

25
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA Y FUNCION BIOLOGICA DEL
CITOCROMO P-450 EN HIGADO HUMANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
SILVERIO ENRIQUE CABRERA MARIN



MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION (ANTECEDENTES HISTORICOS).....	3
OBJETIVOS.....	6
PARTE I.- DESCRIPCION:	
a) Definición.....	7
b) Nomenclatura y Clasificación.....	10
c) Estructura Molecular.....	11
PARTE II.- CICLOS:	
a) Ciclo Catalítico de Oxido-Reducción.....	15
b) Cadena de Transporte de electrones en Mi- tocondrias, Bacterias y Microsomias.....	17
c) Citocromo b_5	23
PARTE III.- METABOLISMO:	
a) Metabolismo de Drogas.....	28
b) Metabolismo de Vitaminas Liposolubles: -- D, A, K, E.	29
c) Metabolismo de Acidos Grasos (Omega Oxida- ción del Acido Araquidónico).....	31
d) Metabolismo de Esteroides Hormonales.....	31
e) Metabolismo de Acidos Biliares.....	32
PARTE IV.- FISIOPATOLOGIA:	
a) Inhibición Reversible e Irreversible.....	35
b) Inhibición Suicida.....	35
c) Necrosis Hepática.....	36
d) Hepatocarcinogenicidad.....	38
e) Hepatitis Autoinmune y Antigenicidad.....	39
PARTE V.- CONCLUSIONES.....	
REFERENCIAS.....	45
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.....	48

R E S U M E N

El Citocromo P-450, es una denominación inadecuada de una familia de isoenzimas que se localiza en forma soluble en el citoplasma de procariontes e integrado en la membrana interna de mitocondrias y la de microsomas de los eucariontes; su peso molecular fluctúa entre 45 000 y 55 000 daltones. Su nombre se debe a que en condiciones reducidas se une al monóxido de carbono (CO) y absorbe intensamente la luz del espectro en los 450 nm.

Los citocromos P-450 son hemoproteínas que pertenecen a una clase de enzimas denominadas Oxigenasas de Función Mixta, que actúan como una oxidasa terminal aceptando electrones, procedentes de un donador, los cuáles pasan a través de una cadena transportadora - siendo aceptados por el oxígeno que se activa y libera originando radicales que son muy reactivos que oxidan al sustrato hidrocarbonado.

Existen diversas maneras por las cuáles un compuesto puede ser oxidado por el Citocromo P-450, sin embargo, también cataliza reacciones reductivas siendo las primeras (oxidativas) las más estudiadas. Se ha reconocido que este complejo enzimático desempeña un papel central en la biotransformación de compuestos Endobióticos y Xenobióticos e interviene en diversos procesos metabólicos: biosíntesis de ácidos biliares, oxidación de vitaminas liposolubles, biosíntesis y metabolismo de hormonas, metabolismo de ácidos grasos y oxidación de drogas. Muchas drogas son transformadas químicamente en el intestino, otras en el pulmón, riñón o piel; pero la gran mayoría de las transformaciones tienen lugar en el hígado.

La biotransformación en dicho órgano es un factor crítico no sólo en la terapéutica de drogas sino también en contra de los

efectos tóxicos de una amplia variedad de sustancias químicas como son insecticidas, herbicidas, fungicidas, colorantes, conservadores de alimentos; así como un gran número de sustancias de las que se ha demostrado son inductoras de cáncer.

INTRODUCCION (ANTECEDENTES HISTORICOS).

Los citocromos fueron descritos en observaciones espectroscópicas de tejido animal por MacMunn¹ en 1886, a los que designó con el nombre de Histoهماتinas y les asignó función respiratoria y de transferencia de oxígeno. No pudo convencer a sus contemporáneos de la importancia de su descubrimiento hecho que pasó inadvertido hasta que en 1925, Keillin² los redescubrió al observar en preparaciones de músculo cardíaco tres bandas de absorción que designó como citocromo a, b y c. Posteriormente, observó en preparaciones de miocardio otro citocromo con características semejantes al citocromo a, por presentar las mismas bandas de absorción, pero, diferente por ser sensible al monóxido de carbono y al cuál llamó citocromo oxidasa (a_3). Este es idéntico a la enzima respiratoria de Warburg o "Atmungsferment".

A partir de 1954 Britton Chance³ desarrolló técnicas espectrofotométricas rápidas y precisas, este avance metodológico significó un gran impulso al estudio de los citocromos. Durante la década de 1950 también adquirió mucho interés el metabolismo microsomal de esteroides y compuestos aromáticos. La posible participación de los citocromos en la hidroxilación de esteroides recibió una considerable atención basada en el comportamiento de un sistema de sales de hierro en presencia de agentes quelantes, ascorbato y oxígeno que favorecen reacciones de hidroxilación, por lo que se postuló que la hemina, componente del citocromo microsomal, forma parte del sitio activo al que llegarían electrones procedentes de las coenzimas NADH y NADPH, con la consecuente reducción del oxígeno molecular⁴ y su incorporación a sustratos biológicos.

Klingenberg⁵ perteneciente a la Johnson Foundation al estudiar en 1957 el comportamiento del citocromo b_5 , descubrió la presencia de un nuevo pigmento microsomal en el hígado de rata capaz de combatir con monóxido de carbono (CO) en condiciones reducidas con

ditionita de sodio (Hidrosulfito de Sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) ó NADPH que presentaba cuatro picos de absorción: alfa 572 nm, beta 532 nm, gama 450 nm y 420 nm.

La hemoglobina es un contaminante frecuente en las preparaciones microsomales y las absorbancias a 572 nm, 532 nm y 420 nm eran explicadas por la formación de un complejo de monóxido de carbono (CO) y hemoglobina, pero, el pico a 450 nm se conservaba con gran nitidez al eliminar la hemoglobina creyó que se trataba de un nuevo pigmento microsomal.

El hallazgo de Klingenberg motivó a todo el grupo de la Johnson - Foundation, Garfinkel⁶ perteneciente a este grupo describió que el pigmento en estudio se identificaba en varios órganos y era reducido por el NADH y que el complejo con monóxido de carbono (CO) era destruido por p^{H} ácido y pancreatina, disminuyendo su absorción por colato y digitonina. Asimismo observó la absorción a 450 nm, por lo que concluyó que no se trataba de una hemoproteína ya que estas tienen la particularidad de absorber alrededor de los 400 nm (Banda de Soret). Klingenberg y Garfinkel después de estudiar las propiedades desconcertantes del complejo con monóxido de carbono (CO), no volvieron a ocuparse de este problema y su descubrimiento pasó inadvertido hasta que R.W. Estabrook⁷ en 1959, informó que la adición de monóxido de carbono (CO) a microsomas de hígado de rata previamente reducidos con ditonita de sodio (Hidrosulfito de Sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) producía una intensa absorción en los 448 nm confirmando las observaciones que anteriormente hicieron Klingenberg y Garfinkel.

Rosenthal⁸ interesado en conocer el mecanismo de hidroxilación de esteroides y confirmar que el sistema microsomal oxidativo era de tipo monooxigenasa de función mixta, propuso a Cooper establecer la estequiometría de la reacción de hidroxilación midiendo el consumo de oxígeno, la oxidación del NADPH y los productos hidroxilados en el C-21, pero, debido a la carencia de un electrodo de --

oxígeno de suficiente sensibilidad que determinara el consumo de pequeñas cantidades de oxígeno aplazó la realización del experimento. Posteriormente, R. W. Estabrook haciendo uso de un espectrofotómetro Aminco-Chance, logró determinar la estequiometría - de la reacción de hidroxilación analizando los cambios de oxidoreducción y el consumo de oxígeno.

Cooper y Estabrook repitieron las condiciones experimentales para identificar el complejo que formaban el pigmento y el monóxido de carbono (CO) en microsomas adrenales, con la presencia de Klingenberg en el laboratorio quien observó que el espectro informado anteriormente correspondía en tipo y propiedades al que él había observado.

Durante el desarrollo de estos eventos (1962) el grupo del "Institute for Protein Research" de Japón encabezado por Omura y Sato⁹ proporcionaron más pruebas acerca de la naturaleza hemoproteínica del complejo al demostrar que el etilisocianuro se combinaba con los microsomas previa reducción y mostraba un espectro característico anormal de hemocromógenos por lo que se le bautizó con el nombre de Citocromo P-450.

O B J E T I V O S .

El propósito de esta revisión consiste en resumir la extensa literatura que existe sobre el Citocromo P-450 y exponer de manera general y sistematizada la participación que tiene en el metabolismo de compuestos endobióticos y xenobióticos en hígado humano.

Asimismo, trata de contribuir a su difusión ya que la información que poseen los estudiantes de licenciatura y posgrado en Biología, Medicina y disciplinas afines es muy escasa; aspecto que contrasta con el creciente interés sobre este grupo de metaloenzimas y - la abundante información especialmente en áreas concernientes a - la Farmacología, Toxicología y Biología Molecular.

PARTE I
DESCRIPCION.

DEFINICION.

Los citocromos denominados P-450 representan un conjunto de hemoproteínas constituido por una familia de isoenzimas polipeptídicas de peso molecular comprendido entre 45 000 y 55 000 -- daltones, poseen como grupo prostético Protoporfirina IX. Su función consiste en activar el oxígeno tisular e incorporarlo a sustancias endobióticas y xenobióticas a diferencia de otros citocromos, por ejemplo, b y c, que sólo son transportadores de electrones. En condiciones reducidas y presencia de monóxido de carbono absorben luz del espectro en la banda de los 450 nm, razón a la que deben su nombre. Sin embargo, el término Ci tocromo P-450 tiende a desaparecer sustituido por una nomenclatura más específica.

En células procariotes se encuentran en forma soluble en el citoplasma en cambio en eucariotes están integrados a la membrana interna de mitocondrias y microsomas, en donde mediante una cadena transportadora de electrones generan oxígeno reducido: superóxido (O_2^-), peróxido ($O_2^{=}$) y agua oxigenada (H_2O_2). En mamíferos existe en altas concentraciones en glándulas endócrinas como gónadas, suprarrenales y placenta participando en la biosíntesis de esteroides, prostaglandinas y omega-oxidación. En concentraciones de gases, metales pesados, hidrocarburos -- aromáticos, terpenos, etc., las células incrementan la síntesis de isoenzimas inducibles (inducción enzimática o biosíntesis de novo) acrecentando su función bioactivadora de oxígeno transformando sustancias inocuas en verdaderos tóxicos (síntesis letal) o bien participando en la biosíntesis de sustancias vitales para la célula. Esta actividad oxidativa ha sugerido un papel fundamental en la evolución de las especies biológicas, ya que al generar radicales altamente reactivos favorecen cambios mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. Esta extraordinaria versatilidad en número y funciones de enzimas y -

sustratos que participan en hidroxilaciones biológicas, dependientes del citocromo P-450 estimulan el interés por conocer - el papel que desempeñan en la fisiología celular ya que se de conoce en detalle su organización estructural así como su regu lación genética.¹⁰

NOMENCLATURA Y CLASIFICACION.

En las últimas dos décadas los investigadores en el campo de los citocromos P-450 han usado diferentes nomenclaturas para un creciente número de isoenzimas aisladas y purificadas. Ha sido tal el desorden que cada grupo de investigadores ha desarrollado su propio sistema de clasificación. Por ejemplo, la isoenzima P-450 IAI ha sido designada con los siguientes sinónimos: P-450_c, P-450 BNPB, P-448₂, P-450 MC⁻ I, P-450 MC, PCBP-4481, P-450 isozima 6, P₁ 450 y P-450_{MC}.

Esta plétora de nombres, números y siglas ha incrementado la confusión; para poner orden a este caos se creó un comité integrado por siete investigadores de este campo para unificar criterios y establecer un sólo sistema de clasificación, en el cual las diferentes proteínas P-450 son agrupadas en una super familia de genes, subdivididas en familias, estas a su vez en subfamilias y finalmente en genes. El criterio utilizado se basa en la secuencia de aminoácidos identificados al examinar 65 polipéptidos de diferentes isoenzimas citocromo P-450.

Los patrones de esta clasificación son los siguientes:

Las familias de genes deben ser designadas por números romanos comenzando con el número I, las subfamilias por letras capitales comenzando con A y continuando alfabéticamente llegando actualmente hasta la H y los genes individuales con números arábigos. Desde 1986 a la fecha se han identificado 13 familias de genes que incluyen 8 de vertebrados (P-450 I, P-450 II, P-450 III, P-450 IV, P-450 XI, P-450 XVII, P-450 y P-450 XXI) 2 de bacterias, 2 de levaduras y 1 de insectos¹¹.

ESTRUCTURA MOLECULAR.

Las hemoproteínas semejan una micela en donde la parte hidrofóbica es el área en la cual se encuentra insertado el grupo hemo portador del centro activo de la enzima, es decir, la protoporfirina IX. El grupo hemo forma seis enlaces coordinados, - cuatro de los cuáles interaccionan con los átomos de nitrógeno correspondientes a los grupos pirrólicos y presentan una disposición coplanar. Las dos uniones restantes denominados ligandos axiales son perpendiculares al plano coplanar antes mencionado y son el quinto y sexto ligandos, que determinan las características fisicoquímicas de la hemoproteína. El quinto ligando interacciona con un átomo de azufre perteneciente a un residuo de una cisteína (Fig. 1). Esta unión es fundamental en las propiedades anómalas del citocromo P-450 respecto de los citocromos b y c en sus interacciones espectrales con sus sustratos. El sexto ligando, aunque no siempre presente, puede -- ser de campo débil o fuerte dependiendo del tipo de ligante -- (H_2O , CO, OH, SH, NH ó CN). Cuando el sexto ligando está presente se forma un complejo octaédrico y cuando falta da lugar a uno piramidal de base cuadrada¹² (Fig..2).

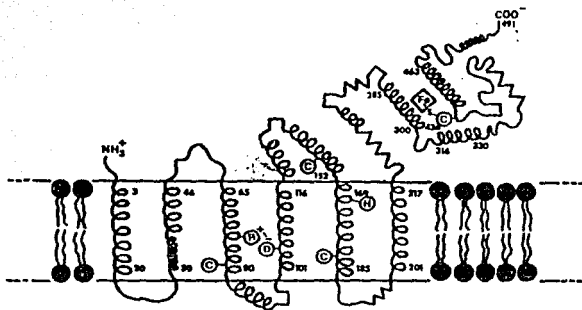


Fig. 1.- ORGANIZACION TOPOGRAFICA EN LA MEMBRANA MICROSONAL -
 DEL CITOCROMO P-450. EL GRUPO HEMO ESTA UNIDO A UNA
 CISTEINA (436) DE LA APOENZIMA.

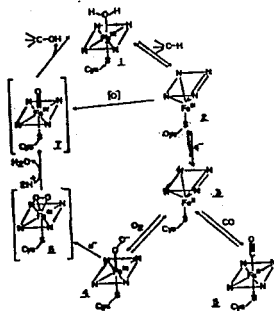


Fig. 2.- ESTRUCTURA MOLECULAR DEL CITOCROMO P-450. EN 1 SE ENCUENTRA PRESENTE EL SEXTO LIGANDO EN ESTE CASO AGUA. EN 2, EL SEXTO LIGANDO ESTA AUSENTE ORIGINANDO UNA PIRAMIDE INVERTIDA DE BASE CUADRADA CON EL QUINTO LIGANDO (Fe-S) UNIDO A UNA CISTEINA..

P A R T E I I

C I C L O S

CICLO CATALITICO DE OXIDO-REDUCCION.

Semejante a todas las enzimas los citocromos P-450 llevan a cabo su función catalítica uniéndose al sustrato, modificándolo y liberando posteriormente el producto final. Para que el sustrato sea oxidado los citocromos P-450 deben ser reducidos, es decir, la reducción involucra que el hierro del hemo pase del estado férrico (Fe^{3+}) al ferroso (Fe^{2+}). Estos eventos que se inician con la unión del sustrato y terminan con la liberación del producto es llamado Ciclo Catalítico. Todos los citocromos P-450 emplean el mismo ciclo catalítico aunque es probable que tengan modificaciones que permitan algunas variaciones, según la naturaleza de la reacción catalizada.

La reacción modelo en la hidroxilación de sustratos lipofílicos es:



Es importante subrayar que la enzima sólo utiliza oxígeno molecular y no el del agua. Un átomo de oxígeno aparece en el sustrato y el segundo es reducido para formar agua; la estequiometría de esta reacción de monooxigenación requiere: 1 mol de oxígeno, 1 mol de NADPH y 1 mol de sustrato; obteniéndose 1 mol de producto hidroxilado, 1 mol de $NADP^+$ y 1 mol de agua. El ciclo catalítico puede ser considerado como una secuencia de seis etapas, dos de las cuales consisten en la adición de dos electrones a la enzima:

ETAPA 1.- FORMACION DEL COMPLEJO ENZIMA - SUSTRATO:



La enzima oxidada es representada por Fe^{3+} y RH es el sustrato el cual se convertirá posteriormente en producto hidroxilado, R-OH. La unión es promovida por atracciones hidrofóbicas entre

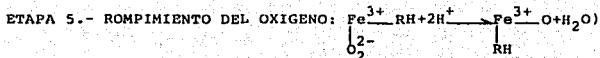
el sustrato y el área del hemo rodeada por los polipéptidos apolares del centro catalítico. Con sustratos endobióticos como esteroides, vitaminas liposolubles y ácidos grasos dicha unión -- muestra gran especificidad, pero, con xenobióticos esta especificidad disminuye de tal forma que un tipo de isoenzima citocromo P-450 puede reaccionar con una amplia variedad de sustratos.

ETAPA 2.- PRIMER ELECTRON: $Fe^{3+}RH + e^- \longrightarrow Fe^{2+}RH$. Durante el proceso de interacción enzima-sustrato se promueve el flujo del primer electrón procedente del NADH ó NADPH hacia el hierro a través de los acarreadores electrónicos. El mecanismo íntimo de este proceso se desconoce aunque dos hechos cruciales ocurren en este estadio: el sexto ligando probablemente agua será ocupado eventualmente por el oxígeno y el sustrato se une al sitio activo de la enzima de tal suerte que permita una interacción de oxígeno-enzima-sustrato; esto implica que el sustrato se una al hemo en el lado opuesto al quinto ligando del ion tiolato.

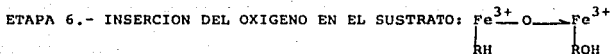
En esta etapa el acarreador de electrones es representado por NADPH citocromo P-450 reductasa a través del citocromo P-450 en estas condiciones el hierro es reducido de férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}).

ETAPA 3.- UNION DEL OXIGENO: $Fe^{2+}RH + O_2 \longrightarrow Fe^{3+}RH$. En esta fase se incorpora el oxígeno por la pérdida del sexto ligando.

ETAPA 4.- SEGUNDO ELECTRON: $Fe^{3+}RH + e^- \longrightarrow Fe^{3+}RH$. Este segundo electrón procede del NADPH-citocromo P-450 reductasa o de la NADH-citocromo b_5 reductasa a través del citocromo b_5 el cual reduce al oxígeno formando radicales altamente reactivos (superóxidos y peróxidos) de manera que el rearrreglo interno de electrones restaura el estado férrico (Fe^{3+}) del hierro.



Los dos átomos de oxígeno se separan uno de los cuales se reduce formando agua y el otro permanece asociado al hierro del -- grupo hemo.



Los detalles de esta estado de transición no son muy claros, - pero, una interpretación razonable propone la siguiente explicación: la enzima elimina H del sustrato hidrocarbonado, este hidrógeno forma una radical hidroxilo con el átomo de oxígeno que a su vez se combina con el radical de carbono del sustrato para que finalmente se forme el sustrato hidroxilado.

ETAPA 7.- DISOCIACIÓN DEL PRODUCTO: $\text{Fe}^{3+} \begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{ROH} \end{array} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{ROH}$ El - sustrato hidroxilado se libera manteniendo el estado férrico - (Fe^{3+}) del complejo que tendrá que ser reducido para reiniciar el ciclo¹³ (Fig. 3).

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN MITOCONDRIAS, BACTERIAS Y MICROSOMAS.

Los electrones requeridos para cada cambio de ciclo proceden - de los nucleótidos de piridina reducidos, NADH y NADPH.

En los citocromos mitocondriales (membranales) ó bacterianos - (solubles) la transferencia de electrones requiere de flavoproteínas específicas, NADPH-adrenoxina reductasa y NADH-putidoxina reductasa, respectivamente. Así como de ferroproteínas -- sulfuradas denominadas adrenoxina y putidoxina, respectivamente. En contraste en los citocromos microsomales se requiere como acarreador sólo una simple flavoproteína, NADPH-citocromo - P-450 reductasa, careciendo de proteínas hierro-azufre. Los --

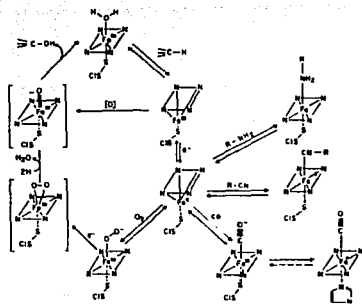


Fig. 3.- CICLO CATALITICO DE OXIDO-REDUCCION DEL CITOCROMO P-450. EL SEXTO LIGANDO APARECE CON DISTINTOS GRUPOS FUNCIONALES (H₂O, NH₂ y CO).

dos sistemas (mitocondrial/bacteriano) y (microsomal) son específicos para donar sus electrones a los citocromos P-450 ya -- que los primeros no pueden sustituir a los segundos y viceversa.

El sistema mitocondrial (membranal) involucra la reducción -- del FAD mediante la NADPH-adrenoxina reductasa, que transfiere un electrón a la proteína hierro-azufre y de aquí al citocromo P-450 componente terminal de la cadena. (Fig. 4).

En el transporte de electrones bacteriano (soluble) la secuencia es la misma sólo que en este caso el FAD es reducido por -- la NADH-putidodoxina reductasa, de aquí pasa un electrón que -- reduce a la ferroproteína sulfurada, y finalmente al citocromo P-450.

En el sistema microsomal (membranal) la NADPH-citocromo P-450 reductasa, reduce directamente al citocromo P-450 (Fig. 5)

La reducción estequiométrica molar entre NADPH-citocromo P-450 reductasa y su correspondiente citocromo P-450 tiene un valor de 1:20 en condiciones fisiológicas normales, pero, bajo la influencia de inductores esta relación se incrementa a 1:35, esto significa que una flavoproteína reducida alimenta y controla a cuando menos 20 moléculas de citocromo P-450 en las -- condiciones antes establecidas¹⁴.

El prefijo de la palabra doxina indica el origen de las ferroproteínas sulfuradas, así tenemos que para las adrenoxinas la proteína es de procedencia adrenal mientras que la proveniente de la bacteria *Pseudomonas putida* se llama putidodoxina, cada -- una con su correspondiente reductasa, por consiguiente su nombre completo será: adrenoxina reductasa y putidodoxina reducta sa, respectivamente (Fig. 6).

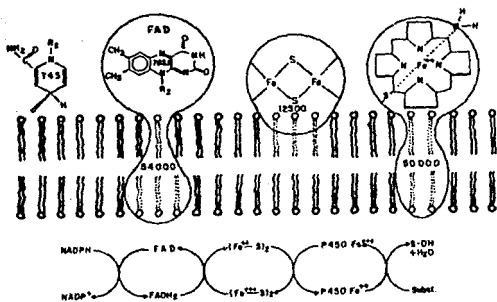


Fig. 4.- CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO EN MITOCONDRIAS.

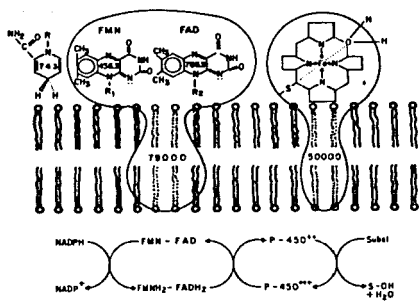
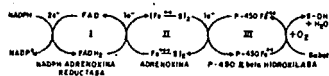
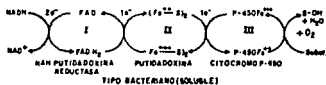


Fig. 5.- CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO EN MICROSOMAS.

CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES



TIPO MITOCONDRIAL (MEMBRANAL)



TIPO BACTERIANO (SOLUBLE)

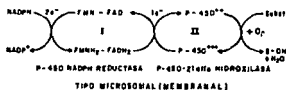
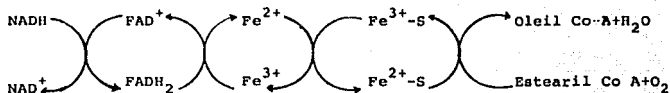


Fig. 6.- COMPARACION DE LOS TRES CICLOS DE TRANSPORTE ELECTRONICO (MITOCONDRIAL, BACTERIANO Y MICROSOMAL).

CITOCROMO b_5

El citocromo b_5 es otra hemoproteína anfipática que se encuentra presente en la estructura microsomal de peso molecular -- igual a 16 700 daltones, sus flavoreductasas dependientes de - NADH y NADPH, son capaces de mantener un flujo de electrones - necesarios en diversos sistemas microsomales, participando en las siguientes funciones:

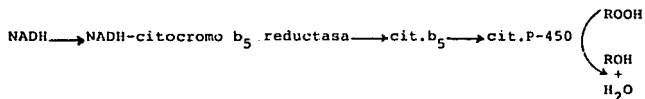
I.- En la formación de ácidos grasos insaturados como ejemplo es la formación de oleil Co A, a partir de estearil Co A, con insaturaciones en los C-6 y C-9.



Citocromo b_5 - reductasa citocromo b_5 desaturasa

FORMACION DE ACIDOS GRASOS INSATURADOS CON b_5

II.- Posible estimulación, inhibición ó carecer de efecto sobre algunos tipos de hidroxilación dependientes de citocromo P-450. Los resultados dependerán del tipo de isoenzimas P-450 y sustratos empleados (Fig. 7).



III.- Donación de electrones para un sistema de lipoperoxidasa microsomal.

IV.- Síntesis de colesterol a partir de lanosterol en el proceso se desprenden 3 grupos metilos angulares, se reducen los 2 dobles enlaces y se crea uno nuevo ¹⁵ (Fig. 8).

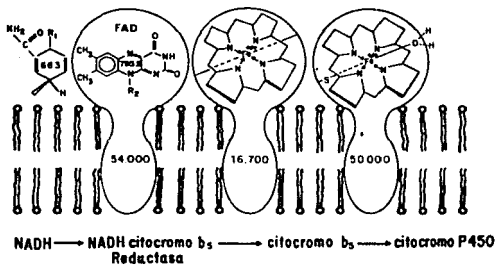


Fig. 7.- CADENA DE TRANSPORTE ELECTRONICO EN CITOCROMO b_5

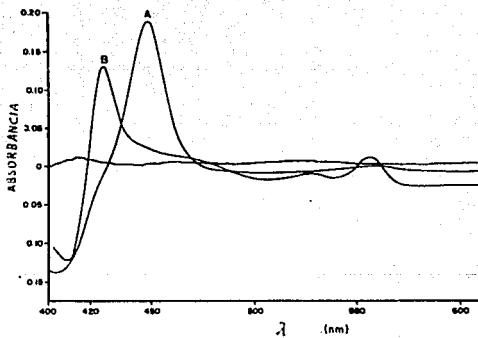
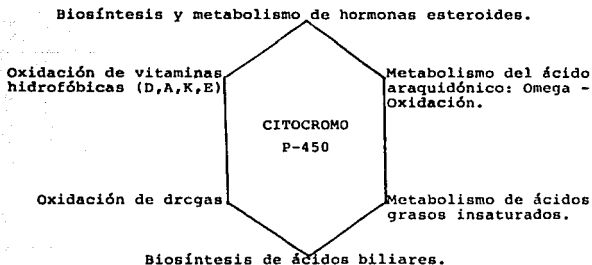


Fig. 8.- A) PERFIL ESPECTROFOTOMETRICO DEL CITOCROMO P-450
 B) PERFIL ESPECTROFOTOMETRICO DEL CITOCROMO b₅.

**FUNCIONES DEL CITOCROMO P-450
EN EL METABOLISMO.**



METABOLISMO DE DROGAS:

Las reacciones de biotransformación de drogas se realiza fundamentalmente en los microsomas hepáticos. El retículo endoplásmico es el sistema primario de oxidación de xenobióticos existiendo un sistema análogo en tejidos extrahepáticos como es en piel, pulmón, riñón, cuerpo lúteo, placenta, monocitos, linfocitos, macrófagos y tejido adrenal.

Las difersas isoenzimas dependientes de citocromo P-450 realizan dos tipos principales de reacciones de biotransformación de drogas: oxidativas y reductivas. Es condición necesaria que las reacciones reductivas deben realizarse en anaerobiosis. -- Sin embargo, en condiciones de isquemia favorecidas por estados de "choque" o anestesia quirúrgica profunda el hígado presenta condiciones de anoxia variable, que propicia reacciones reductivas y por lo tanto la generación de radicales libres -- (Ver reacciones adjuntas).

REACCIONES:

Oxidativas.

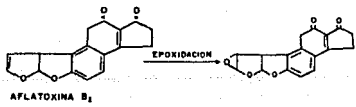
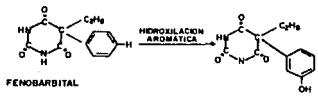
- a) Hidroxilación alifática
- b) Oxidación aromática
- c) Epoxidación de alquenos
- d) Deaminación oxidativa
- e) Dealquilación de nitrógeno
- f) Oxidación de nitrógeno
- g) Dealquilación de oxígeno
- h) Desulfuración oxidativa
- i) Dehalogenación oxidativa
- j) Denitrificación oxidativa

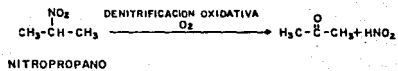
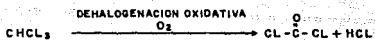
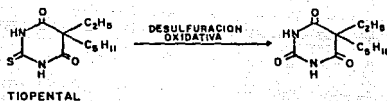
Reductivas.

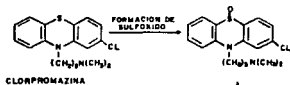
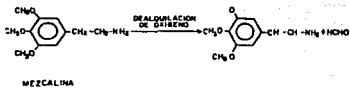
- a) Nitroreducción
- b) Azoreducción
- c) Reducción de óxidos de nitrógeno.
- d) Reducción de aminas terciarias.
- e) Reducción de óxidos de arene.
- f) Dehalogenación reductiva.

Se ha demostrado que una sola isoenzima P-450 realiza hasta -- seis diferentes reacciones: hidroxilación de carbonos, oxigena

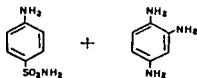
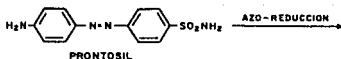
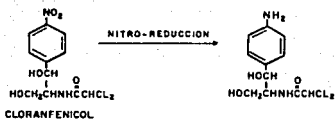
REACCIONES OXIDATIVAS







REACCIONES REDUCTIVAS



DEHALOGENACION



TETRACLORURO DE CARBONO

ción de heteroátomos, liberación de heteroátomos, epoxidación, transferencia de grupo oxidativo e inactivación suicida del -- grupo hemo.

Cuatro criterios han sido establecidos para demostrar la participación del citocromo P-450 en la biotransformación de drogas en microsomas hepáticos:

I.- Estudio in vivo, analizando el incremento o la inhibición del citocromo P-450 tisular después de la aplicación de inductores o inhibidores.

II.- Estudios in vitro, utilizando inhibidores que interaccionen con el grupo hemo o la apoenzima.

III.- Estudios espectrales in vitro, incubando compuestos hidrofóbicos que interaccionen con el citocromo P-450; la perturbación con la proteína y el grupo hemo resulta en cambios espectrales característicos que han sido denominado espectro tipo I, espectro tipo II, espectro inverso del tipo I y espectro anómalo.

IV.- Estudios in vitro, utilizando sistemas reconstituídos con teniendo fracciones purificadas de los componentes del sistema microsomal¹⁶

METABOLISMO DE VITAMINAS:

VITAMINA D.

En hígado, piel o mucosa intestinal el colesterol se transforma a 7 dehidrocolesterol el cual con luz ultravioleta se convierte en un compuesto triénico, después de la ruptura de las uniones C-9 y C-10, denominado coledalciferol o Vitamina D₃, el

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

cual es hidroxilado en las mitocondrias hepáticas por la enzima D_3 -25 hidroxilasa; el producto 25 (OH) D_3 es transportado al riñón en donde se efectúa una doble hidroxilación en posición C-1 y C-24 por la enzima 25 (OH) D_3 I-alfa hidroxilasa - en las mitocondrias de la corteza renal dependiente del sistema P-450¹⁷.

VITAMINA A.

Compuestos inductores que estimulan el metabolismo de drogas también disminuyen el contenido de vitamina A. Esta en dosis elevadas estimula su propio metabolismo y los inhibidores de citocromo P-450 del tipo ketoconazol, clotrimazol y miconazol lo inhiben. Esto sugiere que la hidroxilasa que oxida al ácido *ol-trans*retinoico es dependiente del Citocromo P-450.

Recientemente se ha comunicado que el beta-caroteno precursor de vitamina A, también es sustrato del citocromo P-450 ya que se ha demostrado oxidar el anillo y epoxida formando hidroxi y cetoderivados¹⁸.

VITAMINA K.

Esta vitamina sufre una oxidación mediante la filoquinona epoxidasa (K_1) que la convierte en vitamina K 2,3 epóxido. Es necesario investigar si es dependiente de citocromo P-450¹⁹.

VITAMINA E.

En estudios *in vitro* utilizando alfa-tocoferol y su derivado sintético PMC (2,2,5,7,8 penta metil 6 hidroxi-cromanol) en presencia de microsomas hepáticos inhibe la 7 etoxi-coumaril - deetilasa e incrementa la oxidación de NADPH, estas evidencias indican la posible participación del sistema citocromo P-450²⁰.

METABOLISMO DE ACIDOS GRASOS: (OMEGA OXIDACION DEL ACIDO ARAQUIDONICO).

La mayoría de los tejidos principales del organismo entre ellos el hepático, el muscular (incluido el cardiaco) y el adiposo -- pueden oxidar ácidos grasos. El mecanismo más importante es el Beta-Oxidación sin embargo, existen datos que demuestran que al gunos animales como los conejos y probablemente humanos, pueden catabolizar varios ácidos grasos hasta cierto límite mediante - la Omega Oxidación.

La oxidación del ácido araquidónico se lleva a cabo en los microsomas de la corteza renal y hepática de conejos mediante la Omega Oxidación, la cual consiste en que este ácido graso es - oxidado en el extremo metilo, C-20, originando un ácido dicarboxílico. Para que este proceso se realice se necesita NADPH, Oxígeno molecular y Citocromo P-450. El ácido dicarboxílico -- formado es oxidado a su vez por Beta-Oxidación hasta el ácido succínico el cual podría oxidarse en el Ciclo de los Acidos -- Tricarboxílicos. En esta serie de reacciones están incluidas - las epoxidaciones de las cuatro doble ligaduras del ácido araquidónico: 5,8,11 y 14. Estos epóxidos pueden ser convertidos a sus respectivos dioles por fracciones citosólicas que contie nen epóxido hidrolasa²¹.

METABOLISMO DE ESTEROIDES HORMONALES:

Las hormonas esteroides son sintetizadas a partir de colesterol en las siguientes glándulas: corteza suprarrenal, testículos, ovarios y placenta. Los anillos A y B del colesterol deben ser cambiados, ya que la doble ligadura del anillo B debe ser reubicada al anillo A, el cual a su vez se transformará - en un sistema fenólico mediante la participación de la llamada aromatasa dependiente del Citocromo P-450.

En la conversión de colesterol a glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos es necesario la ruptura de la cadena lateral mediante la participación de una desmolasa que rompe la unión de los carbonos C-20 y C-22 del colesterol. La cadena lateral de esteroides con 21 átomos de carbono es también separada por otra enzima Citocromo P-450 dependiente.

Los glucocorticoides durante su biosíntesis adquieren 3 grupos hidroxilos (11 beta, 17 alfa y 21) catalizados por citocromos P-450 conocidos con el nombre de hidroxilasas. Otra desmolasa rompe el metilo en posición 27 y se ha demostrado ser citocromo P-450 dependiente, finalmente, el aldehído localizado en el carbono 18 de la aldosterona es resultado de la oxidación de una 11 beta Hidroxilasa. En resumen, se ha identificado seis citocromos P-450 dependientes siendo: las desmolosas C-27 y C-21 y las hidrolasas 11 beta, 17 alfa y 21; así como la aromata^{22, 23} (Fig. 9).

METABOLISMO DE ACIDOS BILIARES:

Diversas modificaciones de los anillos y de la cadena lateral del colesterol son necesarios para la formación de ácidos biliares. Estos cambios en los anillos requieren de: 7 alfa hidroxilación, 3 beta oxidación, isomerización, 12 alfa hidroxilación y la delta 4 reducción para producir el 5 beta Colestano, 3 alfa, 7 alfa, 12 alfa triol; las subsecuentes hidroxilaciones ocurren en el C-26 del estero^l posterior oxidación produce el ácido correspondiente. Las hidroxilaciones son actualmente objeto de investigación para tratar de demostrar la participación del Citocromo P-450²⁴.

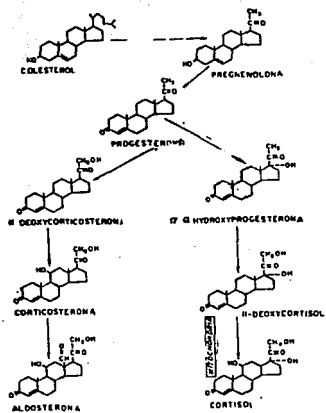


Fig. 9.- BIOSINTESIS DE ESTEROIDES HORMONALES.

P A R T E I V
FISIOPATOLOGIA

INHIBICION REVERSIBLE E IRREVERSIBLE DEL CITOCROMO P-450:

El estudio de diferentes sustratos con distintas isoenzimas -- P-450 ha evidenciado dos tipos de inhibidores: reversibles e irreversibles.

Las inhibiciones reversibles se comportan como inhibidores competitivos y no competitivos (alostéricos) del citocromo P-450 frente a sustancias como monóxido de carbono, alcoholes, fenoles, quinonas, lactonas, benzoflavonas, etc., ejemplos de este grupo son el cloranfenicol y el parathión.

En presencia de compuestos nitrogenados y mediante reducción - del citocromo P-450 se forman complejos metabólicos como: arilalquilaminas, aminas aromáticas, hidrazinas e hidroxilaminas.- En tanto que con compuestos no nitrogenados forman complejos - como el dioxibenceno.

Los inhibidores irreversibles se unen covalentemente a la apoenzima o al grupo prostético (protoporfirina IX) del citocromo P-450 o ambos. Son inhibidores irreversibles: el acetileno, -- las hidrazinas y fenilhidrazonas. Igualmente inhiben la síntesis o aceleran la degradación del grupo hemo del citocromo -- P-450 los iones metálicos: cobalto, manganeso, cadmio, níquel y plomo y los grupos orgánicos peróxidos, benzotiazol y tetracloruro de carbono²⁵.

INHIBICION SUICIDA:

Se denomina inhibición suicida al proceso de bioactivación -- cuando un sustrato es catalíticamente convertido en un electrófilo de gran reactividad o radical libre que se combina irreversiblemente con el sitio activo o con áreas moleculares próximas a éste.

En el caso del citocromo P-450 puede ocurrir que el producto - activado se fije covalentemente a algunos de los aminoácidos - de la apoenzima por ejemplo, con la cisteína del quinto ligando convirtiendo el citocromo P-450 a citocromo P-420 (inactivo) (Fig. 10). en otras circunstancias el producto puede unirse covalentemente al grupo tetrapirrol destruyendo su estructura y acumulándose pigmentos fluorescentes de color verde derivado - de las porfirinas. Tal es el caso del Danazol un esteroide acetilénico que disminuye el contenido de citocromo P-450 y acumula pigmentos verdes, es un ejemplo de inhibición suicida. La destrucción del citocromo P-450 por etinilesteroides, principio activo de anticonceptivos, requiere NADPH y oxígeno. Indica una clara evidencia que el metabolismo oxidativo está relacionado con estos procesos²⁶.

NECROSIS HEPATICA:

Numerosos estudios han demostrado que diversos medicamentos durante su biotransformación se convierten en compuestos bioactivados muy reactivos de vida media corta que alquilan, arilan o acilan componentes estructurales de las células. Debido a que el hígado es el principal órgano de biotransformación de drogas y recibe gran cantidad de sustancias ingeridas diariamente en la dieta, por lo tanto se halla más expuesto a lesiones por este tipo de reacciones.

Como las vías metabólicas responsables de la activación de carcinógenos están localizadas en las oxidasas microsomales, condujeron a sospechar que muchas drogas causaban lesiones tisulares hepáticas iniciadas por la bioactivación y unión covalente a proteínas y nucleótidos produciendo alteraciones funcionales.

En el caso de necrosis hepática inducida por halobencenos, compuestos químicamente inertes, se transforman en muy reactivos

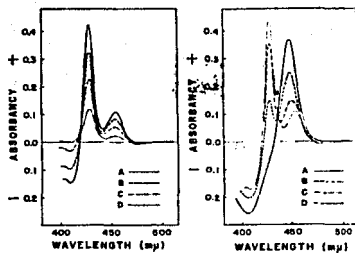


Fig. 10.- CONVERSION DE CITOCROMO P-450 A P-420 UTILIZANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DE AGENTES CAOTROPICOS (A, B, C, D) DETERGENTES, KSCN, FOSFOLIPASAS Y UREA.

en presencia de NADPH, oxígeno y citocromo P-450.

En microsomas hepáticos se forman epóxidos que se unen covalentemente a macromoléculas existiendo una correlación entre la concentración de metabolitos y sus efectos hepatotóxicos. También existen evidencias de efectos tóxicos del tetracloruro de carbono que se incrementa con la inducción de fenobarbital y DDT, pero, disminuye con el cloruro de cobalto. La unión covalente del tetracloruro de carbono al hígado es más intensa en condiciones anaeróbicas indicando que se trata de un proceso reductivo y forma radicales libres. Otros ejemplos de bioactivación se han reportado en alcaloides de pirrolicidina en infusiones de Té. Asimismo, la bioactivación de parathión a paraoxon produce severos efectos hepatotóxicos²⁷.

HEPATOCARCINOGENICIDAD POR AFLATOXINAS:

Las aflatoxinas son un conjunto de compuestos producidos por hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que son hepatotóxicas en diferentes especies animales como ratas, perros y primates incluido el hombre pudiendo causar hepatitis, cirrosis y hepatomas; dependiendo de la dosis y tiempo de exposición. Estas toxinas frecuentemente contaminan alimentos -- destinados al consumo humano especialmente el maíz y cacahuate. Envenenamientos severos han ocurrido en poblaciones de Africa y la India en donde se presentaron verdaderos cuadros con características epidémicas, provocando ascitis e hipertensión -- portal y como resultado una alta mortalidad.

La aflatoxina B₁ es la micotoxina más potente que produce efectos mutagénicos, hepatitis y hepatomas. Sin embargo, este tóxico por sí mismo no es el mutágeno activo sino que requiere una activación previa para convertirse en agente mutagénico y carcinogénico. Diferentes citocromos P-450 han sido involucrados

en la conversión de aflatoxinas inactivas en activas. La 7,8 - benzoflavona y el 3-metilcolantreno también son potentes inductores en la bioactivación de aflatoxinas. Los sistemas enzimáticos para la activación de aflatoxinas se han localizado en - la fracción microsomal y mitocondrial de rata²⁸.

HEPATITIS AUTOINMUNE Y ANTIGENICIDAD DEL CITOCROMO P-450:

El principal cometido del sistema inmunológico es la distinción entre lo propio y lo ajeno. Lo propio se conserva y todo aquello que resulta extraño al organismo lo destruye como sucede - con virus, hongos, bacterias, etc. Sin embargo, esta distinción no es estricta y en ocasiones ocurre que las células de defensa del organismo atacan órganos y tejidos normales. Este comportamiento aberrante degenera en una serie de patologías entre - las que se incluye la hepatitis activa crónica, que es un proceso inflamatorio que generalmente progresa a cirrosis e insuficiencia hepática y se le atribuyen tres causas: viral, tóxica y autoinmune. Esta última se caracteriza por la presencia - de autoanticuerpos organoespecíficos en el suero de los pacientes.

Se ha llegado a identificar en niños dos subgrupos de autoanticuerpos: uno que es antimúsculo liso incluyendo algunas veces - la presencia de anticuerpos antinucleares y otro subgrupo representado por autoanticuerpos antimicrosomas hepáticos y renales LKM (Liver Kidney Microsomal) identificado como una proteína de 50 kilodaltones.

Mediante técnicas inmunoelectrónicas se ha llegado a la conclusión que estos anticuerpos se unen al retículo endoplásmico o - ribosomas. Estos hallazgos sugieren que el antígeno de anticuerpos anti-LKM, corresponde en el cuadro de la hepatitis activa - crónica autoinmune a uno o más Citocromos P-450 perteneciente a

la familia IAI, aunque otros investigadores señalan que codifica con el IID ya que los autoanticuerpos se dirigen contra epítopes del Citocromo P-450 DBI.

El mecanismo que dispara autoanticuerpos LKM en contra del Citocromo P-450 no está bien esclarecido pero, una explicación lógica sugiere que genéticamente se altera la isoforma del citocromo P-450. Esta suposición es sustentada debido al hecho de que autoanticuerpos dirigidos contra ácido tánico favorece la hepatitis e interactúa con el Citocromo P-450 VIII, que normalmente hidroxila drogas esto sugiere que la unión covalente del producto lo transforma en una proteína antigénica (Hapteno)²⁹.

P A R T E V

**CONCLUSIONES, REFERENCIAS Y
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA**

C O N C L U S I O N E S .

Las marcadas diferencias individuales en el metabolismo de compuestos endobióticos y xenobióticos son originadas por factores ambientales y genéticos influyendo en los niveles de isoenzimas P-450 (inducibles y constitutivas) por mecanismos aún -- desconocidos de inducción y represión selectiva.

Diversas drogas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y muchas sustancias químicas inducen isoenzimas específicas. Asimismo, - factores dietéticos modifican el metabolismo de sustancias endobióticas y xenobióticas en animales y en seres humanos.

Una alimentación alta en proteínas, basada en ingestión de carnes asadas (chamuscadas), y baja en carbohidratos o una dieta - rica en coliflor estimulan el metabolismo de drogas y aumentan las hidroxilaciones en posición 2 del estradiol.

Los citocromos P-450 constitutivos (adrenal, gónadas y riñón) - bioactivan hormonas esteroideas, esteroles, ácidos grasos y prog taglandinas de gran importancia en los cambios fisiológicos y - farmacológicos así como en patología humana. Un reto de igual - importancia en el futuro será el desarrollo de métodos no inva- sivos para cuantificar las diferentes isoenzimas en diferentes células y tejidos. Es posible que con los avances en la información y la gran complejidad de las decenas o centenas de isoenzimas que deberán ser identificadas y purificadas se inicie una - nueva subespecialidad en la medicina que estudie los mecanismos de regulación en las biomembranas celulares de todos los teji- dos con excepción de glóbulos rojos y músculos en donde hasta - la fecha no han sido identificadas, sin excluir la posibilidad de encontrarlas aunque sea en pequeñas cantidades.

Individuos que ingieren grandes cantidades de aflatoxinas B₁ en cereales utilizados en la alimentación y contaminados por hongos

(*Aspergillus flavus*) como sucede en Africa y América Latina -- (México), están más expuestos a la formación de hepatocarcinomas ocasionados por la bioactivación producida por hidroxilasas dependientes de citocromo P-450 en el hígado humano, en estas condiciones en estos individuos deberá modularse la concentración de isoenzimas bioactivadoras con inductores o represores selectivos.

En contaminaciones químicas por plaguicidas organohalogenados y organofosforados deberá regularse la concentración de citocromo P-450.

Esto adquiere fundamental importancia en sociedades actuales - ambientalmente muy contaminadas; en donde será necesario inducir isoenzimas detoxificantes que favorezcan la inactivación y eliminación de estos tóxicos.

Otra área adicional de gran promesa será el control de enfermedades en donde participa una excesiva expresión de genes citocromos P-450 involucrados en la patogénesis de hipertensión arterial o en sujetos con deficiencias en hidroxilasas vitales - en la supervivencia y sano desarrollo del individuo. También - será posible reducir los niveles de colesterol incrementando - la actividad de enzimas que metabolicen el colesterol a ácidos biliares. Además, la purificación y disponibilidad de la información de los citocromos P-450 en la especie humana nos permitirá en forma rutinaria mediante sus genes clonados predecir - estudios de metabolismo de drogas y sintetizar nuevos compuestos farmacéuticos con la idea de manipular y "domesticar" la - Farmacología y Toxicología Molecular.

La extraordinaria estereoespecificidad de algunas isoenzimas - nos permitirá sintetizar moléculas orgánicas en beneficio de - áreas agrícolas, industriales y farmacéuticas. Así como en la transformación de desechos tóxicos a productos inactivos y reutilizables.

Este será el reto para los científicos del siglo XXI, en el -- vasto campo de los citocromos P-450. Por lo que en la medida -- que este modesto trabajo logre despertar la inquietud de los -- estudiantes entonces se habrá cumplido el fin propuesto.

REFERENCIAS :

- 1.- MacMunn, C.A., 1914. Spectrum analysis applied to biology and medicine. Longmans, and Co. Ltd Londres.
- 2.- Keillin, D., 1966. the history of cell respiration and -- cytochrome University Press, Londres y Nueva York.
- 3.- Pruton, J.S.; Simmonds, S. 1963 Metal containing oxidases. En: General Biochemistry. John Wiley and Sons inc. Nueva - York, p. 347.
- 4.- Gibson, W.H., 1968. Cytochromes. En: Biological oxidations. Ed. Interciences Publishers; Nueva York, Londres, Sydney, p. 379.
- 5.- Klingenber, M. Pigments of rat liver microsomes. Arch. Bio chem. Biophys. 77: 493, 1958.
- 6.- Garfinkel, D. Studies on pig liver microsomes. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. -- Arch. Biochem. Biophys. 77: 376, 1958.
- 7.- Cooper, D. Y.; Levin, S.S.; Narasinhulu, S.; Rosenthal, O.; Estabrook R. W. Protochemical actions spectrum of the terminal oxidase of mixed funtion oxidase systems. Science -- 147: 400, 1965.
- 8.- Cooper, D. Y.; Estabrook, R. W.; Rosenthal O. The stoichiometry of C-21 hudroxilation by adrenocortical microsomes. J. Biol. Chem. 223: 1320, 1963.
- 9.- Ommura, T.; Sato, R. Evidence for its hemoprotein nature, - the carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239: 2370, 1964.
- 10.- Guaengerich, F. P. Mini review cytochromes P-450 Comp. Bio chem. Physiol. Vol. 89C # 1 pp. 1-4, 1988.
- 11.- Gonzalez, F. J. The molecular biology of cytochrome P-450. Pharmacological Reviews, 1989.
- 12.- Ortiz de Montellano, P. R. 1986. Cytochrome P-450. Structure, mechanism and biochemistry. University Press; Nueva York.
- 13.- White, R. I.; and Coon, M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450. Am Rev. Biochem. 49: 315-356, 1980.

- 14.- M. J. Coon, H. W. Strobel, J. Heidema, R. M., Kaschnitz, A.P. 1972. The molecular basis of electron transport. -- Academic Press, Nueva York.
- 15.- Schemkman, J. B.; Jonsson, I. and Robie-Suh, K. M., The many roles of cytochrome B_5 in hepatic microsomes. Life Sciences 19: 611-624, 1976.
- 16.- Testa, B. and Jenner, P. 1976. Drug metabolism: chemical and biochemical aspects. University Press. Nueva York.
- 17.- Fraser, R. D. Regulation of the metabolism of vitamin D. Physiological Reviews 60: (2) 551-613, 1980.
- 18.- Vandem Bossche H.; Willensens, G. & Tansen, PAJ Cytochrome P-450 dependent metabolism of retinoic acid in rat skin microsomes: inhibition by ketoconazole. Skin Pharmacol 1: 176, 183, 1988.
- 19.- Olson, R. E. The function and metabolism of vitamin K, -- Ann. Rev. Nut. 4: 281-332, 1984.
- 20.- Viner, R. I.; Novikov, K. N.; Kozlov, Y. P. & Kagan, V. E. Does alfa-Tocopherol interact with the active site of -- cytochrome P-450 in the liver microsomes. Bulletin of Experimental Biology and Medicine Vol. 103, 3, p. 336, 1987.
- 21.- Proctor, K. G.; Capdevila, J. H.; Falck, J. R. et al Cardiovascular and renal actions of cytochrome P-450 metabolites of araquidonic acid blood. Vessels 26: 53-64, 1989.
- 22.- Hall, P. F. Cytochromes P-450 and the regulation of steroid sunthesis. Steroids 48, 3-4: 131-196, 1986.
- 23.- Guengerich, F. P. Oxidation of 17 alfa ethynylestradiol - by human liver cytochrome P-450 catalyzed steroid hydroxylatation by alfa naphthoflavone. Molecular Pharmacology 33: 5,500, 1988.
- 24.- Dahlbäck, H.; Characterization of the liver mitochondrial cytochrome P-450. Catalyzing the 25-hydroxylation of 5 - beta-cholestone-3 alfa, 7 alfa, 12 alfa. Research Communications 157: 68, 1989.
- 25.- Test, B. and Jenner, P. Inhibitors of cytochrome P-450 and their mechanism of action. Drug Metabolism Reviews 12 (1): 1-17, 1981.
- 26.- Glenn Sipes I; Krislina, G. and Gillette, J. R. Bioactivation of carbon tetra chloride chloroform and bromo trichloromethane: role of cytochrome P-450. Life Sciences 20: -- 1514-1548, 1977.

- 27.- Potter, W. Z.; Davis, D. C.; Mitchell, J. R. et al. Acetaminophen-induced hepatic necrosis III cytochrome P-450 mediated covalent binding in vitro. Pharmacol and Exper. Therap. 187: 203-210, 1973.
- 28.- Niranjan, B. G. and Avadhani, N. G. Activation of aflatoxin B₁ by a Mono-oxygenase System Localized in rat liver mitochondria. The Journal of Biological Chemistry 255 (14): 6575-6578, 1980.
- 29.- Manus, M. P. et al. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P-450 dbI. The American Society for Clinical Investigation, Inc. 83: 1066-1072, 1989.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.

- Brown, Ch. A.; Black, S. D. Membrane topology of mammalian -- cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulu, Determination by trypsinolysis of phenobarbital treated microsomes. -- The Journal of Biological Chemistry 264; 4442, 1989.
- Faletto, M. B.; Koser, P. L.; Bättula, N.; Townsend, G. K.; -- Maccubin, E.; Gelboin, H. V. and Gurtoo, K. L. Cytochrome P₃-450 encodes aflatoxin B₁ 4-hydroxylase. The Journal of Biological Chemistry, 263, 25: 12187, 1988.
- Gil, L.; Salazar, I.; Vazquez, H. & Lara, M. Role of cytochrome P-450 monooxygenases in the activation of chemical carcinogens. Archivos de Biología y Medicina Experimentales 21, 1: 135, 1988.
- Gueguen, M.; Meunier-Rotival, M.; Bernard, O.; Alvarez, F. Antitumor Kidney microsome antibody recognizes a cytochrome -- P-450 from the II D subfamily. the Journal of Experimental Medicine 168, 2:801, 1988.
- Guengerich, F. P.; Umbenhauer, D. R.; Ged, C.; Muto, T.; Bork, R. W.; Shiuriki, N.; Dannan, G. A.; Beaune, P.; Martin, M. V.; Lloyd, R. S. Purification and characterization of human liver cytochrome P-450 enzymes. Drug Metabolism and its Regulation - 164: 187, 1987.
- Guengerich, F. P. Polimorphism of cytochrome P-450 in humans. -- Trends in Pharmacology Sciences 10: 107, 1989.
- Guengerich, F. P. Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology 29: 241-264, 1989.
- Guengerich, F. P. Multiple forms of cytochrome P-450. Pharmacology I, 3: 205, 1987.
- Guengerich, F. P. Cytochromes P-450. Comparative Biochemistry and Physiology 89, 1: 1, 1988.
- Harada, N.: Novel properties of human placental aromatase as a cytochrome P-450: Purification and characterization of a unique form of aromatase. Journal of Biochemistry 103, 1: 106, 1988.
- Jansson, I.; and Schenkman, J. B.; Influence of cytochrome b₅ - on the stoichiometry of the different oxidative reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals 15, 3: 344, 1987.

Karelampi, S. A.; Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B₁; - role of cytochrome P₁-450. Research Communications 145, 12: - 854, 1987.

Lewis, D. P.V.; Ioannides, C.; Parke, D. V.; Structural requirements for substrates of cytochromes P-450 and P-448. Chemical-Biological Interactions 64, 1-2: 39, 1987.

Meyer, U. A. Genetic Polymorphism of human cytochromes P-450,- Porphyrins and Porphyrins 134: 101, 1987.

Monier, S.; Van luc.; Kreibich, G.; Sabatini, D. D.; Adesnick, M.; Signals of the incorporation and orientation of cytochrome P-450 in the endoplasmic reticulum membrane. The Journal of - Cell Biology 107, 2: 457, 1988.

Nebert, D. W.; Jones, J. e.; Owens, J.; Puga, A.; Evolution of the P-450 gene superfamily. Progress in Clinical and Biological Research 274: 557, 1988.

Nelson, D. r. and Strobel, H. W.; Evolution of cytochrome P-450 proteins Molecular Biology and Evolution 4, 6: 572, 1987.

Nisimoto, Y.; Otsuka-Murakami, H.; Cytochrome b₅ cytochrome c - and cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles. Biochemistry, 27, 16: 5869, 1988.

Shimada, T.; Okuda, Y.; Metabolic activation of environmental - carcinogens and mutagens by human liver microsomes. Role of -- cytochrome P-450 homologous to a 3-methylcholantrene-inducible isozyme in rat liver. Biochemical Pharmacology 37, 3: 459, 1988.

Shimada, T.; Guengerich, F. P. Evidence for cytochrome P-450 - the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the *in vivo* bioactivation of aflatoxins in human liver. Proceedings of the National Academy of the National Academy of Sciences of the USA, 186: 462, 1989.