

ACTIVACIÓN METABÓLICA DEL CITRATO DE CLOMIFENO POR LA FRACCIÓN S9 PROVENIENTE DE RATAS TRATADAS CON DIFERENTES INDUCTORES DEL CITOCROMO P450 (CYP)

Myriam ARRIAGA-ALBA¹, Rocío FLORES-PAZ¹, Elvia GARCÍA-JIMÉNEZ¹, Roberto RIVERA-SÁNCHEZ¹
y Jesús Javier ESPINOSA-AGUIRRE^{2,3}

¹Hospital Juárez de México, Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 5160, D.F. 07760 México

²Instituto de investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal No. 70228, D.F. 04510 México

³División de Medicina Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, D.F. 04530 México

(Recibido abril 1998, aceptado enero 1999)

Palabras clave: citocromos P450, metabolismo de mutágenos

RESUMEN

El citrato de clomifeno (CC) empleado como inductor de ovulación en el tratamiento de la esterilidad, produce mutaciones por corrimiento de lectura del mensaje en la prueba de Ames en presencia de un homogeneizado de hígado de rata tratada con aroclor 1254. El uso de homogeneizado hepáticos procedentes de animales tratados con diferentes estimuladores del CYP, puede ayudar a comprender mejor el metabolismo que transforma el CC en un mutágeno para la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium*. En este trabajo se muestra que el S9 de hígado de animales tratados con estreptozotocina (STZ), inductor de CYP2E1, no "activa" adecuadamente al CC. Con S9 de fenobarbital (FB), inductor de CYP2B1/B2, se logra una respuesta muy similar a la obtenida con S9 proveniente de ratas tratadas con aroclor 1254, mientras que con S9 de 3-metilcolantreno (3MC), inductor de CYP1A1/A2 y CYP2B1, se mejora la respuesta mutagénica del fármaco. Estos datos sugieren que la activación del CC, es una reacción de oxido-reducción mediada principalmente por CYP1A y probablemente por CYP2B.

ABSTRACT

Clomiphene citrate (CC), a drug employed as an ovulation inducer in patients with infertility problems, produced frameshift mutations in the Ames test, only when it was exposed to aroclor 1254 induced S9 mixture. The use of different rat liver inducers permits a better comprehension of the metabolic pathways followed by CC in order to be activated to mutagenic metabolite. The results presented here show that rat liver homogenates induced with streptozotocine (STZ), which enhanced the levels of CYP2E1, did not improve the mutagenicity of CC previously seen for aroclor 1254 S9. The employment of fenobarbital (FB) as a rat liver inducer gave similar results to those obtained with aroclor 1254. S9 induced with 3-methylcholanthrene (3MC), slightly enhanced the mutagenic effect of CC on *S. typhimurium* TA98. These results suggest that a redox reaction mediated by CYP1A and probably CYP2B isozymes are responsible for the transformation of CC to a mutagenic metabolite.

INTRODUCCIÓN

El citrato de clomifeno (CC) se emplea en las clínicas de la reproducción humana especialmente para inducir ovulación en mujeres anovulatorias y oligovulatorias (Schialli 1986). En pacientes masculinos está indicado en algunos casos de oligospermia. Sin embargo, se ha observado que en los varones su empleo no es muy confiable ya que no mejora los niveles

séricos de la hormona luteinizante (LH) (Chiorboli y López 1982, Gómez-Alzugaray 1985).

El CC se ha asociado a diferentes efectos adversos en estudios de animales de laboratorio. Así pues, se ha demostrado que una aplicación a ratas Sprague-Dawley recién nacidas resulta en múltiples anomalías del tracto reproductor, incluyendo ovario quístico, hipoplasia ovárica, hiperplasia del oviducto, metaplasia epitelial y tumores uterinos (Clark y Ormark 1977).

En ratas adultas, el CC puede causar efectos tóxicos que comprometen a casi todos los órganos como el hígado, el bazo, el corazón, el riñón, el útero y los ovarios (Hart 1990). Por otro lado, estudios epidemiológicos realizados entre grupos de pacientes a quienes se les había estimulado el embarazo con la ayuda de este medicamento (250 mg/día/ciclo), muestran que la frecuencia de aborto en el primer trimestre del embarazo fue del 23.9 % en 93 embarazos analizados, en comparación con un grupo testigo al que se indujo la ovulación con ganodotropinas con 8.9 % de abortos en una población de 270 embarazadas (Toshinobu *et al.* 1979). Otro estudio (Bolton 1977) informó del desarrollo de cáncer mamario en el 14 % de los pacientes tratados con el medicamento.

Empleando el sistema de Ames con *Salmonella typhimurium*, se muestra que el CC produce mutaciones por corrimiento de lectura del mensaje en las cepas TA1538, TA97 y TA98, en combinación con la fracción S9 de hígado de rata tratada con aroclor 1254. Utilizando la prueba de *Escherichia coli* Po1A/Po1A⁺, se probó que este fármaco o sus derivados metabólicos son capaces de producir daños genotóxicos. Así mismo, se demostró que dichos daños promueven la desrepresión del sistema SOS; lográndose la expresión de los genes que se encuentran bajo el control del represor *lexA* como el gen de lisogenia del profago y el de la producción de colicina E1 (Arriaga-Alba *et al.* 1996). Sin embargo, es difícil asociar los daños producidos *in vivo* por el CC con los daños genotóxicos encontrados *in vitro*. Para entender mejor los efectos mutagénicos se ha propuesto que se requiere una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares de ambos eventos así como mayor conocimiento de las vías de activación y de desintoxicación del fármaco y de la facilidad con que los posibles metabolitos pueden alcanzar su blanco en el ADN. No obstante, se han descrito grupos de compuestos químicos, para los cuales existe una buena correlación entre la potencia mutagénica y la carcinogénica, por lo que se considera que existen similitudes entre los mecanismos de ambos eventos (Douglas *et al.* 1988).

Estudios de farmacocinética del CC han mostrado que esta molécula se puede fijar fácilmente a receptores de estrógenos, a lipoproteínas de bajo peso molecular y a sitios de unión antiestrogénicos, observándose varias diferencias entre los estudios realizados, lo que puede explicar la diversidad de efectos biológicos observados *in vivo* (Pasqualini *et al.* 1988). Se ha informado también que el 57 % del fármaco es eliminado en heces sin haber sufrido alguna alteración metabólica. Los principales metabolitos del CC son derivados hidroxilados en cualquiera de los anillos de su molécula, por ejemplo: el 4-hidroxiclomifeno y el 4¹-hidroxiclomifeno. Ruenitz y Bagley (1985), propusieron que la capacidad arilante de estos derivados electrofílicos del clomifeno debería evaluarse con respecto a su papel para inducir cáncer mamario en ratas (Ruenitz *et al.* 1987).

El uso de diferentes estimuladores de los citocromos P450 (CYP), ha sido de gran utilidad para evaluar la activación metabólica de diferentes compuestos genotóxicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas, *N*-nitrosaminas y compuestos nitroaromáticos. Por ello es importante la caracterización de compuestos que modulan la expresión de CYP. Por ejemplo, se ha reportado que el ciclohexanol promueve la acti-

vidad de CYP 2B1/B2 y de CYP 2E1, mientras que la estreptozotocina (STZ) hace lo mismo con el CYP 2E1 (Espinoza-Aguirre *et al.* 1993, 1997). Por otro lado, el fenobarbital (FB) induce especialmente los citocromos de la subfamilia CYP2B: 2B1 y 2B2, mejorando la respuesta mutagénica de algunos compuestos como la ciclofosfamida (Black *et al.* 1989). El tratamiento de roedores con FB, solo o en combinación con otros compuestos, ha sido posiblemente el más recomendado después del uso de aroclor 1254 (Callander *et al.* 1995). El 3-metilcolantreno (3MC) induce a los dos miembros de la subfamilia 1A. Con base en estos resultados, Mirvish *et al.* (1995), reportaron que los citocromos de la familia 2B son los responsables del 50 % de la activación de la metil-*N*-amil-nitrosamina. En el caso de la hidroxilación de la cadena lateral de las *N*-nitroso dialquilnitrosaminas, se ha determinado que están involucrados también los citocromos CYP2E1, CYP3A4 y CYP2C (Bellec *et al.* 1997). El estudio de la sobreexposición del gen de *CYP1A1* ha sido de gran interés, demostrándose que puede ser polimórfico ya que uno de sus alelos se encuentra fuertemente asociado a casos de cáncer pulmonar (Zhang *et al.* 1996). En este trabajo, se empleó la fracción S9 obtenida de animales tratados con diferentes inductores de CYP y se exploraron los mecanismos enzimáticos responsables de la activación del citrato de clomifeno, promutágeno capaz de inducir mutaciones por corrimiento en la lectura del mensaje en *S. typhimurium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y cepas

El fosfato de nicotinamina adenina dinucleótido (NADP), la glucosa-6-fosfato (G6P), el 2-aminoantraceno (2AA), el 2-aminofluoreno (2AF), la estreptozotocina (STZ), el fenobarbital (FB) y el 3-metilcolantreno, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Luis MO, EUA). El homogeneizado de hígado de rata tratada con aroclor 1254, fue adquirido de Molecular Toxicology Inc. El citrato de clomifeno químicamente puro fue donado por los Laboratorios Le Petit de México S.A. La cepa de *S. typhimurium* TA98 fue donada por el Dr. Bruce Ames de la Universidad de Berkley California, EUA.

Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con pesos entre 200 y 250 g; cada grupo de tratamiento consistió en tres animales. El primer grupo fue tratado con 3-metilcolantreno (15 mg/ml en aceite de maíz) por vía intraperitoneal a dosis de 25 mg/kg/día durante cuatro días. Al segundo grupo se le suministró fenobarbital en el agua de bebida (1 mg/ml) a libre demanda por cinco días. Un tercer grupo de animales fue tratado con estreptozotocina suspendida en aceite de maíz a dosis de 40 mg/kg/día por tres días, vía intraperitoneal. Se incluyeron grupos de ratas testigos inoculados intraperitonealmente con aceite de maíz o que ingirieron agua *ad libitum*. Después del último día de tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Obtención de la fracción S9

Las fracciones S9 hepáticas se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito por Maron y Ames (1983). Los hígados de cada grupo de animales se procesaron conjuntamente, se cortaron en pedazos pequeños previos a homogeneizarlos en una solución de KCl 250 mM (3 ml/g de hígado humedo). La suspensión resultante se centrifugó a 9000 g por 10 minutos y el sobrante fue decantado y distribuido en alícuotas de 2ml que fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. El procedimiento descrito se llevó a cabo a 4 °C y en condiciones de esterilidad.

Preparación de la mezcla S9 para estudios de activación metabólica *in vitro*

La mezcla S9 para estudios de activación metabólica *in vitro* se preparó con NADP 4 mM, G6P 5 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 33 mM, en amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.4. Los diferentes homogeneizados con fenobarbital, estreptozotocina, 3-metilcolantreno o aroclor 1254, fueron adicionados a una concentración final de 4.0 %.

Ensayos de mutagénesis

Estos ensayos se realizaron con el método de preincubación, empleando la cepa TA98 según lo sugerido por Maron y Ames (1983), para mutágenos débiles. A 100 µl de un cultivo en fase estacionaria en tubo de rosca estéril se le adicionaron 10 µl de las soluciones de CC a probar en concentraciones de 16.2 a 1000 µg por caja de Petri y 500 µl de la mezcla S9. Los tubos se incubaron durante 60° a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 2.0 ml de agar suave al 0.6 % con histidina-biotina 0.5 mM, según las especificaciones de Maron y Ames (1983). El contenido de los tubos se vació en cajas con medio mínimo de Vogel Boner, se incubaron 48 horas a 37 °C y se contaron las revertantes protótrofas a histidina. Se consideró como resultado positivo cuando se duplicó por lo menos el número de colonias revertantes espontáneas y además se obtuvo una respuesta dependiente de la concentración de CC. Cada experimento se repitió cuando menos en cinco ocasiones.

Análisis estadístico de los datos

El cálculo de la potencia mutagénica se realizó empleando el programa SALANAL ("Salmonella Assay Analysis") Versión 1.0 desarrollado por la U.S. Environmental Protection Agency (Research Triangle Park, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **figura 1a** se puede observar la respuesta mutagénica del citrato de clomifeno en presencia de la mezcla S9 de animales tratados con aroclor 1254. Estos resultados muestran que la activación del CC para convertirse en un compuesto mutagénico es una reacción de óxido-reducción dependiente de NADP y posiblemente también de enzimas pertenecientes a la superfamilia de CYP. Estas observaciones concuerdan con reportes anteriores en donde se ha descrito que los principales metabolitos de este fármaco son derivados hidroxilados en cualquiera de los anillos de

su molécula: 4-hidroxiclomifeno y 4'-hidroxiclomifeno (Ruenitz *et al.* 1987), que pueden tener actividad mutagénica.

La mutagenicidad del CC dependiente de la presencia de la mezcla S9 proveniente ya sea de animales expuestos a con STZ, FB o 3MC, así como de sus respectivos animales testigos, se puede notar en las **figuras 1b, 1c y 1d**. Asimismo, la potencia mutagénica calculada a partir de la porción lineal de las curvas de dosis-efecto obtenidas con cada uno de los inductores, se encuentra en la **tabla I**.

La **figura 1b**, muestra el estudio de mutagénesis con homogeneizados de hígado de ratas tratadas con STZ, inductor de CYP2E1, comparada con la obtenida al usar el homogeneizado hepático de animales testigo. En este ensayo, se muestra que la participación del CYP2E1 no mejora la respuesta mutagénica del CC cuando éste fue activado con mezcla S9 proveniente de ratas pretratadas con aroclor 1254. Asimismo, en los datos de la **tabla I**, se puede observar que el homogeneizado del grupo testigo no es capaz de activar al CC. Lo anterior concuerda con reportes previos en los que se ha demostrado que el CYP2E1 actúa sobre compuestos químicos diferentes como es en el caso de algunas nitrosaminas (Espinosa-Aguirre *et al.* 1997).

En la **figura 1c** se nota la mutagenicidad del CC en presencia

TABLA I. POTENCIA MUTAGÉNICA DEL CC MEDIADA POR LA S9 HEPÁTICA PROVENIENTE DE ANIMALES TRATADOS CON DIFERENTES INDUCTORES*

Inductor	Grupo inducido	Grupo testigo
AROCLOR 1254	0.85	0.12
STZ	0.73	0.17
FB	0.79	0.35
3MC	1.55	0.15

*Pendiente de la recta de dosis-efecto, calculada con el programa SALANAL y expresada en número de revertantes/µg. El grupo testigo de aroclor 1254 no contiene NADP y el grupo inducido correspondiente se refiere a experimentos realizados en presencia de NADP. Cada valor representa la media de resultados obtenidos en cinco experimentos independientes

de hígado de rata inducida con FB, inductor de los citocromos CYP2B1/B2, así como de hígado de ratas testigo. El análisis matemático (**tabla I**) indica que la potencia mutagénica del CC activado por S9 de FB, es similar a la obtenida con el activado por la S9 de aroclor 1254. El FB es probablemente uno de los inductores más empleados en estudios de mutagénesis y se ha sugerido como alternativa del uso de aroclor 1254 (Rodríguez-Araiza *et al.* 1995, Xu y Pany 1995). Los resultados obtenidos con FB sugieren que los citocromos de la subfamilia 2B participan en la conversión metabólica del CC en un compuesto mutagénico. Así mismo, se muestra que los resultados reportados por otros autores, en los que se propone el fenobarbital como una alternativa al uso del aroclor 1254, pueden ser aplicables para el estudio de medicamentos con actividad mutagénica moderada (Challender *et al.* 1995).

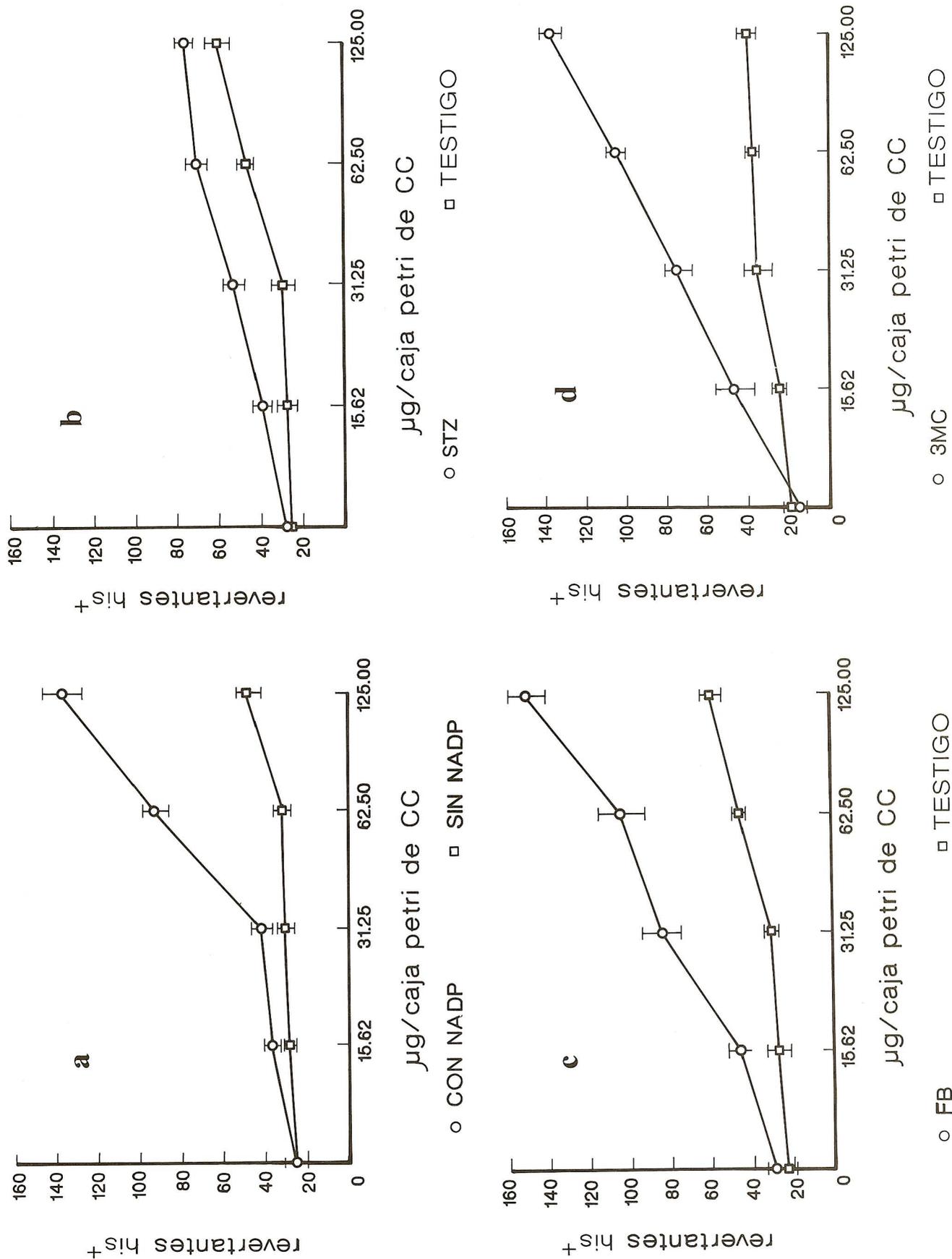


Fig. 1. Efecto de la S9 hepática de rata sobre la mutagénesis del citrato de clomifeno en *Salmonella typhimurium* TA98. Cada punto representa el promedio obtenido de 3 experimentos independientes. a. En presencia y ausencia de NADP, b. Con STZ y su testigo, c. Con FB y su testigo, d. Con 3MC y su testigo.

Los datos logrados con la S9 testigo así como los inducidos con 3-metilcolantreno se encuentran en la **figura 1d**. Es evidente que la mutagenicidad del CC se puede apreciar mejor cuando es activado por la S9 de 3-metilcolantreno en comparación con la S9 testigo y aún con la obtenida de animales inducidos con aroclor 1254 (**Tabla 1, Fig. 1d**). De acuerdo con lo reportado por Mirvish (1995), los citocromos de la familia 1A, se han detectado como parcialmente responsables de la activación de nitrosaminas y de algunos hidrocarburos aromáticos como 2-aminoantraceno y benzo(a)pireno. En efecto, la actividad carcinogénica de estos compuestos se ha asociado al CYP1A1 (Hilali *et al.* 1993). Así por ejemplo, inhibidores de este citocromo y algunos extractos de plantas se han empleado como antimutágenos y antitumorales debido a su capacidad de inhibir al CYP1A1 o de inducir diferentes familias de citocromos (Espinosa-Aguirre *et al.* 1993, Wong *et al.* 1993). Consecuentemente, estos datos sugieren que los citocromos CYP1A1 y CYP1A2, tienen un papel importante en la transformación del citrato de clomifeno en un compuesto que puede ser genotóxico (Arriaga-Alba *et al.* 1996). Las discrepancias de efectos tóxicos, teratogénicos y carcinogénicos producidos por este fármaco en diferentes estudios, podrían estar influenciadas por los niveles de citocromos CYP1A1 y CYP2A2 y en menor proporción por CYP2B1 y CYP2B2.

REFERENCIAS

- Arriaga-Alba M., Flores-Paz R., Díaz-Hernández R. y González-Patiño M.E. (1996). Valoración de riesgo genotóxico de exposición a citrato de clomifeno con diferentes sistemas de pueba bacterianos. *Ginecol. Obst. (Mex)* 64, 490-497
- Black S.M., Ellard S., Meehan R.R., Parry J.M., Adesnik M., Beggs J.D. y Wolf C.R. (1989). The expression of cytochrome P450IIB1 in *Saccharomyces cerevisiae* results in an increased mutation frequency when exposed to cyclophosphamide. *Carcinogenesis* 10, 2139-2143.
- Bellec G., Dreano Y., Bail J.P., Menez J.F. y Berthou F. (1997). Cytochrome P450 hydroxylation of carbon atoms of their alkyl chain of symmetrical N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Mutat. Res.* 37, 199-209.
- Bolton P.M. (1977). Bilateral breast cancer associated with clomiphene. *Lancet* 2, 1176.
- Clark J.H. y Ormac K.S. (1977). Clomid or bonofoxidine administered to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities. *Science* 197, 164-165.
- Chiorbolie E. y López M.A. (1982). O uso do clomifeno no factor masculino da esterilidade. *J. Bras. Urol.* 8, 54-58.
- Callandere R.D., Mackay J.M., Clay P., Elcombe C.R. y Elliot B.M. (1995). Evaluation of phenobarbital-beta-naphtoflavone as an alternative S9 induction regime to aroclor 1254 in the rat for use in *in vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis* 10, 517-522.
- Douglas G., Blakey D.H. y Clayson D.B. (1988). Genotoxicity test as predictors of carcinogens: an analysis. *Mutat. Res.* 196, 83-93.
- Espinosa-Aguirre J.J., Rubio J., López L., Nosti R. y Asteinza J. (1997). Characterization of the CYP isoenzyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis* 12, 159-162.
- Espinosa-Aguirre J.J., Vilchis C., Ostrosky-Wegman P., Benitez L., Lares I. y Rubio J. (1993). Antimutagenesis of cyclohexanol towards 4-(N'-nitrosomethylamine)-(3-pyridil)-1-butanone and nitrosodiethylamine in *Salmonella typhimurium* strain TA100. *Mutat. Res.* 300, 151-154.
- Gómez-Alguzaray R., Mas-Díaz J. y Padrón-Durán R. (1985). Tratamiento prolongado de la oligozoospermia idiopática con dosis pequeñas de clomifeno. *Rev. Cubana, Obstet. Ginecol.* 11, 91-96.
- Hart J.E. (1990). Pituitary-related weight change affecting the liver, uterus and adrenal glands of rats treated with hexoestrol and clomiphene in high doses. *Toxicology* 61, 165-194.
- Hilali A., Crutzen-Faty M.C., Gerber G.B. y Leonard A. (1993). Effect of age on the ability of rat liver tissues to transform chemical promutagens. *Gerontology* 39, 125-127.
- Maron D.M. y Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.
- Mirvish S.S., Huang Q., Wilson J. y Gelboin H.V. (1995). Use of monoclonal antibodies to cytochrome P450s to indicate the critical dealkylation and P450s involved in methyl-N-amyl nitrosamine mutagenicity in the presence of induced rat liver microsomes. *Mutat. Res.* 331, 161-170.
- Pasqualini J.R., Sumida C. y Giambiagi N. (1988). Pharmacodynamic and biological effects of anti-estrogens in different models. *J. Steroid. Biochem.* 31, 613-643.
- Rodríguez-Araiza A., Díaz-Méndez F.M., Navas J.J., Pueyo C. y López B. (1995). Metabolic activation of carcinogenic aromatic amines by fish exposed to environmental pollutants. *Environ. Molec. Mutagen.* 25, 50-57.
- Ruenitz P.C. y Bagley J.E. (1985). Comparative fates of clomiphene and tamoxifen in the immature female rat. *Drug. Metab. Dispos.* 13, 582-586.
- Ruenitz P.C., Arrendale R.F., George G.D., Rhompson C.B., Mokler C.M. y Nanavati N.T. (1987). Biotransformation of the antiestrogen clomiphene to chemically active metabolites in the immature female rat. *Cancer Res.* 47, 4015-4019.
- Schialli S. (1986). The reproductive toxicity of ovulation induction. *Fertil. Steril.* 45, 315-323.
- Toshinobu T., Setichiro F., Noriaki S. y Kihoe S. (1979). Correlation between dosage or duration of clomid therapy and abortion rate. *Inst. J. Fert.* 24, 193-194.
- Wong B.Y., Lau B.H., Yamasaki T. y Tell R.W. (1993). Modulation of cytochrome P-4501A1-mediated mutagenicity, DNA binding and metabolism of benzo(a)pyrene by chinese medical herbs. *Cancer Lett.* 68, 75-78.
- Xu J. y Pant K. (1995). Comparison of rat liver S9 activity induced with aroclor 1254 and phenobarbital beta-naphtoflavone in microbial and CHO Hpgt/mutation assays. *Environ. Molec. Mutagen.* 25, (Supp. 25), 59.
- Zhang Z.Y., Fasco M.J., Hung L., Guengerich F.P. y Kaminsky L.S. (1996). Characterization of purified human recombinant cytochrome P450-IIIc462 and vaL462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.* 56, 3926-3933.