicas del tipo HMG 14 ó 17.

También pudo observarse que ciertas modificaciones de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 ocurren selectivamente en los nucleosomas activos. Estas modificaciones incluyen acetilaciones y fosforilaciones. Otra modificación que ocurre en las histonas de la cromatina de genes activos, es la unión covalente de una pequeña proteína denominada ubiquitina a la histona H2A. Esa unión, aunque covalente, es reversible por ruptura en la mitosis y reasociación en la interfase. Estas modificaciones podrían, por ejemplo, disminuir la tendencia de nucleosomas vecinos a agregarse o afectar la degradación de alguna proteína específica.

Como ya anticipáramos, también hay en la cromatina un grupo de proteínas de tipo no histónico y que tienen naturaleza más ácida. Las proteínas no histónicas constituyen un porcentaje significativo del peso seco de la cromatina, ej. hepática (composición en % de peso seco: ADN 31, ARN 5, histonas 36, y no histonas 28). Estas proteínas cromosómicas son de tipo muy variado e incluyen a las ADN

polimerasas que se requieren para la replicación del ADN, las ARN polimerasas necesarias para la transcripción del ADN y una gran variedad de proteínas reguladoras que tienen como función asegurar el funcionamiento de los genes cuando ello es necesario. Se ha calculado que existen en pequeñas cantidades unas diez mil moléculas de proteínas reguladoras de genes por célula. Estas proteínas reconocen segmentos específicos del ADN sobre el cual operan y en contraste con las histonas tienen más aminoácidos cargados negativamente que positivamente en su estructura. Las proteínas más abundantes dentro de las no histonas no parecen reconocer secuencias específicas en el ADN y más bien influenciarían características más generales de la cromatina como son las requeridas para la transcripción de genes. En ellas están incluidas las del grupo denominado de alta movilidad o HMG y siempre se las encuentra asociadas en genes que están activos

También se encuentran entre las proteínas no histónicas las denominadas hn RNP. Son proteínas que se hallan asociadas no covalentemente con los pre m-ARN que luego sufren distintos procesamientos para convertirse en las formas maduras de m-ARN. En los eucariotas superiores estas proteínas presentes en los hn RNP son un grupo de polipéptidos altamente conservados en la evolución, que están entre las proteínas de tipo no histónico más abundantes del núcleo celular.

En resumen: la expresión genética en las células eucariotas superiores está muy regulada. En esa regulación desempeñan un papel decisivo las proteínas nucleares del tipo histonas y las no histónicas. Ambas no sólo son críticas desde el punto de vista estructural para la cromatina sino que contribuyen de modo fundamental a la determinación de la expresión genética. Se ha demostrado que cambios químicos y físicos en las propiedades de las proteínas nucleares pueden

reflejarse de modo importante en cambios en la expresión genética (129-132).

RESULTADOS

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A MACROMOLECULAS
CELULARES

Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con
ADN hepático de distintas especies animales:

Las muestras de ADN hepático aisladas de animales de las tres especies estudiadas (seis horas de intoxicación con $^{14}\text{CCl}_4$), mostraron un grado de unión covalente (UC) pequeño pero significativo. No se observaron diferencias significativas de UC entre las especies (Tabla VII). La intensidad de las interacciones, expresadas en término de moles de nucleótidos/mol de CCl_4 fueron muy bajas y dentro del orden de magnitud que fuera reportado anteriormente (80). Por otra parte, esta UC no puede ser atribuída a contaminación del ADN con proteínas ya que no fue posible detectarlas con el reactivo del fenol (133) o por absorción al ultravioleta (134).

Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con
proteínas nucleares de hígado de distintas especies animales:

Se observó la unión covalente de ^{14}C desde $^{14}\text{CCl}_4$ en las tres especies (seis horas de intoxicación). La intensidad de UC para el hamster sirio dorado y el ratón C3H fue significativamente mayor que la observada en la rata Sprague Dawley (Tabla VIII). Los valores en hamster y ratón resultaron aproximadamente 4,2 y 3,4 veces superiores al de

Tabla VII

Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con ADN de hígado de distintas especies animales.

-----	-----	-----
Especie ^a	pmol CCl_4 /mg ADN ^b ± SD	mol nucleótidos/mol de metabolitos ($\times 10^6$) ^c ± SD
-----	-----	-----
hamster sirio dorado	2,3 ± 0,2	1,41 ± 0,05
ratón C3H	2,3 ± 0,4	1,41 ± 0,07
rata Sprague Dawley	2,2 ± 0,4	1,47 ± 0,07

a. $^{14}\text{CCl}_4$ fue administrado intraperitonealmente como una solución al 15% (v/v) de CCl_4 en aceite de oliva ($1,1 \times 10^8$ dpm/ml solución) en una dosis de 5 ml/kg. Los animales fueron sacrificados 6 hr después del tratamiento. El ADN fue aislado y determinada la radioactividad unida según se describe en la parte experimental. Los resultados son el promedio de tres muestras diferentes, cada una constituida por un grupo de seis hígados de ratón, dos hígados de hamster o uno de rata.

b. No se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las tres especies.

c. Los cálculos se efectuaron considerando que 1 mg de ADN contenía 3,237 umol de nucleótidos.

Tabla VIII

Interacción "in vivo" de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con proteínas nucleares de hígado de distintas especies animales.

Especie ^a	pmol CCl_4 /mg proteína ^b ± SD
hamster sirio dorado	7,5 ± 0,8
ratón C3H	6,1 ± 1,1
rata Sprague Dawley	1,8 ± 0,5

a. $^{14}\text{CCl}_4$ fue administrado intraperitonealmente como una solución al 15% (v/v) de CCl_4 en aceite de oliva (70×10^6 dpm/ml solución) en una dosis de 5 ml/kg. Los animales fueron sacrificados 6 hr después del tratamiento. Las proteínas fueron aisladas y contada su radioactividad según se describe en la parte experimental. Los resultados son el promedio de tres muestras diferentes conformadas por un grupo de 4 hígados de ratón, 1 de hamster ó 1 rata.

b. Los valores para hamster y ratón fueron significativamente mayores que el correspondiente a rata. No hubo diferencia significativa entre hamster y ratón.

esta última. Entre hamster y ratón no hubo diferencia significativa.

Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con ADN de distintas especies animales:

Los preparados de núcleos purificados de las tres especies fueron capaces de activar al CCl_4 a metabolitos que se unieron al ADN (Tabla IX) . La unión covalente a ADN en ausencia de NADPH fue pequeña pero significativamente más alta en rata que en hamster o ratón y los valores entre estos dos últimos no difirieron significativamente entre sí.

La unión covalente en presencia de NADPH fue significativamente mayor en los núcleos de hamster. No se observó diferencia entre las otras dos especies. Además, el incremento producido por NADPH fue significativo en ratón y hamster pero no en rata (Tabla IX).

Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con proteínas nucleares de distintas especies animales:

La unión covalente "in vitro" a proteínas nucleares producida en ausencia de NADPH fue máxima en hamster, seguida por ratón y en grado mucho menor por la rata (Tabla X). Los valores para los preparados nucleares de hamster y ratón fueron respectivamente 4 y 2,5 veces más altos que el correspondiente a rata.

En presencia de NADPH, los valores obtenidos siguieron el mismo orden entre especies pero relativamente se observó

Tabla IX

Activación nuclear de $^{14}\text{CCl}_4$ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN de distintas especies animales.

especie/condición experimental ^a	pmol CCl_4 /mg ADN \pm SD	mol nucleótidos/mol metabolitos ($\times 10^6$) ^e \pm SD
hamster sirio dorado		
+ NADPH	10,5 \pm 0,8 ^{b,c}	29 \pm 3
NADPH	6,0 \pm 1,7 ^d	54 \pm 2
ratón C3H		
+ NADPH	9,1 \pm 1,6 ^{b,c}	24 \pm 2
NADPH	6,2 \pm 0,6 ^d	54 \pm 3
rata Sprague Dawley		
+ NADPH	8,3 \pm 0,7 ^{b,c}	40 \pm 3
NADPH	7,9 \pm 0,6 ^d	40 \pm 3

a. Las mezclas de incubación contenían núcleos purificados (2,0-2,4 mg de proteína nuclear/ml), sistema generador de NADPH si correspondía y $^{14}\text{CCl}_4$ (2×10^6 dpm/ml, CCl_4 0,2 mM). Las incubaciones se efectuaron a 37 °C durante 1 hr bajo atmósfera de nitrógeno. El ADN fue aislado y contada su radioactividad según se describe en la parte experimental. Cada resultado es promedio de tres muestras separadas.

b. En los casos de hamster y ratón, los valores en presencia de NADPH fueron significativamente mayores que aquellos en ausencia de NADPH. En rata no se observó diferencia significativa entre ambos valores.

c. En presencia de NADPH, el valor para hamster fue significativamente mayor que el correspondiente a rata. No se observó diferencia entre hamster y ratón o entre ratón y rata.

d. Para los experimentos en ausencia de NADPH no se observó diferencia entre rata y hamster o entre ratón y hamster. El valor para rata fue significativamente mayor que el de ratón.

e. Los cálculos se efectuaron considerando que 1 mg de ADN contenía 3,237 μmol de nucleótidos.

Tabla_X

Activación nuclear de $^{14}\text{CCl}_4$ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a las proteínas nucleares de distintas especies animales.

Especie ^a	pmol CCl_4 /mg proteína \pm SD	
	- NADPH	+ NADPH
hamster sirio dorado	193,3 \pm 15,3 ^d	624,5 \pm 12,3 ^{b,d}
ratón C3H	121,8 \pm 2,4	223,2 \pm 12,6 ^b
rata Sprague Dawley	47,8 \pm 1,7	168,4 \pm 4,7 ^{b,c}

a. Las mezclas de incubación contenían núcleos purificados (2,0-2,4 mg de proteína nuclear/ml), sistema generador de NADPH si correspondía y $^{14}\text{CCl}_4$ (2×10^6 dpm/ml, CCl_4 0,2 mM). Las incubaciones se efectuaron a 37 °C durante 1 hr, en atmósfera de nitrógeno. Las proteínas fueron aisladas y contada su radioactividad según se describe en la parte experimental. Cada resultado es el promedio de tres muestras separadas.

b. En todos los casos, los valores en presencia de NADPH fueron significativamente mayores que aquellos en ausencia de NADPH.

c. En ambas condiciones experimentales los valores para rata fueron significativamente más bajos que los de ratón y hamster.

d. En ambos casos los valores para hamster fueron significativamente más altos que los correspondientes para ratón.

una mayor diferencia entre hamster y ratón que entre éste y rata. La unión covalente en hamster y ratón fue 3,7 y 1,3 veces mayor que para rata, respectivamente.

Se observó un marcado efecto del NADPH sobre la activación nuclear de CCl_4 a metabolitos reactivos en las tres especies estudiadas, a razón de 323% en hamster, 183% en ratón y 352% en rata (Tabla X).

Activación nuclear e interacción de metabolitos reactivos de $^{14}\text{CCl}_4$ con diversas fracciones de proteínas nucleares hepáticas de diferentes especies animales:

Todas las fracciones de proteínas nucleares hepáticas de las tres especies reaccionaron con metabolitos de $^{14}\text{CCl}_4$ producidos en presencia o ausencia de NADPH (Tabla XI).

En todos los casos, excepto en la fracción histona de ratón, el NADPH produjo un incremento de la unión covalente a las distintas fracciones. Las fracciones residual y V (proteínas ácidas) fueron los blancos favoritos de ataque. En el caso de la rata, la fracción IV tuvo una marca similar a la fracción V. Las intensidades relativas de unión covalente a la fracción residual, en presencia de NADPH, no fueron significativamente diferentes en las tres especies (ratón \geq rata \geq hamster) (Tabla XI). Sin embargo, en ausencia de NADPH, el valor para ratón resultó mucho mayor que los de rata y hamster, los cuales a su vez no diferían significativamente entre sí. La marca sobre la fracción histona (con NADPH) fue significativamente más alta en ratón o rata que en hamster, mientras que en ausencia de NADPH el valor para ratón era 4,9 veces mayor que para rata y 7,3 veces mayor que para hamster.

Tabla XI

Activación nuclear de $^{14}\text{CCl}_4$ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a las diversas fracciones de proteínas nucleares de distintas especies animales.

Proteínas nucleares ^b	condición experimental ^a			
	+ NADPH		NADPH	
	pmol CCl_4 / mg proteína ± SD	% marca en fracción	pmol CCl_4 / mg proteína ± SD	% marca en fracción

hamster sirio dorado				
I	53,1 ± 10,4	8,8	6,2 ± 0,8	5,1
II	22,9 ± 13,3	3,8	4,1 ± 0,6	3,4
III	23,0 ± 5,5	3,8	8,7 ± 1,0	7,1
IV	43,3 ± 13,6	7,2	10,6 ± 0,8	8,7
V	207,1 ± 33,5	34,3	31,8 ± 3,2	26,1
histonas	26,2 ± 2,3	4,3	9,8 ± 2,7	8,0
residuales	228,1 ± 63,6	37,8	50,6 ± 6,5	41,5
ratón C3H				
I	30,6 ± 1,9	4,3	16,5 ± 1,1	4,0
II	26,9 ± 2,4	3,8	14,7 ± 1,8	3,6
III	23,8 ± 3,5	3,3	14,4 ± 2,0	3,5
IV	51,9 ± 6,5	7,3	34,2 ± 6,7	8,4
V	210,9 ± 10,3	29,5	92,4 ± 13,9	22,6
histonas	82,3 ± 5,4	11,5	71,8 ± 4,1	17,5
residuales	288,2 ± 14,2	40,3	165,4 ± 25,9	40,4
rata Sprague Dawley				
I	54,7 ± 6,2	7,4	20,5 ± 7,5	12,2
II	21,2 ± 1,2	2,9	8,1 ± 0,8	4,8
III	39,6 ± 6,2	5,4	10,3 ± 0,7	6,1
IV	147,0 ± 28,2	20,0	35,4 ± 8,1	21,1
V	156,2 ± 26,5	21,3	30,2 ± 7,0	18,0
histonas	56,0 ± 16,4	7,6	14,7 ± 1,6	8,8
residuales	260,1 ± 10,7	35,4	48,4 ± 24,3	28,9

Tabla XI (continuación).

a. Las mezclas de incubación contenían núcleos purificados (2,0-2,4 mg de proteína nuclear/ml), sistema generador de NADPH si correspondía y $^{14}\text{CCl}_4$ (2×10^6 dpm/ml, CCl_4 0,2 mM). Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 hr, en atmósfera de nitrógeno.

El fraccionamiento de las proteínas nucleares y la medición de la radioactividad unida se realizaron según se describe en la parte experimental. Los resultados son promedios de tres muestras separadas.

b. Las fracciones I y II corresponden a las proteínas nucleares solubles, las fracciones III y IV son desoxirribonucleoproteínas y la fracción V se constituye por las ribonucleoproteínas ácidas.

La unión covalente a la fracción V en presencia de NADPH no difirió significativamente entre hamster y ratón. El valor para rata fue algo menor.

Sin NADPH, en cambio, la unión a la fracción V resultó mayor en ratón que en hamster o rata, que no difirieron entre sí.

La fracción IV (con NADPH) presentó un valor alto para rata, seguido de lejos por las otras dos especies. En ausencia de NADPH, la situación se mantuvo aunque con menores diferencias (Tabla XI).

Los valores para la fracción III en presencia de NADPH fueron pequeños pero significativamente más altos en la rata que en hamster o ratón, que a su vez no diferían uno del otro. En ausencia de NADPH, los valores también resultaron bajos, correspondiendo el mayor para ratón. La unión covalente a la fracción II, con NADPH, no difirió significativamente en las tres especies. En cambio, en ausencia de NADPH, los valores fueron: ratón > rata > hamster (Tabla XI).

Por último, la marca asociada a la fracción I en presencia de NADPH fue similar para rata y hamster y menor para ratón. Sin NADPH, rata resultó similar a ratón y estos valores mayores que el de hamster.

En las figuras 6, 7 y 8 se expresan todos estos resultados de modo gráfico, con el propósito de lograr una mejor visualización de las diferencias de respuesta entre las tres especies.

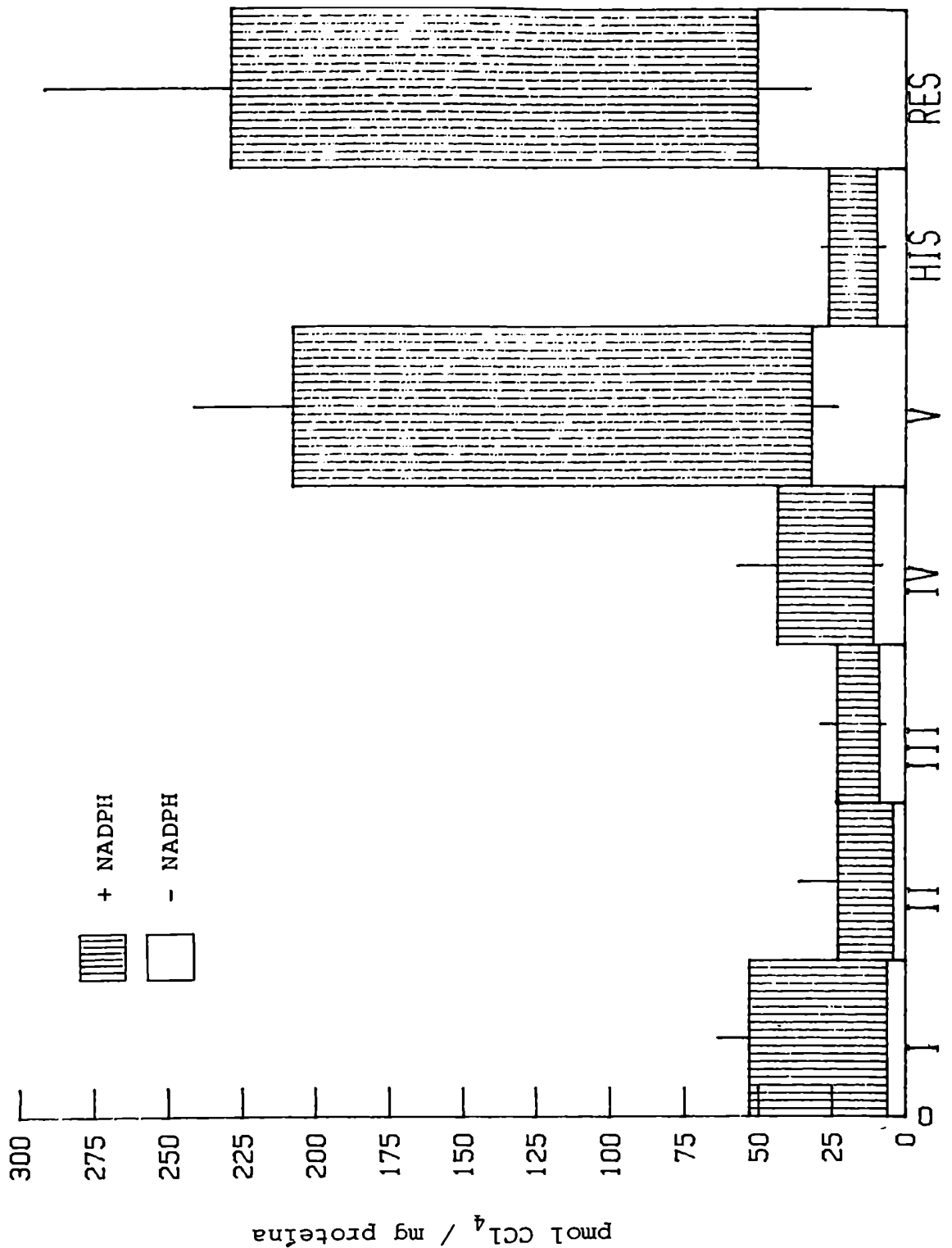


Figura 5. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de hamster con marca de ¹⁴CCl₄ unida covalentemente. I y II, proteínas nucleares solubles; III, desoxiribonucleoproteínas-1; IV, desoxiribonucleoproteínas-2; V, ribonucleoproteínas ácidas; HIS, histonas y RES, fracción residual (proteínas de la membrana nuclear).

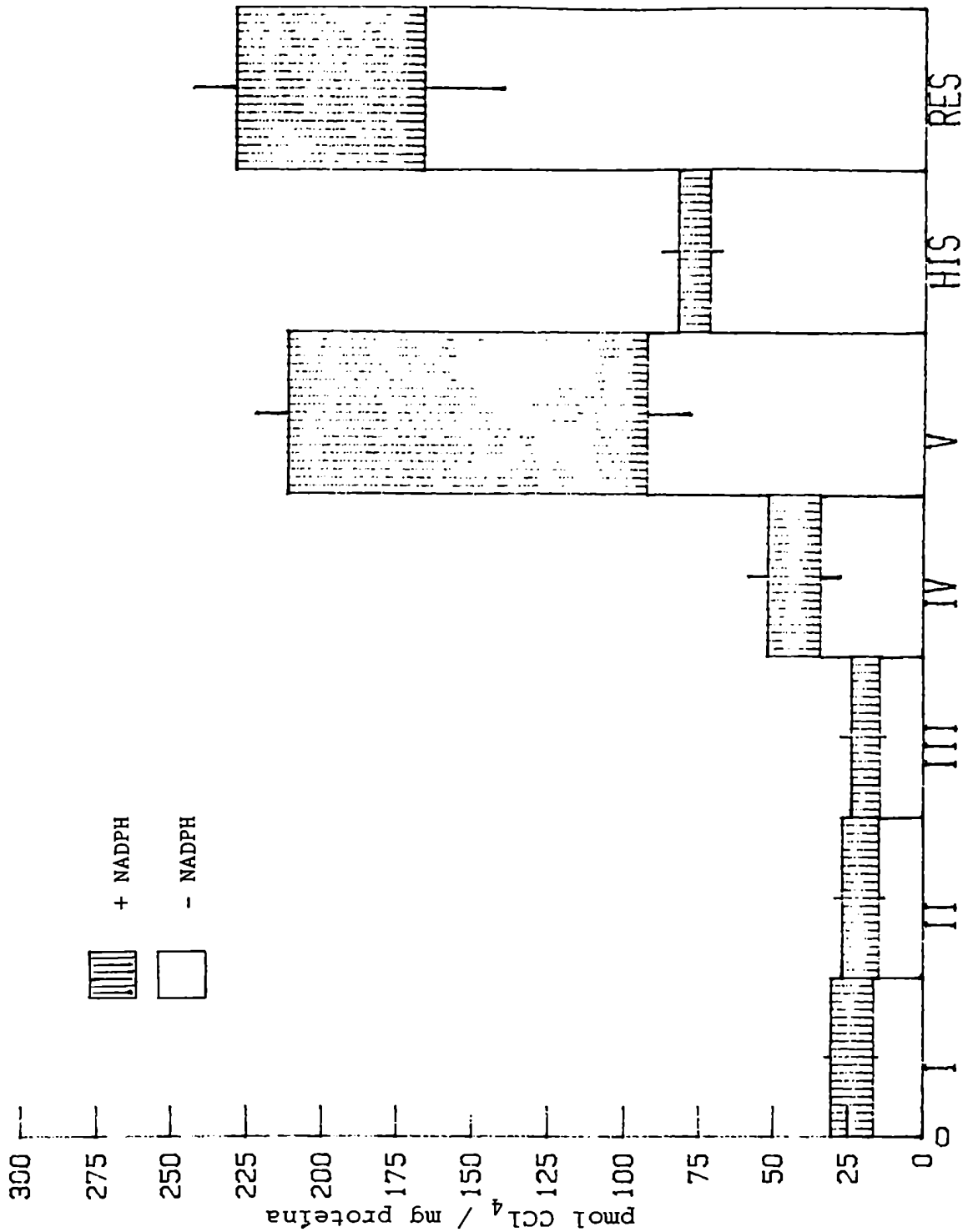


Figura 6. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de ratón con marca de ¹⁴CCl₄ unida covalentemente. I y II, proteínas nucleares solubles; III, desoxiribonucleoproteínas-1; IV, desoxiribonucleoproteínas-2; V, ribonucleoproteínas ácidas; HIS, histonas y RES, fracción residual (proteínas de la membrana nuclear).

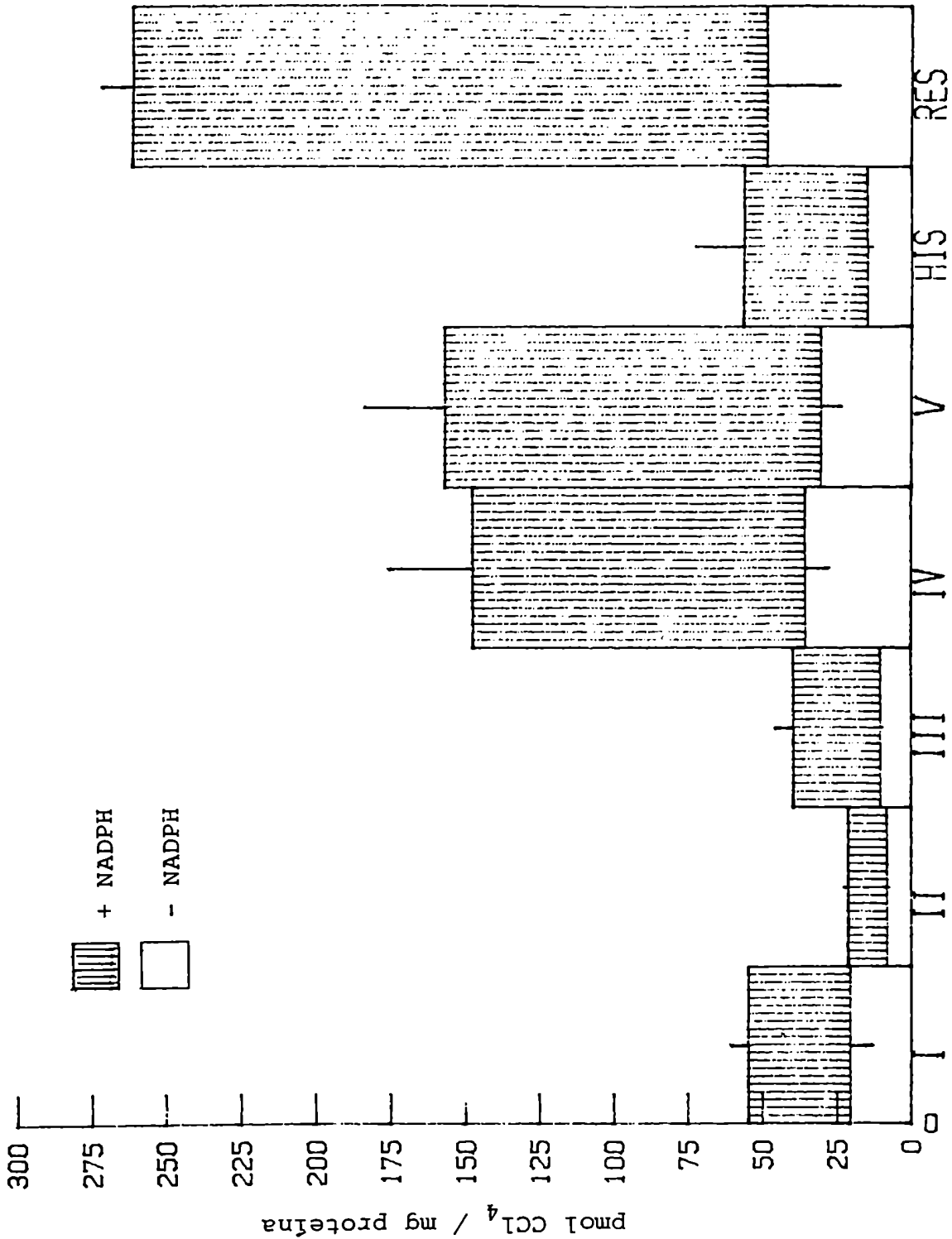


Figura 7. Fracciones de proteínas nucleares de hígado de rata con marca de $^{14}\text{C-Cl}_4$ unida covalentemente. I y II, proteínas nucleares solubles; III, desoxiribonucleoproteínas-1; IV, desoxiribonucleoproteínas-2; V, ribonucleoproteínas ácidas; HIS, histonas y RES, fracción residual (proteínas de la membrana nuclear).

Tabla XII

Comparación entre los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl_4 y los distintos parámetros analizados en las tablas VI a XI.

	Intensidad relativa en las distintas especies ^b

Carcinogenicidad	H > M >> R = 0

UC ADN in vivo	H =

UC PN in vivo	= M >> R

UC ADN in vitro (+NADPH)	H = M = R
UC ADN in vitro (-NADPH)	R > M = H

UC PN in vitro (+NADPH)	H >> M > R
UC PN in vitro (-NADPH)	H > M > R

UC RES (+NADPH)	
UC RES (-NADPH)	
UC HIS (+NADPH)	
UC HIS (-NADPH)	
UC V (+NADPH)	
UC V (-NADPH)	
UC IV (+NADPH)	
UC IV (-NADPH)	
UC III (+NADPH)	
UC III (-NADPH)	
UC II (+NADPH)	
UC II (-NADPH)	
UC I (+NADPH)	
UC I (-NADPH)	

a. UC = unión covalente, PN = proteínas nucleares totales, RES = fracción residual de las proteínas nucleares, HIS = histonas.

b. H = hamster sirio dorado, M = ratón C3H, R = rata Sprague Dawley.

Relación entre los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl₄ y los distintos parámetros analizados:

En la Tabla XII se presenta un resumen de los resultados expuestos en las Tablas VII a XI en relación a los efectos carcinogénicos hepáticos del tetracloruro de carbono en las tres especies.

ESTUDIOS SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS PROMOVIDA POR CCl₄

Biotransformación de CCl₄ a CHCl₃ y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales:

En las tres especies se demostró la capacidad de los núcleos para biotransformar CCl₄ y para desarrollar peroxidación de lípidos (Tabla XIII). El metabolismo a CHCl₃ fue observado en todas las condiciones ensayadas. La presencia de NADPH no produjo un aumento significativo de los valores en ningún caso. Los núcleos de ratón C3H mostraron la máxima capacidad biotransformadora, seguidos por los de hamster y los de rata, siempre con diferencias significativas

Sin NADPH se mantiene ese orden entre especies, también con diferencias significativas. En atmósfera aerobia y en presencia de NADPH no hubo diferencia significativa entre los valores de hamster y ratón pero ambos resultaron significativamente más altos que el de rata. La misma situación se presenta en ausencia de NADPH.

Los núcleos hepáticos de ratón C3H mostraron mayor

Tabla XIII

Biotransformación de CCl₄ a CHCl₃ y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales.

Especie/condición experimental ^a	CHCl ₃ nmol/mg proteína	pentano nmol/mg proteína
hamster sirio dorado		
nitrógeno		
+ NADPH	36 ± 3 ^c	
NADPH	35 ± 3 ^{b,d}	
+ NADPH	35 ± 4 ^f	0,7 ± 0,3 ^j
NADPH	36 ± 3 ^{b,h}	0
ratón C3H		
nitrógeno		
+ NADPH	45 ± 3 ^c	
NADPH	40 ± 3 ^{b,d}	
+ NADPH	38 ± 4 ^{e,f}	1,2 ± 0,5 ⁱ
NADPH	35 ± 4 ^{b,g,h}	0,8 ± 0,3 ^k
rata Sprague Dawley		
nitrógeno		
+ NADPH	29 ± 4	
- NADPH	27 ± 4 ^b	
+ NADPH	29 ± 3	0,5 ± 0,2
NADPH	29 ± 2 ^b	0

a. Las mezclas de incubación contenían núcleos purificados (2,0-2,5 mg de proteína nuclear/ml), sistema generador de NADPH si correspondía y CCl₄ 0,2 mM. Las incubaciones se realizaron a 37 °C durante 1 hora y se procesaron según se describe en la parte experimental. Los resultados son promedios de tres muestras distintas.

Tabla XIII (continuación)

- b. $p > 0,05$ cuando se compara con + NADPH.
- c. $p < 0,05$ cuando se compara con las otras especies.
- d. $p < 0,05$ cuando se compara con las otras especies.
- e. $p > 0,05$ cuando se compara con hamster.
- f. $p < 0,05$ cuando se compara con rata.
- g. $p > 0,05$ cuando se compara con hamster.
- h. $p < 0,05$ cuando se compara con rata.
- i. $p < 0,05$ cuando se compara con las otras especies.
 $p > 0,05$ cuando se compara con rata.
- k. $p > 0,05$ cuando se compara con + NADPH.

actividad peroxidativa (Tabla XIII) que los de las otras dos especies, evaluada como evolución de pentano. Además en ausencia de NADPH una gran parte de esa actividad persiste, al contrario de hamster o rata. Entre estas dos especies no hubo diferencia significativa.

Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de ratón C3H:

Con el propósito de caracterizar la actividad biotransformadora de CCl_4 en los núcleos y su relación con peroxidación de lípidos, se estudió el comportamiento de preparados nucleares de ratón C3H en otras condiciones experimentales (Tabla XIV). Luego de una inactivación enzimática por calentamiento, los núcleos siguen mostrando actividad metabolizadora de CCl_4 . La presencia de NADPH aumenta de modo significativo la producción de CHCl_3 en los dos casos (aerobio y anaerobio). Además la biotransformación en medio anaerobio es más intensa que en aire, ya sea con NADPH o sin él.

Cuando se agrega EDTA a las incubaciones la actividad disminuye significativamente respecto de los valores expuestos en la Tabla XIII, tanto bajo nitrógeno como en aire, con y sin NADPH (Tabla XIV). Por otra parte la presencia de NADPH aumenta significativamente los valores en ambos casos (aire y N_2). Nuevamente la biotransformación a CHCl_3 en medio anaerobio es significativamente más intensa que en aire, con o sin NADPH.

En cuanto a la evolución de pentano (Tabla XIV), los valores para núcleos calentados o en presencia de EDTA son marcadamente más bajos que los correspondientes en la tabla

Tabla XIV

Biotransformación de CCl₄ a CHCl₃ y evolución de pentano en preparados nucleares hepáticos de ratón C3H.

condición experimental ^a	CHCl ₃ nmol/mg proteína	pentano nmol/mg proteína
calentados (100 °C x 5 min)		
nitrógeno		
+ NADPH	32 ± 2 ^c	
NADPH	10 ± 2 ^{b,d}	
aire		
+ NADPH	20 ± 2	0,6 ± 0,2
NADPH	6 ± 1 ^b	0
EDTA (1mM)		
nitrógeno		
+ NADPH	35 ± 3 ^c	
NADPH	18 ± 3 ^{b,d}	
aire		
	12 ± 2	0,3 ± 0,1
	3 ± 1 ^b	0

a. Las mezclas de incubación contenían núcleos purificados (2,0-2,5 mg de proteína nuclear/ml), sistema generador de NADPH si correspondía, EDTA sal disódica 1 mM si correspondía y CCl₄ 0,2 mM. Los núcleos inactivados por calentamiento se obtuvieron calentando una suspensión nuclear a 100 °C por 5 min. Luego de incubar una hora a 37 °C, las muestras se procesaron según se describe en la parte experimental. Cada resultado es promedio de tres muestras independientes.

b. $p < 0,05$ cuando se compara con +NADPH.

c. $p < 0,05$ cuando se compara con aire.

d. $p < 0,05$ cuando se compara con aire.

anterior. En ausencia de NADPH no fue posible medir la formación del hidrocarburo.

Biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 y evolución de pentano en cortes de hígado de diferentes especies animales:

Los cortes de hígado de las tres especies fueron capaces de biotransformar CCl_4 a CHCl_3 , en medios aerobio y anaerobio (Tabla XV).

En nitrógeno el preparado de hamster presentó la máxima actividad, seguido por el de ratón y el de rata (todas diferencias significativas). Bajo atmósfera aerobia, el valor para hamster fue mayor que el de rata pero no difirió significativamente del de ratón. Entre ratón y rata tampoco hubo una diferencia significativa.

Para cada especie, la actividad biotransformadora a CHCl_3 no difirió significativamente entre aire y nitrógeno.

La evolución de pentano fue mayor en ratón C3H que en cualquiera de las otras dos especies. No hubo diferencia significativa entre hamster y rata (Tabla XV).

Tabla XV

Biotransformación de CCl₄ a CHCl₃ y evolución de pentano en cortes delgados de hígado de diferentes especies animales.

especie/condición experimental ^a	CHCl ₃ 10 ⁻⁷ mol/g hígado	pentano 10 ⁻⁷ mol/g hígado
hamster sirio dorado		
nitrógeno	1,79 ± 0,12 ^{b,e}	
aire	1,33 ± 0,37 ^d	1,16 ± 0,21 ^g
ratón C3H		
nitrógeno	1,10 ± 0,08 ^{b,e}	
aire	1,05 ± 0,10 ^c	2,32 ± 0,36 ^f
rata Sprague Dawley		
nitrógeno	0,90 ± 0,05 ^e	
aire	0,92 ± 0,05	1,08 ± 0,28

a. Las mezclas de incubación contenían cortes delgados de hígado (65 - 70 mg hígado/ml) y CCl₄ 0,2 mM. Las incubaciones se realizaron a 37 °C durante 2 horas y se procesaron según se describe en la parte experimental. Los resultados son promedios de tres muestras distintas.

b. p < 0,05 cuando se compara con las otras especies.

c. p > 0,05 cuando se compara con hamster o rata.

d. p < 0,05 cuando se compara con rata.

e. p > 0,05 cuando se compara con aire.

f. p < 0,05 cuando se compara con hamster o rata.

g. p > 0,05 cuando se compara con rata.

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON BASES DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO**

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con bases del ADN:

En las figuras 8 a 11 se presentan los resultados obtenidos en estos estudios. Para cada una de las bases se obtuvieron cromatogramas diferentes al pasar de un modo a otro de detección. En el caso de adenina la detección por FID evidenció la formación de al menos tres productos principales que además tienen respuesta hacia CE (Figura 8). Otros productos menores aparecen en el cromatograma.

La guanina resultó ser más reactiva, mostrando (FID) cinco picos importantes. La detección por CE reveló que tres de ellos contenían cloro y evidenció otro más que la detección por FID no mostró (Figura 9).

Por FID se encontraron para citosina seis picos más importantes y otros cuatro más pequeños (Figura 10). Se hace notar que la derivatización con BSTFA conduce a la formación de dos derivados de la base, el disililado y el trisililado, por lo que probablemente algún producto se encuentre también en dos formas derivatizadas.

La timina presentó un comportamiento similar a las otras tres bases en cuanto a que dió picos con y sin respuesta en CE (Figura 11). En todos estos cromatogramas no se hallan picos que también hubiesen aparecido en los correspondientes controles (sin la base o sin CCl_4 o sin el iniciador).

En los cuatro casos se intentó realizar la identificación estructural de los productos formados (CGL/EM) No se han obtenido aún resultados positivos. Las fragmentaciones generadas por los derivados trimetilsililados

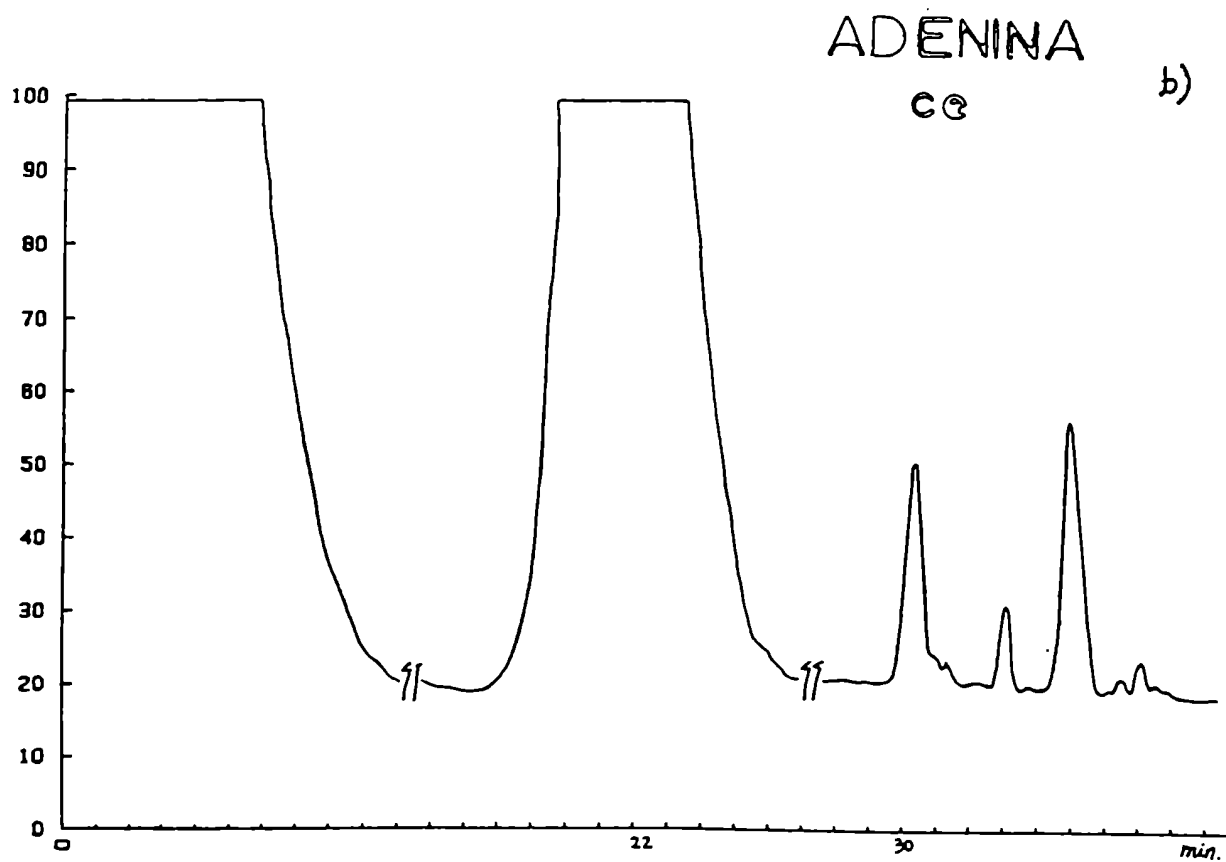
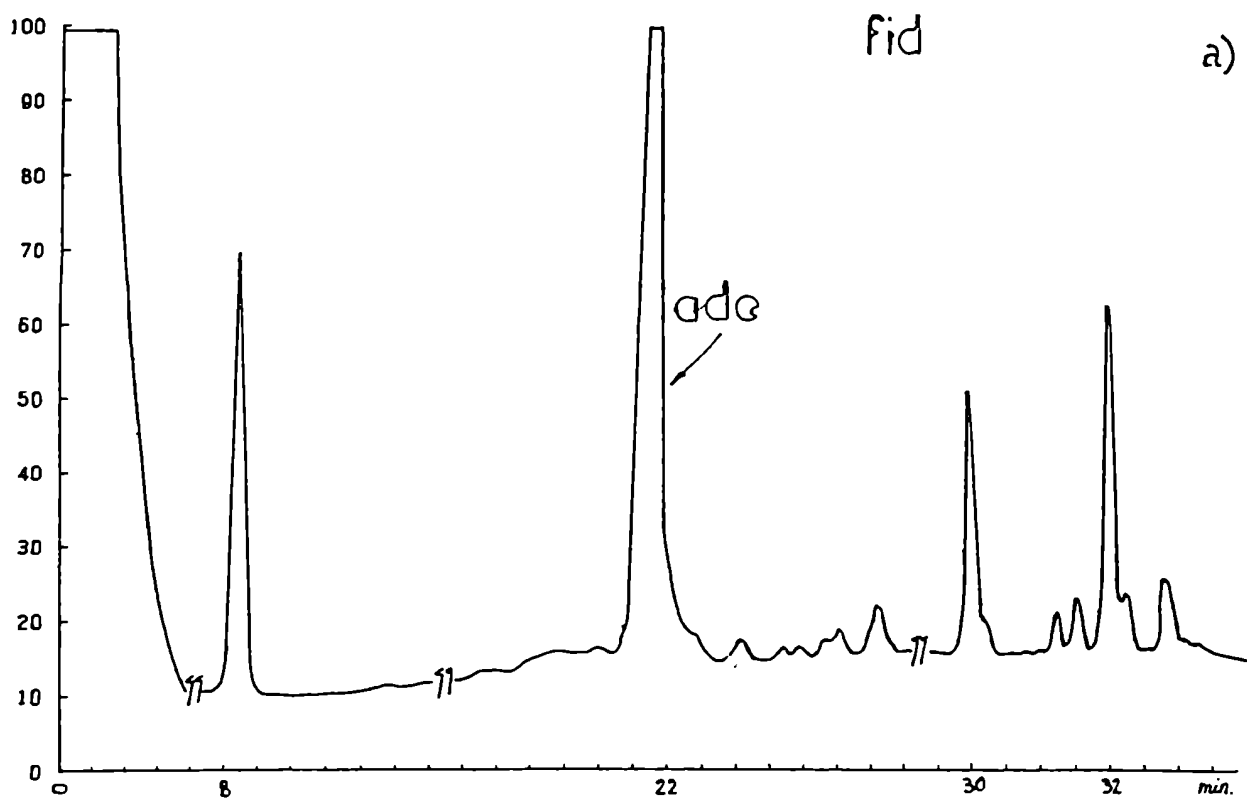


Figura 8. Interacción de radicales libres triclorometilo con adenina. a) detección por FID. b) detección por CE.

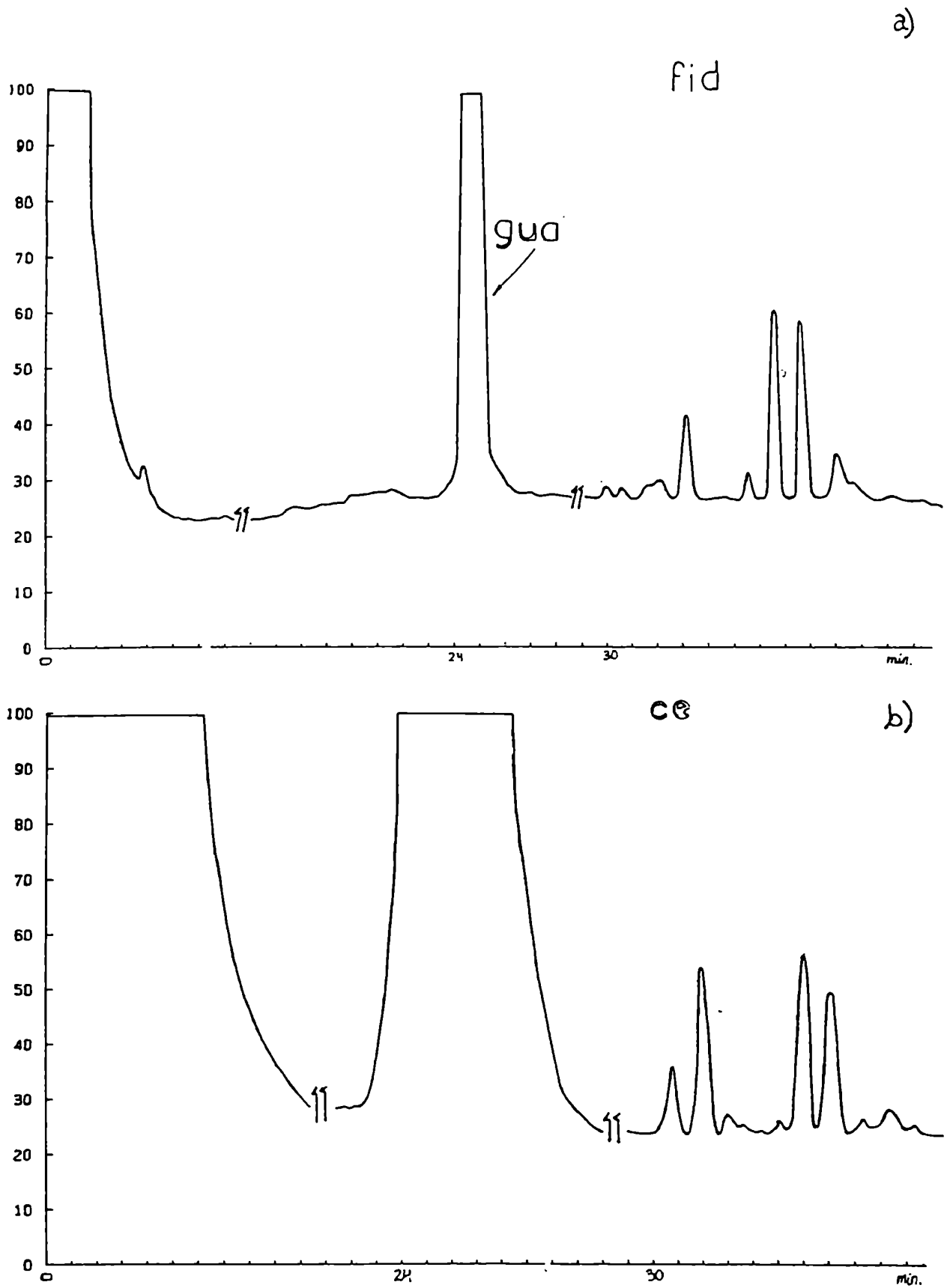
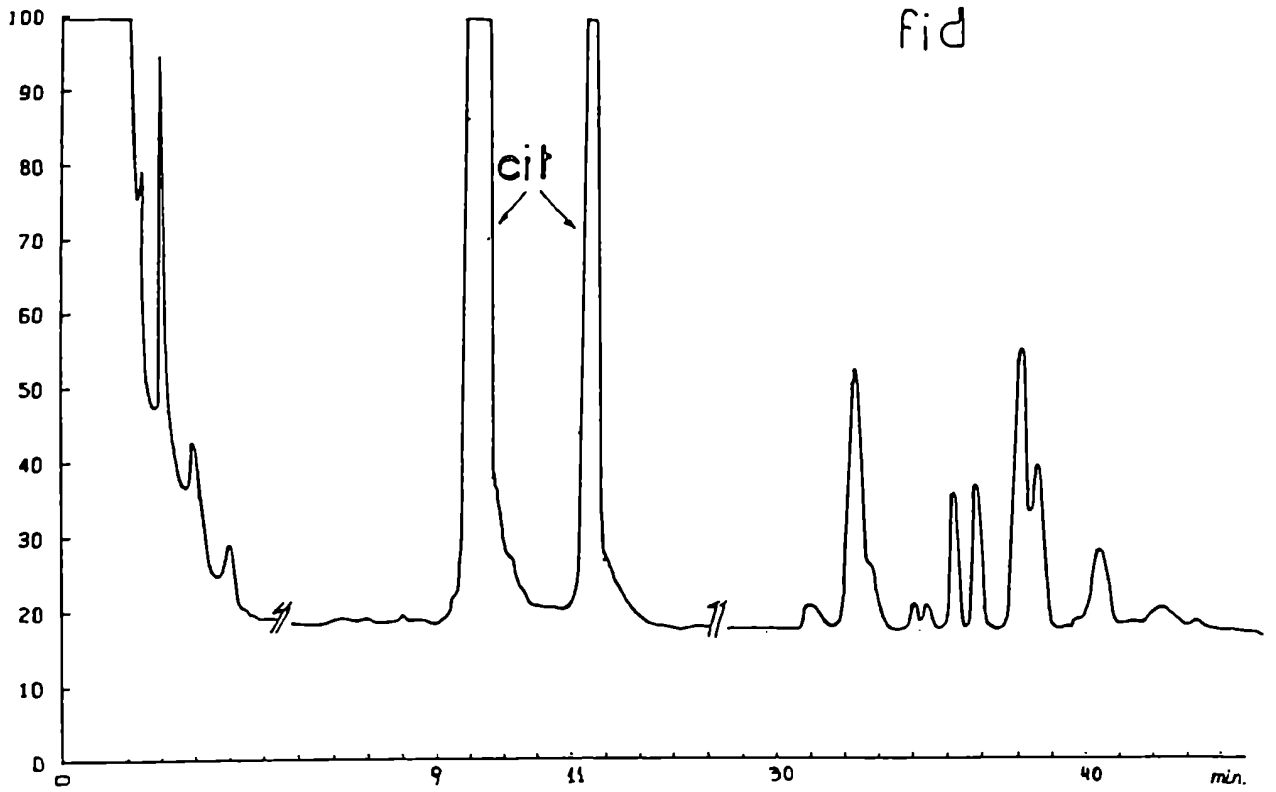


Figura 9. Interacción de radicales libres triclorometilo con guanina. a) detección por FID. b) detección por CE.

a)



b)

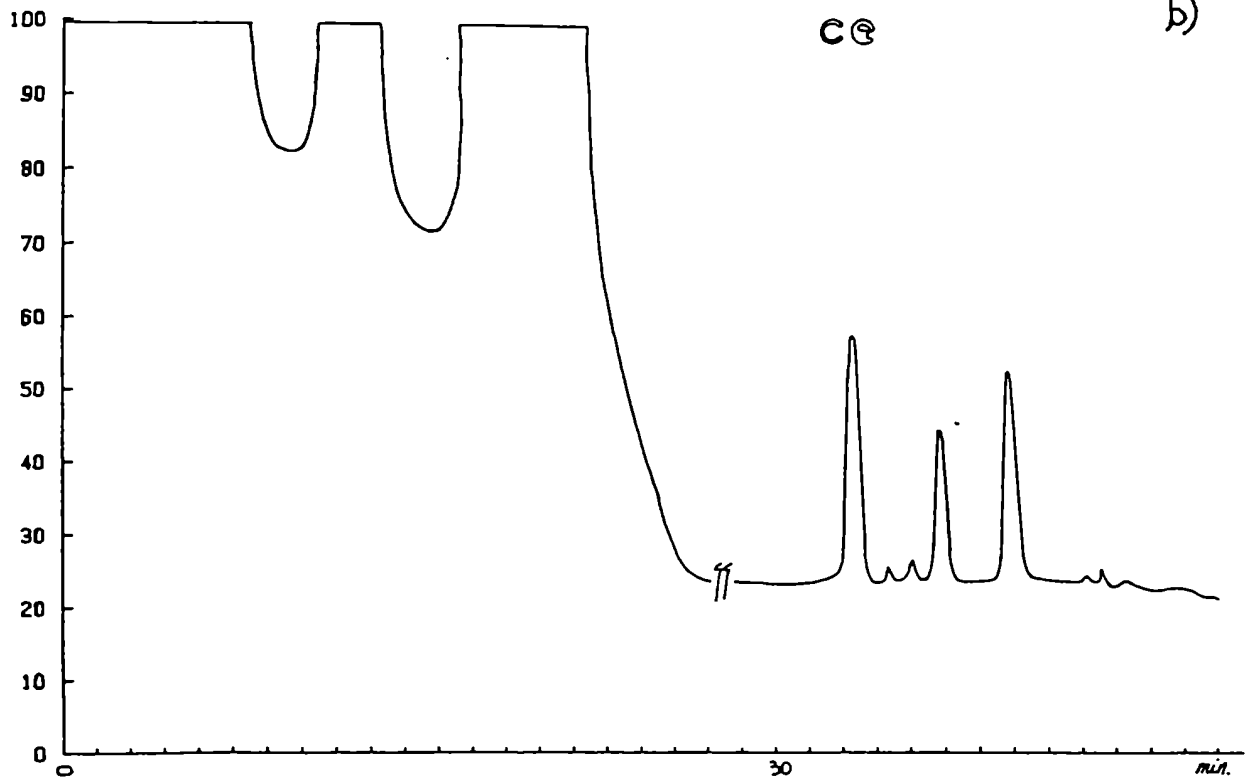


Figura 10. Interacción de radicales libres triclorometilo con citosina. a) detección por FID. b) detección por CE.

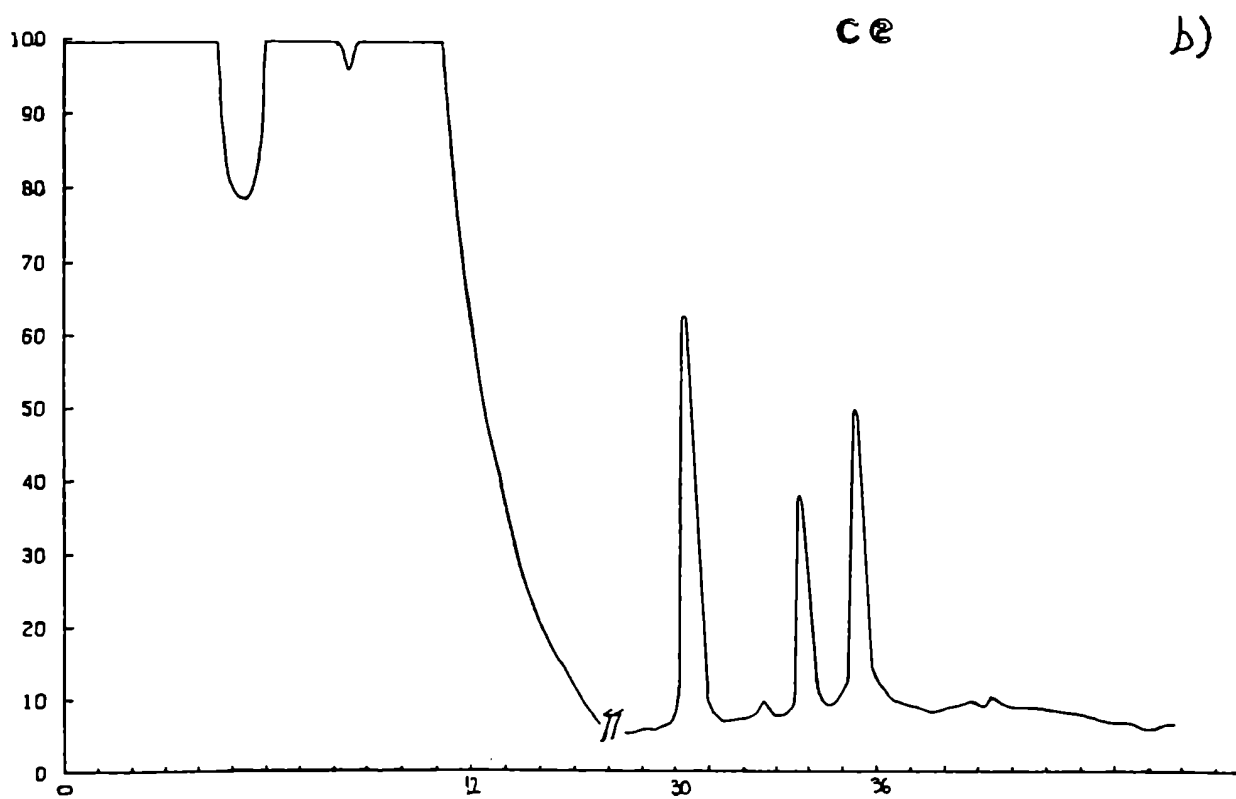
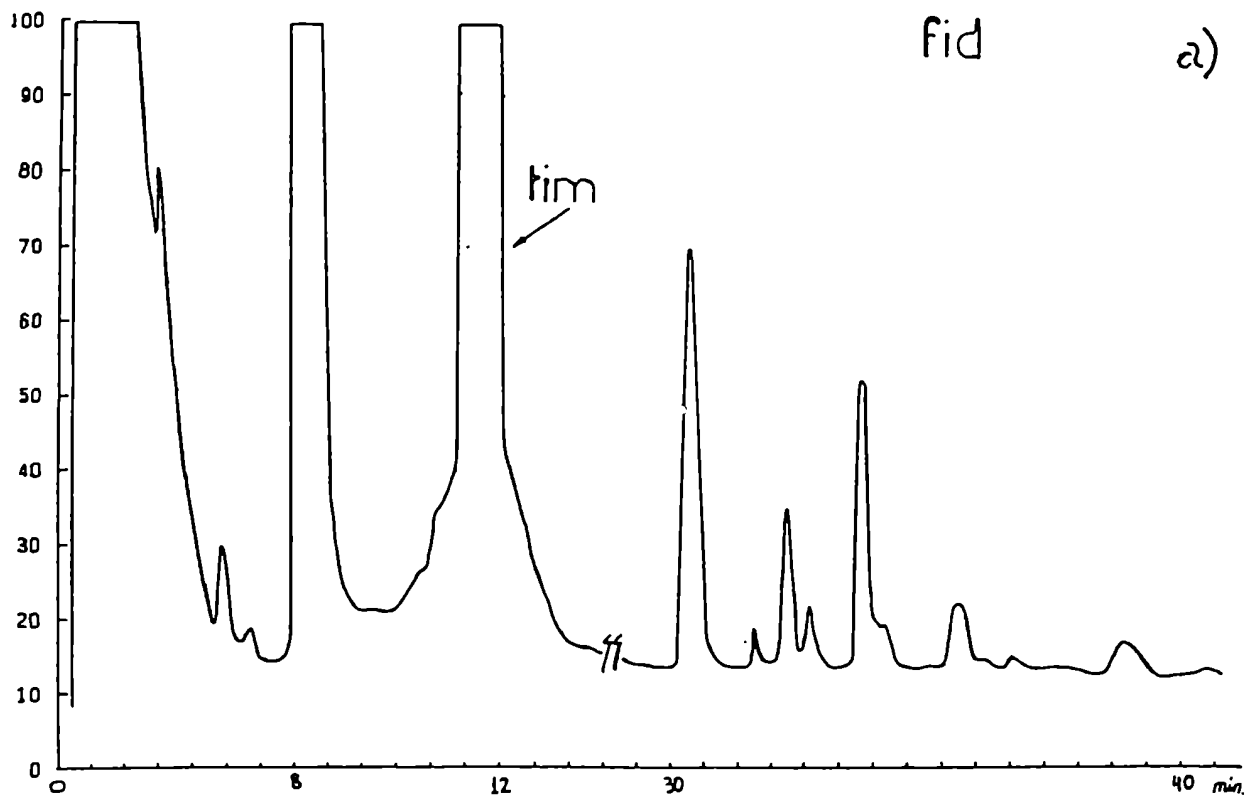


Figura 11. Interacción de radicales libres triclorometilo con timina. a) detección por FID. b) detección por CE.

son escasas (en muchos de los casos limitadas a M^+ , $M-15$ y los iones de la sililación). Por otra parte, los valores de los supuestos iones moleculares no coinciden con estructuras probables que pudieran plantearse. Las alternativas para solucionar este problema podrían pasar por preparar mayor cantidad de los productos de reacción para intentar algún otro tipo de información espectroscópica (ej. resonancia magnética nuclear, HPLC/EM). Otra posibilidad que se está probando es la de preparar nuevos derivados (metilados o pentafluorbencilados) que produzcan espectros con más información.

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON AMINOACIDOS

Sistema modelo de generación de radicales libres triclorometilo. Reacción con aminoácidos:

Fue estudiada la reacción con los aminoácidos arginina, aspártico, cisteína, cistina, glutámico, glicina, histidina, leucina, lisina, metionina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina y valina. Los resultados obtenidos pueden agruparse como sigue:

a) Los aminoácidos arginina, aspártico, glutámico, glicina, leucina, lisina, norleucina y valina no mostraron reaccionar de modo apreciable, en las condiciones experimentales utilizadas (análisis por CGL del residuo seco de la mezcla de reacción derivatizado, con detección por ionización de llama o por captura de electrones).

b) En el caso de los aminoácidos cisteína y cistina, el análisis por CGL/FID o CE de los residuos de evaporación derivatizados no rindieron ningún pico (descontando el del propio aminoácido remanente), a pesar de las variadas condiciones cromatográficas ensayadas (diferentes programas de temperatura en tres columnas de distinto rango de polaridad). Sin embargo, las muestras en ambos casos eran aceites, evidenciando que algún tipo de reacción había ocurrido (diferenciando claramente de los controles respectivos). Se ensayó la derivatización con BSTFA o la acilación con anhídrido trifluoroacético.

Se supuso entonces que los productos de degradación de estos aminoácidos no eran derivatizables por esos modos o que aún derivatizados eran muy retenidos en los sistemas cromatográficos. No se continuaron los estudios con estas interacciones.

c) Los aminoácidos metionina y fenilalanina se tratan en particular más adelante ya que en ambos casos fue posible evidenciar interacciones en situaciones biológicas "in vitro".

d) Los aminoácidos histidina, prolina, serina, treonina, triptofano y tirosina mostraron reaccionar con variado grado de intensidad. En la Tabla XVI se muestra un resumen del comportamiento de cada aminoácido según los distintos tipos de detección utilizados para analizar el efluente cromatográfico. En los casos de triptofano, tirosina y fenilalanina, a pesar de haberse obtenido respuesta negativa con detección por FID y CE, se intentó la detección por EM (corriente iónica total) porque consideramos que quizás algunos productos de interacción probables podían ser mejor eluidos. La detección por FID y CE implicaba el uso de columnas empacadas, en cambio la detección por EM utiliza columnas capilares.

Tabla XVI

Interacción de radicales libres triclorometilo con aminoácidos.

aminoácido	Número de picos detectados en ^a		
	FID	CE	EM
arginina	NV	NV	NT
ác. aspártico	NV	NV	NT
cisteína	NV	NV	NT
cistina	NV	NV	NT
glicina	NV	NV	NT
ác. glutámico	NV	NV	NT
leucina	NV	NV	NT
lisina	NV	NV	NT
valina	NV	NV	NT
metionina	no ^b	no ^b	2
fenilalanina	no ^b	no ^b	4
histidina	3	no	en análisis
prolina	3	no	en análisis
serina	3	4	en análisis
treonina	2	4	en análisis
triptofano	no ^b	no ^b	en análisis
tirosina	no ^b	no ^b	1

a. Varios de los aminoácidos ensayados no dieron derivados volátiles pero estudios previos indicaron reacción positiva por cromatografía en capa delgada (unión covalente de ¹⁴C) (79).

NV: no volátiles, NT: no ensayado

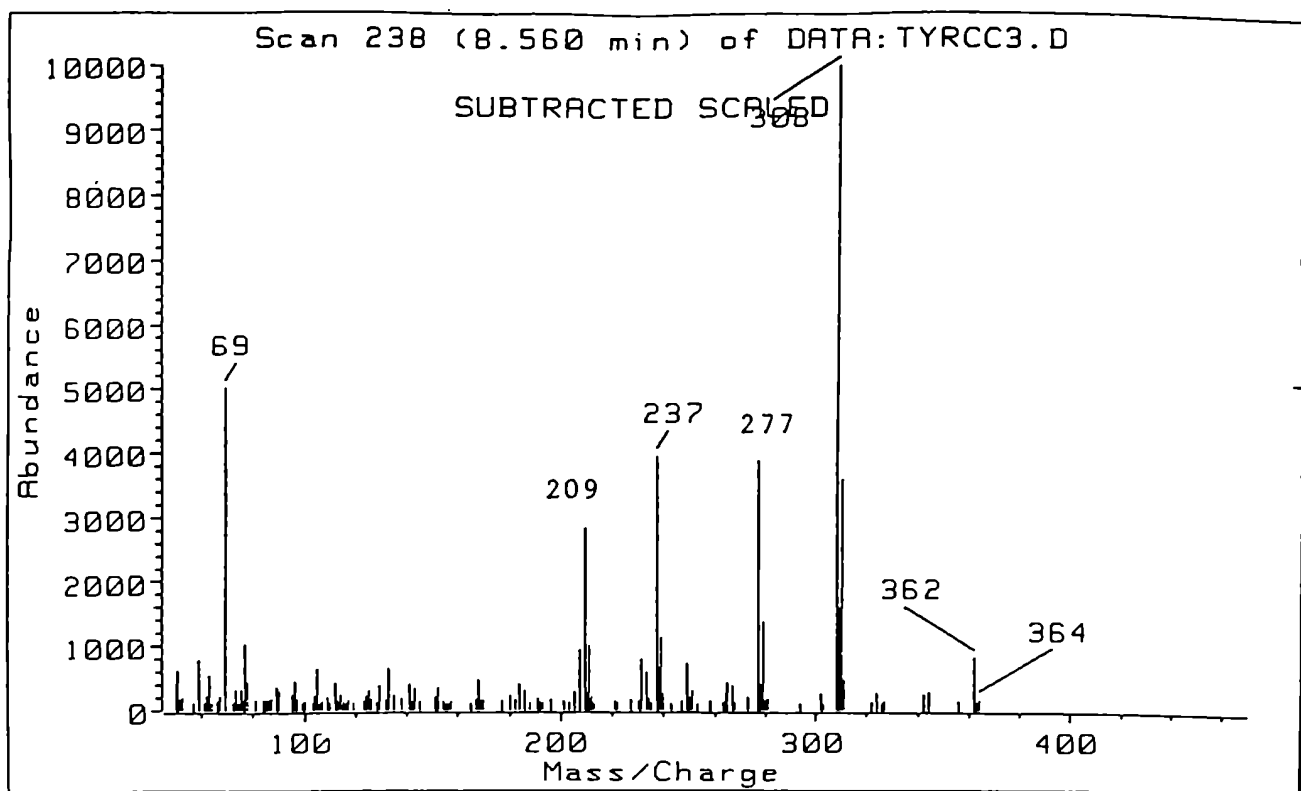
b. No volátiles, en las condiciones cromatográficas empleadas (columnas empacadas). Sin embargo, en un sistema capilar pudieron detectarse productos de interacción.

Para tirosina se identificó al producto principal de interacción (en el sistema de generación con peróxido de benzoílo como iniciador) como un derivado monoclorado en el anillo aromático. No se observó ningún aducto con incorporación de la unidad triclorometilo. El espectro de masas del aducto monoclorado se presenta en la Figura 12. El esquema de fragmentación es el siguiente: M^+ = m/z 421/423, m/z 362/364 (pérdida de $\cdot\text{COOMe}$), m/z 308/310 (pérdida de trifluoracetamida), m/z 277/279 (perdida de $\cdot\text{OMe}$ desde 308/310), m/z 237/239 (cadena lateral), m/z 209/211 (pérdida de CO desde 237/239).

Otros productos menores todavía no han sido identificados.

Contenido de aminoácidos en proteínas microsomales hepáticas de animales intoxicados con CCl_4 :

El análisis por cromatografía en columna de hidrolizados de proteínas microsomales de hígado de ratas controles e intoxicadas con CCl_4 (6 horas de intoxicación) no reveló diferencia significativa en el contenido de cada aminoácido (Tabla XVII).



Posible esquema de fragmentación

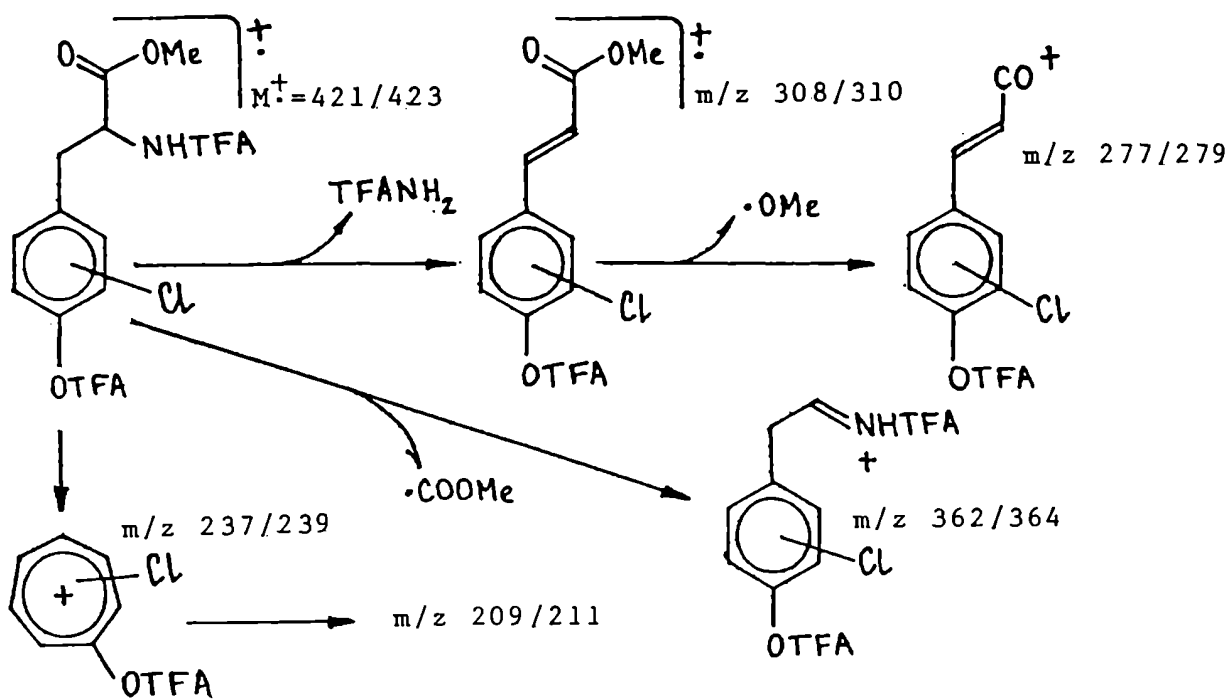


Figura 12. Espectro de masas del aducto de tirosina.

Tabla XVII

Contenido de aminoácidos en proteínas microsomales hepáticas de ratas intoxicadas con CCl₄.

aminoácido ^a	control (nmol/mg prot.) ^b	CCl ₄ (nmol/mg prot.)
ác. glutámico	706,42 ± 134,67	750,47 ± 34,02
serina	351,20 ± 66,36	341,97 ± 35,90
glicina	406,79 ± 86,48	419,15 ± 22,91
prolina	309,38 ± 65,84	305,51 ± 27,54
alanina	489,54 ± 130,96	524,32 ± 26,36
valina	442,09 ± 82,02	449,88 ± 56,40
metionina	440,93 ± 20,53	434,13 ± 31,57
isoleucina	333,61 ± 90,31	332,17 ± 18,23
leucina	650,47 ± 147,50	607,56 ± 56,83
tirosina	190,96 ± 42,15	188,38 ± 35,02
fenilalanina	795,42 ± 31,76	786,70 ± 10,25
histidina	135,55 ± 26,94	134,13 ± 22,93
lisina	459,45 ± 92,99	499,19 ± 36,98
arginina	312,22 ± 72,12	314,47 ± 17,81
cisteína	82,50 ± 16,11	90,23 ± 12,21
treonina	387,17 ± 70,05	379,84 ± 13,01
ác. aspártico	690,58 ± 150,66	707,80 ± 36,24

a. La composición en cada aminoácido fue determinada en un analizador automático de aminoácidos. No se determinaron triptofano y metionina.

b. En todos los casos no se observó diferencia significativa entre los valores controles y los correspondientes intoxicados con CCl₄ (p > 0,05).

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON METIONINA

Sistema modelo de generación de radicales libres
triclorometilo. Reacción con metionina:

El análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas (detección por corriente iónica total) de la capa gaseosa sobre la mezcla de reacción evidenció la presencia de cinco picos (Figura 13). Los picos 1 y 4 correspondieron a etanol y CCl_4 , presentes en la mezcla de reacción. El pico 2 resultó ser cloruro de etilo, el cual probablemente provenga de la reacción de radicales etilo con CCl_4 (también se forma en el blanco de reacción sin aminoácido). El pico 3 fue identificado como CHCl_3 , que resultaría de la abstracción de hidrógeno del medio por parte de $\cdot\text{CCl}_3$. El pico 5 correspondió a dimetil disulfuro (2,3-ditiabutano), sugiriendo la formación intermedia de radicales libres $\cdot\text{SCH}_3$.

El mismo cromatograma se obtuvo cuando se ensayó metionina ester etílico en lugar de metionina.

El residuo de evaporación de la mezcla de reacción resultó ser un aceite no cristalizabile. La posterior derivatización con BSTFA o con anhídrido trifluoracético no rindió ningún pico (descontando el del propio aminoácido remanente), en el análisis por CGL/EM en las diversas condiciones cromatográficas ensayadas. Esto hace suponer que los productos de degradación del aminoácido no son derivatizables por esos modos o son retenidos por la columna.

Los controles efectuados en ausencia de CCl_4 o del peróxido rindieron residuos de evaporación sólidos que sólo evidenciaron la presencia del aminoácido en el análisis por CGL/EM.

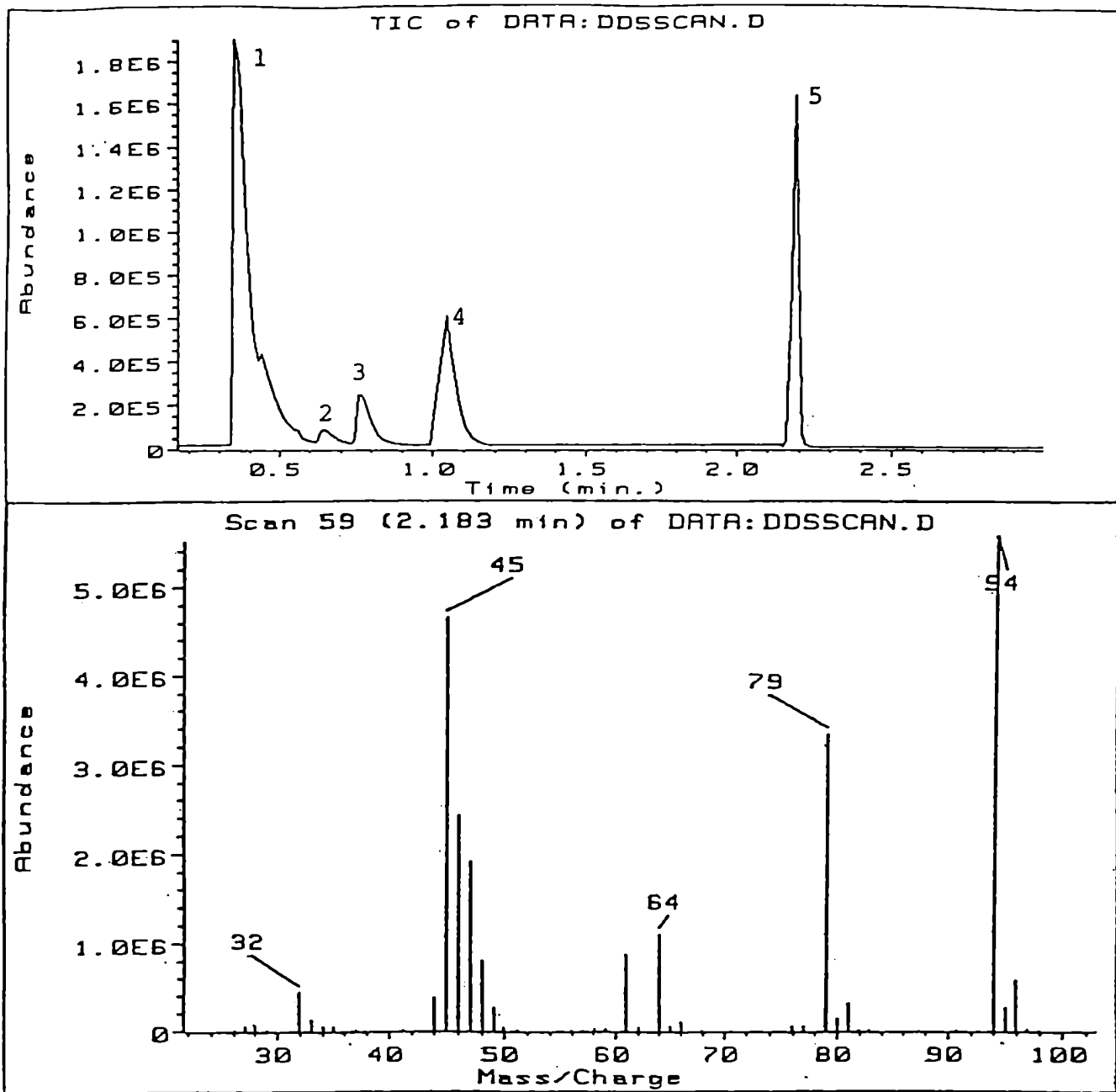


Figura 13. Reacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina.
 a. Cromatograma obtenido por detección de corriente iónica total (CGL/EM/TIC), desde una alícuota del espacio cabeza de la mezcla de reacción entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ y metionina (o metionina ester etílico). Pico 1, etanol; pico 2, cloroetano; pico 3, CHCl_3 ; pico 4, CCl_4 y pico 5, dimetil disulfuro.
 b. Espectro de masas del pico 5 (dimetildisulfuro). La abundancia está expresada como señal de corriente iónica total ($\text{M}^+ = m/z$ 94, m/z 79 (CH_3S_2^+), m/z 64 (S_2^+), m/z 61 ($\text{CH}_2\text{S}^+\text{CH}_3$), m/z 48 (CH_3SH^+), m/z 47 (CH_2SH^+), m/z 46 (CH_2S^+), m/z 45 (CHS^+)).

El análisis por CGL con detección de captura de electrones de la mezcla de reacción sililada tampoco mostró la aparición de alguna señal que sugiriera la formación de aductos con incorporación de cloro sobre el aminoácido.

Activación microsomal de CCl₄. Interacción de radicales libres ·CCl₃ con metionina:

En presencia de NADPH y CCl₄ se observó la formación de cloroformo. Sin NADPH la cantidad de CHCl₃ fue mucho menor. No pudo observarse la formación de dimetildisulfuro en las condiciones experimentales de incubación. Sin embargo cuando se utilizó metionina ester etílico se lo detectó, observándose además metanotiol. Ninguno de los dos apareció en ausencia de NADPH, de CCl₄ o del aminoácido (Figura 14).

Biotransformación de dimetildisulfuro por microsomas hepáticos:

El análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (en el modo de detección por monitoreo selectivo de iones, SIM), demostró que los microsomas hepáticos son capaces de degradar dimetildisulfuro. Los productos de biotransformación detectados fueron metanotiol y ácido sulfhídrico.

Parte de la degradación anaeróbica fue sensible al calor pero una fracción considerable no lo era. Ambas vías de biotransformación resultaron ser parcialmente dependientes de NADPH (Tabla XVIII).

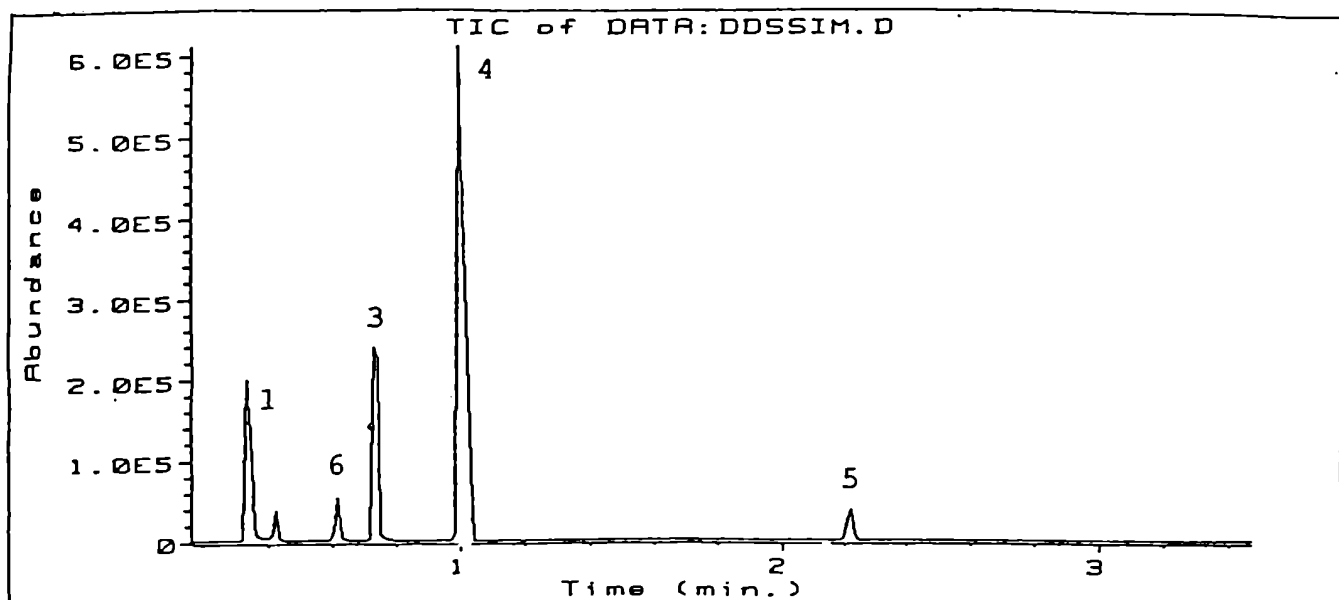


Figura 14. Activación microsomal de CCl_4 . Interacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina. Cromatograma obtenido por detección con monitoreo selectivo de iones (CGL/EM/SIM), desde una alícuota del espacio cabeza de la mezcla de incubación microsomal de CCl_4 y metionina ester etílico. La numeración de los picos corresponde a la definida en la Figura 13: pico 6, metanotiol. La abundancia es expresada como señal debida a la corriente generada por el total de los iones monitoreados.

Tabla XVIII

Degradación de dimetildisulfuro.

condición experimental ^a	DDS degradado x 10 ⁻⁸ mol/mg proteína
nitrógeno	
+ NADPH	7,1 ± 0,2
NADPH	6,3 ± 0,4 ^b
microsomas calentados + NADPH	5,0 ± 0,3 ^{b,c}
microsomas calentados NADPH	3,4 ± 0,3 ^{b,c,d}
aire	
+ NADPH	9,0 ± 0,3
NADPH	7,3 ± 0,5 ^b
microsomas calentados + NADPH	8,2 ± 0,4 ^{b,c}
microsomas calentados NADPH	5,6 ± 0,8 ^{b,c,d}

a. Las incubaciones contenían microsomas hepáticos de ratas preinducidas con fenobarbital sódico (10,5-11,0 mg proteína/ml), sistema generador de NADPH si correspondía y 5 ul de una solución alcohólica de dimetil disulfuro, de modo de lograr una concentración final de 1 mM. Los microsomas inactivados por calentamiento se obtuvieron calentando una suspensión microsomal a 100 °C por 5 min. Luego de incubar a 37 °C por una hora las muestras se procesaron según se describe en la parte experimental.

b. p < 0,05 cuando se compara con NADPH.

c. p < 0,05 cuando se compara con el correspondiente "no calentado".

d. p < 0,05 cuando se compara con microsomas calentados + NADPH.

La degradación aeróbica de dimetildisulfuro fue cuantitativamente más importante que la que ocurrió en atmósfera de nitrógeno. La presencia de NADPH fue capaz de estimular ambas vías metabólicas, la sensible y la resistente al calor.

La mayor parte de la degradación aeróbica de dimetildisulfuro por los microsomas hepáticos no resultó afectada por calentamiento (Tabla XVIII).

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON FENILALANINA

Sistema modelo de generación de radicales libres
triclorometilo. Reacción con fenilalanina:

El análisis por CGL/EM de los productos provenientes de la interacción de $\cdot\text{CCl}_3$ con N-acetil fenilalanina ester metílico reveló la formación de al menos tres compuestos (Figura 15).

Uno de los productos fue identificado como clorobenceno. Otro resultó ser un aducto monoclorado sobre el anillo aromático del aminoácido. Los picos 14 y 16 (Figura 15) correspondieron a los dos isómeros detectados pero no fue posible establecer la posición de la sustitución debido a la similitud entre ambos espectros. El esquema de fragmentación guarda parecido con el del propio aminoácido: $M^+ = m/z$ 255/257; m/z 196/198 (pérdida de $\cdot\text{COOMe}$ desde M^+); m/z 154/156 (pérdida de cetena desde 196/198); m/z 118 (pérdida de HCl desde 154/156); m/z 130 (pérdida de $\text{ClC}_6\text{H}_5\text{CH}_2\cdot$); m/z 125/127 (clorotropilio) y m/z 88 (pérdida de cetena desde 130) (Figura 16).

El tercer producto de reacción identificado fue de naturaleza más insaturada, un derivado del aminoácido del tipo N-acetil imina. Las razones que nos llevaron a asignar esta estructura antes que la de la enamina correspondiente fueron fundamentalmente dos: a) creemos que en las condiciones de reacción (temperatura y tiempo) el equilibrio entre ambas formas favorecería a la imina respecto a la enamina y b) si bien suponemos que los espectros de ambas formas seguramente deben ser bastante similares, la baja

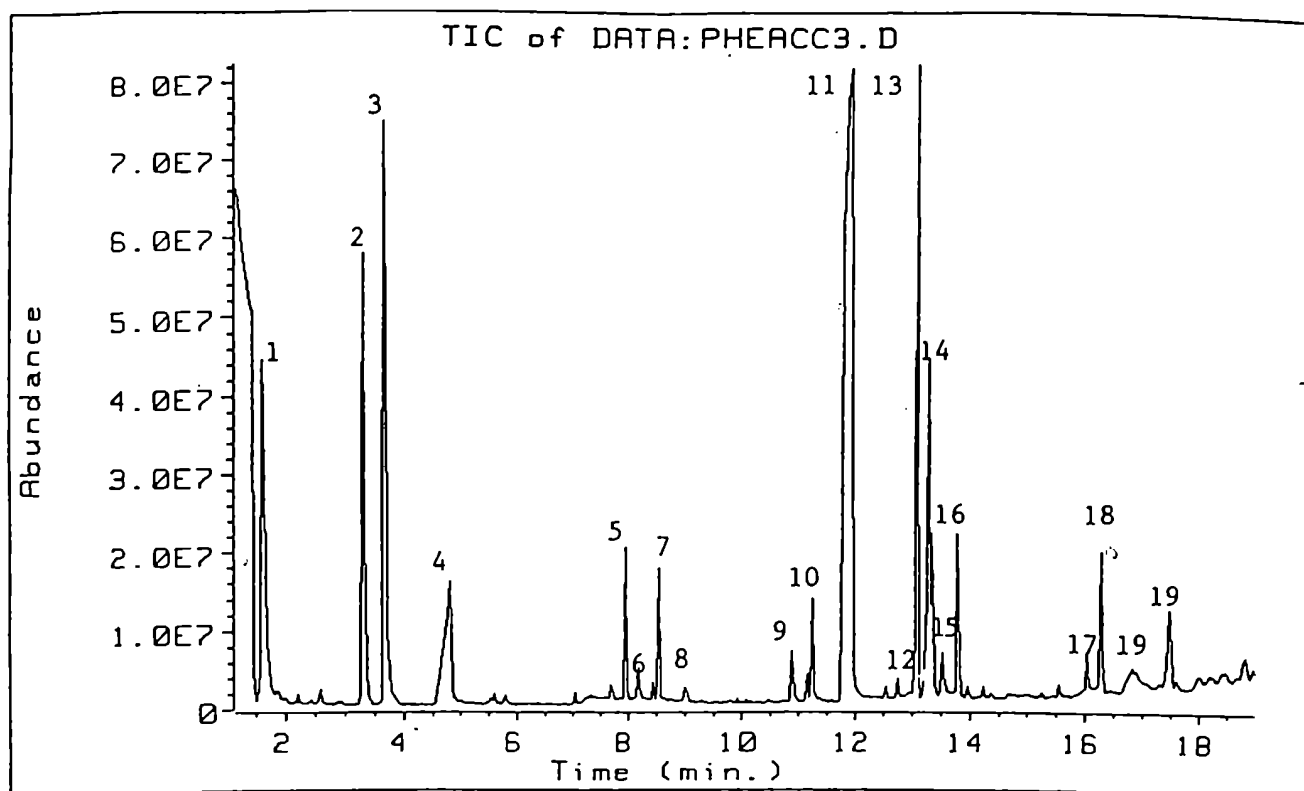
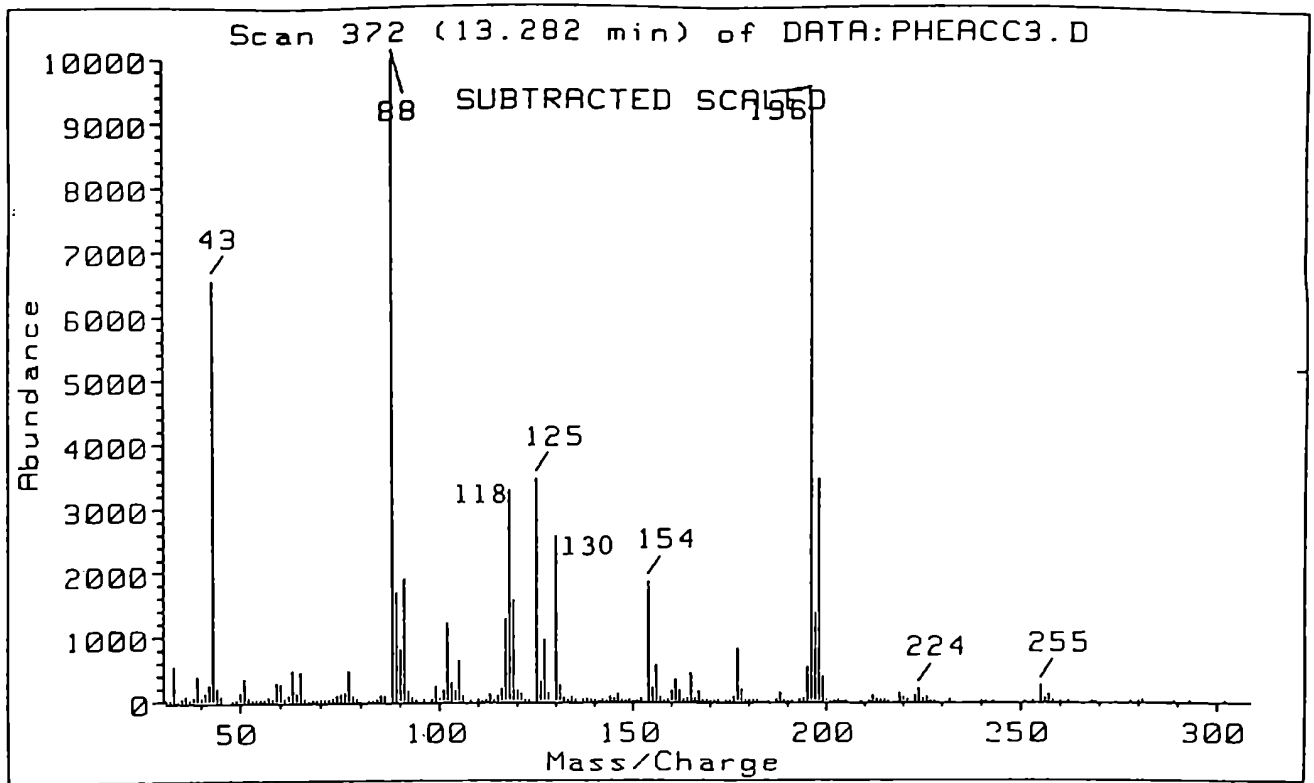


Figura 15. Interacción de radicales libres triclorometilo con fenilalanina.

Cromatograma obtenido por detección de corriente iónica total (CGL/EM/TIC), desde una alícuota de la mezcla de reacción entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ y N-acetil fenilalanina ester metílico. Pico 1, clorobenceno; picos 2, 3, 5-9, 13 y 17, hidrocarburos policlorados; pico 4, ác. benzoico (de peróxido de benzoílo); pico 10, benzoato de fenilo (pérdida de CO_2 desde el peróxido); pico 11, N-acetil fenilalanina ester metílico; picos 12 y 15, derivado tipo imina del aminoácido (dos isómeros); picos 14 y 16, aducto monoclorado del aminoácido (dos isómeros); picos 18 y 19, contaminantes (siliconas y ftalatos). La abundancia se expresa como la señal debida a la corriente iónica total.



Posible esquema de fragmentación:

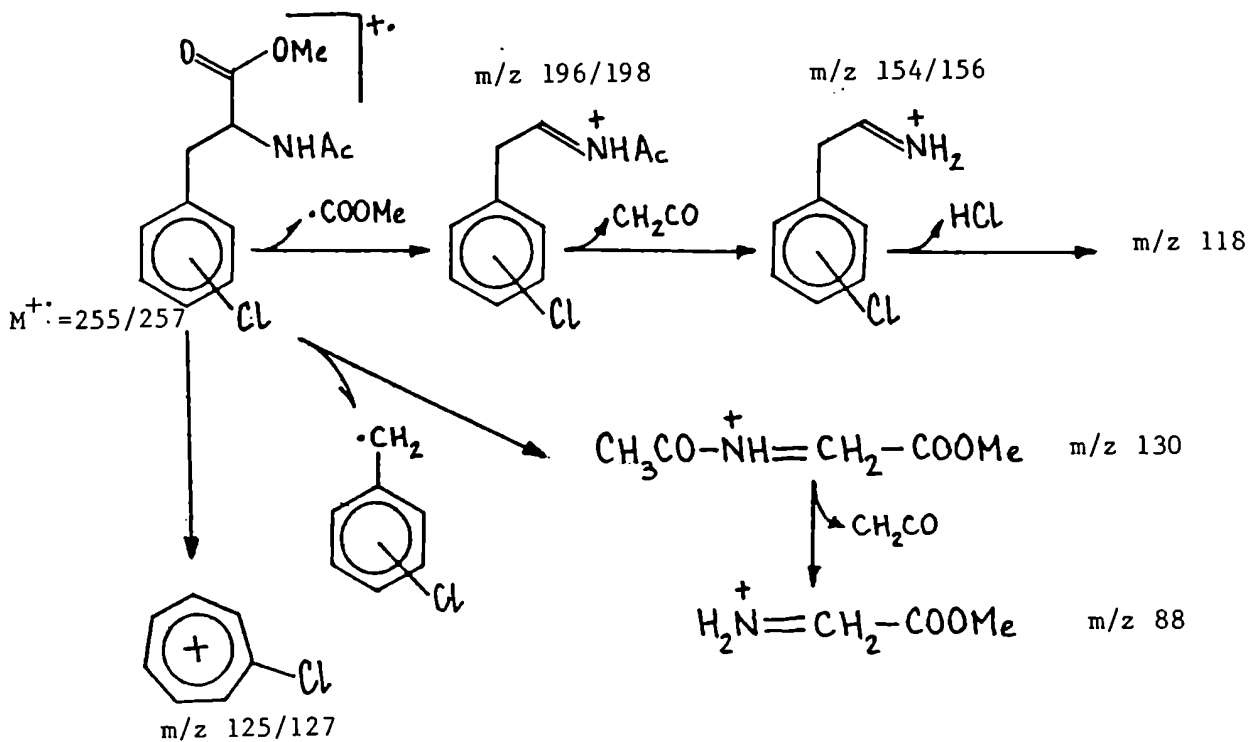


Figura 16. Espectro de masas del pico 14.

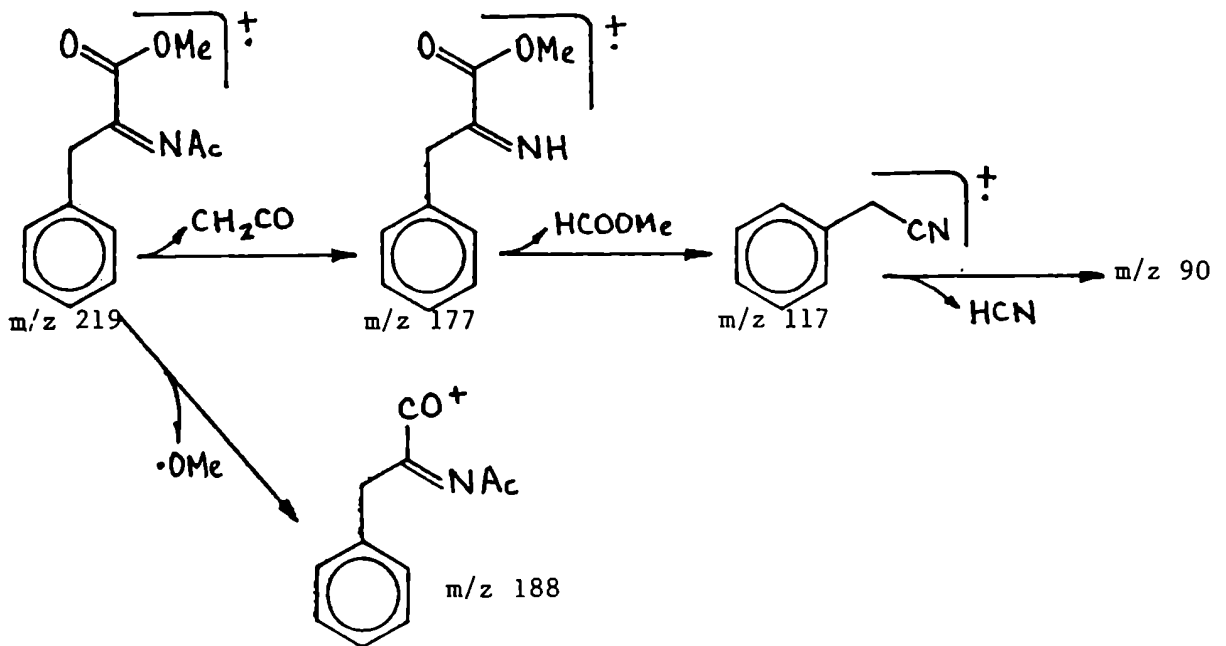
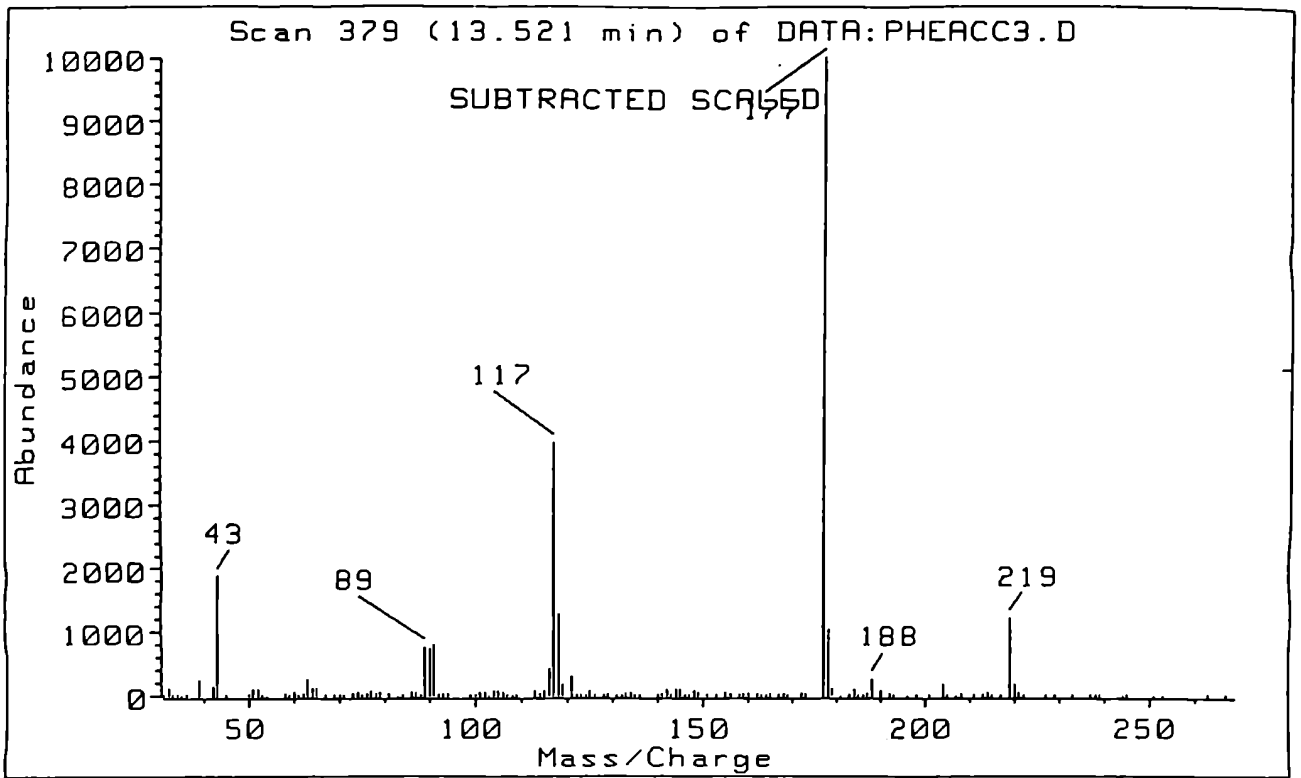


Figura 17. Espectro de masas del pico 15.

abundancia relativa de m/z 43 (respecto por ejemplo del aminoácido o del derivado monoclorado) es más probable para la forma imina.

Los picos 12 y 15 (Figura 15) correspondieron a los dos isómeros posibles (syn y anti) pero no se pudo establecer la configuración de cada uno debido a la gran similitud entre ambos espectros. Los iones principales fueron $M^+ = m/z$ 219; m/z 188 (pérdida de $\cdot OMe$ desde M^+); m/z 177 (pérdida de cetena desde M^+) y m/z 117 (pérdida de $HCOOMe$ desde 177) (Figura 17).

Activación microsomal de CCl_4 . Interacción de radicales $\cdot CCl_3$ con fenilalanina:

Cuando los radicales $\cdot CCl_3$ (generados por biotransformación de CCl_4) interaccionaron con fenilalanina ester metílico no se observó la presencia de ninguno de los tres productos encontrados para la situación de generación "química" de $\cdot CCl_3$. En cambio se pudo identificar benceno en la atmósfera (espacio cabeza) de los frascos de incubación. En ausencia de NADPH no se observó benceno. El aminoácido libre (no esterificado o acetilado) no condujo a la formación de benceno en condiciones similares de incubación.

DISCUSSION

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A MACROMOLECULAS CELULARES

En concordancia con resultados previos nuestros y de otros laboratorios (80,135), los estudios realizados aquí reportaron la existencia de unión covalente (UC) de metabolitos reactivos de tetracloruro de carbono a ADN y a proteínas nucleares hepáticos de rata y ratón. Ahora se hallaron resultados similares en hígado de hamster.

También demostramos la falta de una correlación cuantitativa entre la intensidad de UC a ADN hepático en estas tres especies animales y su conocida respuesta a los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl_4 (4, 108-112). Para poder analizar estos resultados deben tenerse en cuenta factores adicionales. Por ejemplo, estas observaciones podrían indicar que el tetracloruro de carbono, en contraste con otros carcinógenos (136-141), puede inducir tumores hepáticos a través de un mecanismo no genotóxico y/o que la unión covalente a ADN ocurre en posiciones de sus bases que no conducen a un apareo incorrecto de las mismas y/o en regiones del ADN que no se expresan.

Nosotros consideramos diversas hipótesis para tratar de explicar la falta de correlación entre UC a ADN y la diferente respuesta entre especies. Una posibilidad es que el ataque de $\cdot\text{CCl}_3$ sobre las bases ocurra sobre posiciones que no conduzcan a un mal apareo. Otra posibilidad concierne a alteraciones sobre el ADN, no debidas a unión covalente de metabolitos de CCl_4 sino a interacciones con productos de degradación peroxidativa de lípidos o por abstracciones de hidrógeno de $\cdot\text{CCl}_3$ u otros radicales sobre las bases, etc. En resumen, alteraciones que no están acompañadas por

incorporación de marca y que por lo tanto no serían evidenciadas por la medición de UC.

Otro factor importante a tener en cuenta se refiere a la persistencia de los aductos formados. En efecto, debería esperarse una buena correlación sólo si los aductos alteran el apareamiento normal pero persisten lo suficiente.

Un aspecto a considerar para las células eucariotas es que parte de la UC a ADN puede ocurrir en áreas del genoma que están reprimidas en su transcripción. En este sentido hay evidencias positivas para CCl_4 . Van Duuren y colaboradores demostraron que metabolitos de CCl_4 se unen al ADN de la cromatina, ya fuera activa o inactiva, con la misma intensidad pero la persistencia de la UC fue dos veces mayor en la cromatina inactiva (135, 142). Este hallazgo podría implicar que el CCl_4 tiene más posibilidades de comportarse como un promotor que como un iniciador de carcinogénesis.

En efecto, las últimas hipótesis en carcinogénesis química sugieren que las mutaciones en la eucromatina estarían involucradas en el estado de iniciación del proceso mientras que aquellas mutaciones en la heterocromatina se manifestarían solo en el estado de promoción posterior.

Estas posibilidades traen a consideración el problema de evaluar al CCl_4 como un mutágeno. Varios estudios sobre genotoxicidad de CCl_4 dieron resultados negativos (15,80-82,84,112-120,135,142-145). Sin embargo algunos revelaron una acción mutagénica débil (146-148). Por lo tanto es necesario hacer notar que posiblemente muchos de los resultados negativos hayan sido obtenidos en condiciones inadecuadas, considerando que quizás para detectar actividad mutagénica por CCl_4 se requieran condiciones especiales de prueba. Es un compuesto volátil y entonces deberían preverse fugas si el sistema no es hermético. Además CCl_4 no es carcinogénico para muchas cepas de rata (4,111) y en consecuencia, los ensayos

realizados que las involucran pueden no ser adecuados para revelar efectos mutagénicos.

Otro factor frecuentemente no considerado se refiere a que el paso de activación de CCl_4 a metabolitos reactivos es un proceso reductivo que procede más eficientemente en condiciones anaeróbicas y que conduce a la formación de radicales libres muy inestables (15,23).

En los ensayos de mutagenicidad donde se utiliza un sistema de activación exógeno (ej.: microsomas o sobrenadante de 9000 x g) para biotransformar CCl_4 y ADN bacteriano como indicador de genotoxicidad (ej.: test de Ames), prácticamente no habría posibilidad que metabolitos como $\cdot\text{CCl}_3$ o $\cdot\text{O}_2\text{CCl}_3$ (15,23) reaccionaran con el ADN blanco. Debido a su reactividad, interaccionarán antes con proteínas, lípidos y otros componentes del sistema de incubación. Consecuentemente los resultados negativos derivados de ensayos de esta naturaleza deben ser considerados con cuidado.

Esta objeción, sin embargo, es menos crítica cuando se ensayan sistemas con actividad biotransformadora endógena. La activación de CCl_4 a metabolitos reactivos requiere P450 (15,33,41,82,84,112-120,146-148) y por lo tanto si este está presente en el organismo habrá mayor posibilidad de detectar mutagenicidad. Por ejemplo, en estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* (que posee P450) se ha observado un débil efecto genotóxico (146).

También se han reportado efectos genotóxicos débiles en estudios sobre síntesis no programada de ADN en hepatocitos de rata (148) aunque otros autores, utilizando un sistema similar previamente habían obtenido resultados negativos (116). Utilizando la capacidad que poseen mutágenos y carcinógenos para inhibir la síntesis de ADN testicular en ratón, Seiler obtuvo una respuesta positiva para CCl_4 (147). Esto es importante por cuanto el testículo contiene P450

y capacidad biotransformadora de CCl_4 (28). La relevancia de la cercanía del sitio de activación del CCl_4 al ADN se ve ilustrada por nuestros resultados sobre el ataque de metabolitos reactivos de CCl_4 a ADN en mezclas de incubación conteniendo preparados nucleares, sistema generador de NADPH y CCl_4 . La membrana nuclear contiene P450 y nuestro laboratorio ya había demostrado su capacidad biotransformadora de CCl_4 (33).

En el caso de experimentos como éstos, donde nosotros sólo observamos determinada intensidad de UC al ADN y no identificamos aductos específicamente, las correlaciones con carcinogenicidad no son totalmente claras. En el pasado nuestro laboratorio demostró que se producen al menos veinte aductos cuando $\cdot\text{CCl}_3$ producidos químicamente (sistema con peróxido de benzoílo como iniciador) atacan a bases de ADN (82).

Debemos considerar también la posibilidad que el CCl_4 no sea genotóxico. Si este fuera el caso, luego nos hallaríamos frente al problema general de explicar como puede ocurrir la carcinogénesis por mecanismos no genotóxicos. En este aspecto, varias hipótesis han sido propuestas (136-139).

Todas ellas involucran cambios en el modo de expresión genética durante el proceso carcinogénico aunque no sugieren como el carcinógeno produciría ese cambio.

Anteriormente, resultados de nuestro laboratorio demostraron que otro haloalcano no genotóxico, el cloroformo, era capaz de interactuar con las diferentes fracciones de proteínas nucleares pudiendo cambiar así el modo normal de expresión de los genes (33, 144). Debido a alteraciones producidas sobre los mecanismos reguladores, oncogenes reprimidos en su expresión podrían expresarse y conducir a la formación de tumores (130).

Los resultados obtenidos aquí revelan una correlación

interesante entre la UC ("in vitro" e "in vivo") de metabolitos reactivos de CCl_4 a proteínas nucleares de hígado de distintas especies animales y su conocida susceptibilidad diferencial a los efectos hepatocarcinogénicos de este compuesto. Además la unión covalente a proteínas nucleares es significativamente mayor en las proteínas no histonas, de naturaleza acídica. La marca intensa a la fracción residual es atribuible al hecho de que estas proteínas están muy cercanas a los sitios de biotransformación del CCl_4 (proteínas de la membrana nuclear). Este comportamiento es similar al mostrado por el cloroformo (144).

Es bien conocido que las proteínas acídicas tienen funciones regulatorias en relación a la expresión genética (129, 130) y consecuentemente podría esperarse que su alteración debida al ataque de metabolitos reactivos condujera a la pérdida o a cambios en su capacidad funcional. Muchos otros autores ya habían enfatizado el posible rol de las diferentes proteínas nucleares en la carcinogénesis química (149-153).

Sin embargo, la mayor parte de los estudios fueron realizados con carcinógenos genotóxicos relativamente fuertes y entonces el efecto se oscurece por la ocurrencia conjunta de un ataque al propio material genético, el ADN, un blanco más relevante. Nuestros resultados nos permiten sugerir una hipótesis de trabajo para el caso de carcinógenos no genotóxicos como aparentemente lo serían CCl_4 y CHCl_3 . En estos casos, las interacciones de sus metabolitos con proteínas nucleares alterarían las cualidades reguladoras de las mismas, permitiendo así la expresión del potencial oncogénico.

ESTUDIOS SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS PROMOVIDA POR CCl₄

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el núcleo hepático era capaz de bioactivar CCl₄ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente al ADN y a las proteínas nucleares (33,80,144). Por otra parte los experimentos descriptos aquí muestran que los blancos de interacción favoritos son las fracciones proteicas acídica y residual. La intensidad de UC se correlaciona bien con los efectos carcinogénicos de CCl₄ en las tres especies ensayadas. No se encontró correlación con la UC total a ADN.

En los estudios sobre peroxidación de lípidos promovida por CCl₄ encontramos que los núcleos hepáticos son capaces de biotransformar CCl₄ a CHCl₃ y de promover un proceso peroxidativo en presencia de CCl₄.

Para nuestra sorpresa, la biotransformación nuclear de CCl₄ puede ocurrir también en ausencia de NADPH. En el caso del ratón C3H la peroxidación de lípidos es dependiente de NADPH sólo en parte. El estudio más detallado de ambos procesos en núcleos hepáticos de esta especie sugiere la existencia de modos de biotransformación enzimáticos y no enzimáticos, como lo demostró la susceptibilidad parcial al calentamiento. Los efectos inhibidores de EDTA sobre la biotransformación a CHCl₃ y sobre la peroxidación de lípidos indicarían la participación de metales en los dos procesos (probablemente hierro).

La existencia de peroxidación nuclear en presencia de CCl₄ puede ser relevante, ya que es sabido que durante la degradación de los ácidos grasos polinosaturados se generan diversas especies reactivas (lipoperoxilos, alcoxilos de lípidos, hidroperóxidos, malondialdehído, 4-hidroxi-2-

nonenal y otros compuestos carbonílicos) (23, 154). La formación de estas especies en el entorno del ADN o de las proteínas nucleares puede ser importante en relación a los efectos carcinogénicos hepáticos de CCl_4 . Sin embargo no hubo correlación entre peroxidación nuclear y la conocida respuesta carcinogénica de las tres especies.

En efecto, no hubo diferencia significativa en la capacidad de estimular peroxidación entre preparados nucleares hepáticos de hamster y rata, mientras que ésta no desarrolla cáncer por CCl_4 y el hamster sí lo hace (4,108-110, 112). Varios productos finales de la peroxidación (4-hidroxi-2-nonenal, malondialdehído, etc.) podrían tener suficiente estabilidad como para ser capaces de migrar a lugares distantes dentro de la célula (ej. del retículo endoplásmico al núcleo) (23, 154). En vista que la mayor parte de la peroxidación de lípidos en hígado de animales intoxicados con CCl_4 ocurre en el retículo endoplásmico, donde está localizado el P450 principalmente (15,23,58), nosotros consideramos relevante analizar la posible correlación entre peroxidación en tejido hepático entero y respuesta carcinogénica.

Nuevamente, como en el caso de los núcleos, nosotros encontramos aquí que no hay una correlación cuantitativa entre la capacidad de CCl_4 de promover peroxidación en tejido entero y la respuesta carcinogénica en cada especie. La intensidad de la peroxidación en hamster no difirió significativamente de la observada en rata. Estos resultados sugieren que la peroxidación de lípidos no es determinante en el proceso de inducción de cáncer por CCl_4 pero no excluyen su participación en determinados estadios del proceso global de desarrollo del cáncer.

Nosotros observamos sin embargo, alguna correlación entre la capacidad de preparados nucleares para

biotransformar CCl_4 a CHCl_3 y la respuesta carcinogénica en las tres especies. En efecto, los núcleos hepáticos de hamster y ratón C3H, más susceptibles, fueron mejores metabolizadores que los de rata Sprague Dawley, no susceptible. Estos resultados no prueban pero sí son indicadores de la posibilidad que durante la biotransformación nuclear de CCl_4 se formen especies reactivas (ej. $\cdot\text{CCl}_3$), las cuales por unión covalente, por abstracción de hidrógeno u otra reacción de naturaleza desconocida son capaces de determinar o modular el proceso que termina en un cáncer hepático por CCl_4 .

La biotransformación en tejido hepático entero por el contrario, no se correlacionó con la respuesta carcinogénica. Esto es concordante con el hecho que la mayor parte de la biotransformación hepática de CCl_4 ocurre en el retículo endoplásmico y con la idea que es prácticamente imposible para un radical libre como $\cdot\text{CCl}_3$ viajar hasta los blancos relevantes a la carcinogénesis como ADN o proteínas nucleares (15,23,33,80,82,135,142,144).

**INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO
CON BASES DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO**

Las bases del ADN demostraron ser capaces de reaccionar con radicales $\cdot\text{CCl}_3$ producidos químicamente. Estos resultados concuerdan con datos previos de nuestro laboratorio (82). De los productos que se formaron sólo algunos contendrían cloro, indicando que pueden producirse alteraciones en las moléculas blanco (ej. bases) que no impliquen necesariamente la unión covalente de algún metabolito del tóxico (dimerizaciones, fragmentaciones, etc.). Al resultar infructuosa la identificación estructural de estos productos, no fue posible establecer si las alteraciones que se producen pueden conducir a modificaciones en el apareo de las bases. Por supuesto, debe tenerse siempre en cuenta que de todos los productos que se formaron durante el ataque de $\cdot\text{CCl}_3$ sobre cada base del ADN ensayada, sólo algunos tendrán ocurrencia y relevancia en la situación biológica real. El sistema modelo de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ tiene la utilidad de presentar posibles candidatos para explicar las alteraciones que se observan "in vitro" o "in vivo".

Por otra parte, la relevancia de la ocurrencia de determinada alteración estará sujeta a que consecuencias trae sobre la expresión de ese material genético. En el caso de otros radicales libres (ej. $\cdot\text{OH}$) se ha visto que puede ocurrir la adición del radical a la posición C-8 de guanina. Esta posición no está involucrada en el apareo normal con citosina y por lo tanto no debería esperarse que la adición sobre ella condujera necesariamente a una lectura errónea del ADN en la duplicación.

Debe considerarse además la capacidad de las células para reparar algunas lesiones sufridas en el material

genético por ataque químico o físico, en cuanto a que ella determinará la persistencia de la alteración.

Puesto que en los estudios sobre unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a macromoléculas quedó evidenciada una buena correlación de efecto carcinogénico con la UC a proteínas nucleares y, ante las dificultades presentes en la identificación estructural de los productos de interacción de $\cdot\text{CCl}_3$ con las cuatro bases del ADN, se decidió no continuar con estos experimentos (como parte de este trabajo de tesis) y dedicar más esfuerzo a los estudios sobre interacciones con aminoácidos.

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON AMINOACIDOS

Varios aminoácidos mostraron ser reactivos en el sistema modelo de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$, lo cual se correlaciona con resultados anteriores de nuestro laboratorio (79). La respuesta, sin embargo, fue diferente según el caso, por lo que analizaremos los resultados con el mismo esquema con que los presentamos:

a) Para este primer grupo (arginina, aspártico, glutámico, glicina, leucina, lisina, norleucina y valina) no se observó reacción. Los aminoácidos arginina, aspártico y glutámico habían presentado algún grado de unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$. La diferencia en los resultados puede justificarse en la distinta sensibilidad de los métodos de detección empleados en cada caso.

Debe notarse sin embargo que los estudios de UC solamente evidenciaron la formación de aductos con incorporación de ^{14}C , ignorando cualquier otro producto de

reacción (aductos clorados pero sin ^{14}C , fragmentaciones, dímeros, etc.). Por lo tanto la correlación (o la no correlación) entre esos estudios y los aquí analizados debe ser interpretada con cuidado.

Para los restantes (glicina, leucina, lisina, norleucina y valina), en cambio, tampoco se había observado incorporación de marca (79). En el caso de los aminoácidos de cadena lateral alifática no debería descartarse la posibilidad que se formen hidrocarburos gaseosos como productos de degradación por ataque de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$. Tal es el comportamiento de leucina e isoleucina frente a especies reactivas de oxígeno (154). Estudios en ese sentido serán realizados en el futuro.

b) Cisteína y cistina habían presentado una incorporación importante de marca desde $^{14}\text{CCl}_4$ (79). En los estudios realizados aquí no fue posible separar productos de interacción volátiles, a pesar de haberse evidenciado una reacción intensa (ver Resultados). Debido a la particular relevancia biológica de estos dos aminoácidos, se proseguirán en el futuro los estudios de sus interacciones con $\cdot\text{CCl}_3$, intentando la separación por otras técnicas (ej. HPLC) o investigando la posible formación de algún producto gaseoso.

c) Los casos de los aminoácidos metionina y fenilalanina se discuten por separado más adelante debido a que aquí fue posible avanzar en más profundidad en lo que se refiere a extrapolaciones a situaciones biológicas.

d) Para los aminoácidos histidina, prolina, serina, treonina, triptofano y tirosina pudimos evidenciar la formación de productos de interacción con y sin incorporación de cloro.

Por otra parte, estos aminoácidos habían mostrado incorporación de marca desde $^{14}\text{CCl}_4$, más importante en el caso de triptofano y tirosina (79). En el caso de tirosina, además, se identificó un producto resultante de la

interacción. Están en curso los estudios de identificación estructural de los productos de reacción para los restantes aminoácidos de este grupo.

El estudio sobre contenido de cada aminoácido componente de las proteínas microsomales hepáticas en ratas intoxicadas con CCl_4 no mostró una diferencia significativa entre animales tratados y controles. Esto sugiere que las alteraciones producidas por los metabolitos reactivos del tóxico afectan a una fracción pequeña del pool de cada aminoácido blanco y entonces, aunque las alteraciones puedan ser cualitativamente importantes, no serán reveladas por medidas cuantitativas de este tipo.

En mezclas de incubación enzimáticas en anaerobiosis nosotros encontramos dimetildisulfuro, metanotiol y H₂S. Estos últimos podrían formarse en pasos reductivos enzimáticos o no enzimáticos. La formación de metanotiol también puede explicarse suponiendo que en el medio de incubación los radicales $\cdot\text{SCH}_3$ pueden abstraer hidrógeno de una mayor variedad de donores que en la situación de generación "química" de $\cdot\text{CCl}_3$.

Una observación interesante fue que solamente el éster de metionina (y no el aminoácido libre) fue capaz de producir cantidades detectables de dimetildisulfuro, en las mezclas de incubación enzimáticas. Además la metionina constituyente de la proteína microsomal no parece interaccionar en algún grado mensurable.

Estos resultados pueden ser explicados asumiendo que el éster etílico, más liposoluble, tiene mayor probabilidad de acceder a los sitios activos del citocromo P450 y por lo tanto encontrarse más cerca de los lugares de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$. Por otra parte, los residuos de metionina en la apoproteína (u otras proteínas microsomales) tienen posiciones relativamente fijas en la estructura proteica (157) que pueden no estar cercanas a los sitios activos y consecuentemente no conducirían a cantidades detectables del disulfuro. De hecho, nosotros no observamos una disminución significativa en el contenido de metionina en proteína microsomal hepática de ratas intoxicadas con CCl₄ (6 horas).

Estos resultados sugieren que, si las interacciones descritas aquí entre $\cdot\text{CCl}_3$ y metionina son biológicamente relevantes, seguramente deben involucrar una fracción menor del pool de metionina.

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON FENILALANINA

En el caso de éste aminoácido no se obtuvieron buenos resultados en el sistema modelo, utilizando etanol absoluto como solvente. El objeto de emplear etanol fue mantener una correlación con resultados anteriores de nuestro laboratorio (79). Por otra parte, el uso de CCl_4 como medio de reacción (que favorecería las interacciones que nos interesan) obliga a derivatizar los aminoácidos a formas más liposolubles pero que simultáneamente alteran de modo radical sus estructuras (particularmente a nivel de la cadena lateral). Esto tiene el inconveniente que los resultados que se obtuvieran estarían más alejados de lo que pudiese suceder en la situación biológica, tanto "in vitro" como "in vivo". Resumiendo, el uso de CCl_4 como solvente en el sistema modelo de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ presenta una situación de compromiso entre una mejor probabilidad de interacción con el aminoácido y la más difícil extrapolación de los resultados obtenidos a situaciones biológicas, condicionando su potencial relevancia.

Para el caso particular de fenilalanina, ante el fracaso de los estudios que utilizaban el sistema modelo tradicional (no se observó la aparición de productos de interacción, a pesar de ser un blanco probable de ataque), se intentó estudiar la interacción con radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ en un medio de tetracloruro de carbono (sin etanol). Se consideró que que no podía ser importante la modificación estructural agregada por la acetilación, en ausencia de otros grupos funcionales acilables en la cadena lateral. Aún así se vió luego en los resultados como el comportamiento de este derivado del aminoácido fue completamente distinto en el

sistema "químico" respecto de la generación enzimática de $\cdot\text{CCl}_3$ en preparados microsomales.

Los resultados muestran que los radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ (generados química o enzimáticamente) pueden interaccionar en condiciones experimentales apropiadas con el aminoácido fenilalanina (en la forma de derivados liposolubles) para dar productos que derivan de la fragmentación o alteración de su estructura.

En el medio de reacción puramente químico observamos la formación de clorobenceno, un derivado monoclorado (I) y un derivado insaturado de estructura imina (II). El mecanismo más probable para la formación de clorobenceno implicaría la existencia transitoria de radicales libres fenilo provenientes del aminoácido, producidos por ataque sobre éste de radicales $\cdot\text{CCl}_3$.

El derivado II podría formarse a partir de una abstracción de hidrógeno por $\cdot\text{CCl}_3$ sobre la posición bencílica del aminoácido, seguida de la eliminación de $\text{H}\cdot$ e isomerización a la forma imina final. El aducto monoclorado I se formaría simplemente por adición de un radical cloro al anillo aromático y subsecuente rearomatización.

En el sistema de activación microsomal de CCl_4 no observamos la formación de clorobenceno o de los compuestos I ó II y en cambio encontramos benceno. Creemos que la razón para este comportamiento diferencial entre los sistemas químico y enzimático consiste en que en este último la concentración de CCl_4 es mucho menor y por lo tanto la producción de $\cdot\text{CCl}_3$ es menor. Otra razón, más importante quizás, es la mayor variedad y cantidad de donores de hidrógeno presentes en el medio de incubación enzimático. Esto explicaría porque los radicales $\cdot\text{C}_6\text{H}_5$ y $\cdot\text{CCl}_3$ darán con mayor facilidad benceno y cloroformo que los otros productos. La formación en el medio biológico de I es improbable debido

a la baja concentración de radicales libres $\cdot\text{Cl}$ durante la transformación enzimática de CCl_4 , que es un camino reductivo antes que una ruptura homolítica.

Cuando se utilizó fenilalanina en lugar de su éster etílico o del derivado N-acetilado y ester etílico, no se formó benceno. Esto recuerda el caso del experimento equivalente con metionina para generar dimetildisulfuro. La razón para tal resultado estaría nuevamente en el requisito de un determinado grado de liposolubilidad para acceder a los sitios activos del citocromo P450 y tener así una mayor probabilidad de interacción con $\cdot\text{CCl}_3$. Los residuos de fenilalanina de las proteínas microsomales tienen posiciones fijas que no necesariamente están cerca de los sitios de generación de $\cdot\text{CCl}_3$, de modo de producir cantidades medibles de benceno (157).

Esto explicaría que no hayamos observado una disminución significativa en el contenido de fenilalanina en la proteína microsomal hepática de ratas intoxicadas con CCl_4 (6 horas).

Estos resultados indicarían que, de tener estas interacciones con fenilalanina algún significado toxicológicamente relevante, las mismas sólo podrían involucrar a una fracción muy pequeña del pool del aminoácido.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió la capacidad de interacción de metabolitos reactivos del tetracloruro de carbono (principalmente radicales libres triclorometilo) con el ADN y con proteínas nucleares, la peroxidación de lípidos hepática (total y nuclear) estimulada por CCl_4 y la biotransformación de CCl_4 a CHCl_3 en hígado (total y en núcleos); en tres especies animales con diferente respuesta a la carcinogénesis hepática inducida por CCl_4 . Ellas fueron el hamster sirio dorado, el ratón C3H y la rata Sprague Dawley. La susceptibilidad hacia este carcinógeno sigue el orden: hamster \geq ratón C3H \gg rata Sprague Dawley = 0.

No se observó correlación entre el grado de susceptibilidad de esas especies y la intensidad de las interacciones (expresadas como unión covalente de ^{14}C) de metabolitos reactivos de CCl_4 con el ADN.

Se observó correlación, en cambio, entre la intensidad de las interacciones con proteínas nucleares totales y la respuesta carcinogénica a CCl_4 en esas especies.

Cuando se efectuaron estudios sobre distintas fracciones de las proteínas nucleares (solubles I y II, desoxirribonucleoproteínas I y II, histonas, ribonucleoproteínas ácidas y proteínas residuales) se verificó la existencia de una correlación entre intensidad de las interacciones de metabolitos reactivos de CCl_4 (unión covalente de ^{14}C) con las fracciones ácida y residual, y la respuesta carcinogénica de las tres especies al CCl_4 .

Se verificó que preparados nucleares de hígado de hamster, de ratón C3H y de rata Sprague Dawley son capaces de biotransformar CCl_4 a CHCl_3 y de estimular (en atmósfera aerobia) la peroxidación de sus lípidos en presencia de CCl_4

y en presencia o ausencia de NADPH. No hubo correlación entre peroxidación nuclear (o en tejido entero) y la conocida respuesta carcinogénica de las tres especies. Habría sin embargo alguna correlación entre la capacidad biotransformadora de CCl_4 a CHCl_3 en preparados nucleares y la susceptibilidad a la carcinogénesis por CCl_4 . No se observó lo equivalente en tejido hepático entero.

Se observaron interacciones entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ (generados por acción iniciadora de peróxido de benzoilo sobre CCl_4) y las cuatro bases del ADN: guanina, adenina, citosina y timina (detección por FID, CE y EM). En los cuatro casos se intentó realizar la identificación estructural de los productos formados por espectrometría de masas. No se han obtenido aún resultados positivos. Las fragmentaciones generadas por los derivados trimetilsililados son escasas y ello dificulta la interpretación de los espectros (ver Resultados). Es nuestra intención proseguir en el futuro con la identificación estructural, intentando modos alternativos de derivatización u otras técnicas espectroscópicas.

Se evidenciaron interacciones entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ (generados por acción iniciadora de peróxido de benzoilo sobre CCl_4) y varios aminoácidos (fue estudiada la reacción con 18 aminoácidos). Los aminoácidos arginina, aspártico, glutámico, glicina, leucina, lisina, norleucina y valina no mostraron reaccionar de modo apreciable. Los restantes (cisteína, cistina, metionina, fenilalanina, histidina, prolina, serina, treonina, triptofano y tirosina) reaccionaron con distinto grado de intensidad. Para algunos (metionina, fenilalanina y tirosina) fue posible identificar productos de interacción, ya fuera aductos clorados, productos de fragmentación, etc.

En los casos de metionina y de fenilalanina observamos la ocurrencia de interacciones que no pueden ser consideradas

como unión covalente de metabolitos reactivos o peroxidación de lípidos inducida por CCl_4 . Se trata de alteraciones inducidas sobre los aminoácidos que implican la fragmentación de la molécula. Para metionina pudimos observar la formación de dimetildisulfuro y de metanotiol, en un sistema de incubación microsomal "in vitro". Ambos productos derivarían de la fragmentación de la cadena lateral del aminoácido para dar radicales libres $\cdot\text{SCH}_3$.

La fenilalanina mostró también ser capaz de generar productos de degradación como el benceno, que fue observado en incubaciones de microsomas hepáticos.

Hemos visto que el tetracloruro de carbono, que produce una variedad de alteraciones y daños en el hígado, se metaboliza a especies muy reactivas que interaccionan con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y que esas interacciones son la causa original de las alteraciones que más o menos directamente conducirán a los efectos tóxicos visibles. Se desprende de esto la importancia que tiene conocer en lo posible la química de esas interacciones pues ello nos permitirá a su vez entender mejor cada efecto observado en los parámetros que midamos, nos permitirá predecir tipos y localizaciones de otras alteraciones probables y por último dará las pautas para diseñar tratamientos que neutralicen o eviten algunas de esas interacciones y/o sus consecuencias.

Si tenemos en cuenta además la relevancia del sistema CCl_4 -hepatocito como modelo experimental de daño celular, extrapolable a situaciones de otros tóxicos-hepatocito, CCl_4 -otros órganos, otros tóxicos-otros órganos o aún otros tóxicos-otros seres vivos, resulta obvio el interés que para nosotros y otros laboratorios tiene investigar en este campo, por la generalidad que puede asignarse a los resultados que se obtengan (15, 158).

En este trabajo se ha pretendido aportar al conocimiento de las interacciones de metabolitos reactivos de CCl_4 con aminoácidos y bases de ácidos nucleicos, pues es muy poco lo realizado hasta ahora en el tema. Somos conscientes de la cantidad de trabajo experimental que implican estos objetivos pero justamente nuestra intención es continuar con esta línea en el futuro.

Un hallazgo a nuestro juicio novedoso, comprende a los resultados obtenidos con metionina y en parte con fenilalanina. Encontramos mecanismos de alteración de los componentes celulares que no corresponden a los tradicionales en la toxicología del CCl_4 y de otros tantos compuestos (unión covalente de metabolitos y peroxidación de lípidos) pero que son completamente justificados por la naturaleza química de los productos de biotransformación de CCl_4 , esto es fundamentalmente el radical libre triclorometilo. Desde que se postula la formación ya sea "in vivo" o "in vitro" de un radical libre, deben esperarse en principio todas las interacciones que normalmente realiza tal especie (abstracciones, adiciones, dimerizaciones, etc.). Lo que encontremos en la situación real dependerá del medio en que se haya formado, qué otras moléculas se hallen presentes, la estabilidad de los productos formados, etc., eso es lo que aporta el medio biológico. Este razonamiento, que puede parecer trivial, ha sido sin embargo resistido en el medio de investigación toxicológico o en patología, limitándose exclusivamente a considerar las interacciones tóxico-medio en términos de uniones covalentes y/o peroxidación de lípidos. En determinados casos incluso la sola existencia de radicales libres suponía peroxidación de lípidos como causa excluyente de las patologías observadas. Es en este sentido donde creemos haber hecho un aporte relevante, al señalar mecanismos de interacción posibles simplemente reconociendo

al tóxico como una sustancia química que reaccionará como tal y que debe estar atento a considerar todos los tipos de interacción posibles, de acuerdo a su naturaleza.

En lo que se refiere a carcinogénesis química, consideramos que el tetracloruro de carbono puede servir como un buen modelo para estudiar el modo de acción de muchos carcinógenos no genotóxicos. La buena correlación obtenida entre unión covalente a proteínas nucleares (y entre éstas a las ácidas) y susceptibilidad a la inducción de tumores en distintas especies, nos hace pensar en que la hipótesis propuesta puede ser válida. En efecto, las alteraciones que pueda producir un metabolito reactivo como un radical libre interaccionando con los distintos aminoácidos muy probablemente alteren o anulen las funciones de las proteínas reguladoras de la expresión genética. Esto permitiría la expresión de zonas del genoma que usualmente no se expresan y así comenzaría la transformación de la célula.

Por otra parte, creemos que esta hipótesis es extrapolable a muchos otros carcinógenos epigenéticos, ya que la idea central, la alteración de los mecanismos reguladores de la expresión del ADN por ataque de metabolitos reactivos, es conceptualmente generalizable a muchas sustancias que se biotransforman generando especies de gran reactividad química. Es nuestra intención realizar en el futuro experimentos similares con otros hidrocarburos clorados que poseen un comportamiento como carcinógenos del mismo tipo que el tetracloruro de carbono.

PARTE EXPERIMENTAL

Productos químicos utilizados:

Tetracloruro de carbono (bajo contenido de azufre), marca Mallinkrodt, USA.

[¹⁴C]CCl₄, de New England Nuclear Corp., Boston. USA.

Actividad específica: 4,5 mCi/mmol. Pureza del 99% (CGL).

Los experimentos que involucraban su uso fueron realizados dentro de los seis meses siguientes al análisis. La velocidad de descomposición radiolítica es menor de 1% en 18 meses cuando se lo guarda a -20 °C. En nuestro laboratorio fue almacenado a -70 °C en la obscuridad. Consecuentemente la radiólisis del producto en ese lapso no resultó significativa.

El resto de los compuestos químicos que se emplean, detallados en cada uno de los métodos, son de la mejor calidad.

Equipamiento utilizado:

Las mediciones de conteo de radioactividad fueron realizadas en un contador de centelleo líquido marca Beckman, modelo LS-133.

Las medidas de cloroformo y pentano en mezclas de incubación se efectuaron en un cromatógrafo de gases marca Packard, modelo 870, con detector de ionización de llama.

El análisis por CGL/CE de los productos de interacción de radicales $\cdot\text{CCl}_3$ con aminoácidos o bases se efectuó en el mismo cromatógrafo, equipado con un detector de captura de electrones de ⁶³Ni.

Las medidas del contenido de distintos aminoácidos en proteínas microsomales fueron realizados en un analizador automático marca Beckman, modelo 119 CL, en la cátedra de

Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA.

Las determinaciones estructurales por espectrometría de masas se realizaron en un sistema de cromatografía gaseosa capilar acoplado a un espectrómetro de masas marca Hewlett Packard 5890/5970B MSD.

Tratamiento estadístico de los datos (159):

En todos los experimentos que involucraron sistemas biológicos, ya fuera "in vivo" o "in vitro", se efectuó el tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Puesto que siempre se hicieron comparaciones entre dos grupos (de igual número de muestras cada uno), se aplicó el F-test seguido por el test de Student (Student's t-test).

El F-test es un test de homogeneidad de variancias entre dos grupos de datos. El valor calculado de F se compara en tablas de valores apropiados y según resulte significativo o no, se indica con que test de Student debe seguirse el análisis estadístico.

Si el valor de F no es significativo (variancias homogéneas) corresponde aplicar el Student's t-test con $df = N_1 + N_2 - 2$ (df: grados de libertad).

En el otro caso (F significativo, $N_1 = N_2$) se utiliza el Student's t-test con $df = N - 1$. Consideramos significativa una diferencia cuando el valor de p fue ^{menor} ~~mayor~~ que 0,05.

ESTUDIOS SOBRE UNION COVALENTE DE $^{14}\text{CCl}_4$ A MACROMOLECULAS CELULARES

Unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a ADN y proteínas nucleares totales. Estudios "in vivo":

Animales y tratamientos:

Fueron utilizados animales macho, adultos, de las siguientes especies: ratón C3H (25-30 g), rata Sprague Dawley (220-240 g), y hamster sirio dorado (80-90 g). Los animales ayunaron 12 a 14 horas antes de ser tratados con CCl_4 .

Administración intraperitoneal (i.p.) de $^{14}\text{CCl}_4$ 15% en aceite de oliva. Dosis: 1 ml/200 g de peso corporal. La actividad específica empleada fue: 32 uCi/mmol (unión a ADN) o 20 uCi/mmol (unión a proteínas). Tiempo de intoxicación: 6 horas.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se desangraron inmediatamente y se extrajeron los hígados enteros. Estos se procesaron a 4 °C según se indica en el siguiente título.

Obtención de ADN de hígado de distintas especies (160, 161):

Se homogeneizaron x gs de hígado con 7 volúmenes de SSC (cloruro de sodio 0.3 M: citrato de sodio 0.03 M), centrifugando luego el homogeneizado a 5000 x g durante 20 min. Se resuspendió el precipitado con 5 volúmenes de SSC y se lo centrifugó en las mismas condiciones.

Se resuspendió nuevamente el precipitado empleando 10 volúmenes de cloruro de sodio 1 M, 1 volumen de dodecil sulfato de sodio 10% y 10 volúmenes de Kirby-fenol (composición: 500 g de fenol, 55 ml de agua destilada, 70 ml de m-cresol y 0,5 g de 8-hidroxiquinolina).

Se agitó la mezcla enérgicamente durante 30 min (agitador tipo "Wrist action") y posteriormente se la centrifugó a 15000 x g durante 30 min. En el sobrenadante queda retenido el ADN, que se precipitó con etanol p.a., con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación se realizó la purificación del ADN, redisolviéndolo con 20 ml de acetato de sodio 5% e incubando a 35 °C con solución de ribonucleasa de pancreas bovino. La digestión del ARN se permitió durante 15 min al cabo de los cuales se reprecipitó el ADN con 20 ml de etoxietanol, recogiendo con ayuda de una varilla de vidrio. Se lo resuspendió nuevamente con 12 ml de agua destilada, 12 ml de K_2HPO_4 2.5 M y 12 ml de metoxietanol y luego de una centrifugación a 3000 x g durante 30 min (5 °C) quedó retenido el ADN en el sobrenadante. Se lo precipitó con bromuro de cetil trimetil amonio 1%, recogiendo con ayuda de una varilla de vidrio. A continuación se lavó el ADN con agua destilada dos veces y acetato de sodio 2% :etanol 70% (1:1), (15 min). En situaciones de incorporación de poca marca al ADN, se debe asegurar la no contaminación con proteínas, que generalmente tienen un mayor grado de unión covalente. Con este propósito se disolvió el ADN con solución lisante (NaCl 0.015 M, citrato de sodio 0.0015 M, dodecilsulfato de sodio 1%) y se efectuaron dos extracciones con CIP (cloroformo 480 ml, alcohol isoamílico 20 ml, llevar a 1 litro con fenol líquido), centrifugando cada vez a 15000 x g durante 30 min. Finalmente, la fase acuosa se trató con etanol p.a. para precipitar el ADN. Se lavó con agua destilada (dos veces), etanol, etanol:eter etílico (1:1) y éter. Se guardó en desecador, en vacío.

Determinación de la concentración de ADN (161):

Debido a que el ADN conserva una cantidad variable de agua ligada, aún luego del procedimiento de secado, no es correcto determinar por pesadas las muestras que se utilizarán para la medición de la radioactividad incorporada.

La concentración de ADN fue determinada espectrofotométricamente sobre la base de una absorbancia de 20 a 260 nm, para una solución de ADN de 1 mg/ml. Se efectuaron lecturas con dos concentraciones de la muestra, promediando los valores obtenidos.

Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ al ADN:

El ADN purificado obtenido a partir del tejido o de un preparado nuclear se disolvió en buffer fosfato pH 7.4 a una concentración de 0.5-1 mg/ml. Una alícuota de esta solución se mezcló con 6 % PPO (2,5-difeniloxazol) en tolueno: triton X-100 (60:40) y se contó en contador de centelleo líquido, deduciendo el valor de un blanco apropiado. Se repite la lectura a las 24 horas para descontar posibles artefactos por quimioluminiscencia. La marca se considera significativa cuando supera en un 50% el valor de radioactividad determinado en el blanco.

Determinación del grado de contaminación del ADN con proteínas:

Para el caso de carcinógenos débiles como el tetracloruro de carbono, usualmente el grado de unión

covalente a proteínas es mucho mayor que el correspondiente al ADN. Por lo tanto es necesario asegurar la pureza de los ácidos nucleicos para no obtener resultados falsos positivos, debido a contaminación con proteínas marcadas.

A tal efecto, se determinó la presencia de proteínas en las muestras de ADN aislado, de dos maneras: a) Con el reactivo del fenol, por el método de Lowry (133); b) por absorción diferencial en el ultravioleta, determinando la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (134).

Obtención de nucleos purificados (162):

Todos los procesos se llevaron a cabo a 4 °C. Se lavó el hígado entero dos veces en sacarosa-TKM 0.25 M (sacarosa 0.25 M en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5/KCl 2.5 mM/MgCl₂ 5 mM) . Se homogeneizó con 3 volúmenes de sacarosa-TKM 0.25 M con la ayuda de un homogeneizador de teflón/vidrio tipo Potter-Elvehjem. El homogenato fue filtrado luego a través de una tela de nylon (100 mesh) y centrifugado a 2000 x g durante 20 min..

Se lavó cada pellet dos veces con sacarosa-TKM 0.25 M, centrifugando cada vez a 1000 x g por 5 min. El precipitado se resuspendió en 34 ml de sacarosa-TKM 2.2 M y se depositó sobre un colchón de 4.5 ml de sacarosa-TKM 2.3 M (gradiente discontinuo). Siguió una ultracentrifugación a 80000 x g durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y limpiado cuidadosamente el interior de los tubos con hisopo de gasa. Se enjuagó con 5 ml de sacarosa-TKM 0.25 M y se limpió nuevamente.

Se agregaron 11 ml de sacarosa-TKM 0.25 M, suspendiendo con cuidado. Se mezcló con 22.5 ml de sacarosa-TKM 2.2 M y se depositó sobre colchón de 4.5 ml de sacarosa-TKM 2.3 M.

Se repitió la ultracentrifugación descartando el sobrenadante y limpiando el tubo como antes.

Se resuspendió el pellet con 5 ml de sacarosa-TKM 1.0 M, se llenó el tubo y se centrifugó a 2000 x g, por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de sacarosa-TKM 0.25 M, centrifugado a 1000 x g x 5 min. El pellet así lavado se utilizó en las incubaciones, en la dilución adecuada.

La pureza del preparado nuclear se determinó por microscopía de contraste de fase, comprobando su integridad y mediante microscopía electrónica de transmisión, donde aparecieron sólo trazas de contaminación con retículo endoplásmico.

Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a proteínas nucleares (80):

Los pellets fueron lavados con ácido tricloroacético (TCA) 5%, desnaturalizando las proteínas. Luego se calentó en TCA 5% a 85-90 °C durante 30 min para eliminar ácidos nucleicos. Finalmente se lavaron sucesivamente y hasta radioactividad negativa en los líquidos de lavado, con etanol:dietileter:clorofomo (2:2:1), acetona y dietiléter.

Estos lavados eliminan los lípidos y la marca no unida covalentemente, además de secar el precipitado.

Una alícuota de la muestra de proteínas fue disuelta en ácido fórmico concentrado y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido usando 5 ml de butoxietanol 48% (v/v) en tolueno y 15 ml de 2,5-difenil oxazol (PPO) 8% en tolueno: butoxietanol, 3:1. Se consideró significativa la marca asociada a una muestra, cuando superó en un 50% el valor del blanco apropiado.

Incubaciones "in vitro" para determinar la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a ADN y proteínas nucleares:

Se efectuaron incubaciones a 37 °C en un medio de núcleos purificados de hígado de distintas especies, en presencia del compuesto marcado. Bajo diferentes condiciones experimentales de incubación se determinó la capacidad de los núcleos de biotransformar el $^{14}\text{CCl}_4$ a metabolitos reactivos que se unen covalentemente a sus proteínas y ADN.

Los medios de incubación estuvieron constituidos por: nucleos purificados de hígado de la especie en cuestión (2.0-2.4 mg de proteína nuclear/ml de medio, determinada por el método de Lowry (133)), 50 ul de una solución alcohólica de $^{14}\text{CCl}_4$ (CCl_4 0.2 mM, 2×10^6 dpm/ml de medio) y 1.0 ml de sistema generador de NADPH, con el cual se iniciaron las incubaciones. Su composición era: 0.5 ml de MgCl_2 0.15M, 0.5 ml de buffer sacarosa-TKM 0.25 M, 10 l de isocítrico deshidrogenasa tipo I de corazón de porcino (Sigma Chem. Co.); 4.68 mg de dl-isocitrato de sodio y 1.72 mg de NADP sal de sodio.

El medio de incubación se constituyó con sacaraosa-TKM 0.25 M (sacarosa 0.25M en buffer Tris-HCl, pH 7.5/ KCl 2.5mM / MgCl_2 5mM), necesario para la estabilidad de la suspensión nuclear en esas condiciones (Volumen final: 5 ml). Las incubaciones fueron de 60 min a 37 °C, bajo una atmósfera de nitrógeno (metabolismo reductivo). Cada muestra (con o sin sistema generador de NADPH) se hizo por triplicado.

Obtención de ADN desde preparados nucleares. Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ (163):

Se detuvo la incubación por inmersión en un baño a 4 °C y se sedimentaron los núcleos a 1000 x g por 10 min. Se lavó el pellet con 5 ml de sacarosa 0.25 M/MgCl₂ 5mM/Tris 0.05 M pH 7.4 (tres veces). El pellet fue luego lisado en 0.03 M NaCl/citrato de sodio 3 mM/dodecil sulfato de sodio 2% y se extrajo el ADN con fenol saturado en el buffer. La fase orgánica contiene las proteínas nucleares mientras que el ADN fue precipitado de la fase acuosa con etanol. Se lo redisolvió luego en buffer y se lo trató con RNasa. Se precipitó el ADN con etanol y se lo lavó dos veces con éter. Las medidas de radioactividad incorporada se realizaron de modo análogo a la situación "in vivo", descrita anteriormente, bajo el título "Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ al ADN."

Obtención de proteínas nucleares totales desde preparados nucleares (80):

Se detuvo la incubación con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 5% para desnaturalizar las proteínas. Luego siguió el procedimiento descrito más arriba bajo el título "Determinación de la unión covalente de $^{14}\text{CCl}_4$ a proteínas microsomales o nucleares".

Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado:

Se partió de los núcleos, al finalizar la incubación,

mediante el procedimiento descrito por Steele y Busch (164) que se resume en la Figura 18. Las proteínas nucleares solubles (fracciones I y II) se extrajeron dos veces con 10 volúmenes (por cada gramo de tejido húmedo) de NaCl 0.14 M y una vez con 5 volúmenes de buffer Tris-HCl 0.1 M pH 7.6, por homogeneización y agitación durante 20 min. Al centrifugar estas suspensiones 6000 x g (10 min) se obtuvieron respectivamente en los sobrenadantes las fracciones I y II. Luego de la extracción con Tris, el precipitado se trató con uno a dos volúmenes de NaCl 2 M para extraer las desoxyribonucleoproteínas-1 (fracción III). En esta extracción la muestra fue triturada durante 20 segundos, con gotas de octanol para controlar la formación de espuma. El extracto fue centrifugado a 25000 x g durante 1 h y el sobrenadante se decantó y se guardó durante una noche en congelador (-40 °C). Esta es la fracción III que comprende a las proteínas básicas ligadas al ADN a partir de las cuales luego se obtienen las histonas (Figura 18).

El precipitado de 25000 x g se agitó con 1/4 del volumen inicial de NaCl 2 M durante toda la noche, con la ayuda de una barrita magnética y luego de una centrifugación a 16000 x g por 1 hora se lo reextrajo durante otra hora, seguida de igual centrifugación. Se reunieron las dos suspensiones y se centrifugaron a 20000 x g (20 min).

El sobrenadante contiene las proteínas ácidas (no histonas) ligadas al ADN, que corresponden a la fracción de desoxyribonucleoproteínas-2 (IV). El precipitado contiene las ribonucleoproteínas ácidas (V), proteínas ácidas no ligadas al ADN y las proteínas residuales (VI). Para obtener estas dos últimas fracciones se trató el precipitado con NaOH 0.05 N durante 2 min con homogeneización suave y centrifugación a 20000 x g (20 min). El sobrenadante fue llevado a pH 6 con la ayuda de HCl diluido.

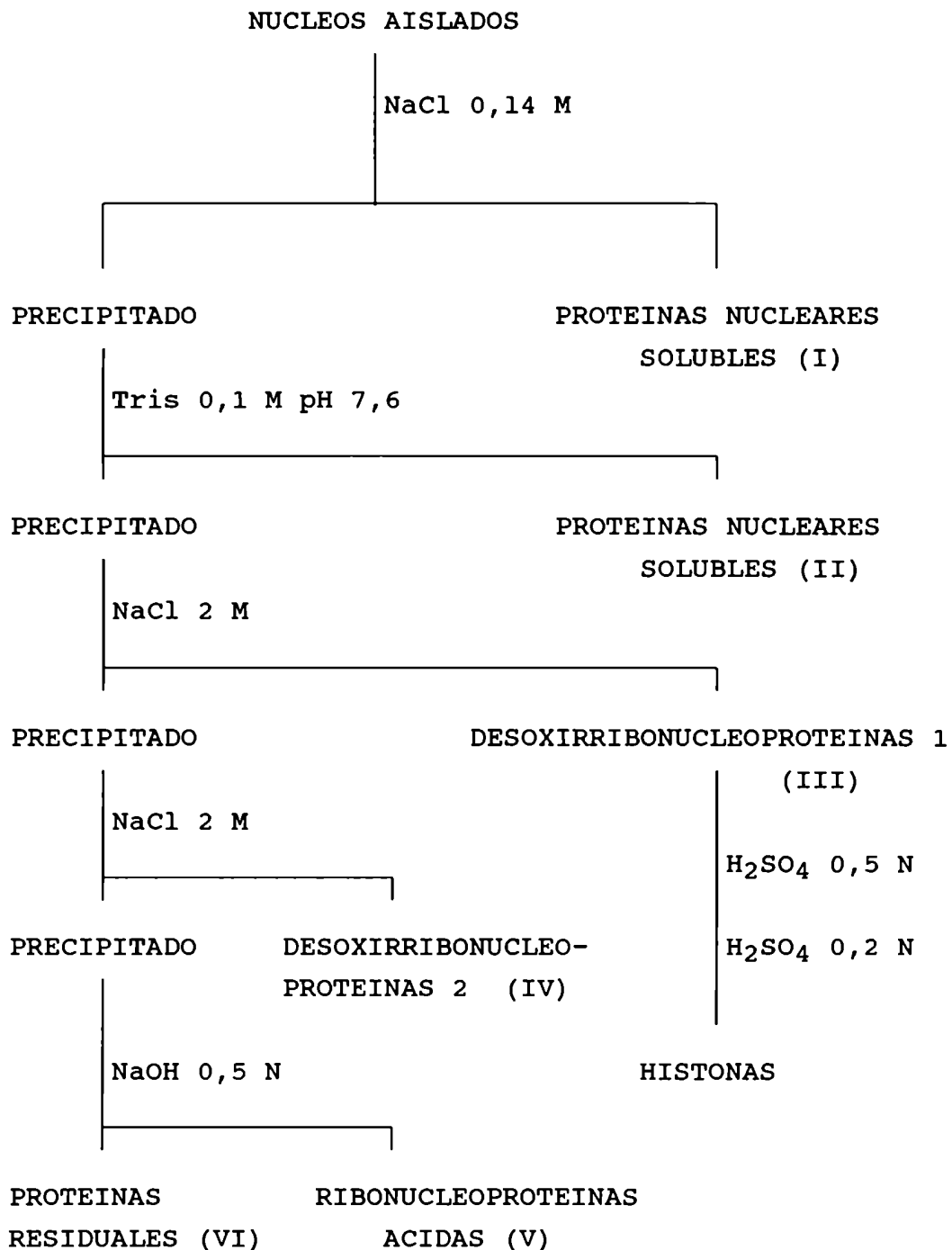


Figura 18. Obtención de diferentes fracciones de proteínas nucleares de hígado.

El precipitado se extrajo otras dos veces con NaOH 0.05 N durante 20 min con ayuda de una barrita magnética. Los dos extractos se centrifugaron , los sobrenadantes se decantaron y llevaron a pH 6, combinándolos finalmente con el primer extracto alcalino para obtener la fracción V de rinobucleoproteínas ácidas (no histonas) no ligadas al ADN. El precipitado está formado por las proteínas residuales (VI)(Figura 18).

De esta fracción residual de desoxirribonucleoproteínas-1 (III) ya obtenidas, se extrajeron las histonas. Se llevó el extracto de NaCl 2 M a 4 °C y se trató con una concentración final de H₂SO₄ 0.5 N. Se centrifugó a 20000 x g (20 min) y el precipitado se trató con H₂SO₄ 0.2 N dos veces, por homogeneización y centrifugación. Ambos sobrenadantes se combinaron y se agregó ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final del 20%. Así se obtuvieron las histonas.

En todas las fracciones, para favorecer la precipitación de las proteínas, se empleó albúmina de huevo, 15 mg/fracción. Cada fracción se lavó y secó sucesivamente con TCA 20%, etanol p.a. hasta radioactividad negativa en los líquidos de lavado. Una alícuota se reservó para la determinación del contenido de proteína por el método de Lowry (133).

La determinación de radioactividad asociada a cada una de las distintas fracciones se efectuó según lo descrito para proteínas nucleares totales (80).

**ESTUDIOS "IN VITRO" SOBRE PEROXIDACION DE LIPIDOS PROMOVIDA
POR CCl₄**

Animales y tratamientos:

Se utilizaron animales macho, adultos, de las siguientes especies: ratón C3H (25-30 g), hamster sirio dorado (80-90 g) y rata Sprague Dawley (220-240 g). Los animales fueron ayunados 12-14 horas antes de ser sacrificados (aislación de núcleos o preparación de cortes de hígado).

Incubaciones "in vitro" para estudiar la capacidad biotransformadora de CCl₄ a CHCl₃ y la actividad peroxidativa de preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales:

Los medios de incubación estuvieron constituidos por núcleos purificados de hígado de la especie en cuestión (2.0-2.5 mg de proteína nuclear/ml de medio, determinada por el método de Lowry (133)), 50 ul de una solución alcohólica de CCl₄ (concentración final: 0,2 mM) y 1 ml de sistema generador de NADPH, con el cual se iniciaron las incubaciones. Su composición era: 0.5 ml de MgCl₂ 0,15 M, 0,5 ml de buffer sacarosa-TKM 0,25M, 10 ul de isocítrico deshidrogenasa tipo I de corazón porcino (Sigma Chem. Co), 4,68 mg de dl-isocitrato de sodio y 1,72 mg de NADP sal de sodio. El medio de incubación se constituyó con sacarosa-TKM 0,25 M (sacarosa 0,25 M en buffer Tris-HCl pH 7,5/KCl 2,5 mM/MgCl₂ 5 mM), necesario para la estabilidad de la suspensión nuclear en esas condiciones (volumen final: 5 ml). Las incubaciones

fueron de 60 min a 37 °C, en atmósfera aerobia o anaerobia, según correspondiera. Cada muestra (con o sin sistema generador de NADPH) se hizo por triplicado. La reacción se interrumpió con ácido tricloroacético a una concentración final de 10%. Luego de equilibrar 1 hora a 37 °C, se tomó una alícuota (400 ul) del espacio cabeza de cada muestra y se inyectó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama, en las condiciones que se detallan a continuación:

temperatura de inyección: 170 °C.

columna: Porapak QS (Waters Assoc.), 80-100 mesh, 1 m x 2 mm D.I..

gas portador: nitrógeno (velocidad: 30 ml/min, presión en cabeza de columna: 16 psi).

temperatura de columna: 140 °C (isotérmico).

temperatura de detector: 200 °C.

atenuación: 1×10^{-10} - 3×10^{-11} amp/mV.

La cuantificación de CHCl_3 en las muestras se efectuó por comparación con una curva de calibración adecuada, realizada el mismo día.

La cuantificación de n-pentano se efectuó por comparación con una curva de calibración realizada el mismo día, a partir de un estandar gaseoso de hidrocarburos en nitrógeno (Supelco, Inc.).

Preparación de cortes delgados ("slices") de hígado:

Los cortes delgados de hígado de las tres especies se prepararon con un micrótopo de mano tipo Stadie Riggs, obteniéndose fetas de un espesor de ca. 500 um que se utilizaron inmediatamente.

Incubaciones "in vitro" para estudiar la capacidad biotransformadora de CCl₄ a CHCl₃ y la actividad peroxidativa de cortes de hígado de diferentes especies animales:

Los medios de incubación estuvieron constituidos por: cortes delgados de hígado (400 mg de tejido húmedo), 50 ul de una solución alcohólica de CCl₄ (concentración final 0,2 mM) y 6 ml de solución de Krebs-Ringer/glucosa. Esta solución está constituida del siguiente modo:

Solución A: NaCl 0,14 M/KCl 6 mM/CaCl₂ 3 mM/MgSO₄ 1,5 mM/
/KH₂PO₄ 1,5 mM.

Solución B: buffer Na₂HPO₄ 0,1 M pH 7,4 (con HCl).

Se mezclan 100 ml de solución A con 10 ml de solución B y 200 mg de glucosa.

Las muestras se incubaron por dos horas a 37 °C, deteniéndose la reacción con ácido tricloroacético a una concentración final de 10%. Luego siguió el procedimiento descrito más arriba bajo el título: "Incubaciones "in vitro" para estudiar la capacidad biotransformadora de CCl₄ a CHCl₃ y la actividad peroxidativa de preparados nucleares hepáticos de diferentes especies animales".

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON
BASES DEL ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Sistema modelo de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$.
Reacción con bases del ADN:

La mezcla de reacción consistió en una solución saturada (a temperatura ambiente, conc. final aprox. 10 mM) en etanol absoluto de la base en cuestión, 1M en CCl_4 más el agregado de 1 mg de peróxido de benzoilo , con un volumen final de 5 ml. Se calentó a 80°C por 16 horas en ampolla, bajo atmósfera de nitrógeno. Se efectuaron simultáneamente controles, en ausencia de CCl_4 o de peróxido o de la base en cuestión. Se siguió luego el calentamiento por una hora más a 110 °C con el objeto de consumir el exceso de peróxido. La mezcla se enfrió con hielo, se transfirió a otra ampolla y se evaporó a sequedad (40 °C con corriente de nitrógeno). Para remover trazas de agua se agregó un pequeño volumen de diclorometano y se llevó a sequedad nuevamente (dos veces). La derivatización del residuo de evaporación se efectuó con una mezcla de BSTFA:acetonitrilo (1:1) (0,1 ml por mg de base) y las condiciones de reacción fueron 140 °C por 30 min. La técnica de derivatización resultó de una adaptación de la descripta por Dizdaroglu (165).

El análisis de una alícuota del derivatizado se realizó por CGL con detección por ionización de llama (FID) o por captura de electrones (CE). Las condiciones fueron las siguientes:

temperatura de inyector: 200 °C

modo de inyección: directo (vol. de inyección: 2 ul).

gas portador: nitrógeno (flujo: 30 ml/min, presión en cabeza de columna: 25 psi)

columna: 3% OV-1 en Gas Chrom Q, 80-100 mesh, 2 m x 2 mm D.I.
temperatura de columna: 90 °C por 2 min, luego hasta 280 °C a
una velocidad de 8 °C/min
temperatura de detector: 280 °C

INTERACCION DE RADICALES LIBRES TRICLOROMETILO CON AMINOACIDOS

Sistema modelo de generación de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$.

Reacción con aminoácidos:

A continuación se describe el procedimiento general empleado, basado en la metodología utilizada en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (79). En determinados casos (ej. metionina, fenilalanina, etc) se efectuaron modificaciones que se detallan oportunamente:

A cinco mililitros de una solución 1 M de CCl_4 en etanol absoluto se agregaron 1 mg de peróxido de benzoílo y el aminoácido (en la forma de clorhidrato del ester etílico o metílico) en una concentración final de 10-15 mM. Se calentó a 85 °C por 16 horas en ampolla cerrada, bajo atmósfera de nitrógeno. Se efectuaron simultáneamente controles, en ausencia de peróxido o de CCl_4 o del aminoácido en cuestión. Se siguió luego el calentamiento por una hora más a 110 °C con el propósito de destruir el exceso de peróxido. La mezcla se enfrió con hielo, se transfirió a otra ampolla y se evaporó a sequedad (40 °C con corriente de nitrógeno). Con la intención de remover trazas de agua se agregó un pequeño volumen de diclorometano y se llevó nuevamente a sequedad (dos veces). Luego se siguió la derivatización por dos modos alternativos:

a) sililación con una mezcla de BSTFA:acetonitrilo (1:1) en un exceso de 30 molar sobre el aminoácido, a 150 °C por 15 min o dos horas, según el aminoácido, de acuerdo con el método descrito por W. Gehrke et al. (166).

b) trifluoracetilación con una mezcla de anhídrido trifluoroacético:acetato de etilo (1:1), 80 °C por 15 min, de acuerdo con Leimer et al. (167).

El análisis de una alícuota del derivatizado se realizó por CGL con detección por FID o por CE. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

temperatura del inyector: 250 °C

modo de inyección: directo (vol.de inyección: 1-2 ul)

gas portador: nitrógeno (flujo: 30 ml/min, presión en cabeza de columna: 22 psi)

columna: 1% OV-17 en Gas Chrom Q, 80-100 mesh, 2 m x 2 mm D.I.

temperatura de columna: 90 °C por 1 min, luego a 5 °C/min hasta 225 °C

temperatura del detector: 250 °C

Se hace notar que para varios de los aminoácidos fueron ensayadas también otras columnas y programas de temperatura con el objeto de cubrir un rango más o menos amplio de polaridad y peso molecular de los productos de reacción. Es así que algunas de las muestras se analizaron también en columnas de 1% OV-1 en Gas Chrom Q, 80-100 mesh, 2m x 2mm D.I. y 3% OV-210 en Gas Chrom Q, 80-100 mesh, 2 m x 2 mm D.I.

Composición de aminoácidos en proteínas microsomales de animales intoxicados con CCl₄:

Para el estudio sobre contenido de aminoácidos en proteínas microsomales hepáticas se utilizaron ratas Sprague

Dawley macho (200-280 g) ayunadas durante las 12-14 horas previas al tratamiento. El tóxico fue administrado intraperitonealmente como una solución al 20% (v/v) en aceite de oliva, en una dosis de 5 ml/kg (1 ml CCl₄/kg). Los controles recibieron una cantidad equivalente de aceite.

Pasadas 6 horas de intoxicación los animales fueron sacrificados y sus hígados rápidamente procesados. El tiempo de intoxicación elegido resulta de un compromiso entre una máxima probabilidad de unión covalente y un tiempo máximo al cual aún no ha comenzado la necrosis.

Obtención de microsomas de hígado de rata (41):

Se emplearon animales macho adultos jóvenes. Los animales tuvieron libre acceso a agua y se ayunaron 12-14 hs., previo a ser sacrificados. Se decapitaron y desangraron inmediatamente, retirando los hígados. Desde ese momento, todo el material se manipuló a 4 °C. Los hígados se homogeneizaron con 4 volúmenes de KCl 1.15%, en un homogeneizador de vidrio/teflón tipo Potter-Elvehjem. El homogenato se centrifugó a 9.000 x g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se sometió a ultracentrifugación a 105.000 x g por una hora. El pellet de microsomas resuspendido en un volumen adecuado se empleó para aislar proteínas totales o en las incubaciones para los estudios "in vitro".

Determinación del contenido de aminoácidos en proteínas microsomales hepáticas de ratas intoxicadas con CCl₄:

Luego de obtenidos los microsomas de los animales

tratados, las proteínas fueron aisladas, precipitando la suspensión con ácido tricloroacético (TCA) 10%. Luego siguió un calentamiento en TCA 5% a 85-90 °C durante 30 minutos (hidrólisis de ARN). Finalmente las proteínas se lavaron sucesivamente con etanol: éter etílico:cloroformo (2:2:1), acetona y éter. El primer lavado se repitió cinco veces para asegurar la completa delipidación, pues los lípidos interfieren en el análisis cromatográfico.

Una alícuota se disolvió en ácido fórmico concentrado y se hidrolizó con HCl 6N a 110 °C durante 24 horas, en vacío.

El análisis cromatográfico se realizó en un analizador de aminoácidos que opera con columnas de resinas de intercambio iónico, elución con distintos buffers y detección espectrofotométrica previa reacción con ninhidrina, todo el proceso hecho en forma automática. En líneas generales se sigue el procedimiento descrito por Moore y Stein (168).

INTERACCION DE RADICALES TRICLOROMETILO CON METIONINA

Sistema modelo de generación de radicales triclorometilo.

Reacción con metionina:

A cinco mililitros de una solución 1 M de CCl_4 en etanol absoluto se agregó 1 mg de peróxido de benzoilo y 10 mg de l-metionina (13.6 mg dl-metionina ester etílico). Se efectuaron simultáneamente controles, en ausencia de CCl_4 o de peróxido o de aminoácido. Se calentó a 85 °C por 16 horas en una ampolla, bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se siguió una hora más a 110 °C con el propósito de destruir el exceso de peróxido. La mezcla se enfrió con hielo, se transfirió a

un vial con tapa con septum dejando equilibrar la muestra a 60 °C por una hora. Se tomó una alícuota (400 ul) del espacio cabeza de cada muestra y se inyectó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, en las condiciones que se detallan a continuación:

Temperatura de inyección: 200 °C.

Modo de inyección: "splitless" (tiempo de purga: 30 seg).

Columna: Ultra 1 (metil silicona, Hewlett Packard), 25 m x 0,32 mm D.I., (espesor de film: 0.52 um).

Gas portador: helio (velocidad lineal: 42 cm/seg, presión en cabeza de columna: 85 kPa).

Temperatura de columna: 35 °C por 2 minutos, luego a 5 °C/min hasta 70 °C.

Temperatura de interfase: 280 °C.

Temperatura de la fuente de ionización: ca. 200 °C.

Energía de ionización: 70 eV.

Rango de barrido: 10 a 250 a.m.u..

Velocidad de barrido: 1.12 scan/seg..

Voltaje electromultiplicador: 2000-2200 volts.

Cada pico del cromatograma fue comparado contra la biblioteca de espectros disponible en la computadora, confirmándose su identificación.

Estudios "in vitro" para la formación de productos de interacción de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina:

Animales y tratamientos:

El sistema enzimático de la oxidasa de función mixta es fácilmente inducible por numerosos compuestos. La forma de P450 que cataliza la reducción del CCl_4 puede inducirse con fenobarbital, incrementando así el metabolismo del tóxico.

Con ese propósito, ratas Sprague Dawley macho (80- 100 g) se trataron durante tres días con una dosis diaria intraperitoneal de fenobarbital sódico, 80 mg/kg, en solución fisiológica. En el cuarto día y con un ayuno previo de 12-14 hs., los animales fueron utilizados para la obtención de microsomas de hígado.

Incubaciones "in vitro" para estudiar las interacciones de radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ con metionina:

El medio de incubación estuvo constituido por: microsomas de hígado de rata, preinducidos (10.5-11.0 mg de proteína microsomal/ml de medio, determinada por el método de Lowry (133)), 5 ul de una solución alcohólica de CCl_4 (concentración final:3 mM), dl-metionina o dl-metionina éster etílico, 1 mM y 0.3 ml de sistema generador de NADPH, con el cual se iniciaron las incubaciones. Su composición era: 0,3 ml de MgCl_2 0,15 M, 0,3 ml de buffer, K_2HPO_4 20 mM, pH 7.4, 10 ul de isocítrico deshidrogenasa tipo I de corazón de porcino (Sigma Chem. Co.), 3.10 mg de dl-isocitrato de sodio y 1.15 mg de NADP sal de sodio.

El medio de incubación se constituyó con buffer K_2HPO_4 20 mM, pH 7.4, llevando a un volumen final de 3 ml.

Las incubaciones fueron de 60 min a 37 °C en atmósfera de nitrógeno. Se llevaron a cabo simultáneamente controles, en ausencia de sistema generador de NADPH o de CCl_4 (cada muestra por triplicado).

Al cabo de una hora de incubación, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y luego de agregar 1,8 g de MgSO_4 , los frascos se cerraron con tapas con septum. Se dejó equilibrar una hora a 60 °C y se analizó una alícuota del espacio cabeza de cada muestra mediante cromatografía

gaseosa/espectrometría de masas, en el modo de monitoreo selectivo de iones. Las condiciones cromatográficas fueron idénticas a las descritas anteriormente.

Las masas seleccionadas fueron: 46 y 31 (etanol); 48, 47, 34 y 33 (metanotiol); 118, 120, 83 y 47 (CCl₄) y 94, 79, 64, 61 y 45 (dimetildisulfuro).

Para cada masa se seleccionó un tiempo de residencia (dwell time) de 100 mseg.

Biotransformación microsomal de dimetildisulfuro.

Incubaciones "in vitro":

El medio de incubación fue similar al de los estudios descritos anteriormente salvo que fueron omitidos el CCl₄ y el aminoácido y se agregó 10 ul de una solución alcohólica de dimetil disulfuro, de modo de lograr una concentración final de 1 mM. Los microsomas inactivados por calor se obtuvieron calentando la suspensión a 100 °C por 5 minutos previamente a efectuar la incubación.

Las incubaciones se llevaron a cabo a 37 °C por 60 min, en atmósfera de aire a nitrógeno. Se detuvieron enfriando en baño de hielo, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito.

INTERACCION DE RADICALES TRICLOROMETILO CON FENILALANINA

Sistema modelo de generación de radicales triclorometilo.

Reacción con fenilalanina:

Se disolvieron 10.0 mg de N-acetil-d,l-fenilalanina éster metílico y 1 mg de peróxido de benzoílo en 5 ml de tetracloruro de carbono. Se calentó a 85 °C por 16 horas en una ampolla, bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se siguió el calentamiento a 110 °C por una hora más con el propósito de destruir el exceso de peróxido. Una vez en frío, se analizó una alícuota de la mezcla de reacción por CGL/EM. Se efectuaron simultáneamente controles en ausencia de peróxido o del aminoácido.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

temperatura del inyector: 250 °C

modo de inyección: "splitless" (tiempo de purga: 30 seg)

columna: Ultra 2 (5% fenilmetilsilicona, Hewlett Packard),

25 m x 0,32 mm D.I., espesor de film: 0,52 um

gas portador: helio (velocidad lineal: 46 cm/seg, presión en cabeza de columna: 90 kPa)

temperatura de columna: 100 °C por un minuto, luego a 10 °C/min hasta 280 °C

temperatura de interfase: 280 °C temperatura de la fuente de ionización: ca. 200 °C

energía de ionización: 70 eV

rango de barrido: 30 a 650 u.m.a.

velocidad de barrido: 0,70 scan/seg

voltaje de electromultiplicador: 2400 volts

Estudios "in vitro" para la formación de productos de interacción entre radicales $\cdot\text{CCl}_3$ y fenilalanina.

Animales y tratamientos:

Para las incubaciones "in vitro" se utilizaron preparados microsomales hepáticos de ratas Sprague Dawley preinducidas con fenobarbital. El tratamiento de los animales y la posterior obtención de los microsomas ya fueron descritos en la sección correspondiente bajo el título "Estudios "in vitro" para la formación de productos de interacción entre radicales $\cdot\text{CCl}_3$ y metionina".

Incubaciones "in vitro" para estudiar las interacciones entre radicales $\cdot\text{CCl}_3$ y fenilalanina:

Las incubaciones se realizaron de modo análogo a lo descrito para el caso del aminoácido metionina (ver la sección anterior). Se ensayaron fenilalanina, fenilalanina ester metílico y N-acetil fenilalanina ester metílico.

El análisis de las muestras (espacio cabeza de cada frasco de incubación) se realizó por CGL/EM. Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

temperatura del inyector: 150 °C

modo de inyección: split (10:1)

columna: Ultra 1 (metilsilicona, Hewlett Packard), 25 m x 0,32 D.I., espesor de film: 0,52 μm .

gas portador: helio (velocidad lineal: 35 cm/seg, presión en cabeza de columna: 80 kPa).

temperatura de columna: 60 °C, isotérmica.

temperatura de interfase: 200 °C.

temperatura de la fuente de ionización: ca. 200 °C.

energía de ionización: 70 eV.

Con el objeto de incrementar la sensibilidad se utilizó el modo de detección por monitoreo selectivo de iones (SIM).

Las masas seleccionadas fueron 78, 52, 51 y 50. El tiempo de residencia seleccionado para cada masa fue de 100 milisegundos.

BIBLIOGRAFIA

1. W.F. Oettingen. The halogenated aliphatic, olefinic, cyclic, aromatic hydrocarbons including the halogenated insecticides, their toxicity and potential dangers; 75. USHEW Publication No 414, Washington DC (1985).
2. IARC Monograph 1, 53. International Agency for Research on Cancer, Lyon (1972).
3. L. Fishbein. Mut. Res., 32, 267 (1976).
4. IARC Monograph 20, 371. International Agency for Research on Cancer, Lyon (1979).
5. National Academy of Sciences. "Chloroform, carbon tetrachloride, and other halomethanes: An environmental assessment", 1-249, Washington DC (1978).
6. US.EPA: "Ambient water quality criteria for carbon tetrachloride", EPA 440/5-80-026. US.EPA, Washington DC (1980).
7. Y.T. Woo; D. Lai; J. Arcos y M. Argus. Chemical Induction of Cancer, Vol IIIB; 37-149, Academic Press, New York (1985).
8. IARC Monograph, Supplement 7 to Vols 1 to 42, p 143. International Agency for Research on Cancer, Lyon (1987).
9. US.EPA: "Health assessment document for carbon tetrachloride", EPA 600/8-82-001. Environmental Criteria and Assessment Office, EPA, Cincinnati, Ohio (1983).
10. T.F. Slater. Nature 209, 36 (1966).
11. R.O. Recknagel. Pharmacol. Rev. 19, 145 (1967).
12. R.O. Recknagel y E.A. Glende. Crit. Rev. Toxicol. 2, 263 (1973).
13. E.A. Smuckler. Environ. Health Perspec. 15, 13 (1976).
14. E.S. Reynolds y M.T. Moslen, en "Free Radicals in Biology" (W.A. Pryor, ed.), 4, 44 (1980).

15. J.A. Castro. Proc. 9th IUPHAR Intl. Congress Pharmacol. 2, 243 (1984).
16. H. Sasame; J.A. Castro y J.R. Gillette. Biochem. Pharmacol. 17, 1759 (1968).
17. M.I. Díaz Gomez; C.R. de Castro; N. D'Acosta; O.M. de Fenos; E.C. de Ferreyra Y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 34, 102 (1975).
18. T.E. Gram y J.R. Gillette, en "Fundamentals of Biochemical Pharmacology", pp. 571, Pergamin Press Ltd., New York (1971).
19. T.E. Gram. Extrahepatic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds, pp. 1 al 580. SP Medical & Scientific Books, New York (1980).
20. J.A. Castro. Acta Bioq. Clin. Latinoam. 19, 201 (1985).
21. I. Glenn Sipes y J. Galdolfi. En "Casarett and Doull's Toxicology- The basic science of poisons", (C.D. Klaassen; M. Amdur y J. Doull, eds.), pp 64, MacMillan Publishing Co.; New York (1986).
22. G.D. Castro y J.A. Castro. Acta Bioq. Clin. Latinoam., 22, 221 (1988).
23. T.F. Slater. En " Free radicals, lipid peroxidation and cancer", (D.C. Mc Brien y T.F. Slater, eds.), 243, Academic Press, New York (1982).
24. T.L. Macdonald. Crit Rev. Toxicol. 11, 85 (1983).
25. K. Cheeseman; E. Albano; A. Tomasi y T.F. Slater. Environ. Health Perspec. 64, 85 (1985).
26. E. Janzen; H. Strouks; C. Dubose; J.L. Poyer y P.B. Mc Cay. Environ. Health Perspec. 64, 151 (1985).
27. M.W. Anders y L.R. Pohl. En " Bioactivation of foreing compounds "; (M.W. Anders, ed), 283, Academic Press, New York (1985).
28. M.C. Villarruel; E.G.D. de Toranzo y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 337 (1977).

29. J.A. Castro; M.I. Díaz Gomez; E.C. de Ferreyra; C.R. de Castro; N. D'Acosta y O.M. de Fenos. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 315 (1972).
30. E.G.D. de Toranzo; M.C. Villarruel y J.A. Castro. Toxicology 10, 39 (1978).
31. C.R. de Castro; A.S. Bernacchi; E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Toxicology 11, 289 (1978).
32. J.A. Castro; M.I. Díaz Gomez; E.C. de Ferreyra; C.R. de Castro; N. D'Acosta y O.M. de Fenos. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 337 (1973).
33. M.I. Díaz Gomez y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 27, 191 (1980).
34. C.R. de Castro; A.S. Bernacchi; M.C. Villarruel; G. Fernandez y J.A. Castro. Agents and Actions 15, 664 (1984).
35. M.C. Villarruel; G. Fernandez; E. Aguilar y J.A. Castro J. Appl. Toxicol. 7, 173 (1987).
36. A.E. Mac Lean. Biochem. Pharmacol. 16, 2030 (1967).
37. J.A. Castro; H.A. Sasame y J.R. Gillette. Pharmacologist 9, 203 (1967).
38. J.A. Castro y M.I. Díaz Gomez. Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 541 (1972).
39. N. D'Acosta; J.A. Castro; E.C. de Ferreyra; M.I. Díaz Gomez y C.R. de Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 4, 641 (1972).
40. J.A. Castro; C.R. de Castro; N. D'Acosta; M.I. Díaz Gomez y E.C. de Ferreyra. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 273 (1973).
41. M.I. Díaz Gomez; J.A. Castro; E.C. de Ferreyra; C.R. de Castro y N.D'Acosta. Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 534 (1973).
42. J.A. Castro; E.C. de Ferreyra; C.R. de Castro; M.I. Díaz Gomez; N. D'Acosta y O.M. de Fenos. Toxicol. Appl. Pharmacol. 24, 1 (1973).

43. J.A. Castro; C.R. de Castro; O.M. de Fenos; E.C. de Ferrera; M.I. Díaz Gomez y N. D'Acosta. *Pharmacol. Res. Comm.* 4, 185 (1972).
44. H. Uehleke; K. Hellmer y S. Tabarelli. *Xenobiotica* 3, 1 (1973).
45. J.R. Trudell; R. Bösterling y A.J. Trevor. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 79, 2678 (1982).
46. B.F. Trump; E.M. Mc Dowell y A.U. Arstila. En " Principles of Pathobiology", R.B. Hill y M. La Via, eds., pp 20, Oxford University Press, New York, (1980).
47. B.F. Trump; K. Laiho; W. Mergner y A.U. Arstila. *Beitr. Pathol.* 152, 243 (1974).
48. E.A. Smuckler y J.L. James. *Pharmacol. Rev.* 36, 775 (1984).
49. R.O. Recknagel. *Pharmacol. Rev.* 19, 145 (1967).
50. T.F. Slater. " Free radical mechanisms of liver injury" Pion Ltd., London (1972).
51. E.A. Smuckler. Structure and function of the endoplasmic reticulum in animal cells. Universitetsforlaget, Oslo, (1968)
52. E.A. Smuckler y M. Arcasoy. *Intl. Rev. Exptl. Pathol.* 7, 305 (1969).
53. E.S. Reynolds y M.T. Moslen. En " Toxic injury of the liver ", B.E. Farber y M.M. Fischer eds., pp 541, M. Decker New York, (1980).
54. R.O. Recknagel. *Trends Pharmacol. Sci.* 129 (1983).
55. J.R. Mitchell; C.V. Smith; B. Lauterburg; H. Hughes; G. Corcoran y E.C. Horning. En " Drug metabolism and drug toxicity ", J.R. Mitchell y M.G. Homing, eds., pp 301-319, Raven Press, New York, (1984).
56. M.V. Dianzani. *Proc. Nutr. Soc.* 46, 43 (1987).
57. C. Klaassen y G.L. Plaa. *Biochem. Pharmacol.* 18, 2019 (1969).
58. G.D. Castro y J.A. Castro. *Toxicology* 35, 319 (1985).

59. A.S. Bernacchi; C.R. de Castro; E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Brit. J. Exptl. Pathol. 63, 35 (1982)
60. L. Moore; G.R. Davenport y E.S. Landon. J. Biol. Chem. 251, 1197 (1976).
61. A. Marzi; E.G.D. de Toranzo y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 52, 82 (1980).
62. E.G.D. de Toranzo; E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Brit. J. Exptl. Pathol. 64, 166 (1983).
63. E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 40, 515 (1983).
64. E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Toxicol. Lett. 21, 173 (1984).
65. E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 46, 289 (1984).
66. E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 47, 289 (1985).
67. M.C. Villarruel; G. Fernandez; E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 83, 287 (1986).
68. E.C. de Ferreyra; A.S. Bernacchi y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 53, 399 (1986).
69. G. Fernandez; M.C. Villarruel; E.C. de Ferreyra; O.M. de Fenos y J.A. Castro. J. Appl. Toxicol. 6, 413 (1986).
70. A.S. Bernacchi; G. Fernandez; M.C. Villarruel; E.C. de Ferreyra; C.R. de Castro; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Exptl. Mol. Pathol. 48, 286 (1988).
71. E.C. de Ferreyra; M.C. Villarruel; A.S. Bernacchi; G. Fernandez; O.M. de Fenos y J.A. Castro. Arch. Toxicol. en prensa (1989).
72. M.C. Villarruel y J.A. Castro. Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 108 (1973).
73. M.C. Villarruel y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 105 (1975).

74. M.C. Villarruel; M.I. Díaz Gomez y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 33, 106 (1975).
75. B. Link; H. Dürk; D. Thiel y H. Frank. Biochem. J. 223 577 (1984).
76. G.A. Ansari; M.T. Moslen y E.S. Reynolds. Biochem. Pharmacol. 31, 3509 (1982).
77. C. Cessi; C. Colombini y L. Mameli. Biochem. J. 101, 46 (1966).
78. E.S. Reynolds. J. Pharmacol. Exptl. Ther. 155, 117 (1967).
79. M.C. Villarruel y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 28, 79 (1980).
80. M.I. Díaz Gomez y J.A. Castro. Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 199 (1980).
81. P. Rocchi; G. Prodi; S. Grilli y A.M. Ferrari. Intl. J. Cancer. 11, 419 (1973).
82. M.I. Díaz Gomez y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 32, 147 (1981).
83. G. Fernandez; M.C. Villarruel; E.G.D. de Toranzo y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 35, 283 (1982).
84. D. Kitta; M. Schwarz; H. Tennekes; H. Uehleke y W. Kunz En " Biological Reactive Intermediates ", vol.2, (R. Snyder ed.), pp 769, Plenum Press, New York (1982).
85. E.N. Frankel. Progress Lipid Res. 22, 1 (1982).
86. E.N. Frankel. Progress Lipid Res. 23, 197 (1985).
87. E.N. Frankel. Chem. Phys. Lipids 44, 73 (1987).
88. H. Esterbauer. En " Free radicals, lipid peroxidation and cancer ", D. Mc Brien y T.F. Slater eds., pp 101-122, Academic Press, New York (1982).
89. A. Sevanian y P. Hochstein. Ann. Rev. Nutr. 5, 365 (1985).
90. B. Halliwell y J.M.C. Gutteridge. Molec. Aspects Med. 8, 89 (1985).

91. A. Horton y S. Fairhurst. CRC Crit. Rev. Toxicol. 18, 28 (1987).
92. H. Kappus. Chem. Phys. Lipids 45, 105 (1987).
93. T.F. Slater. Biochem. J. 222, 1 (1984).
94. G. Poli; E. Albano y M. Dianzani. Chem. Phys. Lipids 45, 117 (1987).
95. C. Fraga, S. Llesuy y A. Boveris. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 34, 41 (1984).
96. M.C. Villarruel; E.G.D. de Toranzo y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 14, 193 (1976).
97. E.G.D. de Toranzo y J.A. Castro. Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol 29, 385 (1980).
98. R. Suss; V. Kunzel y J. Scribner. Cancer. Experiments and concepts, pp 1-275, Springer Verlag, New York (1986).
99. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVII, 3 (1983)
100. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVII, 213 (1983).
101. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVII, 203 (1983).
102. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVI, 243 (1982).
103. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVII, 369 (1983).
104. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XV, 363 (1981).
105. J. Castro. Acta Bioquim. Clin. Latinoam., XVI, 3 (1982).
106. G.M. Williams y J.H. Weisburger. En " Casarett and Doull's Toxicology ", C.D. Klaassen, M. Amdur y J. Doull eds. pp 99, MacMillan Publishing Co., New York (1986).
107. E.C. Miller y J.A. Miller. Cancer, 47, 2327 (1981).
108. G. Della Porta, B. Terracini y P. Schubik. J. Natl. Cancer Inst., 26, 855 (1961).

109. J.E. Edwards. J.Natl. Cancer Inst., 2, 197 (1941).
110. H.B. Andervont. J. Natl. Cancer Inst., 20, 431 (1958).
111. M.D. Reuber y E.L. Glover. J. Natl. Cancer Inst., 44, 419 (1970).
112. E.K. Weisburger. Environ. Health Perspect., 21, 7 (1977).
113. H. Uehleke, T. Werner, H. Greim y M. Kramer. Xenobiotica, 7, 393 (1977).
114. V.F. Simmon, K. Kauhanen y R.G Tardiff. En "Progress in Genetic Toxicology", D. Scott, B.A. Bridges y F.M. Sobels (eds.), pp 249, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York (1977).
115. E.D. Barber, W.H. Donish y K.R. Mueller. Mutat. Res., 90, 31 (1981).
116. B.J. Dean y G. Hudson-Walker. Mutat. Res., 64, 329 (1979).
117. J.C. Mirsalis y B.E. Butterworth. Carcinogenesis, 1, 621 (1980).
118. V.M. Craddock y A.R. Henderson. Cancer Res., 38, 2135 (1978).
119. J.C. Mirsalis, C.K. Tyson y B.E. Butterworth. Environ. Mut., 4, 553 (1982).
120. M. Schwarz, J. Hummel, K.E. Appel, R. Rickart y W. Kung. Cancer Lett., 6, 221 (1979).
121. J.H. Gans y R. Korson. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 175, 237 (1984).
122. H. Saibner, K. Mc Carthy y D. Doolittle. Bamerry Repor 25, 355 (1987).
123. D. Doolittle, G. Muller, H. Scribner J. Toxicol. Environm. Heath, 22, 63 (1987).
124. M. Busser y W. Lutz. Carcinogenesis, 8, 1433 (1987).
125. P. Garberg, E. Akerblom y G. Bolcsfoldi. Mut. Res., 203, 155 (1988).

126. R. Crebelli, R. Benigni, J. Franekic, G. Conti, L. Conti y A. Carere. *Mut. Res.*, 201, 401 (1988).
127. M. Linet y J.A. Blattner. En "Chronic lymphocytic leukemia", (Polliak Et al., eds.), pp 11, Harwood Acad. Publ., New York (1988).
128. G.C. Millner. *Dis. Abstrac. Int. (B)*, 49, 3129 (1989).
129. J. Darnell, H. Lodish y D. Baltimore. "Molecular cell biology", Scientific American Books, New York (1986).
130. B. Alberts, O. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. Watson. *Molecular biology of the cell*", Garland Pub. Inc., New York (1983).
131. J. Watson, N. Hopkins, J. Roberts, J. Steitz y A.M. Weiner. *Molecular biology of the gene*, vol. 1, Th Benjamin - Cummings Publishing Co. Inc., Menlo Park, California (1987).
132. E.D.P. De Robertis y E.M.F. De Robertis. *Cell and Molecular biology*, Lea and Febiger, Philadelphia (1987).
133. O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr y R. Randall. *J. Biol Chem.*, 193, 265 (1951).
134. E. Layne, en "Methods in enzymology", (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, eds.), vol. 3, pp 451, Academic Press, New York
135. I.F. Orumbo, S. Banerjee y B.L. Van Duuren. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 24, 320 (1983).
136. W.T. Stott, R.H. Reitz, A.M. Schumann y P.G. Watanabe *Food Cosmet. Toxicol.*, 19, 567 (1981).
137. J.H. Weisburger y G.M. Williams. *Environ. Health Perspect.*, 50, 233 (1983).
138. K. Hooper. *Clin. Toxicol.*, 22, 283 (1984).
139. F.P. Perera. *Environ. Res.*, 34, 175 (1984).
140. J. McCann, E. Choi, E. Yamasaki y B.N. Ames. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 5135 (1975).
141. M. Meselson y K. Russel. En "Origins of human cancer", H. Hiatt, J. Watson y J. Winston (eds.), pp 1473, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1977).

142. I.F. Oruambo y B.L. Van Duuren. *Cancer Lett.*, 37, 31 (1987).
143. G.N. Levy y M.J. Brabec. *Tox. Lett.*, 22, 229 (1984).
144. M.I. Díaz Gómez y J.A. Castro. *Cancer Lett.*, 9, 21 (1980).
145. A.B. Di Renzo, A.J. Gandolfi e I.G. Sipes. *Toxicol. Lett.*, 11, 243 (1982).
146. D.F. Cullen, C.R. Wolf y R.M. Philpot. *Mut. Res.*, 77, 55 (1980).
147. J.P. Seiler. *Mut. Res.*, 46, 305 (1977).
148. G. Brambilla, A.M. Bassi, P. Faggin, M. Ferro, R. Finollo, A. Martelli, L. Sciaba y U.M. Murinari. En "Free Radicals in Liver Injury", G. Poli, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani y T.F. Slater (eds.), pp 59, IRL Press, Oxford (1985).
149. D.B. Yarosh. *Mut. Res.*, 145, 1 (1985).
150. J.I. Goodman, R.L. Vorce y B.L. Baranyi-Funlong. *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 354 (1986).
151. M. Gronow. *Chem. Biol. Interact.*, 29, 1 (1980).
152. R.A. Weinsberg. *Cancer Res.*, 36, 149 (1982).
153. I.B. Weinstein. *J. Cell Biochem.*, 33, 213 (1987).
154. H. Remmer, W. Kessler, H. Einsele, T.H. Hintze, G. Díaz de Toranzo, A.M. Gharaibeh y H. Frank. *Drug. Met. Rev.*, 20, 219 (1989).
155. M. Fitchett, B.C. Gilbert y M. Jeff. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, B 311, 517 (1985).
156. M. Lieberman, T. Kunishi, L.W. Mapson y D.A. Wardale. *Biochem. J.*, 97, 449 (1965).
157. G.R. Janig y D. Pfeil. En "Cytocrome P450", K. Rauckpaul y H. Rein (eds.), pp 72, Akademik-Verlag, Berlin (1984).
158. J.A. Castro y E.G. Díaz de Toranzo. *Biomed. Environ. Sci.*, 1, 19 (1988).
159. S.C. Gad y C.S. Weil. En "Principles and Methods of

Toxicology", A.W. Hayes (ed.), pp 273, Raven Press, New York (1982).

160. P.F. Swann y P.N. Magee. *Biochem.J.*, 110, 30 (1968).

161. P. Sagelsdorff, W.K. Lutz y C. Schlatter. *Carcinogenesis* 4, 1267 (1983).

162. A. Viviani, W.K. Lutz y C. Schlatter. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 191 (1978).

163. J. Vaught y E. Bresnick. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 69, 587 (1976).

164. W.J. Steele y H. Busch. *Cancer Res.*, 23, 1153 (1963).

165. M. Dizdaroglu. *J. Chrom.*, 295, 103 (1984).

166. K.R. Leimer, R.H. Rice y C.W. Gehrke. *J. Chrom.*, 141, 355 (1977).

167. K.R. Leimer, R.H. Rice y C.W. Gehrke. *J. Chrom.*, 141, 121 (1977).

168. D.H. Spackman, W.H. Stein y S. Moore. *Anal. Chem.*, 30, 1190 (1958).

RESUMEN

El estudio de los mecanismos por los cuales las sustancias químicas producen daños en un ser viviente se puede realizar de modo más simple y racional con el empleo de sistemas modelo de experimentación. El tetracloruro de carbono actuando sobre el hepatocito es un clásico en la investigación toxicológica y en patología. Todavía queda mucho por entender acerca de las reacciones químicas que ocurren entre este tóxico y los distintos componentes celulares y que son la causa primaria de todos los procesos que conducen a los varios tipos de daños observados.

En el campo de la carcinogénesis química, dos razones apoyan el empleo de este modelo experimental: el tetracloruro de carbono es un representante de una extensa familia de sustancias químicas carcinogénicas con mecanismo de acción desconocido. Por otra parte, desde el punto de vista ambiental, la carcinogénesis hepática por CCl_4 es un problema relevante por él mismo y por otros solventes clorados de amplio uso industrial.

En el presente trabajo se pretendió aportar al conocimiento de la química de las interacciones de CCl_4 con componentes celulares, actuando éste sobre el hepatocito. Además se propone una nueva hipótesis para entender el mecanismo de acción iniciadora de la carcinogénesis de este compuesto, que por su naturaleza general sería extrapolable a otros carcinógenos.

Se estudió la capacidad de interacción de metabolitos reactivos del tetracloruro de carbono (principalmente radicales libres triclorometilo) con el ADN y con proteínas nucleares, la peroxidación de lípidos hepática (total y nuclear) estimulada por CCl_4 y la biotransformación de CCl_4

a CHCl_3 en hígado (total y en núcleos); en tres especies animales con diferente respuesta a la carcinogénesis hepática inducida por CCl_4 . Ellas fueron el hamster sirio dorado, el ratón C3H y la rata Sprague Dawley.

La susceptibilidad hacia este carcinógeno sigue el orden: hamster \geq ratón C3H \gg rata Sprague Dawley = 0.

No se observó correlación entre el grado de susceptibilidad de esas especies y la intensidad de las interacciones (expresadas como unión covalente de ^{14}C) de metabolitos reactivos de CCl_4 con el ADN.

Se observó correlación, en cambio, entre la intensidad de las interacciones con proteínas nucleares totales y la respuesta carcinogénica a CCl_4 en esas especies.

Cuando se efectuaron estudios sobre distintas fracciones de las proteínas nucleares (solubles I y II, histonas, desoxirribonucleoproteínas I y II, ribonucleoproteínas ácidas y proteínas residuales) se verificó la existencia de una correlación entre intensidad de las interacciones de metabolitos reactivos de CCl_4 (unión covalente de ^{14}C) con las fracciones ácida y residual, y la respuesta carcinogénica de las tres especies al CCl_4 .

Se verificó que preparados nucleares de hígado de hamster, de ratón C3H y de rata Sprague Dawley son capaces de biotransformar CCl_4 a CHCl_3 y de estimular (en atmósfera aerobia) la peroxidación de sus lípidos en presencia de CCl_4 y en presencia o ausencia de NADPH. No hubo correlación entre peroxidación nuclear (o en tejido entero) y la conocida respuesta carcinogénica de las tres especies. Habría sin embargo alguna correlación entre la capacidad biotransformadora de CCl_4 a CHCl_3 en preparados nucleares y la susceptibilidad a la carcinogénesis por CCl_4 . No se observó lo equivalente en tejido hepático entero.

Se observaron interacciones entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$

(generados por acción iniciadora de peróxido de benzoilo sobre CCl_4) y las cuatro bases del ADN: guanina, adenina, citosina y timina (detección por FID, CE y EM). En los cuatro casos se intentó realizar la identificación estructural de los productos formados por espectrometría de masas. No se han obtenido aún resultados positivos. Las fragmentaciones generadas por los derivados trimetilsililados son escasas y ello dificulta la interpretación de los espectros (ver Resultados). Es nuestra intención proseguir en el futuro con la identificación estructural, intentando modos alternativos de derivatización u otras técnicas espectroscópicas.

Se evidenciaron interacciones entre radicales libres $\cdot\text{CCl}_3$ (generados por acción iniciadora de peróxido de benzoilo sobre CCl_4) y varios aminoácidos (fue estudiada la reacción con 18 aminoácidos). Los aminoácidos arginina, aspártico, glutámico, glicina, leucina, lisina, norleucina y valina no mostraron reaccionar de modo apreciable. Los restantes (cisteína, cistina, metionina, fenilalanina, histidina, prolina, serina, treonina, triptofano y tirosina) reaccionaron con distinto grado de intensidad. Para algunos (metionina, fenilalanina y tirosina) fue posible identificar productos de interacción, ya fuera aductos clorados, productos de fragmentación, etc.

En los casos de metionina y de fenilalanina observamos la ocurrencia de interacciones que no pueden ser consideradas como unión covalente de metabolitos reactivos o peroxidación de lípidos inducida por CCl_4 . Se trata de alteraciones inducidas sobre los aminoácidos que implican la fragmentación de la molécula. Para metionina pudimos observar la formación de dimetildisulfuro y de metanotiol, en un sistema de incubación microsomal "in vitro". Ambos productos derivarían de la fragmentación de la cadena lateral del aminoácido para dar radicales libres $\cdot\text{SCH}_3$.

Fenilalanina mostró también ser capaz de generar productos de degradación como el benceno, que fue observado en incubaciones de microsomas hepáticos.

Hemos visto que el tetracloruro de carbono, que produce una variedad de alteraciones y daños en el hígado, se metaboliza a especies muy reactivas que interaccionan con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y que esas interacciones son la causa original de las alteraciones que más o menos directamente conducirán a los efectos tóxicos visibles. Se desprende de esto la importancia que tiene conocer en lo posible la química de esas interacciones pues ello nos permitirá a su vez entender mejor cada efecto observado en los parámetros que midamos, nos permitirá predecir tipos y localizaciones de otras alteraciones probables y por último dará las pautas para diseñar tratamientos que neutralicen o eviten algunas de esas interacciones y/o sus consecuencias.

Si tenemos en cuenta además la relevancia del sistema CCl_4 -hepatocito como modelo experimental de daño celular, extrapolable a situaciones de otros tóxicos-hepatocito, CCl_4 -otros órganos, otros tóxicos-otros órganos o aún otros tóxicos-otros seres vivos, resulta obvio el interés que para nosotros y otros laboratorios tiene investigar en este campo, por la generalidad que puede asignarse a los resultados que se obtengan (15, 158).

En este trabajo se ha pretendido aportar al conocimiento de las interacciones de metabolitos reactivos de CCl_4 con aminoácidos y bases de ácidos nucleicos, pues es muy poco lo realizado hasta ahora en el tema. Somos conscientes de la cantidad de trabajo experimental que implican estos objetivos pero justamente nuestra intención es continuar con esta línea en el futuro.

Un hallazgo a nuestro juicio novedoso, comprende a los

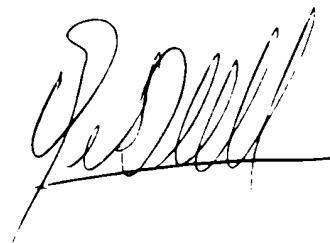
resultados obtenidos con metionina y en parte con fenilalanina. Encontramos mecanismos de alteración de los componentes celulares que no corresponden a los tradicionales en la toxicología del CCl_4 y de otros tantos compuestos (unión covalente de metabolitos y peroxidación de lípidos) pero que son completamente justificados por la naturaleza química de los productos de biotransformación de CCl_4 , esto es fundamentalmente el radical libre triclorometilo. Desde que se postula la formación ya sea "in vivo" o "in vitro" de un radical libre, deben esperarse en principio todas las interacciones que normalmente realiza tal especie (abstracciones, adiciones, dimerizaciones, etc.). Lo que encontremos en la situación real dependerá del medio en que se haya formado, qué otras moléculas se hallen presentes, la estabilidad de los productos formados, etc., eso es lo que aporta el medio biológico. Este razonamiento, que puede parecer trivial, ha sido sin embargo resistido en el medio de investigación toxicológico o en patología, limitándose exclusivamente a considerar las interacciones tóxico-medio en términos de uniones covalentes y/o peroxidación de lípidos.

En determinados casos incluso, la sola existencia de radicales libres suponía peroxidación de lípidos como causa excluyente de las patologías observadas. Es en este sentido donde creemos haber hecho un aporte relevante, al señalar mecanismos de interacción posibles simplemente reconociendo al tóxico como una sustancia química que reaccionará como tal y que debe estarse atento a considerar todos los tipos de interacción posibles, de acuerdo a su naturaleza.

En lo que se refiere a carcinogénesis química, consideramos que el tetracloruro de carbono puede servir como un buen modelo para estudiar el modo de acción de muchos carcinógenos no genotóxicos. La buena correlación obtenida entre unión covalente a proteínas nucleares (y entre éstas a

las acídicas) y susceptibilidad a la inducción de tumores en distintas especies, nos hace pensar en que la hipótesis propuesta puede ser válida. En efecto, las alteraciones que pueda producir un metabolito reactivo como un radical libre interaccionando con los distintos aminoácidos muy probablemente alteren o anulen las funciones de las proteínas reguladoras de la expresión genética. Esto permitiría la expresión de zonas del genoma que usualmente no se expresan y así comenzaría la transformación de la célula.

Por otra parte, creemos que esta hipótesis es extrapolable a muchos otros carcinógenos epigenéticos, ya que la idea central, la alteración de los mecanismos reguladores de la expresión del ADN por ataque de metabolitos reactivos, es conceptualmente generalizable a muchas sustancias que se biotransforman generando especies de gran reactividad química. Es nuestra intención realizar en el futuro experimentos similares con otros hidrocarburos clorados que poseen un comportamiento como carcinógenos del mismo tipo que el tetracloruro de carbono.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luis Q', written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. P. M.', written in a cursive style.

APENDICE

Trabajos publicados.

Los resultados aquí obtenidos han dado origen, en forma total o parcial, a las siguientes publicaciones:

Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions.

G.D. Castro, M. I. Díaz Gómez y J.A. Castro. Carcinogenesis, 10(2), 289-294 (1989).

Dimethyldisulfide formation during trichloromethyl radical attack on methionine.

G.D. Castro, M.I. Díaz Gómez y J.A. Castro. Biochemical Pharmacology, 38(22), 4145-4147 (1989).

Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species.

G.D. Castro, M.I. Díaz Gómez y J.A. Castro. Cancer Letters, (1990), en prensa.

Interaction of trichloromethyl free radicals with phenylalanine.

G.D. Castro, M.I. Díaz Gómez y J.A. Castro. Archives of Toxicology, (1990), enviado para su consideración.

Se adjuntan copias de los trabajos publicados.

Presentaciones en congresos.

"Aductos resultantes de la interacción del radical libre triclorometilo con las bases del ácido desoxirribonucleico".

-. IV Congreso y V Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Río Cuarto, Córdoba, 8 al 11 de agosto de 1985.

"Efecto de distintos tratamientos sobre el proceso de peroxidación de lípidos promovido por el tetracloruro de carbono. Estudios in vivo por evolución de pentano".

-. IV Congreso y V Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología, Río Cuarto, Córdoba, 8 al 11 de agosto de 1985.

-. XXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB), Huerta Grande, Córdoba, 28 al 30 de octubre de 1985.

"Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions".

-. First Congress of Toxicology in Developing Countries, Buenos Aires, Argentina, 15 al 21 de noviembre de 1987.

"Diferencias en la interacción entre los metabolitos reactivos del CCl₄ y el DNA o las fracciones de proteínas nucleares hepáticas en distintas especies. Su relación con la carcinogenicidad del CCl₄".

-. XXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de investigación Bioquímica (SAIB) y V Congreso PAABS Cono Sur, Villa Giardino, Córdoba, 13 al 16 de noviembre de 1988.

"Dimethyldisulfide formation during trichloromethyl radical attack on methionine".

-. V International Congress of Toxicology (IUTOX '89), Brighton, Inglaterra, 16 al 21 de julio de 1989.

"Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species".

-. V International Congress of Toxicology (IUTOX '89), Brighton, Inglaterra, 16 al 21 de julio de 1989.

Species differences in the interaction between CCl₄ reactive metabolites and liver DNA or nuclear protein fractions

Gerardo D. Castro, María I. Díaz Gómez and José A. Castro¹

Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX) - CITEFA/CONICET
Zufriategui 4380, 1603 Villa Martelli, Pcia. de Buenos Aires, Argentina

¹To whom reprint requests should be addressed

CCl₄ has been reported to be a liver carcinogen for several mice strains, for Syrian Golden hamsters, but not for Sprague–Dawley rats. CCl₄ is an experimental carcinogen for which no convincing evidence of mutagenicity is available despite the fact that CCl₄ reactive metabolites bind covalently to liver DNA. Here we describe studies on the relationship between the intensities of the covalent binding (CB) of CCl₄ reactive metabolites to liver DNA and nuclear proteins either *in vivo* or *in vitro* after activation to reactive metabolites by nuclear preparations, considering the known susceptibility of the C3H mice, Syrian Golden hamsters and Sprague–Dawley rats to CCl₄. There was no correlation between the intensity of CCl₄ carcinogenic effects on the liver and CB of CCl₄ reactive metabolites to total DNA either *in vitro* or *in vivo*. A good correlation between carcinogenicity and CB to total nuclear proteins (*in vivo* or *in vitro*) was found. Nuclear protein fractionation studies revealed CB of CCl₄ reactive metabolites to both histone and non-histone proteins when nuclear preparations activated CCl₄ either in the presence or absence of NADPH. Acidic and residual nuclear proteins were the favorite targets of the interaction with CCl₄ reactive metabolites. A good correlation between CB to these nuclear protein fractions and CCl₄ carcinogenicity in the three species was found.

Introduction

CCl₄ has been reported to be a liver carcinogen in numerous animal studies (1–6). Syrian Golden hamsters although only used in one study (2) were the most sensitive species studied, followed by mice and then rats (1–6). Several strains of mice (including C3H) have responded to CCl₄ with formation of liver tumors (1–6). In general rats have a lower susceptibility. In a comparative study with five different strains of rats, CCl₄-induced liver tumors were only found in high incidences in Japanese and Osborne–Mendel strains; a moderate response was observed in Wistar rats (5). No tumors were observable in Black or Sprague–Dawley rats, even after repeated oral doses of CCl₄ (5). The mechanism of these species or strain differences is not clear. Genotoxic and epigenetic mechanisms have been proposed (7–10). There is a small percentage of 'animal carcinogens' for which no evidence of mutagenic effects was found or which gave doubtful or even contradictory results (7–12). CCl₄ and CHCl₃ obviously belong to this group (13–34).

*Abbreviations: CB, covalent binding; P-450, cytochrome P-450; TCA, trichloroacetic-acid; PPO, 2,5-diphenyloxazole; d.p.m., disintegrations per minute.

In this work we attempted to establish a correlation between the intensity of the covalent binding (CB*) of CCl₄ reactive metabolites to DNA or to nuclear proteins and the known different susceptibility to CCl₄ cancer induction in Golden hamsters, C3H mice and Sprague–Dawley rats.

Materials and methods

Chemicals

CCl₄ (CAS: 56-23-5) low sulfur quality was from Mallinkrodt, USA. [¹⁴C]CCl₄ was purchased from New England Nuclear Corp., Boston, MA and diluted before use with unlabeled CCl₄. The sp. act. was 4.5 mCi/mmol and the chemical was 99% pure as shown by GLC analysis. Experiments were performed within the six months following this analysis. The rate of radiolytic decomposition of [¹⁴C]CCl₄ is <1% for 18 months when stored as liquid at –20°C (NEN Research Products Technical Sheet). [¹⁴C]CCl₄ was stored in our laboratory at –70°C in the darkness. Consequently, expected rates of radiolysis of the [¹⁴C]CCl₄ employed should be non-significant. Other chemicals used were of the highest purity available.

Animals and treatments

Non-inbred male animals of the following species were used: C3H mice (25–30 g); Sprague–Dawley rats (220–240 g) or Syrian Golden hamsters (80–90 g). The animals were starved for 12–14 h before CCl₄ administration or before being killed (nuclei isolation experiments). [¹⁴C]CCl₄ was given i.p. as a 15% (v/v) solution in olive oil (5 ml of this solution per kg). Sp. acts employed in the study on *in vivo* CB of [¹⁴C] from [¹⁴C]CCl₄ to liver DNA were 32 μCi/mmol and 20 μCi/mmol in the studies on CB to nuclear proteins. In both experiments animals were killed 6 h after receiving [¹⁴C]CCl₄.

Methods

Isolation of liver DNA was accomplished by the phenol–cresol procedure as described by Swann and Magee (35) but including two additional steps of extraction with CIP (CHCl₃: phenol: isoamyl alcohol 48:50:2) to purify further DNA from protein. DNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm. A value of absorbance of 20 was taken as a basis for a solution containing 1 mg DNA per ml. Aliquots of the DNA solution were mixed with 6% PPO (2,5-diphenyloxazole) in toluene: Triton X-100 (60:40) and counted. Background was deducted and its value was 35 d.p.m. The radioactivity bound to DNA was also calculated as moles of DNA nucleotides per mol of carcinogen. It was assumed for that calculation that 1 mg of liver DNA contained 3.23 μmol of nucleotides (36,37).

Nuclear preparations were obtained by the method of Viviani *et al.* (38). Purity of the preparations was checked by phase contrast microscopy. Proteins were isolated and counted as previously described (13,14,39).

The *in vitro* binding of [¹⁴C] from [¹⁴C]CCl₄ to nuclear DNA was performed as follows: incubation mixtures containing nuclear preparations (2.0–2.4 mg of nuclear protein per ml), NADPH generating system (13,39) and 0.2 mM [¹⁴C]CCl₄ (2.10⁶ d.p.m. per ml) in 0.25 M sucrose/50 mM Tris–HCl pH 7.5/2.5 mM KCl/5 mM MgCl₂ (final volume, 5 ml) were conducted for 1 h at 37°C under a N₂ atmosphere. Incubation was followed by DNA extraction and purification as described by Vaught and Bresnick (40). Radioactivity counting and DNA determination were performed as described above. In the studies where the *in vitro* CB of ¹⁴CCl₄ metabolites to nuclear proteins was studied incubations were performed as described above but they were followed by centrifugation to collect nuclei (40) and separation of the different nuclear protein fractions by the procedure described by Steele and Busch (41). In that procedure, fractions I and II correspond to nuclear sap proteins, fractions III and IV are deoxy-ribonucleoproteins, fraction V is acid ribonucleoproteins (acidic). The remaining proteins after those extractions are the residual fraction. Protein concentrations in each fraction were determined with the use of the phenol reagent (42). Then, to improve the quantitative precipitation by trichloroacetic acid (TCA) of all the label associated with the protein fractions, 15 mg of pure egg albumin was added to each fraction. Proteins were then purified and dried by successive washings with ethanol: ether: CHCl₃ (2:2:1); acetone and ether and weighed. An aliquot was dissolved in concentrated formic acid and counted as previously described (43).

Statistics

The significance of the difference between two mean values was assessed by Student's *t* test (44).

Results

In vivo covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ to liver DNA or nuclear proteins of different animal species

Samples of liver DNA isolated from animals of the three different species tested, treated with $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ 6 h before being killed,

Table I. *In vivo* covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ to liver DNA of different animal species^a

Species	pmol $\text{CCl}_4/\text{mg DNA}^b$ \pm SD	mol nucleotides/mol of CCl_4 metabolites ($\times 10^6$) ^c \pm SD
Syrian Golden hamster	2.3 \pm 0.2	1.41 \pm 0.05
C3H mice	2.3 \pm 0.4	1.41 \pm 0.07
Sprague–Dawley rat	2.2 \pm 0.4	1.47 \pm 0.07

^a $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ was administered i.p. to animals starved for 12–14 h, in an olive oil solution, 15% (v/v) CCl_4 (1.1×10^8 d.p.m./ml solution) at a dose of 5 ml/kg. Animals were killed 6 h after $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ administration. DNA was isolated and CB determined as described in Materials and methods. Results are the mean of three different liver samples, each taken from a pool of 6 livers for mice, a pool of two for hamsters and from one liver for rats.

^bNo significant difference was observed between the three species.

^cCalculations were performed considering that 1 mg of DNA contained 3.237 μmol of nucleotides.

Table II. *In vivo* covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ to liver nuclear proteins of different animal species^a

Species	pmol $\text{CCl}_4/\text{mg protein}^b$
Syrian Golden hamster	7.5 \pm 0.8
C3H mice	6.1 \pm 1.1
Sprague–Dawley rat	1.8 \pm 0.5

^a $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ was administered i.p. in an olive oil solution, 15% (v/v) CCl_4 (70×10^6 d.p.m./ml solution) at a dose of 5 ml/kg to animals starved for 12–14 h and killed 6 h later. Proteins were isolated and counted as described in Materials and methods. Results are the mean of three different liver samples each taken from a pool of four livers for mice and from one liver for rat and hamster.

^bValues of mice and hamster were significantly higher than those of rats. No significant difference was observed between mice and hamster.

Table III. *In vitro* covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ to liver nuclear DNA from different animal species^a

Species	Experimental conditions	pmol $\text{CCl}_4/\text{mg DNA}$ \pm SD	mol nucleotides/mol of CCl_4 metabolites ($\times 10^6$) \pm SD ^c
Syrian Golden hamster	NADPH	10.5 \pm 0.8 ^{b,c}	29 \pm 3
	no NADPH	6.0 \pm 1.7 ^d	54 \pm 2
C3H mice	NADPH	9.1 \pm 1.6 ^{b,c}	24 \pm 2
	no NADPH	6.2 \pm 0.6 ^d	54 \pm 3
Sprague–Dawley rat	NADPH	8.3 \pm 0.7 ^{b,c}	40 \pm 3
	no NADPH	7.9 \pm 0.6 ^d	40 \pm 3

^aIncubation mixtures containing nuclear preparations (2.0–2.4 mg of nuclear protein/ml), NADPH generating system and 0.2 mM $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ (2×10^6 d.p.m./ml) were conducted for 1 h at 37°C under nitrogen. DNA was isolated and counted as described in Materials and methods. Results are the mean of three separate samples.

^bIn the case of hamsters and mice, values in the presence of NADPH were significantly higher than those in the absence of NADPH. For rats, no difference was observed between both values.

^cIn the presence of NADPH, the value from hamster was significantly higher than that from rats. No difference was observed between hamster and mice or between mice and rats.

^dFor the experiments in the absence of NADPH, no difference was observed between rat and hamster or between mice and hamster. The value from rats was significantly higher than that from mice.

^eCalculations were performed considering that 1 mg of DNA contained 3.237 μmol of nucleotides.

showed a small but significant degree of CB (Table I). There were no significant differences among intensities of the CB to DNA in the three species (Table I). The intensities of the interactions in terms of moles of nucleotides/mol of CCl_4 were very low and within the same order of magnitude previously reported (14). CB cannot be attributed to contamination of isolated DNA with proteins because we were neither able to detect proteins by the phenol reagent nor by ultraviolet absorption. We also observed CB of ^{14}C from $^{14}\text{CCl}_4$ to liver nuclear proteins from the three animal species when the animals were exposed to $^{14}\text{CCl}_4$ administered i.p. 6 h before (Table II). The intensity of this CB in samples from Syrian Golden hamster and C3H mice was significantly higher than that observed in those from Sprague–Dawley rats (Table II). Values in the two former species were ~ 3.4 – 4.2 -times higher than in the latter. There was no significant difference between the CB to total liver nuclear proteins in Syrian golden hamsters and C3H mice (Table II).

In vitro covalent binding of ^{14}C from $[^{14}\text{C}]\text{CCl}_4$ to liver DNA or nuclear proteins from different animal species

Highly purified nuclear preparations from the three animal species tested were able to activate CCl_4 to reactive metabolites that bind covalently to DNA (Table III) and nuclear proteins (Table IV) both in the presence or absence of NADPH. CB to DNA in the absence of NADPH was slightly but significantly higher in rats than in either mice or hamsters and values in the latter species were not significantly different (Table III). NADPH-dependent CB to DNA in nuclear preparations was significantly higher in the hamster preparations. No difference was observed in the case of the other two species (Table III). The NADPH enhancing effect on CB to DNA was significant in mice and hamsters but not in rats (Table III). The *in vitro* CB of CCl_4 metabolites to nuclear proteins produced in the absence of NADPH was hamster $>$ mice $>$ rat (Table IV). The values in hamsters or mice preparations were 4- and 2.5-times, respectively, higher than those observed for rats (Table IV). The *in vitro* CB to nuclear proteins produced in the presence of NADPH was hamster $>$ mice $>$ rat (Table IV). The values in hamster or mice preparations were 3.7- and 1.3-times, respectively, higher than those observed using rat nuclear suspensions (Table IV). There was a significant NADPH enhancing effect in the nuclear activation of CCl_4 to reactive metabolites covalently bound to nuclear proteins in the three species tested (Table IV). The NADPH enhancing effect was

323% in the hamsters; 183% in mice and 352% in rats (Table IV).

In vitro CB of ¹⁴C from [¹⁴C]CCl₄ to nuclear protein fractions from livers of different animal species

All nuclear protein fractions from livers of the three animal species interacted with CCl₄ reactive metabolites produced either in the presence or absence of NADPH (Table V).

In all cases (except that of mice histone fraction) there was an NADPH enhancing effect on the CB to the different nuclear

fractions (Table V). Residual and fraction V (acidic) were the favorite targets of CB attack (Table V). In the case of the rat, CB to fraction IV was similar to that of fraction V (Table V). The relative intensities of the CB to the residual fraction obtained in the presence of NADPH were not significantly different in the three species tested (C3H mice ≥ rat ≥ hamster) (Table V). In the absence of NADPH, however, values of CB in mice were significantly higher than those observed in the other two species which were not significantly different (Table V). The intensity of CB to histone fraction (when incubation mixtures contained NADPH) was significantly higher in mice or rat than in the hamster while in the absence of NADPH values of CB to histone were 4.9-times higher than in rats and 7.3-times higher than in hamster (Table V). The CB to fraction V (acidic) proteins in the presence of NADPH was not significantly different in mice and hamster but slightly more intense than in the rat (Table V). In the absence of NADPH however, values of CB to fraction V in mice were significantly higher than those in hamsters or rats which in this case were not significantly different (Table V). The CB to fraction IV in the presence of NADPH was significantly higher in rats than in the other two species, in which case were not significantly different from each other (Table V). In absence of NADPH, CB to fraction IV was significantly smaller in mice and hamster than in the rat in which case values were as high as those reported above for fraction V (Table V). Values of CB of fraction III in the presence of NADPH were slightly but significantly higher in the rat than in the hamsters or mice which in turn were not significantly different from each other (Table V). In the absence of NADPH, CB to fraction III values

Table IV. *In vitro* covalent binding of ¹⁴C from [¹⁴C]CCl₄ to nuclear proteins from liver of different animal species^a

Species	pmol CCl ₄ /mg protein ± SD	
	no NADPH	NADPH
Syrian Golden hamster	193.3 ± 15.3 ^d	624.5 ± 12.3 ^{b,d}
C3H mice	121.8 ± 2.4	223.2 ± 12.6 ^b
Sprague-Dawley rat	47.8 ± 1.7 ^c	168.4 ± 4.7 ^{b,c}

^aIncubation mixtures containing nuclear preparations (2.0–2.4 mg nuclear proteins/ml), NADPH generating system and 0.2 mM [¹⁴C]CCl₄ (2 × 10⁶ d.p.m./ml) were conducted for 1 h at 37°C under nitrogen. Proteins were isolated and counted as described in Materials and methods. Results are the mean of three separated samples.

^bIn all cases, values in the presence of NADPH were significantly higher than those in the absence of NADPH.

^cFor both experimental conditions, the values from rat were significantly lower than those from mice and hamsters.

^dFor both experimental conditions, values from hamster were significantly higher than those from mice.

Table V. *In vitro* covalent binding of ¹⁴C from [¹⁴C]CCl₄ to nuclear protein fractions from livers of different animal species^a

Nuclear proteins ^b	NADPH		No NADPH	
	pmol CCl ₄ /mg protein ± SD	% label in fraction	pmol CCl ₄ /mg protein ± SD	% label in fraction
Syrian Golden hamster				
I	53.1 ± 10.4	8.8	6.2 ± 0.8	5.1
II	22.9 ± 13.3	3.8	4.1 ± 0.6	3.4
III	23.0 ± 5.5	3.8	8.7 ± 1.0	7.1
IV	43.3 ± 13.6	7.2	10.6 ± 0.8	8.7
V	207.1 ± 33.5	34.3	31.8 ± 3.2	26.1
histones	26.2 ± 2.3	4.3	9.8 ± 2.7	8.0
residual	228.1 ± 63.6	37.8	50.6 ± 6.5	41.5
C3H mice				
I	30.6 ± 1.9	4.3	16.5 ± 1.1	4.0
II	26.9 ± 2.4	3.8	14.7 ± 1.8	3.6
III	23.8 ± 3.5	3.3	14.4 ± 2.0	3.5
IV	51.9 ± 6.5	7.3	34.2 ± 6.7	8.4
V	210.9 ± 10.3	29.5	92.4 ± 13.9	22.6
histones	82.3 ± 5.4	11.5	71.8 ± 4.1	17.5
residual	228.2 ± 14.2	40.3	165.4 ± 25.9	40.4
Sprague-Dawley rat				
I	54.7 ± 6.2	7.4	20.5 ± 7.5	12.2
II	21.2 ± 1.2	2.9	8.1 ± 0.8	4.8
III	39.6 ± 6.2	5.4	10.3 ± 0.7	6.1
IV	147.0 ± 28.2	20.0	35.4 ± 8.1	21.1
V	156.2 ± 26.5	21.3	30.2 ± 7.0	18.0
histones	56.0 ± 16.4	7.6	14.7 ± 1.6	8.8
residual	260.1 ± 10.7	35.4	48.4 ± 24.3	28.9

^aIncubation mixtures containing nuclear preparations (2.0–2.4 mg of nuclear protein/ml), NADPH generating system and 0.2 mM [¹⁴C]CCl₄ (2 × 10⁶ d.p.m./ml) were conducted for 1 h at 37°C under nitrogen. Nuclear protein fractions were isolated and counted as described in Materials and methods. Results are the mean of three separate samples.

^bFractions I and II correspond to nuclear sap proteins, fractions III and IV are deoxyribonucleoproteins, fraction V is acid ribonucleoproteins.

Table VI. Comparison between CCl₄ liver carcinogenic effects and different parameters reported in the present study

Parameter ^a	Intensity of parameter in the species tested ^b
Carcinogenicity	H ≥ M >> R = 0
CB DNA in vivo	H = M = R
CB NP in vivo	H = M >> R
CB DNA in vitro (NADPH)	H = M = R
CB DNA in vitro (no NADPH)	R > M = H
CB NP in vitro (NADPH)	H >> M > R
CB NP in vitro (no NADPH)	H > M > R
CB F Res (NADPH)	H = M ≥ R
CB F Res (no NADPH)	M >> H = R
CB F His (NADPH)	M > R > H
CB F His (no NADPH)	M >> R > H
CB F V (NADPH)	M = H > R
CB F V (no NADPH)	M >> H = R
CB F IV (NADPH)	R >> M = H
CB F IV (no NADPH)	R = M > H
CB F III (NADPH)	R > M = H
CB F III (no NADPH)	M > R = H
CB F II (NADPH)	M = H = R
CB F II (no NADPH)	M > R > H
CB F I (NADPH)	R = H > M
CB F I (no NADPH)	R = M > H

^aNP, total nuclear proteins; F, fraction; Res, residual nuclear protein; His, histone.

^bH, Syrian Golden hamster; M, C3H mice; R, Sprague-Dawley rat.

were slightly but significantly higher in mice than in the other two species (Table V). The CB to fraction II in the presence of NADPH was not significantly different in the three species tested (Table V). In the absence of NADPH, CB to fraction II was significantly higher in mice than in rats and this significantly higher than in hamsters (Table V). Values of CB to fraction I in the presence of NADPH were not significantly different in rats and hamsters but both were significantly higher than those found in the case of mice (Table V). In contrast, equivalent values obtained in absence of NADPH were similar in rat and mice and both higher than those obtained with hamster preparations (Table V).

A summary of the results depicted in Tables I–V and their relation to CCl₄ liver carcinogenic effects in the three species (as reported in literature) is shown in Table VI.

Discussion

In agreement with previous results from our laboratory and others (14–18), the present study reports CB of CCl₄ reactive metabolites to liver DNA and nuclear proteins of rats and mice. Findings for Golden hamster liver are added. We were not able to find any quantitative correlation between the intensity of CB to liver DNA in those three animal species and their known response to CCl₄ liver carcinogenic effects (1–6).

In order to discuss these results, several additional factors should be considered. These observations might suggest that CCl₄ in contrast to many other carcinogens (7–12), leads to liver tumor induction via a non-genotoxic mechanism and that CB to liver DNA occurred in positions where no mispairing resulted, or at DNA regions not being expressed. These possibilities focus on the problem whether CCl₄ is mutagenic.

Many studies of CCl₄ genotoxicity failed to give positive results (13–31). However, not all tests performed were entirely

negative, a few of them revealed weak genotoxic actions of CCl₄ (32–34). Furthermore, it is important to remark that many of the negative results available in literature were not adequate considering that CCl₄ could require special testing conditions. For example, CCl₄ is volatile and closed systems must be employed. Further, CCl₄ is not carcinogenic for most rat strains (1,5) and consequently, tests performed using these may not be adequate to reveal mutagenic effects. Other factors not frequently considered might be that CCl₄ activation to reactive metabolites is a reductive process which proceeds more efficiently under anaerobic conditions, and that it leads to production of extremely reactive ·CCl₃ free radicals (and to CCl₃O₂· if oxygen is present) (20,45). In mutagenicity tests where exogenous activation systems (e.g. 9000 × g supernatant or microsomes) and bacterial DNA were used (e.g. Ames test) there would be no chance for a metabolite such as ·CCl₃ or CCl₃O₂· (20,45) to reach the target DNA. In effect, their known ability to interact with proteins, lipids and other components from the incubation system would scavenge these metabolites (20,45). Consequently, negative results involving tests of this nature or not considering the above mentioned CCl₄ characteristics should be considered with caution.

CCl₄ activation is known to require P-450 to produce reactive metabolites (20–43); consequently, when endogenous P-450 is available, more chances to detect mutagenicity exist. For example, in studies performed on *Saccharomyces cerevisiae* (which contains P-450) weak genotoxic effects were observed (32). Weak genotoxic effects of CCl₄ were also reported in studies on unscheduled DNA synthesis in rat hepatocytes (34). However, other workers using a similar system previously reported negative results (26). Using the ability to inhibit mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a simple assay for mutagenesis, Seiler obtained a positive response for CCl₄ (33). This is important, because testes also contain P-450 and are able to biotransform CCl₄ to reactive metabolites (46). The relevance of the neighbourhood of the CCl₄ activation system to DNA is illustrated by our results on the attack by CCl₄ reactive metabolites to DNA in incubation mixtures containing nuclear preparations, NADPH generating system and CCl₄.

In the case of experiments such as the present one where we only observed intensity of CB to total DNA and not individual adducts, potential correlations might be obscured. This may not be an unlikely possibility; we showed previously that at least 20 adducts are produced when chemically induced ·CCl₃ attacks DNA bases (21). Another important factor to take into account is related to the persistence of the different adducts formed. In effect, a good correlation should only be expected for those adducts able to lead to mispairing (47).

Another factor to consider for eukaryotic cells is that part of the CB to DNA might occur in transcriptionally repressed areas of the genome. There is already evidence in that respect for CCl₄. In effect, results obtained by Van Duren and coworkers (17,18) showed that CCl₄ reactive metabolites bound to active and inactive chromatin DNA to the same extent but persistence of CB to DNA was two-fold greater in the inactive chromatin than in the active one (17,18). This behavior might imply that CCl₄ has more chances to behave as a promoter than as an initiator or as a mutagen in eukaryotic systems. In effect, current views in chemical carcinogenesis suggest that mutations in the euchromatin might be involved in the initiation stage of the process while those mutations occurring in the heterochromatin might only become manifest at the latter stage of promotion (48).

However, we must also consider the possibility that CCl₄ were not genotoxic at all. Several hypotheses were advanced for carcinogens of this kind (7–10), all of which involve changes in the pattern of gene expression during the carcinogenic process (7–10). Nuclear proteins are responsible for the control of gene expression and chromosome structure (49). We previously reported the ability of ·CCl₃ formed during CCl₄ biotransformation to give adducts with aminoacids (20). This pattern of binding is remarkably similar to the one we previously reported for the case of CHCl₃ (13) and also to that reported for several other liver carcinogens (50). It is well known that acidic proteins have regulatory functions in relation to gene expression (49,50). The studies on CCl₄ and on CHCl₃ (13) might suggest that for the case of some non-genotoxic carcinogens, interactions of their reactive metabolites with critical nuclear proteins might be of importance. It is currently believed that expression of otherwise repressed oncogenes might be involved in some stage of the carcinogenic process induced by both viruses and chemicals (48,51,52). We can not ignore, however, the possibility that the CB of reactive metabolites to nuclear proteins could represent only something that accompanied the carcinogenic process but is secondary to other factors.

Further work is necessary to clarify these matters.

Acknowledgements

This work was presented at the first Meeting of Toxicology in Developing Countries, Buenos Aires, Argentina, November 1987 and it was supported by Public Health Service Grant DK-13195-19.

References

- IARC (1979) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some halogenated hydrocarbons. Vol 20, 371–389, Lyon, France.
- Della Porta, G., Terracini, B. and Shubik, P. (1961) Induction with carbon tetrachloride of liver cell carcinomas in hamsters. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**, 855–863.
- Edwards, J.E. (1941) Hepatomas in mice induced with carbon tetrachloride. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2**, 197–199.
- Andervont, H.B. (1958) Induction of hepatomas in strain C3H mice with 4-*o*-tolylazo-*o*-toluidine and carbon tetrachloride. *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**, 431–438.
- Reuber, M.D. and Glover, E.L. (1970) Cirrhosis and carcinoma of the liver in male rats given subcutaneous carbon tetrachloride. *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 419–427.
- Weisburger, E.K. (1977) Carcinogenicity studies in halogenated hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.*, **21**, 7–16.
- Stott, W.T., Reitz, R.H., Schumann, A.M. and Watanabe, P.G. (1981) Genetic and non-genetic events in neoplasia. *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**, 567–576.
- Weisburger, J.H. and Williams, G.M. (1983) The distinct health risk analysis required for genotoxic carcinogens and promoting agents. *Environ. Health Perspect.*, **50**, 233–245.
- Hooper, K. (1984) Epigenetic carcinogens problems with identification and risk estimation. *Clin. Toxicol.*, **22**, 283–289.
- Perera, F.P. (1984) The genotoxic/epigenetic distinction: relevance to cancer policy. *Environ. Res.*, **34**, 175–191.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 5135–5139.
- Meselson, M. and Russel, K. (1977) Comparison of carcinogenic and mutagenic potency. In Hiatt, H., Watson, J. and Winston, J. (eds), *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, pp. 1473–1477.
- Díaz Gómez, M.I. and Castro, J.A. (1980) Covalent binding of chloroform metabolites to nuclear proteins. No evidence for binding to nucleic acids. *Cancer Lett.*, **9**, 213–218.
- Díaz Gómez, M.I. and Castro, J.A. (1980) Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to liver nuclear DNA, proteins and lipids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 199–206.
- Rocchi, P., Prodi, G., Grilli, S. and Ferrari, A.M. (1973) *In vivo* and *in vitro* binding of CCl₄ with nucleic acids and proteins in rat and mouse liver. *Int. J. Cancer*, **11**, 419–425.
- Levy, G.N. and Brabec, M.J. (1984) Binding of carbon tetrachloride metabolites to rat hepatic mitochondrial DNA. *Tox. Lett.*, **22**, 229–234.
- Oruambo, I.F. and Van Duuren, B.L. (1987) Distribution of carbon tetrachloride metabolite(s) to DNase-I-sensitive and resistant chromatin. *Cancer Lett.*, **37**, 311–316.
- Oruambo, I.F., Banerjee, S. and Van Duuren, B.L. (1983) Covalent binding of carbon tetrachloride to DNA from mouse liver chromatin *in vitro*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **24**, 320–330.
- Di Renzo, A.B., Gandolfi, A.J. and Sipes, I.G. (1982) Microsomal bioactivation and covalent binding of aliphatic halides to DNA. *Toxicol. Lett.*, **11**, 243–252.
- Castro, J.A. (1984) Mechanical studies and prevention of free radical cell injury. *Proc. IX International Congress of Pharmacology*. McMillan Press Ltd, London Vol 2, pp. 243–250.
- Díaz Gómez, M.I. and Castro, J.A. (1981) Reaction of trichloromethyl free radicals with deoxyribonucleic acid bases. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **32**, 147–153.
- Uehleke, H., Werner, T., Greim, H. and Kramer, M. (1977) Metabolic activation of haloalkanes and tests *in vitro* for mutagenicity. *Xenobiotica*, **7**, 393–400.
- Simmon, V.F., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977) Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water. In Scott, D., Bridges, B.A. and Sobels, F.H. (eds), *Progress in Genetic Toxicology*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, pp. 249–259.
- Barber, E.D., Donish, W.H. and Mueller, K.R. (1981) A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.*, **90**, 31–48.
- Dean, B.J. and Hudson-Walker, G. (1979) A *in vitro* chromosome assay using cultured rat liver cells. *Mutat. Res.*, **64**, 329–337.
- Mirsalis, J.C. and Butterworth, B.E. (1980) Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: an *in vivo*–*in vitro* assay for potential carcinogens and mutagens. *Carcinogenesis*, **1**, 621–625.
- Craddock, V.M. and Henderson, A.R. (1978) *De novo* and repair replication of DNA in liver of carcinogen-treated animals. *Cancer Res.*, **38**, 2135–2143.
- Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982) Detection of genotoxic carcinogens in the *in vivo*–*in vitro* hepatocyte DNA repair assay. *Environ. Mut.*, **4**, 553–562.
- Schwarz, M., Hummel, J., Appel, K.E., Rickart, R. and Kung, W. (1979) DNA damage induced *in vivo* evaluated with a non-radioactive alkaline elution technique. *Cancer Lett.*, **6**, 221–226.
- Kitta, D., Schwarz, M., Tennekes, H.A., Uehleke, H. and Kunz, W. (1982) Covalent binding of CCl₄-intermediates to reduced pyridine nucleotides in mouse liver. In Snyder, R., Parke, D.V., Kocsis, J.J., Jollow, D.J., Gordon, C. and Witmer, C.M. (eds), *Biological Reactive Intermediates II. Chemical Mechanisms and Biological Effects, part 'A'*. Review Press, New York, pp. 769–777.
- Gaus, J.H. and Korson, R. (1984) Liver nuclear DNA synthesis in mice following carbon tetrachloride administration or partial hepatectomy. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **175**, 237–242.
- Cullen, D.F., Wolf, C.R. and Philpot, R.M. (1980) Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.*, **77**, 55–63.
- Seiler, J.P. (1977) Inhibition of testicular DNA synthesis by chemical mutagens and carcinogens. Preliminary results in the validation of a novel short term test. *Mut. Res.*, **46**, 305–310.
- Brambilla, G., Bassi, A.M., Faggini, P., Ferro, M., Finollo, R., Martelli, A., Sciaba, L. and Marinari, U.M. (1985) Genotoxic effect of lipid peroxidation products. In Poli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U. and Slater, T.F. (eds), *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press, Oxford, pp. 59–70.
- Swann, P.F. and Magee, P.N. (1968) Nitrosamine induced carcinogenesis: dimethylnitrosamine, dimethylsulphate and methyl methane sulphonate. *Biochem. J.*, **110**, 30–47.
- Szafarz, D. and Weisburger, J.H. (1969) Stability of binding of label from *N*-hydroxy-*N*-2 fluorenylacetylacetamide to intracellular targets, particularly deoxyribonucleic acid in rat liver. *Cancer Res.*, **29**, 962–968.
- Bookes, P. (1975) Covalent interaction of carcinogens with DNA. *Life Sci.*, **16**, 331–344.
- Viviani, A., Lutz, W.K. and Schlatter, C. (1978) Time course of the induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in rat liver nuclei and microsomes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, dieldrin and other inducers. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 191–194.
- Díaz Gómez, M.I. and Castro, J.A. (1980) Nuclear activation of carbon tetrachloride and chloroform. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **27**, 191–194.
- Vaught, J. and Bresnick, E. (1976) Binding of polycyclic hydrocarbons to

- nuclear components *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 587–591.
41. Steele, W.J. and Busch, H. (1963) Studies on acidic nuclear proteins of the Walker tumor and liver. *Cancer Res.*, **23**, 1153–1163.
 42. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
 43. Díaz Gómez, M.I., Castro, J.A., Ferreyra, E.C.de, D'Acosta, N. and Castro, C.R.de (1973) Irreversible binding of ¹⁴C from ¹⁴CCl₄ to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed function oxygenase activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 534–541.
 44. Bancroft, H. (1960) *Introducción a la Bioestradiística*. EUDEBA, Buenos Aires, Argentina, pp. 205–211.
 45. Slater, R.F. (1982) Activation of carbon tetrachloride. Chemical principles and biological significance. In McBrien, D.C. and Slater, T.F. (eds), *Free radical, lipid peroxidation and cancer*. Academic Press, New York, pp. 243–270.
 46. de Toranzo, E.G., Villarruel, M.C. and Castro, J.A. (1978) Early destruction of cytochrome P-450 in testis of carbon tetrachloride poisoned rats. *Toxicology*, **10**, 39–44.
 47. Yarosh, D.B. (1985) The role of O⁶-methylguanine-DNA-methyl-transferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.*, **145**, 1–16.
 48. Goodman, J.I., Vorce, R.L. and Baranyi-Funlog, B.L. (1986) Genetic toxicology chemical carcinogens modify DNA in a non-random fashion. *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**, 354–357.
 49. Alberts, B., Bray, O., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc., New York, 435–476.
 50. Gronow, M. (1980) Nuclear protein and chemical carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.*, **29**, 1–30.
 51. Weinberg, R.A. (1982) Oncogens of spontaneous and chemically induced tumors. *Adv. Cancer Res.*, **36**, 149–163.
 52. Weinstein, I.B. (1987) Growth factors, oncogens and multistage carcinogenesis. *J. Cell Biochem.*, **33**, 213–224.

Received on June 13, 1988; revised on October 10, 1988; accepted on October 27, 1988

SHORT COMMUNICATIONS

Dimethyldisulfide formation during trichloromethyl radical attack on methionine

(Received 14 December 1988; accepted 26 April 1989)

Carbon tetrachloride hepatotoxicity has been considered to be related to trichloromethyl free radical formation and its interaction to give protein and/or lipid adducts, and/or to the initiation of a lipid peroxidation process of polyunsaturated fatty acids from cellular membranes that might occur directly or more likely after formation of CCl_3CO_2 (trichloromethyl peroxy) radical [1-4]. In the course of previous studies from our laboratory, we reported that chemically produced $\cdot\text{CCl}_3$ (trichloromethyl radical) was able to interact with several amino acids to give adducts and with methionine to lead to the formation of volatile products of garlic-like odor [5]. In this work we analyzed the structure of these volatile products formed when chemically produced $\cdot\text{CCl}_3$ interacts with methionine and whether enzymatically produced $\cdot\text{CCl}_3$ may be able to lead to a similar end product.

Materials and methods

Chemicals. CCl_4 analytical reagent (ACS Standards) was purchased from Mallinkrodt. *dl*-Methionine ethyl ester·HCl (MetES*), *l*-methionine (Met), benzoyl peroxide and dimethyl disulfide (DDS) were Sigma Grade (Sigma Chemical Co.).

Animals and treatments. Sprague-Dawley male rats (80-100 g) were used for the experiments on phenobarbital (PB) preinduced animals (all *in vitro* experiments using liver microsomal suspensions). In those experiments, animals were injected intraperitoneally with PB once daily for 3 days at a dose of 80 mg/kg, and the animals were fasted overnight and used on the morning of day 4. The experiments on the methionine content in liver microsomal proteins were performed with Sprague-Dawley male rats (200-280 g). In these experiments, food was withdrawn 12-14 hr before CCl_4 administration. CCl_4 was given *i.p.* as a 20% (v/v) solution in olive oil at a dose of 5 ml/kg (1 ml of pure CCl_4 /kg). Controls received an equivalent amount of olive oil. Animals were killed 6 hr after either CCl_4 or olive oil administration. Livers were rapidly removed and processed.

Procedures. The preparation of hepatic microsomal fractions and the isolation of purified microsomal protein were described previously in detail [5, 6]. The amino acid composition of the protein was performed by column chromatography by a procedure devised by Spackman *et al.* [7]. The study of the *in vitro* chemical $\cdot\text{CCl}_3$ production and its interaction with Met or MetES was carried out as previously described by Villarruel and Castro [5]. A head-space aliquot of the sample (400 μl) was used for GLC analysis. Blanks without CCl_4 and without Met or MetES were run simultaneously. The interaction between enzymatically generated $\cdot\text{CCl}_3$ and Met or MetES was carried out in aluminium-sealed silicone septum-stoppered glass vials of 15-ml capacity. Incubation mixtures contained liver microsomes (10.5 to 11.0 mg protein/ml); NADPH-generating system [5]; 3 mM CCl_4 ; 1 mM Met (or MetES) and 20 mM phosphate buffer, pH 7.4, to a final volume of 3 ml.

* Abbreviations: Met, *l*-methionine; MetES, *dl*-methionine ethyl ester·HCl; DDS, dimethyldisulfide; MeSH, methyl mercaptan; MS, mass spectrometry; TIC, total ion current; and SIM, selective ion monitoring.

Adequate control vials without NADPH-generating system or without CCl_4 were carried out simultaneously. After 1 hr of incubation, samples were ice-cooled and, after adding 1.8 g of anhydrous MgSO_4 , the samples were septum-capped again for head-space analysis by GLC. Biotransformation of DDS by liver microsomes was studied by head-space analysis under experimental conditions similar to those described above but containing 1 mM DDS and excluding CCl_4 or Met (or MetES). Total ion current chromatographic (TIC) and mass spectrometric (MS) identification of head-space components was performed in a Hewlett-Packard (HP) model 5970 B mass selective detector interfaced to an HP 5890 gas chromatograph (GC). GC conditions were as follows: injection port 200°, in the splitless injection mode. Separations were carried out in a fused silica capillary column (25 m \times 0.32 mm i.d.) cross-linked with methyl-silicone gum (0.52 μm film thickness) (HP No. 19091 2-112); carrier gas: helium (linear velocity 42 cm/sec, 85 kilopascals). Column temperature was maintained at 35° for 2 min and then increased to 70° at a ramp velocity of 5°/min. GLC-MS interface temperature was 280° and ion source temperature was ca. 200°. Scanning range in MS was from 30 to 200 atomic mass units and scanning speed was 0.96 range scans/sec. In some experiments selective ion monitoring (SIM) of mass spectra was employed to increase sensitivity. Selected masses were as follows: 46 and 31 (ethanol); 48, 47, 34 and 33 (MeSH); 118, 120, 83 and 47 (CCl_4); and 94, 79, 64 and 61 (DDS). Dwell time for all the peaks was 200 msec. Selection of masses for SIM studies and identification was made by comparison against the National Bureau of Standards Library of mass spectra.

Results

Interaction of $\cdot\text{CCl}_3$ with methionine (Met) or methionine ethyl ester (MetES). The GLC/TIC analysis of the volatile products arising from chemically generated $\cdot\text{CCl}_3$ interaction with Met revealed the presence of five peaks (Fig. 1). Peaks 1 and 4 corresponded to ethanol and CCl_4 present in the reaction mixture. Peak 2 was identified by GLC/MS as ethyl chloride which is likely to result from $\cdot\text{C}_2\text{H}_5$ and $\cdot\text{Cl}$ radicals formed when ethanol and CCl_4 were heated in the presence of benzoyl peroxide catalyst (reaction blank). Peak 3 was identified as chloroform by GLC/MS and would result from $\cdot\text{CCl}_3$ hydrogen atom abstraction from medium. Peak 5 was identified by GLC/MS as DDS (see Fig. 1). The same five peaks were observed when MetES was used instead of Met. In anaerobic incubation mixtures containing liver microsomes, NADPH and CCl_4 , a peak identified as CHCl_3 was observed. Very little CHCl_3 was formed in contrast when NADPH was omitted. Addition of Met to incubation mixtures where CCl_4 , NADPH and microsomes were present did not result in any GLC/TIC detectable peak of DDS under the experimental conditions employed. However, when MetES was used in the incubation mixtures in place of Met, a peak identified by MS as DDS was evident. An additional peak corresponding to MeSH was also observable by GLC/SIM. Neither DDS nor MeSH was observed when CCl_4 , NADPH or MetES was excluded from the incubation mixtures. The GLC/SIM head-space analysis of anaerobic incubation mixtures containing liver

TIC of DATA: DDSSCAN.D

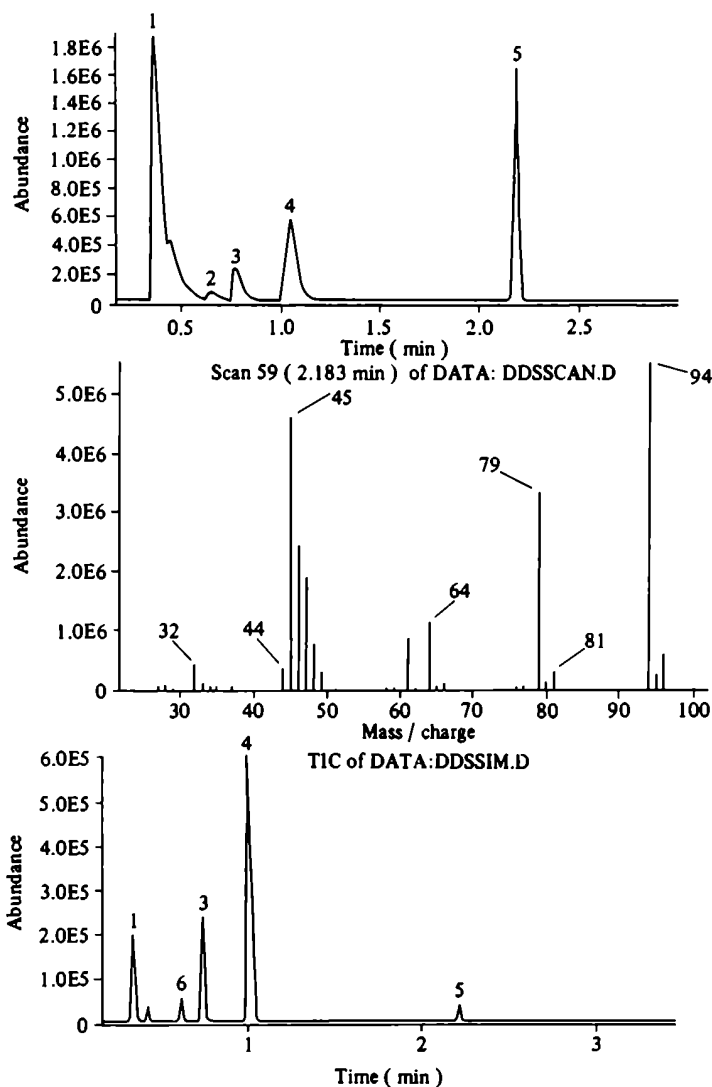


Fig. 1. Identification of volatile reaction products arising from $^{14}\text{C}\text{Cl}_3$ attack on Met or MetES. Top panel: GLC/MS (scan mode) obtained from the head-space analysis of reaction products formed when chemically generated $^{14}\text{C}\text{Cl}_3$ interacts with Met or MetES. Peak 1, ethanol; 2, ethyl chloride; 3, CHCl_3 ; 4, CCl_4 ; 5, DDS. In peaks 2 and 3, the expected isotopic ratios for chlorine containing ions were observed. Center panel: Mass spectra of peak 5. Comparing it against the MS library and a pure standard revealed that it corresponded to DDS. Bottom panel: GLC/MS (SIM mode) obtained from the head-space analysis of reaction products formed when enzymatically generated $^{14}\text{C}\text{Cl}_3$ interacts with MetES under a N_2 atmosphere. Peak 6, MeSH. See Materials and Methods for details. Abundance is expressed as total ion current signal. E indicates use of exponential nomenclature, e.g. 1.8E6 is equivalent to 1,800,000.

microsomes. NADPH and DDS showed that the system degraded DDS. Degradation was accompanied by formation of products which were identified by GLC/MS as MeSH and H_2S . A part of the DDS anaerobic degradation was heat sensitive, but a relevant fraction of it was not. Both heat-sensitive and heat-resistant anaerobic DDS metabolizing activity of rat liver microsomes partially required NADPH presence, but there was also a fraction that did not. Degradation of DDS under aerobic conditions was more intense than under anaerobic conditions.

NADPH was able to stimulate slightly both the heat-sensitive and the heat-resistant aerobic metabolizing activity of rat liver microsomes. Most of the aerobic ability of liver microsomes to degrade DDS was heat insensitive (in either the presence or absence of NADPH) (Table 1).

Methionine content in liver microsomal protein from control and CCl_4 -treated animals. There was no significant difference in the Met content of liver microsomal protein of control and CCl_4 -treated animals (6 hr of poisoning) (controls = 440.93 ± 20.53 ; treated = $434.13 \pm$

Table 1. DDS degradation by liver microsomes from phenobarbital-preinduced rats*

Experimental condition	DDS degradation ($\times 10^{-8}$ mol/mg protein)
Nitrogen	
NADPH	7.1 \pm 0.2
No NADPH	6.3 \pm 0.4†
Heated + NADPH	5.0 \pm 0.3†‡
Heated, no NADPH	3.4 \pm 0.3†‡§
Air	
NADPH	9.0 \pm 0.3
No NADPH	7.3 \pm 0.5†
Heated + NADPH	8.2 \pm 0.4†‡
Heated, no NADPH	5.6 \pm 0.8†‡§

* Liver microsomes from phenobarbital-preinduced animals were used (microsomal protein, 10.5 to 11.0 mg/ml). The incubations contained an NADPH-generating system when indicated. Heated microsomes were obtained by heating microsomal suspensions at 100° for 5 min. The final concentration of DDS was 1 mM. GLC/MS/SIM head-space analysis of reaction mixture was made after a 1-hr incubation at 37°. Values are means \pm SD, N = 3.

† P < 0.05 when compared to unheated NADPH control.

‡ P < 0.05 when compared to unheated counterpart.

§ P < 0.05 when compared to heated + NADPH.

31.57 nmol/mg microsomal protein; values were obtained using three animals per group; P > 0.05) (Student's *t*-test).

Discussion

The studies described here revealed that chemically or enzymatically generated $\cdot\text{CCl}_3$ interacts under appropriate experimental conditions with Met and/or MetES to produce DDS. DDS may result from $\cdot\text{CCl}_3$ attack on the $\text{RCH}_2\text{—SCH}_3$ bond in Met or MetES to abstract a hydrogen and release $\cdot\text{SCH}_3$ radical followed by dimerization and CHCl_3 formation. The proposed reaction mechanism takes into consideration the fact that under these experimental conditions no adducts are formed [4] and that CHCl_3 is produced. In anaerobic enzymatic incubation mixtures we also found MeSH and H_2S formation which would result from enzymatic and non-enzymatic pathways of liver microsomal reductive degradation. One interesting observation

was that only MetES but not Met led to detectable amounts of DDS in enzymatic incubation mixtures producing $\cdot\text{CCl}_3$ and that endogenous Met present in microsomal protein did not seem to interact. These results might be explained assuming that the lipid soluble MetES has more chance to have access to cytochrome P-450 active sites and be close to the place where the highly reactive $\cdot\text{CCl}_3$ is known to be produced [1–4]. Cytochrome P-450 Met residues [8] (or other Met present in microsomal protein), on the other hand, have relatively fixed positions in the proteins that may not be close enough to the site of $\cdot\text{CCl}_3$ production to be attacked and lead to measurable amounts of DDS. In support of this assumption is the fact that we did not observe a significant decrease in Met content in liver microsomal protein from 6-hr CCl_4 poisoned rats. These results suggest that, if the interactions described here between $\cdot\text{CCl}_3$ and Met are biologically significant, they should involve only a minor fraction of the total Met pool.

Centro de Investigaciones
Toxicológicas (CEITOX)
CITEFA/CONICET
Pcia. de Buenos Aires
Argentina

GERARDO D. CASTRO
MARÍA I. DÍAZ GÓMEZ
JOSÉ A. CASTRO*

REFERENCES

1. Castro JA. Mechanical studies and prevention of free radical cell injury. In: *Proceedings of the IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology, London, UK, 1984* (Eds. Paton W, Mitchell J and Turner T), pp. 243–250. Macmillan, London, 1984.
2. Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: status quo and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 4: 129–131, 1983.
3. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 222: 1–15, 1984.
4. Janzen EG, Stronks HJ, Dubose CM, Poyer JL and McCay PB. Chemistry and biology of spin-trapping radicals associated with halocarbon metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Environ Health Perspect* 64: 151–170, 1985.
5. Villarruel MC and Castro JA. Reactions of trichloromethyl free radicals with amino acids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 28: 79–85, 1980.
6. Díaz Gómez MI, Castro JA, de Ferreyra EC, D'Acosta N and de Castro CR. Irreversible binding of ^{14}C from $^{14}\text{CCl}_4$ to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed-function oxygenase activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 25: 534–541, 1973.
7. Spackman DH, Stein WH and Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal Chem* 30: 1190–1206, 1958.
8. Jänig GR and Pfeil D. Structure–function relationships of the essential components of the liver microsomal monooxygenase system. In: *Cytochrome P-450* (Eds. Rauckpaul K and Rein H), pp. 72–76. Academic-Verlag, Berlin, 1984.

* Correspondence: Dr José Alberto Castro, CEITOX, CITEFA/CONICET, Zufriategui 4380, 1603 Villa Martelli, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

The influence of acute phenytoin administration on biotransformation and lipid peroxidation in the liver of rats of different ages

(Received 6 December 1988; accepted 4 July 1989)

Phenytoin is a frequently used antiepileptic. Its influence on biotransformation of xenobiotics in liver is well known. The metabolism of benzphetamine [1], dicoumarol and hexobarbital [2] increases after administration of phenytoin.

Whereas Eling *et al.* [2] have shown that phenytoin increases the biotransformation activities which are inducible by phenobarbital we have found enhanced activities inducible by 3-methylcholanthrene or β -naphthoflavone in 60-day-old male rats [3]. In this study additionally other age groups were investigated to reveal whether the induction type is age dependent.

Furthermore the influence of phenytoin on lipid peroxidation in the liver of the same animals of different ages was determined to detect any interaction between induction and lipid peroxidation. Acute intoxication by several drugs leads to enhanced lipid peroxidation and to liver damage [4-7] and the monooxygenase system may play an important role by formation of compounds which can act as initiators of lipid peroxidation [4].

Finally we tried to find possible interactions of micro-

somal lipid peroxidation and the different isozymes of cytochrome P-450 by adding various substrates for different isozymes of cytochrome P-450 to the incubation mixtures.

Materials and methods

Male Wistar rats (up to an age of 10 days, males and females) of the Institute's colony breed (Uje: Wist) were used. They were raised and housed under controlled conventional conditions [room temperature 22-26°, humidity >50%, natural day-night light cycle, soft wood bedding, pellet diet (cubed diet, VEB Versuchstierproduktion, Berlin) and tap water *ad lib*; litters restricted to 6, weaning at 28-30 days] [8]. The rats received phenytoin (diphenylhydantoin sodium, DPH) for three days prior to being killed at various doses *i.p.* One control group was injected with 0.9% NaCl-solution, a second control group with 12% ethanol. Ethanol was used in this concentration for the dilution of phenytoin. On the 10th, 30th, 60th and 120th day of life the animals were killed in ether anaesthesia by decapitation, and the livers were removed for preparation of the 9000g supernatant. One part of the supernatant

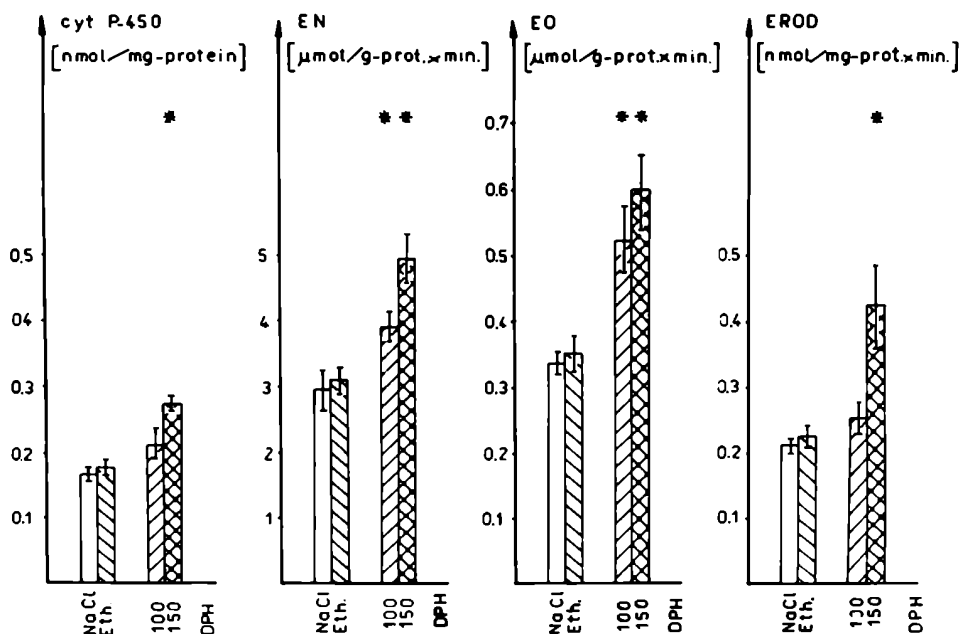


Fig. 1. The influence of a 3-day-pretreatment with phenytoin (DPH, dose in mg/kg body wt) on cytochrome P-450 concentration (cyt P-450), ethylmorphine N-demethylation (EN, formaldehyde release), ethoxycoumarin O-deethylation (EO, coumarin release), and ethoxyresorufin O-deethylation (EROD, resorufin release) in the 9000g liver supernatant of 60-day-old male rats (N = 6). Controls received the same volumes of either saline (NaCl) or 12% ethanol (Eth). (*) Significant differences from ethanol treated controls ($P \leq 0.05$).

Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

Bay 15
Shannon Industrial Estate
Co. Clare, Ireland
(P.O. Box 85 Limerick)



Tel (061) 61944/61810
Telex 72191
Fax (061) 62144

Editor's code:
PS837

Dear Author(s)

The following manuscript has been accepted for publication in **CANCER LETTERS**

Author(s): GD Castro, MI Diaz Gomez, JA Castro

Title: Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal sp

Date of receipt: 23/3/90

Date of receipt of revised version:

Date of acceptance: 19/4/90

Sincerely yours
[Signature]
Editor

AUTHORS REPRINT ORDER

Please read terms of delivery and prices overleaf, then complete and return this form immediately even if you do not wish to order reprints, to:

ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD., P.O. Box 85, Limerick, Ireland.

PLEASE SUPPLY ME WITH:	QUANTITY
Reprints free of charge.....	50
Reprints (minimum order 100).....	—
	50

All reprints are supplied with covers at no extra charge.

DELIVER REPRINTS TO

(Please type or print clearly)

Name JOSE A. CASTRO Vol. 22U Page 120 to 120
Address CEITOX, CIIEFA/CONICET
ZUFRIATEGUI 4380
City VILLA MARTELLI Zone 1603 PCA. BS. AS.
Country ARGENTINA

BILL/INVOICE/CHARGE TO

Name

Address

City..... Zone

Country

P.O. unnecessary

DELIVERY INSTRUCTIONS

Please indicate method of delivery below. Options available are as follows:

To EUROPE

Surface mail (no extra charge)

To USA, CANADA and JAPAN

Surface Air Lift (SAL) (no extra charge)

Airmail (40% extra)

To AUSTRALASIA, ASIA, AFRICA, CENTRAL and SOUTH AMERICA

Surface mail (no extra charge)

Airmail (40% extra)