

# PERFIL DE SENSIBILIDAD DE HEP-G2 COMO MODELO PARA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE XENOBIÓTICOS BIOACTIVADOS VIA CYP<sub>450</sub>\*

SENSITIVITY PROFILE HEP-G2 AS A MODEL OF CYTOTOXIC ACTIVITY  
DETERMINATION OF BIOACTIVATED XENOBIOTICS VIA CYP<sub>450</sub>\*

Stephanie O. PRIETO<sup>1</sup>, Fabio A. ARISTIZÁBAL G.<sup>2\*</sup>

Recibido: Junio 22 de 2008 Aceptado: Junio 11 de 2009

## RESUMEN

Para establecer la acción anticancerígena se han propuesto numerosas metodologías, principalmente enfocadas en la valoración de la citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares neoplásicas derivadas de diferentes tipos de cáncer humano; sin embargo, gran parte de estas líneas celulares presentan el inconveniente de ser limitadas metabólicamente y, por lo tanto, pueden no resultar apropiadas para establecer la citotoxicidad de potenciales profármacos, al mostrar falsos negativos. La línea celular Hep-G2 se emplea en la detección de moléculas que requieran activación metabólica para ejercer una actividad biológica, por ser de origen hepático y por exhibir actividad de varias enzimas de la fase I y II, que juegan un importante rol en la activación y detoxificación de xenobióticos. Hep-G2 es utilizada como modelo para encontrar actividad citotóxica producida por 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridina (PhIP) y ciclofosfamida, en presencia o ausencia de agentes inductores. Para este análisis se mide indirectamente el número de células viables mediante los ensayos de reducción del MTT y de tinción con resazurina. Adicionalmente se evalúa la posibilidad de emplear sistemas de co-cultivos con otras líneas celulares para fortalecer la sensibilidad del método. Se observa una limitada citotoxicidad de PhIP y ciclofosfamida, por lo cual se establece un sistema de cocultivos, en donde las respuestas son similares a las obtenidas con cada línea celular independiente. Los resultados permiten proponer que Hep-G2, pretratada con algunos agentes inductores, muestra, aunque limitadamente, una sensibilidad por PhIP, similar a lo propuesto por diferentes autores.

**Palabras clave:** citocromos, Hep-G2, enzimas inductoras, citotoxicidad, MTT, resazurina.

## ABSTRACT

Several methodologies have been proposed in order to establish anticancer action, mainly focused on *in vitro* cytotoxicity valuation on neoplastic cell lines derived from human cancer. However, most of these cell lines are metabolically incompetent, restricting model sensibility and generating false negative answers. Hep-G2 cell line is widely used because of its high sensibility reflecting phase I and II activity of some enzymes of phase I and II, which play an important role in activation and detoxification of xenobiotics. In this study, Hep-G2 is used as a model to find cytotoxic activity produced by 2-amino-

---

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

<sup>2</sup> Grupo de Farmacogenética del Cáncer. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Edificio 450, Ciudad Universitaria, Carrera 30 No 45 – 03. A.A. 14490. Bogotá, Colombia.

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: faaristizabal@unal.edu.co.

1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) and Cyclophosphamide, in presence or absence of inductor agents. This analysis was carried out by measuring indirectly viable number of cells with assays like MTT and resazurine staining. In addition, the possibility of co-cultures with other cell lines was evaluated according to strengthen method sensibility. Cytotoxicity of PhIP and cyclophosphamide was observed with the cellular staining methods. For this reason a co-culture system was established. The answer was similar to independent cell lines. These results propose that pre-treated Hep-G2 cells with some inductive agents show sensibility by PhIP as different authors postulate.

**Key words:** cytochrome, Hep-G2, enzyme inducer, cytotoxicity, MTT, resazurina.

## INTRODUCCIÓN

En la exhaustiva búsqueda por entender el cáncer y plantear alternativas en su contra, se han realizado diferentes estudios de bioprospección entre los que se utilizan ensayos de toxicidad. Se practican en modelos animales, permitiendo detectar posibles efectos tóxicos; sin embargo, aunque existe similitud entre los animales y el hombre en cuanto a la absorción y distribución de los compuestos administrados, hay diferencias en los procesos de biotransformación y posterior eliminación (1-4). Esto ha conducido a desarrollar métodos alternativos de estudio, que aceleren la búsqueda de moléculas cabeza de serie, apoyando el descubrimiento de nuevos principios activos y permitiendo aproximarse al conocimiento de los procesos que potenciales fármacos podrían sufrir al ser administrados en humanos. Es aquí donde el uso de modelos *in vitro*, que utilizan cultivos celulares de origen humano que generan resultados válidos, rápidos, sencillos y relativamente económicos, ha tomado importancia (5).

En la búsqueda de moléculas anticáncer, los ensayos de citotoxicidad empleando líneas celulares derivadas de neoplasias humanas se han convertido en una de las principales herramientas de apoyo a los procesos de bioprospección. Uno de los mayores inconvenientes que presentan los modelos experimentales *in vitro* está asociado a que algunos xenobióticos requieren una previa bioactivación por biotransformación, posiblemente asociada a la vía enzimática de los citocromos P450 (CYP<sub>450</sub>), para revelar un efecto tóxico del compuesto (4,6). Esto se debe a que los CYP, responsables de la mayoría de las actividades de la fase I de biotransformación de xenobióticos, generalmente están inactivos en las líneas celulares cultivadas usadas, lo que conduce a que con los ensayos tradicionales de citotoxicidad no es posible detectar efectos tóxicos (5, 7-9). Entre los xenobióticos que requieren bioactivación encontra-

mos promutagénicos, tales como 2- amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b]piridina (PhIP) y fármacos como ciclofosfamida (CP), entre otros (4).

Se proponen alternativas para solucionar los impedimentos de las técnicas convencionales y poder obtener así resultados contundentes. Tales metodologías se basan en el tratamiento previo de los fármacos con enzimas microsómicas o preparados hepáticos (10,11); o usando líneas celulares neoplásicas hepáticas, en donde se hace evidente la activación de las sustancias por los citocromos (4, 12-14). Sin embargo, las líneas celulares, adicionalmente, pueden requerir tratamientos previos con inductores enzimáticos que les permiten activar ciertos CYP, proporcionando un efecto real en los ensayos de toxicidad. Entre los agentes inductores se encuentran el 3-metilcolantreno (3-MC) y omeprazol, los cuales activan la isoforma CYP1A (15 -18).

En este estudio se utilizó una línea celular derivada de hepatocarcinoma (Hep-G2) como modelo para encontrar actividad citotóxica producida por algunos productos xenobióticos que requieren ser biotransformados, en presencia o ausencia de agentes inductores. Con este fin se realizaron ensayos convencionales de citotoxicidad empleando parte del panel de líneas celulares disponibles incluyendo a Hep-G2 y, adicionalmente se evaluó la posibilidad de emplear sistemas de cocultivos entre Hep-G2 y otras líneas celulares, buscando fortalecer la sensibilidad del método como alternativa para, posteriormente, emplear la metodología en el establecimiento de potenciales acciones anticáncer de diferentes sustancias y sobre líneas celulares provenientes de diferentes tumores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Compuestos

2- amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b]piridina (PhIP) y 3- metilcolantreno (3-MC),

obtenidos de MP Biomedicals (Bogotá, Colombia). Omeprazol (OM) y ciclofosfamida (CP), obtenidos del Instituto de Cancerología (Bogotá, Colombia). Resazurina y MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) (Sigma).

### Cultivos celulares y tratamiento

Se emplearon las líneas celulares neoplásicas de origen humano: Hep-G2 (carcinoma hepatocelular); SiHa (carcinoma de cérvix); HT-29 (adenocarcinoma colorrectal) y NCI-H460 (carcinoma de pulmón), disponibles en el banco de células del grupo de Farmacogenética del Cáncer, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Las cuatro líneas celulares se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100  $\mu$ g/mL, en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad relativa.

Se siguieron los procedimientos señalados por Cordero *et al.* (19) estableciendo las densidades celulares para trabajar, previa evaluación de 5 diferentes concentraciones celulares (2.500, 5.000, 10.000, 15.000 y 20.000), utilizando los métodos de tinción celular MTT o resazurina.

Inicialmente, en placas de 96 pozos, se sembraron las líneas celulares, y finalizado el periodo de preincubación (24h), se adicionaron los profármacos (PhIP y CP) en combinación o ausencia de agentes inductores (3-MC u OM). Para los tratamientos se prepararon soluciones madre (concentración 1000X) en DMSO (inferior al 0.1%) para PhIP y 3-MC, y en solución salina tamponada con fosfatos (PBS) para ciclofosfamida y omeprazol. Las células fueron expuestas a los compuestos por 24 y 48 horas, excepto para 3-MC (2  $\mu$ M) y omeprazol (50  $\mu$ M), los cuales fueron agregados 6 horas antes de la adición de PhIP y ciclofosfamida. Finalizados

los tiempos de exposición de las líneas celulares a los tratamientos, se les adicionó resazurina (concentración final de 10% v/v) o MTT (0.25 mg/ mL), para continuar con la incubación por 4h, a 37°C, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% humedad. Posteriormente se realizaron las lecturas de supervivencia celular mediante el equipo TECAN y BIO-RAD, respectivamente.

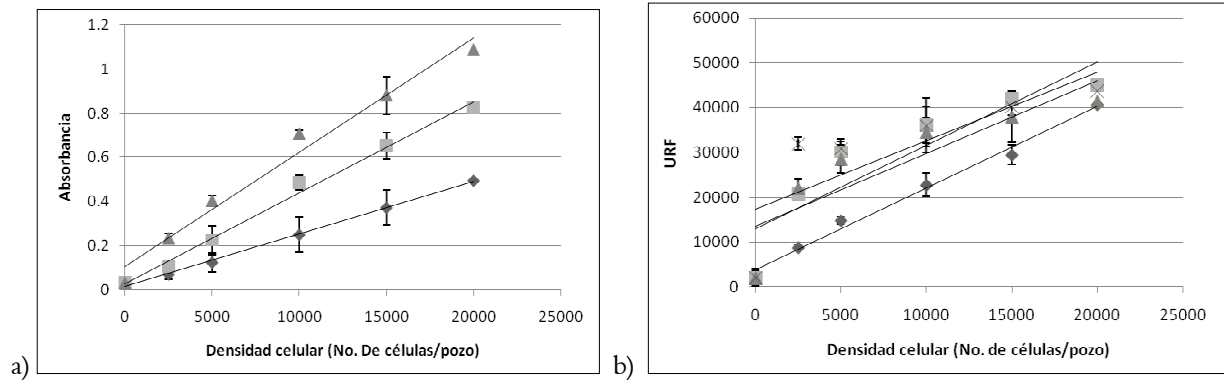
Adicionalmente se realizaron co-cultivos entre Hep-G2 en combinación con las líneas celulares SiHa, HT-29 y NCI-H460, empleando las proporciones 50:50, 75:25 y 25:75. Estos co-cultivos fueron sometidos a los mismos tratamientos que las líneas por separado.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y al menos dos veces, en semanas diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de la densidad celular de Hep-G2

Para establecer la densidad celular de Hep-G2 (número de células/pozo), que permite realizar ensayos de citotoxicidad sin que haya desprendimiento a causa de la confluencia celular en los pozos, se estudió la linealidad de la relación entre absorbancia o unidades de fluorescencia (MTT y resazurina, respectivamente) y el número de células, y se estableció el rango de densidad celular en que esto se cumple para los dos métodos. Se encontró un comportamiento lineal, tanto en valoraciones realizadas en un periodo de incubación de 24 horas, como en las realizadas tras 48 y 72 horas de incubación ( $r \geq 0.99$  a 24h y  $r \geq 0.98$  tras 48 h y 72h), para la reducción del MTT, y ( $r \geq 0.99$  a 24h,  $r \geq 0.92$  tras 48 h,  $r \geq 0.93$  tras 72h y  $r \geq 0.96$  tras 96 h) para el método de tinción con resazurina (Véase figura 1, paneles A y B respectivamente).



**Figura 1.** Selección de la densidad de trabajo y evaluación del rango de linealidad con base en la relación número de células y absorbancia o unidades relativas de fluorescencia (URF); se muestran los resultados para Hep-G2, con 24 horas de incubación (◆); 48 horas de incubación (■); 72 horas de incubación (▲) y 96 horas de incubación (X). A: reducción del MTT; B: tinción con resazurina.

Para la línea celular Hep-G2, con base en los resultados obtenidos para ambos métodos, el rango de linealidad se estableció entre 5.000 y 15.000 células/pozo. Se observó una diferencia de comportamiento entre los dos métodos empleados; así con la reducción del MTT (véase figura 1A), en los diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h), a medida que aumenta el tiempo de incubación hay un amplio aumento en las unidades de absorbancia, dando la sensación de que el incremento en la cantidad de células viables no se manifiesta en una proporción equivalente en la absorbancia.

Este comportamiento no fue observado con el método de resazurina (Véase figura 1B), en donde se evidenció un incremento de las URF proporcional al número de células, posiblemente causado por las diferencias entre los fundamentos de los dos métodos de tinción, ya que el de MTT es de punto final, e incluso de carácter acumulativo en relación al producto que se mide (20), a diferencia de la resazurina, que permite un seguimiento continuo contra el tiempo de lectura, y para lo cual el producto que se detecta, resofurina, no se acumula sino que es, a su vez, metabolizado por las células, transformándose en dihidroresofurina que, además de no ser fluorescente, puede llegar a ser tóxica para las células (21, 22).

Con el objeto de establecer si existe correlación entre las respuestas obtenidas con ambos métodos, se aplicó la prueba de correlación de Pearson para cada tiempo de incubación de la línea celular Hep-G2, mediante el programa de GraphPad Prism (Versión 5). Los valores de correlación calculados mostraron que los coeficientes fueron cercanos a 1, lo que indica que ambos métodos estaban asociados

en forma positiva y, por ende, cuando aumentan las unidades de absorbancia obtenidas por un método, aumentan las unidades relativas de fluorescencia (URF) detectada en el otro.

A partir de estos resultados se seleccionó la densidad celular para los ensayos de citotoxicidad en líneas celulares separadas y en co-cultivos. Esta fue de 15.000 células/pozo, que se encuentra dentro del rango previamente analizado y reduce las variables en los procedimientos, ya que se emplearía la misma densidad celular para todas las líneas, teniendo la seguridad de que no se presentarán desprendimientos celulares a causa de la confluencia.

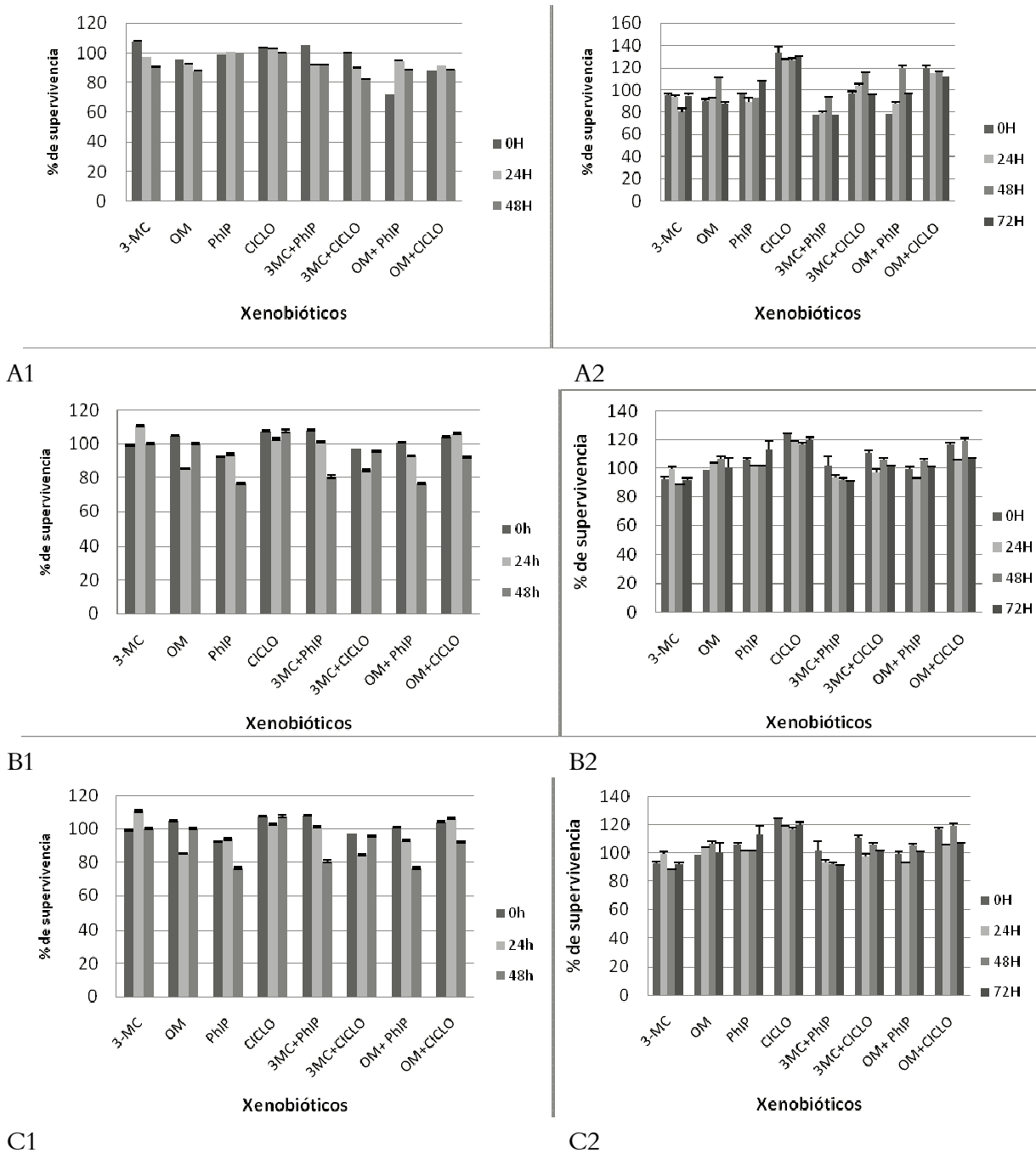
#### ***Evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares a agentes xenobióticos.***

Se verificó la sensibilidad de las líneas celulares por separado a los agentes xenobióticos y, posteriormente, a la combinación de cada agente inductor con los compuestos PhIP y ciclofosfamida, evaluando la citotoxicidad mediante el cálculo del porcentaje de células que permanece viable después de la exposición al compuesto.

Se observó que para SiHa y HT-29 (Véase figura 2 A y B), el porcentaje de supervivencia después del periodo de tratamiento fue del 80% aproximadamente en todos los tratamientos, lo que demuestra que ninguno de los compuestos en estudio en las concentraciones ensayadas causó disminución notoria en la supervivencia celular y, por ende, no se obtuvieron concentraciones letales superiores al 50%. Estos resultados evidenciaron que los compuestos no son citotóxicos para estas líneas celulares, o que su citotoxicidad en las concentraciones empleadas es mínima. Adicionalmente se observó que, en al-

gunos tratamientos, el porcentaje de supervivencia fue superior al 100%, considerándose como un efecto proliferativo significativo, por ser mayor de 10%, posiblemente por tres razones: problemas en la inoculación; a causa de algún tipo de inducción proliferativa por el compuesto empleado; y por último, motivos asociados a la hórmesis, como lo observado por Kinoshita *et al.* (23) (Véase figura 2 A y B).

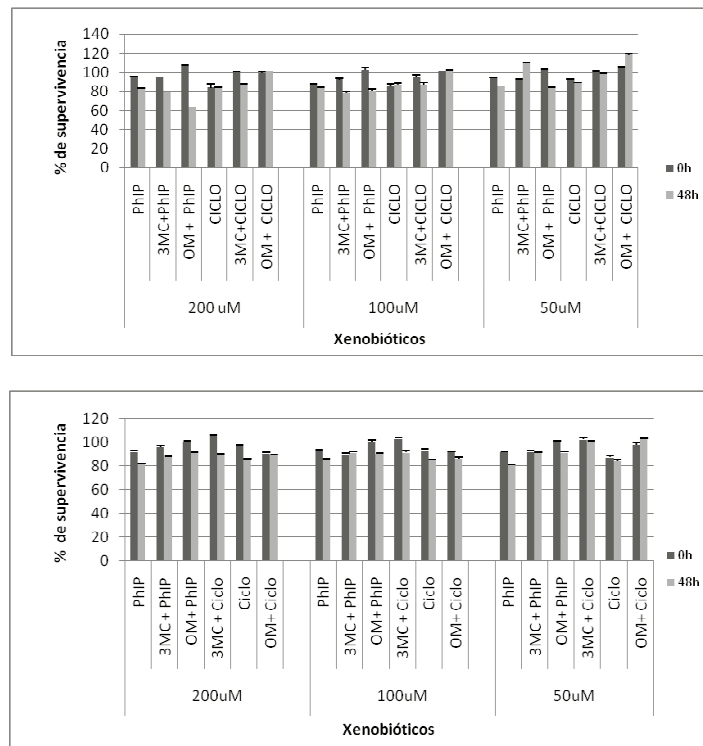
Por otra parte, al aplicarse el mismo procedimiento empleado para las líneas SiHa y HT-29 en la línea celular Hep-G2 (Véase figura 2 C), a diferencia de lo que se esperaba, tampoco se obtuvo una citotoxicidad importante, ni cuando se aplicaron previamente los agentes inductores. Por tal motivo se procedió a efectuar otros ensayos con el objetivo de establecer la razón por la cual no hubo citotoxicidad notoria.



**Figura 2.** Valoración de la sensibilidad a 3-MC, Omeprazol, PhIP y Ciclofosfamida empleando los métodos de MTT (1) y resazurina (2). A: HT-29; B: SiHa; C: Hep-G2. Las 72 horas obtenidas a partir del método de resazurina corresponden al pos-tratamiento.

Inicialmente se repitió el ensayo para Hep-G2 y NCI-H460, incluyendo esta última línea celular que, según la literatura, también puede expresar un alto número de isoformas de citocromos por ser de origen pulmonar. Para estos ensayos se tuvo en consideración que las soluciones stock de los agentes inductores y de los tóxicos se prepararan el mismo día. También se incluyeron otras concentraciones más altas de PhIP y de ciclofosfamida (100 y

200  $\mu\text{M}$ ), para confirmar que el motivo de esta falta de citotoxicidad no se debió a la baja concentración del xenobiótico colocado. Se empleó como control positivo la resazurina misma, comprobando así lo propuesto por O'Brien *et al.* (22) quienes señalan el efecto citotóxico que ejerce este colorante sobre las líneas celulares, posiblemente a causa de la transformación de resorufina a dihidroresorufina durante una exposición superior a 12 horas (Véase figura 3 A y B).



B.

**Figura 3.** Valoración de la sensibilidad a 3-MC, Omeprazol, PhIP y Ciclofosfamida empleando el método de resazurina durante un periodo de tratamiento de 48 horas. **A.** Hep-G2. **B.** NCI-H460

Se observó una disminución en el porcentaje de supervivencia cercana al 64% para la línea celular Hep-G2, empleando omeprazol como agente inductor y a la mayor concentración de PhIP como compuesto tóxico (200  $\mu\text{M}$ ), por lo cual nuevamente se hizo el ensayo, pero esta vez sólo con este agente inductor y con los dos tóxicos. Cabe mencionar que en esta ocasión el agente inductor permaneció seis horas, como anteriormente (24), y veinticuatro horas, como lo sugieren otros autores (25, 26).

Los resultados mostraron que el efecto citotóxico de PhIP parece incrementarse cuando se le ha aplicado previamente un agente inductor, como lo sugiere Guengerich (4), pero que dicho cambio es reducido, puesto que el porcentaje de supervivencia

fue superior al 70%, lo que hace suponer que este comportamiento se debió a la falta de actividad biotransformadora importante, por lo que la cantidad de tóxico producido es limitada.

Por otra parte, estos resultados corroboran la sugerencia de que Hep-G2, pretratada con inductores de CYP1A como 3-MC, puede incrementar su sensibilidad a PhIP (24, 27). Sin embargo, en este ensayo también se observó que el aumento del efecto citotóxico al colocar previamente los inductores, no fue muy relevante para un estudio de citotoxicidad convencional.

Además es importante mencionar que, según trabajos realizados por Wilkening *et al.* (24), referentes a estudios de moléculas capaces de ser activadas

como promutagénicos, tales como benzo[a]pireno y PhIP, se evidenció que la expresión de la isoforma CYP1A es la más apropiada para observar dicha actividad tóxica, porque en los ensayos de regulación de expresión génica fue la que mostró mayor actividad tóxica con los tratamientos. Paralelamente se realizaron estudios genotóxicos con ciertos promutagénicos, empleando cultivos primarios de hepatocitos humanos y la línea celular Hep-G2, en los que se observó que PhIP solo ocasionaba daños del DNA en hepatocitos humanos. Sin embargo estos autores propusieron que la línea celular Hep-G2, pretratada con 3-MC, mostraría un incremento de sensibilidad a PhIP y, por ende, se observaría efecto relevante. Dicho efecto no se obtuvo en este estudio donde la toxicidad detectada fue reducida.

Los resultados también mostraron que para el compuesto ciclofosfamida no se observa un efecto en la viabilidad celular, puesto que los porcentajes de supervivencia para las cuatro líneas celulares tratadas con este compuesto fueron superiores al 80%. Esto concuerda con estudios realizados por otros autores, en donde el fármaco tampoco mostró actividad citotóxica *in vitro* (28-30). Este comportamiento se debe a que la ciclofosfamida es un profármaco que requiere para disociarse a mostaza fosforamida y acroleína, los metabolitos responsables de su actividad citotóxica, una oxidación catalizada por enzimas CYP<sub>450</sub>. Se considera que ninguna de las cuatro líneas celulares empleadas expresa constitutivamente los citocromos, ya que en condiciones *in vitro* pueden perder la habilidad de hacerlo (31), por lo que la ciclofosfamida permanece inactiva en el cultivo.

Adicionalmente, en este estudio se emplearon dos agentes inductores que activan algunas isoformas de CYP, pero posiblemente no son los apropiados para activar las isoformas necesarias para ver citotoxicidad *in vitro* con ciclofosfamida. Así, a pesar de que el omeprazol activa la vía CYP1A, según Masubuchi *et al.* (32), y el xenobiótico lansoprazol (LAN) es recomendado por ser considerado un inductor muy potente, pueden no estarse activando las isoformas apropiadas, dado que para la ciclofosfamida las isoformas de citocromos encargadas de esta transformación o metabolización en el hombre son CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8 y CYP2C9, de las cuales se ha demostrado que son activadas *in vivo* por rifampicina, fenobarbital o dexametasona (33, 34).

Al comparar los dos métodos de conteo celular empleados en las líneas celulares HT-29, SiHa y

Hep-G2, se observó una similaridad en el patrón de las columnas (Véase figura 2). Puede concluirse pues, que no se evidencian diferencias de sensibilidad notables.

Para los ensayos de recuperación en los que se uso el método de tinción con resazurina, finalizado el tratamiento con los cuatro compuestos, se reemplazó el medio de tratamiento y se determinó la población celular viable para, posteriormente, continuar la incubación en medio fresco durante 24 horas más y, finalmente, realizar nuevamente la determinación de las poblaciones celulares viables, con el fin de observar si las células eran capaces de recuperar la capacidad de proliferar eficientemente después del tratamiento. Los resultados obtenidos para SiHa, HT-29 y Hep-G2 reflejaron, para todos los xenobióticos y particularmente con ciclofosfamida, un aumento celular considerable con relación a lo observado en el tratamiento, lo cual indica que los efectos de los tratamientos tuvieron más efecto como inhibidores de proliferación celular que como citotóxicos (23).

Los resultados obtenidos en repeticiones en semanas diferentes ratificaron los valores de supervivencia obtenidos a partir de la citotoxicidad de los cuatro compuestos. La tendencia de las columnas con relación al ensayo anterior, en cada gráfica, fue la misma, pero los valores variaron, estableciendo de este modo la reproducibilidad de los resultados.

#### Establecimiento de cocultivos

Como se obtuvo una sensibilidad, aunque reducida, de la línea celular Hep-G2 frente al agente tóxico PhIP, con previa activación mediante los inductores, se intentó establecer un sistema de cocultivos entre esta línea celular en combinación con SiHa, HT-29 y NCI-H460, con el fin de observar si el efecto también podía ser visualizado mediante este modelo.

Los resultados mostraron un comportamiento similar al establecido con líneas celulares separadas, aunque se emplearon diferentes proporciones de las líneas celulares en el co-cultivo (50:50; 25:75; 75:25).

Dado que al emplear el sistema de co-cultivos con otras líneas celulares para fortalecer la sensibilidad del método, no se obtuvo un efecto relevante de los xenobióticos, similar al obtenido con las líneas independientes, se puede sugerir que la presencia de un tipo celular no conduce necesariamente a afectar la supervivencia o la dinámica del crecimiento de la otra población celular, garantizando que el efecto

que se observe en un ensayo se debe al tratamiento mismo y no a la combinación de las diferentes líneas celulares. Sin embargo, es recomendable realizar nuevos ensayos en los que se pueda diferenciar el comportamiento de cada línea celular al exponerse a un tratamiento determinado, mediante algún marcador celular particular.

Por otro lado, este tipo de aproximaciones (en las que se empleen co-cultivos para evaluar potencial actividad anticáncer de diversas sustancias en mezclas de líneas celulares provenientes de diferentes tumores y así obtener ensayos más próximos a los *in vivo*), podrían resultar interesantes, puesto que uno de los mayores inconvenientes de los sistemas *in vitro* es que cada tipo celular es estudiado por separado, a diferencia de lo que ocurre en el cuerpo humano, donde son posibles múltiples interacciones de los órganos, críticas para la toxicidad de un fármaco. Por ejemplo, un fármaco inicialmente transformado en el hígado, genera metabolitos que pueden causar toxicidad en un órgano distante, como el corazón (2, 3, 35, 36).

A causa de estas limitaciones en los ensayos, se hace necesario encontrar el modelo celular que exprese constitutivamente las isoformas CYP<sub>450</sub> apropiadas, o disponer de alternativas experimentales que faciliten la inducción de sobreexpresión de tales isoformas y obtener resultados confiables, de gran similitud con los que pueden observarse en el cuerpo humano.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio contó con la colaboración del Laboratorio de Estudios Farmacológicos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Li AP. Overview: Evaluation of metabolism-based drug toxicity in drug development. *Chem Biol Interact.* 2009; 179 (1): 1–3.
- Li AP. Accurate prediction of human drug toxicity: a major challenge in drug development. *Chem Biol Interact.* 2008; 150 (1): 3–7.
- Li AP. In vitro evaluation of human xenobiotic toxicity: scientific concepts and the novel integrated discrete multiple cell co-culture (IdMOC) technology. *ALTEX.* 2008; 25 (1): 43–49.
- Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and Toxicity. *AAPS J.* 2006; 8 (1): E101–E111.
- Donato M, Gómez-Lechón M. Nuevas estrategias en la identificación de interacciones metabólicas durante el desarrollo de fármacos. En: Cascales A, Gómez-Lechón M, O'Connor J (Eds). *Genómica, proteómica, citómica y metalodómica. Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos.* 2005. p.267-295.
- Beaune PH, Lecoecur S. Immunotoxicology of the liver: adverse reactions to Drugs. *J Hepatol.* 1997; 26 (6): 37–42.
- León C, Gómez S, Morantes S, Cordero C, Aristizábal F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica.* 2006; 26 (1): 161-168.
- Freshney I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 4ª ed. USA: John Wiley and Sons; 2000. 589 p.
- Ponsoda X, Jover R, Núñez C, Royo M, Castell J, Gómez-Lechón M. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentration. *Toxicol In Vitro.* 1995; 9 (6): 959-966.
- Soars M, McGinnity D, Grime K, Riley R. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Chem Biol Interact.* 2007; 168 (1): 2-15.
- Lu C, Li AP. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact.* 2001; 134 (3): 271-281.
- Brandon E, Raap C, Meijerman I, Beijnen J, Schellens J. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharm.* 2003; 189 (3): 233-246.
- Gómez M, Garza L, Waksman N, Piñeyros A. Detección de los metabolitos de la toxina T-514 (Peroxisomicina A1) del género *Karwinskia in vivo e in vitro*. *Ciencia UANL* 2002; 5 (4): 485-492.
- Fricke S, Buckley R. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an *in vitro* screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* 1996; 16 (6B): 3755.
- Castell J, Donato T, Gómez-Lechón M. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* 2005; 57 (SUP 1): 189-204
- Orellana M, Guajardo V. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Med Chile.* 2004; 132 (1): 85-94.
- Omicinski C, Rimmel R, Hosagrahara V. Concise Review of the Cytochrome P450s and their Roles in Toxicology. *Toxicol Sci.* 1999; 48 (2): 151-156.
- Li AP. Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact.* 1997; 107 (1): 5-16.
- Cordero C, Aristizábal F. Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 2002; 4 (1): 100-106.
- Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65 (1-2): 55-63.
- Rolón M, Vega C, Escario J, Gómez A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2005. 99 (2): 103-107.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 5421-5426.
- Kinoshita A, Wanibushi H, Wei M, Fukushima S. Hormesis in Carcinogenicity of Non-genotoxic Carcinogens. *J Toxicol Pathol.* 2006; 19 (3): 111-122.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hep-G2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31 (8): 1035-1042.
- Kikuchi H, Kato H, Mizuno M, Hossain A, Ikawa S, Miyazaki J, et al. 1996. Differences in Inducibility of CYP1A1-mRNA by



- Benzimidazole Compounds between Human and Mouse Cells: Evidences of a Human-Specific Signal Transduction Pathway for *CYP1A1* Induction. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 334 (2): 235-240.
26. Sotiropoulos M, Pappas P, Marselos M. Effects of 3-Methylcholanthrene and aspirin co-administration on ALDH3A1 in Hep-G2 cells. *Chem Biol Interact*. 2001; 130-132 : 235-245.
  27. Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res*. 1999; 441 (2): 215-224.
  28. Franke H, Kole S, Ciftci Z, Haanen C, Vermes I. In vitro effects of estradiol dydrogesterone, tamoximen y cyclophosphamide on proliferation vs. death in human breast cancer cell. *Cancer Lett*. 2003; 190 (1): 113-119.
  29. Gut I, Danielová V, Holubová J, Soucek P, Kluckova H. Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel and docetaxel for tumor cell line in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Arch Toxicol*. 2000; 74 (8): 437-446.
  30. Tsai C, Perng R, Chang-Kuo-Ting, Venzon D, Gadzar A. Evaluation of the relative cytotoxic effects of anticancer agents in serum-supplemented versus serum-free media using a tetrazolium colorimetric assay. *J Cancer Res*. 1996; 87 (1): 91-97.
  31. MacFadyen M, Mcleod H, Jackson F, Melvin W, Doehmer J, Murray G. Cytochrome P<sub>450</sub> CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2001; 62 (2): 207-212.
  32. Masubuchi N, Li AP, Okazaki O. An evaluation of the cytochrome P450 induction potential of pantoprazole in primary human hepatocytes. *Chem Biol Interact*. 1998; 114 (1-2): 1-13.
  33. Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res*. 1997; (10): 1946-54
  34. Lindley C, Hamilton G, McCune J, Faucette S, Shord S, Hawke R, *et al*. The Effect of Cyclophosphamide with and without Dexamethasone on Cytochrome P450 3A4 and 2B6 in Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30 (7): 814-822.
  35. Li AP. Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact*. 2007; 168 (1): 16-29.
  36. Li AP. A novel in vitro system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2004; 150 (1): 129-136.