

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Facultad de Ciencias**

**“Efecto de los niveles de glutatión sobre la expresión y  
actividad del CYP1A1 inducido por albendazol”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(EXPERIMENTALES)**

**P R E S E N T A**

**BIOL. RUBÉN GERARDO ZAMORA MENDOZA**

**DIRECTORA DE TESIS : DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**

**MÉXICO. D.F**

**ENERO, 2005**

m340372





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Dolores Gerardo Zamora  
Mexcala

FECHA: 26/09/2008

UPTAA: [Signature]



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN

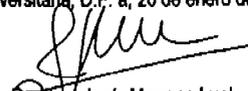
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Zamora Mendoza Rubén Gerardo con número de cuenta 91152088, con la tesis titulada: "Efecto de los niveles de glutatión sobre la expresión y actividad del CYP1A1 Inducido por albendazol", bajo la dirección del(a) Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Presidente:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Vocal:	Dr. Ruy Pérez Monfort
Secretario:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Suplente:	Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Suplente:	Dra. Rolando Hernández Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 20 de enero del 2005

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

### **Agradecimientos**

A la M en C. Diana Escobar García por su asesoría en los ensayos de actividad enzimática.

A el Dr en CB. Rafael Camacho por su asesoría en los ensayos de mutagenicidad de Ames.

### **Reconocimientos**

El Biol. Rubén Gerardo Zamora Mendoza recibió una beca para estudios de posgrado de Maestría en Ciencias Biológicas de CONACYT periodo 2002-2004.

Este trabajo fue financiado por PAPIIT IN215301 y IX219804.

### **Miembros del comité tutorial**

- **Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte** IIB
- **Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre** IIB
- **Dr. Rolando Hernández Muñoz** IFC

**A mis padres Rubén y Bertha<sup>†</sup> , por ser los culpables de que escriba estas líneas, esperando que se sientan orgullosos tanto como estoy yo de ellos.**

**“Una teoría es algo en lo que nadie cree, a excepción de quien la formulo. Un experimento es algo en lo que todos creen, a excepción de quien lo hizo”**

**- Atribuida a Albert Einstein**

**“El hombre fuerte crea sus sentimientos; el débil sufre los que le impone el destino.”**

**- Alfred de Vigny**

## AGRADEZCO \_\_\_\_\_

A la Dra. **Maricha**, por haber confiado en mi persona y mi capacidad, considerando mis grandes limitaciones por ser mi guía en el infinito camino de encontrar la luz, que es la verdad, espero no haberla defraudado. A **Paty** que siempre me ha ayudado y escuchado y se que siempre podré contar con su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio que con el tiempo se han hecho parte fundamental de mi vida, ya que a ellos les confió mis alegrías y tristezas y me soportan uno que otro trauma de índole existencial.

A **Jorge**, por contagiarme su entusiasmo no solo en el conocimiento también en su forma de ver la vida y por estar en mi mismo canal y frecuencia. A **Wendy** por su infinito optimismo y por su maravillosa forma de ser, la cual siempre me recuerda que en gran medida el destino de un hombre empieza por sus sueños. A **Valeria** por brindarme su amistad y transmitirme valores que solo un gran ser humano tiene.

A **Danny** por su sencillez y franqueza que me han ayudado a verme tal y como soy aunque no me guste y/o lo niegue, siempre seré su amigo para lo quiera, donde sea y cuando sea.

A **Roxana, Jazmín y Elsa** por contagiarme de su juventud e ímpetu y sus inmensas ganas de vivir y comerse el mundo, ya que a veces se me olvida lo bonito que es la vida.

A mis amigos y amigas de toda la vida. A **Veronica** por ser para mí un ejemplo de que cuando se desea algo se lucha hasta alcanzarlo. A **Damaris y Alejandra**, por ser más que mis amigas y soportar todos mis desvaríos mentales y ser mujeres excepcionales, creo que nunca sabrán cuanto las quiero. A **Nacho** porque he aprendido de él muchas cosas que en ningún instituto se aprenderían, A **Agustín y Yemín** por ser amigos y por brindarme su confianza y hacerme partícipe de sus aventuras.

A todo los demás que gracias a su estimación se me olvida lo duro de esta vida y por hacerme partícipe de tantas noches de copas, chelas y pláticas extensas dignas del dios Baco.

A Dios que aunque casi no platico con El no me olvido de su magnificencia y grandeza

A mis gatos "tota", "gatoso" y "tigre"<sup>†</sup>, por ser más que mascotas, parte importante de mi familia.

## **INDICE RESUMEN**

	<b>Paginas</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1-16</b>
1.1 Glutati6n	1-7
1.1.1 Propiedades y caracteristicas	1-2
1.1.2 Bioquímica y síntesis	2-4
1.1.3 Inhibidores de la síntesis de GSH	4-5
1.1.4 Funciones	6
1.1.5 Enzimas relacionadas con el GSH	6-7
1.2 Citocromos P450	8-16
1.2.1 Mecanismo de oxidaci6n de xenobi6ticos por citocromos P450	10
1.2.2 Citocromo P450 Subfamilia 1A	11
1.2.3 Mecanismo general de inducci6n del citocromo P450 1A1	12-13
1.2.4 Inducci6n del CYP1A1 por benzimidazoles	13-15
1.2.5 Control de la Inducibilidad del CYP1A1	16
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>3. JUSTIFICACI6N E HIPOTESIS</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
4.1 General	
4.2 Particulares	
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>20-24</b>
5.1 Obtenci6n de microsomas de los esquemas 1 y 2 de tratamiento	21
5.2 Determinaci6n de actividades O-dealquilaci6n de alcoxiresorufinas (AROD)	22
5.3 Determinaci6n de la actividad enzimática de la glutati6n reductasa (GR)	22
5.4 Determinaci6n de los niveles de GSH	22-23
5.5 Determinaci6n de proteínas	23
5.6 Electroforesis e Inmunodetecci6n para el CYP1A1/A2 y CYP2B1	23-24
5.7 Análisis de resultado	24
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>25-35</b>
6.1 Niveles de GSH	25-26
6.2 Actividad de Glutati6n reductasa	26-27

6.3 Actividad de Etoxi-Resorufina-O-Deetilasa (EROD)	28
6.4 Medición de actividad MROD (1A2), PROD (2B1) Y BROB (2B2).	29
6.5 Inmunorrélicas	29-30
6.5.1 CYP1A1/2	
6.5.2 CYP2B1	
6.6 Efecto del BSO sobre la Inducción de CYP1A1 por un sustrato clásico.	32
6.7 Actividad de GR en citosol de animales tratados con B[a]P y BSO	33
6.8 Actividad EROD en microsomas inducidos con B[a] P	34
6.9 Inmunorrélicas del CYP1A1 inducido por B[a]P	35
7. DISCUSIÓN	36-39
8. CONCLUSIONES	40
9. REFERENCIAS	41-46

## Índice de tablas y figuras

## Paginas

Fig.1	Estructura de $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina (GSH)	2
Fig.2	Ciclo del glutatión.	4
Fig.3	Ciclo REDOX del GSH	7
Fig.4	Reacciones de reducciones catalizadas por el citocromo P450	9
Fig.5	Localización del sistema citocromo P450 en la membrana del retículo endoplásmico	9
Fig.6	Representación esquemática de las fases de oxidación de un xenobiótico por enzimas de citocromo P450	10
Fig.7	Mecanismo de activación transcripcional por AhR	13
Fig.8	Modelo alternativo de inducción del CYP1A1	14
Fig.9	Principal ruta metabólica del Albendazol	15
Fig.10	% de los niveles de GSH en animales tratados con BSO y ABZ	25
Fig.11	Niveles de GSH en animales tratados con BSO y ABZ	26
Fig.12	% de GR en grupos tratados con BSO y ABZ	27
Fig.13	Actividad GR en grupos tratados con BSO y ABZ	27
Fig.14	Actividad EROD en microsomas inducidos con ABZ y tratados con BSO	28
Tabla.1	Actividades Enzimáticas MROD, PROD y BROD	29
Fig.15	Inmunorréplica del CYP1A1/2 inducido por ABZ (grupos control y BSO)	30
Fig.16	Inmunorréplica CYP1A1/2 inducido por ABZ (grupos ABZ y BSO/ABZ)	30
Fig.17	Análisis densitométrico de membranas (CYP1A1/2) inducido por ABZ	30
Fig.18	Actividad PROD (CYP2B1) en microsomas inducidos con ABZ y tratados con BSO	31
Fig.19	Inmunorréplica del CYP1A2B1 inducido por ABZ (grupos control y BSO)	31
Fig.20	Inmunorréplica CYP2B1 inducido por ABZ (grupos ABZ y BSO/ABZ)	31
Fig.21	Análisis densitométrico de membranas (CYP2B1) inducido por ABZ	31
Fig.22	% de los niveles de GSH en grupos tratados con BSO, B[a]P y BSO/B[a]p	32
Fig.23	Niveles de GSH en animales tratados con BSO, B[a]P y BSO/B[a]p	32
Fig.24	% de GR en grupos tratados con BSO y B[a]P	33
Fig.25	Actividad de GR en grupos tratados con BSO y B[a]P	33
Fig.26	Actividad EROD en microsomas inducidos con B[a]P y tratados con BSO	34
Fig.27	Inmunorréplica del CYP1A1/2 inducido por B[a]P (grupos control y BSO)	35
Fig.28	Inmunorréplica CYP1A1/2 inducido por B[a]P (grupos ABZ y BSO/ABZ)	35
Fig.29	Análisis densitométrico de membranas (CYP1A1/2) inducido por B[a]P	35

## Abreviaciones

8-oxoG	8-oxo-guanosina
ABZ	Albendazol
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
ARNT	Translocador nuclear del receptor Ah
AROD	O-Dealkilación de alcoxiresorufinas
B[a]P	Benzo[a]pireno
BROD	Benziloxi-resorufina O-Deetilasa
BSO	Butionin sulfoximina
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
EROD	Etoxi-resorufina O- Deetilasa
GCG	$\gamma$ -glutamilcistein sintetasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductatasa
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación-S-transferasa
HAP (ingles PAH)	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HSP90	Proteína de choque térmico 90
MROD	Metoxi-resorufina O-Deetilasa
MSO	Metionin Sulfoximina
OMZ	Omeprazol
PROD	Pentoxi-resorufina O-Deetilasa
SOD	Superóxido dismutasa
TBZ	Tiabendazol
TCB	Tetraclorobifenilos
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
UGT	UDP-glucoroniltransferasa
XRE	Elemento de respuesta a xenoblótico

## RESUMEN

Los citocromos P450 de la subfamilia 1A tienen un papel importante en la transformación y bioactivación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y también de compuestos con importancia farmacológica como los benzimidazoles en especial el albendazol un fármaco ampliamente usado para combatir infestaciones parasitarias. En este estudio investigamos la modulación de la síntesis y actividad del citocromo P450 1A1 (CYP1A1) por los niveles de GSH. Para ello utilizamos un modelo animal a los cuales se les indujo el CYP1A1 inyectando albendazol (ABZ) (50mg/kg i.p) por 8 horas y manipulamos el estado de glutatión (GSH) tisular deteniendo su síntesis al inyectar L-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO) (2 mmol/kg i.p). Hubo una tendencia decreciente del nivel de GSH a las 3 y 6 hrs. (85%, 62% respectivamente) siendo esta disminución significativa a 11hrs (21%). El ABZ no tuvo efecto sobre los niveles de GSH. La actividad de la glutatión reductasa (GR) fue inhibida parcialmente por el tratamiento con BSO (74%), siendo esta inhibición significativa en los animales tratados con BSO y ABZ (65%). La inyección con ABZ indujo la actividad catalítica del CYP1A1 (Etoxiresorufina O-deetilasa [EROD]). Este efecto se vio incrementado significativamente por el tratamiento con BSO (10 veces). Sin embargo el incremento de la actividad no fue seguida por la expresión de la proteína detectada por inmunorreplicas. Por la posible sobreestimación de EROD medimos la actividad de los CYPs 1A2, 2B1 y 2B2. El tratamiento con BSO no afectó la expresión y la actividad catalítica de estos citocromos en el periodo de tiempo en que fue administrado el ABZ. Cuando se utilizó un sustrato clásico como benzo[a]pireno (B[a]P), se observó que el B[a]P disminuyó significativamente los niveles de GSH y este descenso fue más evidente al administrarlo junto con BSO (36%). El B[a]P inhibió asimismo la actividad GR (69%), por el contrario hubo una inducción significativa de GR en presencia de BSO (145%). En la actividad EROD no hubo cambios en el tratamiento de BSO/B[a]P. El B[a]P previo tratamiento con BSO tuvo un efecto significativo sobre la inducción proteica del CYP1A1. La disminución del GSH en tejido hepático afectó ligeramente la expresión del CYP1A1, y su capacidad para activar compuestos como el B[a]P. El incremento observado en la actividad EROD promovida por BSO pudiera deberse a una sobre estimación del método como ha sido mencionado por otros autores. Por otra parte el B[a]P disminuye los niveles de GSH y afecta la actividad de GR al conjugar su efecto con BSO. Se conoce que el B[a]P genera compuestos reactivos de su propio metabolismo y estos consumen GSH para su eliminación, por lo que la disponibilidad de GSH disminuye aun más a la vez que promueve la rápida conversión de GSH a su estado reducido al estar inhibida la síntesis por un inhibidor como el BSO. Todo sugiere que el CYP1A1 es afectado de forma diferente cuando es inducido por un sustrato clásico (B[a]P) y no clásico (ABZ), en presencia de niveles bajos de GSH.

Palabras clave: Citocromo P450 1A, benzimidazoles, glutatión, glutatión reductasa albendazol, benzo[a]pireno, Etoxiresorufina O-deetilasa

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Glutati6n

#### 1.1.1 Propiedades y caracteristicas

El glutati6n ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) es el tiol celular no proteico m1s abundante ya que se encuentra en concentraciones milimolares (1 a 10 mM, dependiendo del tipo celular) (Dickinson y cols.2002). Est1 presente en animales, plantas y microorganismos y es soluble en agua encontr1ndose principalmente en el citosol celular (Kosower y Kosower, 1978., Meister A, 1976., Kidd PM, 1991, Lomaestro y Malone, 1995). El glutati6n (o GSH tiene un peso molecular de 314.6 Da mientras que la forma oxidada (GSSG) tiene un peso molecular de 612.6 Da. Est1 formado por tres amino1cidos: 1cido glut1mico, cisteina y glicina unidos por un enlace gama entre los dos primeros amino1cidos el cual resiste la degradaci6n por peptidasas (Figura1).

Hay evidencias que indican que la porci6n  $\gamma$ -glutamil del glutati6n funciona en el transporte de amino1cidos (especialmente cisteina y otros amino1cidos neutrales), de p1ptidos y de aminas (Meister y Anderson, 1983). El grupo sulfihidrilo (-SH) del residuo de cisteina le da a la mol1cula el car1cter de donador de electrones, como lo indica su potencial redox negativo  $GSSG + 2 H^+ + 2e^- \rightarrow 2 GSH$  ( $E^{\circ} = -0.23 V$ ) (Lewin. S, 1976).

Esto hace del GSH un potente antioxidante y un cofactor para las reacciones enzim1ticas que requieren la disponibilidad de electrones, comport1ndose como un "equivalente reductor" (Kehrer y Lund, 1994). Tambi1n puede reaccionar de manera reversible con los grupos tioles de la prote1nas, p1ptidos y mol1culas de cisteinas formando enlaces disulfuro, afectando los estados de oxidaci6n de mol1culas importantes como la SOD Cu,Zn (super6xido dismutasa Cu,Zn) y la anhidrasa carb6nica, por un proceso descrito como glutationilaci6n (Halliwell y Gutteridge, 2000; Kretzchmar, 1996).

Gracias a que los puentes disulfuro son estructuras fundamentales en la conformaci6n de una prote1na, estos mecanismos son capaces de regular la actividad de varias enzimas como cinasas y fosfatasas.

El poder reductor del GSH es una medida de la capacidad celular para la depuraci6n de radicales libres, donaci6n de electrones y capacidad de donar grupos sulfihidrilos. Estos procesos son la clave de las m1ltiples acciones del GSH a nivel

molecular, celular y tisular, y describen su efectividad como una antitoxina sistémica (Meister A, 1976).

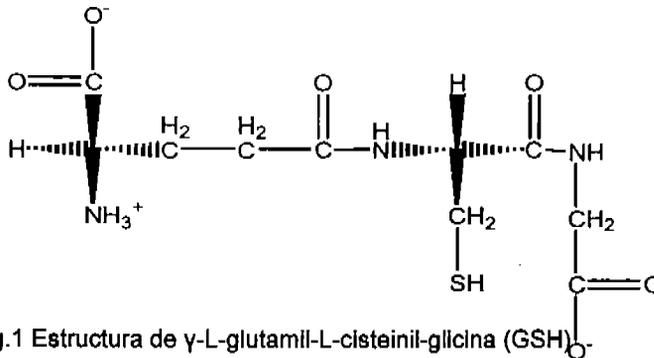


Fig.1 Estructura de  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH).

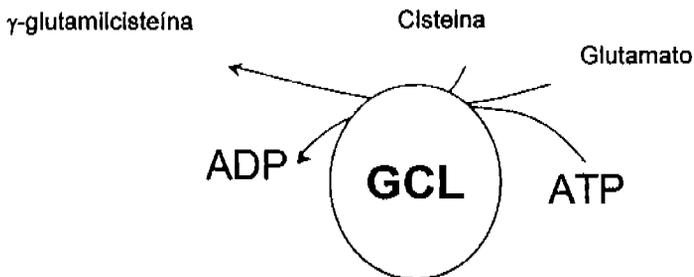
### 1.1.2 Bioquímica y síntesis

Los procesos que llevan a cabo la síntesis y la degradación del glutatión se incluyen en el ciclo  $\gamma$ -glutamil, que está estrechamente relacionado a varias funciones fisiológicas y metabólicas en las que participa este péptido.

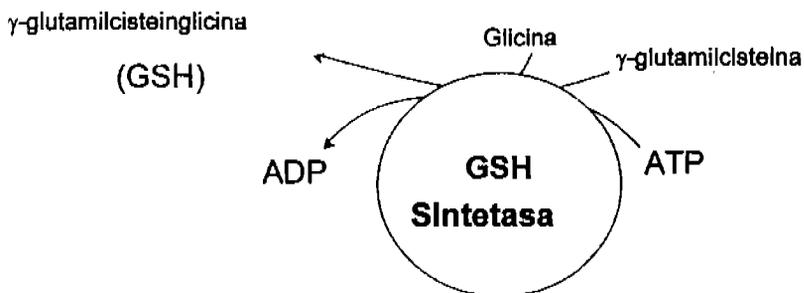
Se sintetiza en la célula por acciones secuenciales de la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa (GCS) y la glutatión sintasa (GS) en una serie de seis reacciones catalizadas enzimáticamente (Meister A, 1973; 1983) (Figura 2).

La actividad de la GCS parece ser el factor limitante en la síntesis de GSH, su actividad es regulada por retroalimentación negativa por elevadas concentraciones fisiológicas de glutatión. La GCS está compuesta de dos subunidades una catalítica (GSh) y una regulatoria (GSI).

La GSh es responsable de la actividad catalítica favoreciendo la unión dependiente de ATP del ácido glutámico con una cisteína, mientras que la GSI modula la  $K_m$  de la enzima por el glutamato y su sensibilidad a la inhibición por retroalimentación por GSH.



El segundo paso sintético es catalizado por la glutatión sintasa que añade glicina utilizando ATP al dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína, la cual no es inhibida por el producto de la reacción como la GCS. Su expresión es tejido específica y se encuentra en gran cantidad en riñón.



El glutatión se transporta (exportado de las células) por la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa una enzima unida a la superficie externa. La acción de esta enzima es la de romper de una manera ATP dependiente, la unión gama entre el glutamato y la cisteína para transferir el residuo glutamilo a otros aminoácidos formando  $\gamma$ -glutamilo aminoácidos, y cisteinglicina. Este último compuesto se degrada por la acción de dipeptidasas para formar cisteína y glicina libre.

Los  $\gamma$ -glutamil aminoácidos formados en la reacción de transpeptidación son sustratos de la enzima intracelular  $\gamma$ -glutamil ciclotransferasa, la cual los convierte en los correspondientes aminoácidos libres, frecuentemente cisteínas; los residuos  $\gamma$ -glutamil forman 5-oxiprolina.

La 5-oxiprolinasa (d) abre la estructura cíclica para producir glutamato. (Wilson. y Cannan, 1937, Meister y Bukenberger, 1962)

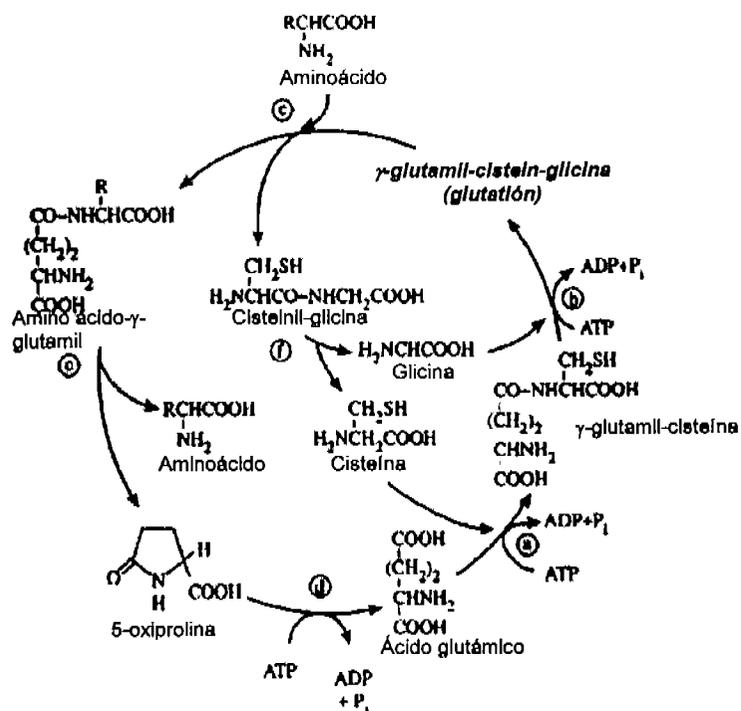


Fig.2 Ciclo del glutatión.

(a)  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa, (b) glutatión sintetasa, (c)  $\gamma$ -glutamil ciclotransferasa, (d) oxiprolinasa, (e)  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa; (f) peptidasa

### 1.1.3 Inhibidores de la síntesis de glutatión.

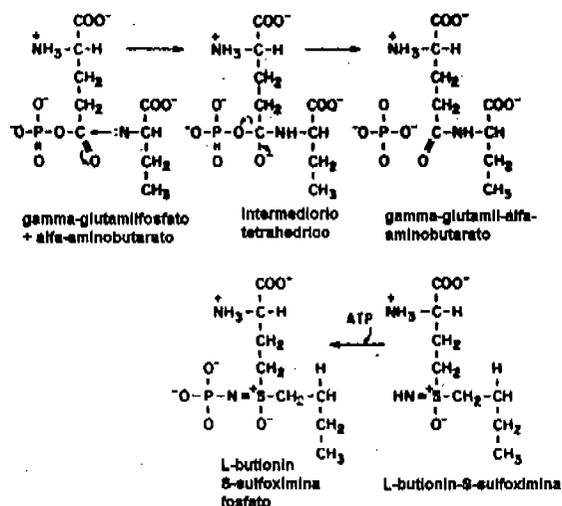
La L-butlonin-[S,R]-sulfoximina (BSO) es un inhibidor de la síntesis de GSH. Su administración produce un decremento en los niveles tisulares de GSH y esto a largo plazo produce una disminución en los niveles plasmáticos del péptido (Griffith y Meister, 1979).

La disminución rápida de GSH en el hígado y riñón, por la acción de un inhibidor de la GCS, produce un efecto muy rápido sobre la poza de GSH en estos tejidos, debido a que a pesar de que la síntesis es inhibida, su exportación continúa (Pastore y cols., 2003).

Químicamente el BSO es un análogo de la metionín sulfoximina (MSO) el cual se identificó como un Inhibidor específico de la biosíntesis de GSH, pero debido a que era muy tóxico, el BSO se empleó en lugar del MSO ya que conservaba la especificidad en la inhibición de la síntesis de GSH y no presentaba toxicidad sobre los tejidos en el cual fue probado (Griffith, 1982).

#### Mecanismo de acción

El BSO se une reversiblemente como un análogo de  $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -aminobutirato un producto intermedario de la reacción normal de la enzima, ya que solo un diastomero del BSO es unido, la unión inicial ocurre con una KI de 25  $\mu$ M o menos (Griffith, 1982). El BSO unido es entonces fosforilado en el nitrógeno de la sulfoximina. La estequiometría y distribución de carga del producto BSO-P recuerda al intermedario tetrahédrico hipotético formado durante la reacción entre el  $\alpha$ -aminobutirato y el  $\gamma$ -glutamil-fosfato. La extrema firmeza de la unión sugiere que el BSO-P es también un análogo estructural cercano del estado de transición asociado con la formación o colapso del intermedario producido en la reacción normal. (Griffith, 1982).



Kramer y colaboradores en 1987 observaron una disminución de GSH después de inyecciones intra peritoneales simples o múltiples a ratas. La disminución máxima de GSH se presentó en un lapso de 2-4 horas en plasma, riñón e hígado y fue más tardía en otros tejidos.

#### 1.1.4 Funciones

La poza de GSH participa como mencionamos brevemente antes, en 3 funciones principales: a) como cofactor para la glutatión S transferasa (GST) en las vías de detoxificación, b) como sustrato para la GGT que transfiere el ácido glutámico presente en la molécula de GSH a otros aminoácidos, para su incorporación a la célula y c) para depuración de radicales libres y como cofactor de enzimas antioxidantes.

El papel fisiológico del GSH se ha implicado en multitud de funciones celulares tales como el transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, el mantenimiento de enzimas en su forma activa, la protección contra la radiación y endotoxinas. También participa en reacciones de transhidrogenación involucradas en la formación y mantenimiento de grupos -SH de otras moléculas (p.ej coenzima A). Provee de capacidad reductora para varias reacciones y juega un papel importante en la detoxificación de peróxidos de hidrógeno, otros peróxidos y radicales libres (Hayes y McLellan, 1999), participa en la detoxificación de metales reactivos endógenos y exógenos y electrófilos, y en la regulación del ciclo celular y diferenciación celular (Meister y Anderson, 1983; Meister, 1984; Wang y Ballatori, 1998; DeLeve y Klapowitz, 1990).

#### 1.1.5 Enzimas relacionadas con el glutatión.

La función antioxidante del GSH es mantenida por su reciclamiento a través de la acción de 1) la glutatión peroxidasa (GPx) y 2) la glutatión reductasa (GR). La superóxido dismutasa (SOD), cataliza la reducción del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) produciendo  $H_2O_2$  el cual es reducido por la glutatión peroxidasa generando en la reacción una molécula de  $H_2O$ . La glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) es una enzima ampliamente distribuida, que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión (GSH). Es esencial para el ciclo redox del glutatión, ya que mantiene niveles adecuados de glutatión celular reducido.

Esta enzima homodimérica es miembro de la familia de las oxidoreductasas, la cual funciona como flavoproteína de disulfuros. Cada subunidad tiene cuatro dominios, empezando en el NH-terminal: un dominio de unión a FAD, un dominio de unión a NADPH, un dominio central y un dominio de interfase. El sitio activo de la GR está en la interfase dimérica. Ya que el sitio de unión a GSSG está compuesto de residuos de ambas subunidades solo la forma dimérica es activa (Bashir y cols., 1995)

El glutatión oxidado se reduce por una reacción de múltiples pasos en la cual GR es inicialmente reducida por NADPH. La GR contiene flavín adenin nucleótidos y usa los equivalentes reductores desde el NADPH para reconvertir GSSG a 2GSH. (Figura 3)

Las enzimas dependientes de GSH proveen la segunda línea de defensa, ya que funcionan detoxificando moléculas reactivas y ayudan a prevenir la propagación de radicales libres. Muchas de las proteínas dependientes de GSH son inducidas coordinadamente a través del elemento de respuesta antioxidante (del inglés: ARE).

La transcripción de la glutatión-S-transferasa (GST) es modulada por varios agentes pro-oxidantes por medio del ARE (Xia y cols., 1996). Esta enzima cataliza la conjugación del GSH con compuestos producidos *in vivo* durante el estrés oxidativo y representa un sensor capaz de transmitir las variaciones REDOX a la maquinaria de apoptosis modulando las vías de cinasa activadas por estrés (Adler y cols., 1999).

Durante el curso de las reacciones catalizadas por GPx y GR el GSH es reciclado a través de procesos de óxido-reducción.

En contraste, el GSH se consume durante la generación de glutatión S-conjugados por la glutatión S-transferasas o por la actividad de la  $\gamma$ -GGT (Pastore y cols., 2003).

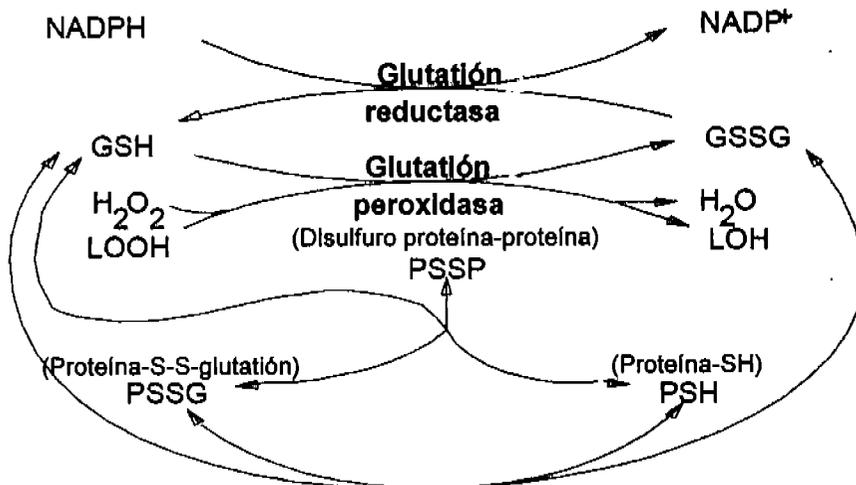


Fig.3 Ciclo REDOX del GSH

## 1.2 Citocromos P450

Los citocromos P450 son un grupo de enzimas que al ser reducidas con ditionita de sodio y mezcladas con monóxido de carbono, presentan un pico máximo de absorción en luz visible alrededor de 450 nm (Omura y Sato, 1964). Oxigenan un amplio espectro de sustratos lipofílicos originando una serie de metabolitos intermedios que se van a convertir en sustratos de las enzimas de la llamada fase II del metabolismo. Muchos de los metabolitos que originan los P450, son biológicamente activos y su expresión es modulada por muchos de los agentes que metabolizan. Farmacólogos y toxicólogos originalmente se interesaron en los citocromos P450 ya que estas enzimas juegan papeles importantes en el metabolismo de medicamentos, carcinógenos y hormonas esteroides (Estabrook, 1996).

La superfamilia de citocromos P450 está presente desde bacterias hasta humanos y se piensa que se diversificó ampliamente desde su origen. Se han encontrado genes de este grupo en arqueobacterias, en plantas y casi en todas las especies animales.

Los citocromos P450 participan en las reacciones de fase I del metabolismo. En ellas ocurre la biotransformación de los grupos funcionales susceptibles a sufrir reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para transformarlos en moléculas con mayor polaridad. Las transformaciones efectuadas aumentan la hidrofiliidad de los diversos compuestos y su excreción corporal (Perelman, 2000).

Los compuestos como fármacos y plaguicidas son transformados predominantemente en el hígado humano por las subfamilias CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2E1 y CYP3A4. (Spatzeneger y Jaeger, 1995; Meyer y Perdew 1999).

Las biotransformaciones oxidativas catalizadas por los citocromos P450 incluyen hidroxilación aromática y de cadena lateral, desalquilación de N, O y S, oxidación de N, sulfoxidación, hidroxilación de N, desaminación, deshalogenación y desulfuración. (Figura4)

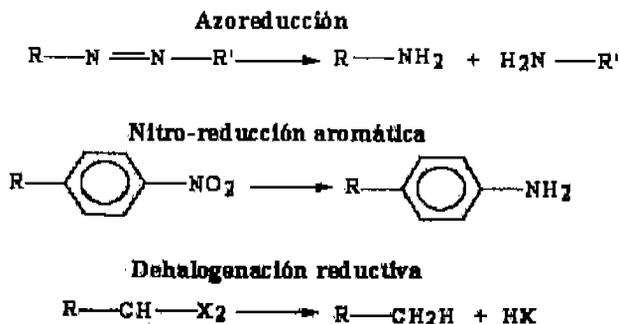


Fig.4 Reacciones de reducciones catalizadas por el citocromo P450

Estos complejos enzimáticos se encuentran anclados a la membrana del retículo endoplasmático a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana. Esta hélice transmembranal está seguida, por regla general, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interactúan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana. (Chaple, 1998) (Figura 5). La característica estructural común al grupo de xenobióticos oxidados por los citocromos P450 es su alta liposolubilidad. (Perelman, 2000)

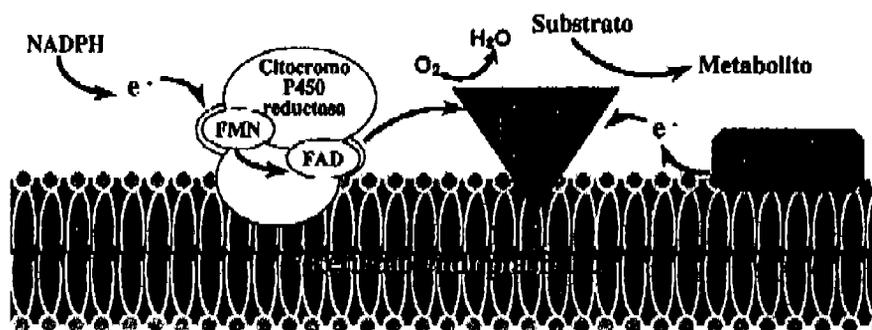


Fig.5 Localización del sistema citocromo P450 en la membrana del retículo endoplasmático

### 1.2.1 Mecanismo de oxidación de xenobióticos por acción de los citocromos P450

Las enzimas del citocromo P450 son proteínas de membrana con un grupo hemo (Goodman y Gilman, 1996), que para catalizar sus reacciones requieren de la reductasa NADPH-citocromo P450, NADPH+H de cofactor y oxígeno molecular.

La reacción de oxidación multifásica consiste en que el sustrato (xenobiótico) reacciona con la forma oxidada del citocromo P450 ( $\text{Fe}^{+3}$ ), para formar un complejo enzima-sustrato. La reductasa del citocromo P450 acepta un electrón de NADPH+ $\text{H}^+$ , que a su vez reduce el complejo oxidado de citocromo P450-xenobiótico. El complejo citocromo P450-sustrato reducido ( $\text{Fe}^{+2}$ ) reacciona con oxígeno molecular y con un segundo electrón de NADPH+ $\text{H}^+$  donado a través de la misma reductasa de flavoproteína, para formar una especie de oxígeno activado, principalmente un grupo hidroxilo (-OH).

En las fases finales se libera un átomo de oxígeno en forma de agua y otro se transfiere al sustrato. Una vez liberado el sustrato sometido a oxidación, la enzima oxidada (citocromo P450) se regenera (Goodman y Gilman, 1996) (Figura 6)

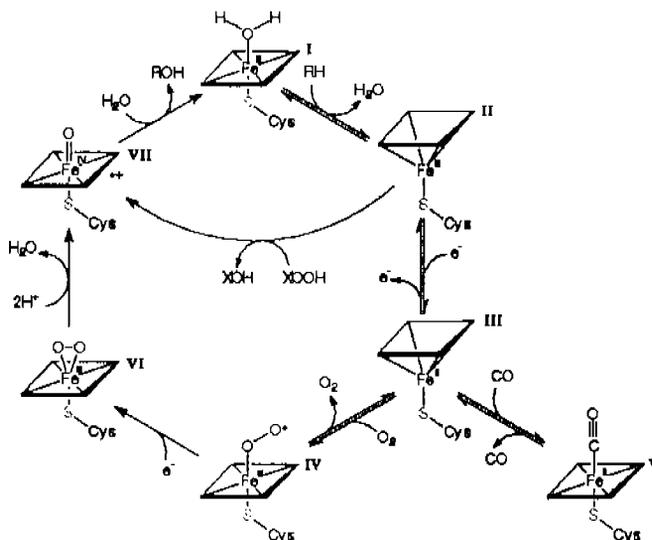


Fig.6 Representación esquemática de las fases de oxidación de un xenobiótico por enzimas de citocromo P450

### 1.2.2 Citocromo P450 Subfamilia 1A

Varios genes de la superfamilia de citocromos P450 son altamente inducibles, particularmente por xenoblóticos que se unen a receptores intracelulares específicos y consecuentemente modulan la expresión del gen. La subfamilia CYP1A incluye tres genes (*CYP1A1*, *CYP1A2* y *CYP1B1*) que son inducibles por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y por dioxinas. Los HAPs son sustratos para la enzima CYP1A1, la cual cataliza su oxidación.

El gen *CYP1A1* es altamente inducible por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y por hidrocarburos aromáticos planares tales como el 3-metilcolantreno o el benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) (Morel y Barouki, 1998). Como enzima metabolizadora de fase I, la principal función atribuida a la enzima CYP1A1 es la de oxidar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) hidrofóbicos, como primer paso para su eliminación. Sin embargo, hay evidencias que sugieren que la alta actividad de la enzima puede llevar a toxicidad por bioactivación de xenoblóticos. Esto es mejor ejemplificado por el metabolismo de bifenilos policlorados (PCBs). (Brooks y cols, 1999)

El B[*a*]P se encuentra en el humo del tabaco y en la carne asada. Sufre dos reacciones de oxigenación sucesivas por la CYP1A1, que conduce la formación de un compuesto altamente mutagénico y carcinogénico: el diol-epóxido-benzo-*a*-pireno. Este último, así como otros metabolitos intermedios pueden ser sustratos de las enzimas de fase II tales como la GST y UGT (UDP-glucuroniltransferasa) y dar lugar a otras moléculas hidrofílicas que van a ser posteriormente excretadas. Por lo tanto el balance entre la actividad del CYP1A1 y las actividades enzimáticas de fase II es crítico para evitar la acumulación de reactivos tóxicos intermedios del metabolismo de B[*a*]P (Morel y Barouki, 2001).

La actividad de la CYP1A1 puede también producir Especies Reactivas de Oxígeno. Ya que se ha demostrado que varias mono-oxigenasas liberan peróxido de hidrógeno durante su ciclo catalítico particularmente en la presencia de los llamados sustratos no acoplados (Puntarulo y Cederbaum, 1998). Por lo tanto, se puede dar el caso de que una alta actividad de la CYP1A1 puede ser deletérea a causa de la generación de un estrés oxidante y la subsiguiente oxidación de macromoléculas biológicas. Por ejemplo se ha

demostrado que la inducción del *CYP1A1* por TCDD causa alteraciones en el DNA al ser oxidado, formando 8-oxo-guanosina (8-oxoG) (Parky cols., 1996).

### 1.2.3 Mecanismo general de Inducción del citocromo P450 1A1

La inducción del gen *CYP1A1* por HAPs y dioxinas es un paradigma de la regulación génica por xenobióticos (Whitlock, 1999). Se ha demostrado que estos compuestos se unen a un receptor citoplasmático llamado AhR. (Receptor de hidrocarburos aromáticos) que es un factor de transcripción que contiene motivos hélice-hoja-hélice/per.-ARNT-sim (bHLH./PAS). En la ausencia de un ligando, el AhR está presente en el citosol formando un complejo con HSP90, la proteína tipo Inmunofilina XAP2 y la co-chaperona p23. Se piensa que esta última contribuye a mantener la estabilidad del complejo HSP90 (Meyer y Perdew, 1999; Kalazuaskas y cols., 1999). Cuando los xenobióticos se unen al receptor, AhR este es liberado del complejo multiproteínico citosólico y entra al núcleo donde forma un heterodímero con la proteína ARNT (translocador nuclear del receptor Ah). Los estados de transactivación del heterodímero AHR/Arnt reclutan factores de transcripción generales CB/p300 para Arnt y RIP140, SRC-1 para AhR como coactivador. (Kobayashi y cols., 1997; Kumar y cols., 1999)

El dímero AHR/Arnt se une a una secuencia de DNA conocida como elemento de respuesta a xenobióticos (XREs; 5'-TNGCGTG-3) presentes en el promotor del gen *CYP1A1*, causando una modificación local de la estructura de la cromatina (Figura 7).

Se ha observado que el complejo AhR-ARNT hace sinergia con otros factores de transcripción como NF1 y Sp1, produciendo una potenciación en la expresión del gen. (Nebert y cols., 2000)

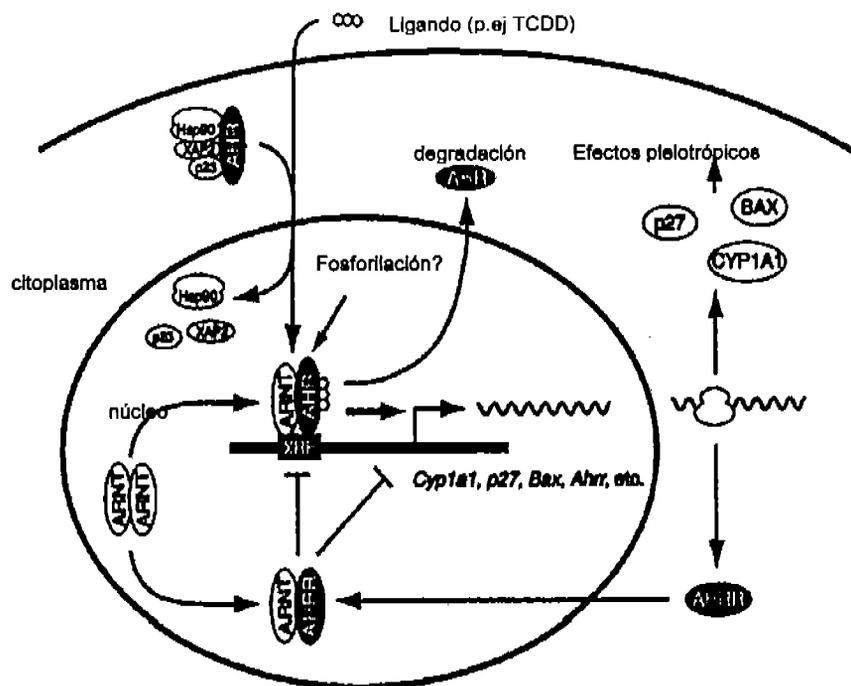


Fig.7 Mecanismo de activación transcripcional por AhR

#### 1.2.4 Inducción del *CYP1A1* por benzimidazoles

Recientemente se propuso una ruta alternativa de inducción del *CYP1A1* la cual es independiente del receptor AhR (receptor de hidrocarburos aromáticos). A estos inductores se les ha llamado inductores no clásicos, ya que se trata de varios compuestos no policíclicos y no planares. Ellos no comparten los criterios estructurales que los clasifica como inductores clásicos y ligandos del AhR, a diferencia de compuestos hidrofóbicos planares o co-planares de estructura policíclica (Lewis 1997; Delescluse y cols., 2000).

La independencia del AhR ha sido demostrada por ensayos de unión a ligando, en la cual haciendo competir sustratos no clásicos como el tiabendazol (TBZ) y omeprazol (OMZ) con un inductor clásico como el TCDD. Los primeros no desplazan al segundo en su

unión al receptor (Lemaire y cols., 2004). Ya que esos compuestos no se unen directamente al AhR (Daujat y cols, 1992), según un reporte por Kikuchi y cols. (1998), los compuestos benzimidícos como el omeprazol serían capaces de inducir la expresión del *CYP1A1* a través de una vía mediada por proteínas-tirosina cinasas, de la familia Src

Delescluse y cols. (2000) han propuesto un modelo alternativo de inducción del *CYP1A1*, en el cual el complejo formado por AhR, HSP90 y otras proteínas (proteínas relacionadas a inmunofilinas P; y/o pp60<sup>src</sup>), se disociarían en el núcleo en lugar del citoplasma. AhR heterodimeriza con Arnt. HSP90 y pp60<sup>src</sup> podrían probablemente jugar un papel facilitador ampliando la función del receptor para transducir el mensaje. Ellos podrían también participar en inter-relaciones y/o interconexiones entre numerosos receptores intracelulares (RAR, receptor de ácido retinoico; GR, receptor de glucocorticoides; ER, receptor de estrógenos; PR, receptor de progesterona) y vías de señalización (Figura 8).

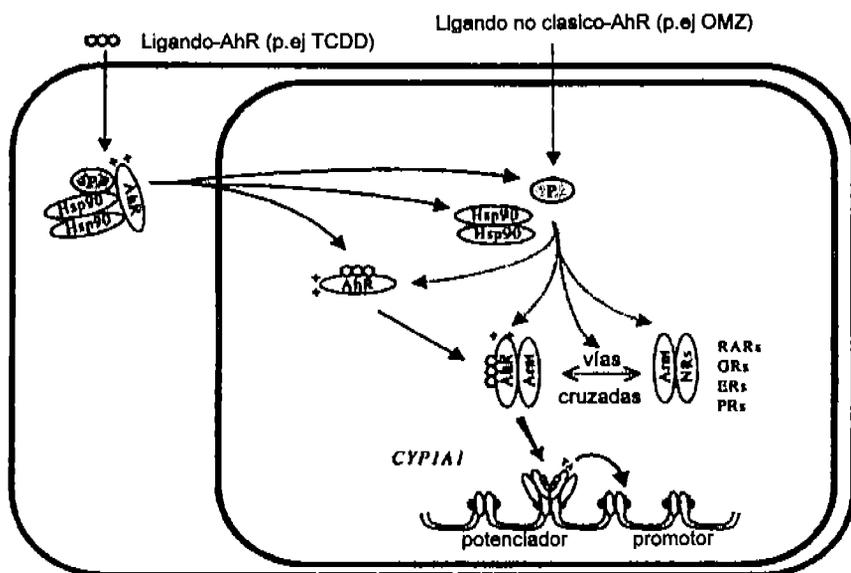


Fig.8 Modelo alternativo de inducción del *CYP1A1*

Entre los inductores no clásicos se encuentran los benzimidazoles los cuales incluyen compuestos como el omeprazol, un inhibidor de  $H^+/K^+$ -ATPasa gástrica, y benzimidazoles antihelmínticos como el albendazol, para el cual se sabe que este tipo de compuesto sulfurado sufre una S-oxidación en dos etapas dando primeramente sulfóxido de albendazol seguido por sulfona de albendazol. La Flavín monooxigenasa y el CYP3A4 (Fagerton y cols., 1986., Moroni y cols., 1995 y Rawden y cols., 2000) participan predominantemente en el primer paso metabólico, mientras la formación de la sulfona es catalizada por la familia CYP1A1 (Figura9).

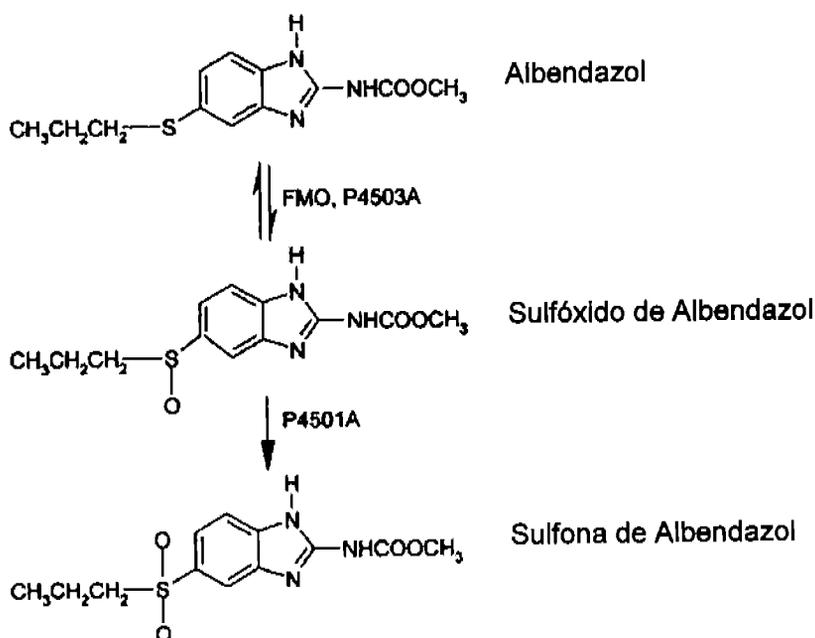


Fig.9 Principal ruta metabólica del Albendazol (Ballhorova y cols., 2003)

### 1.2.5 Control de la inducibilidad del CYP1A1

La expresión del gen *CYP1A1* es inducida primariamente por ligandos del AhR. Aunque es improbable que esto represente el único determinante del nivel de expresión de este gen. Otros factores tales como hormonas, citocinas y otras sustancias químicas han demostrado que modulan este efecto. La eficiencia del AhR podría ser modulada por eventos de fosforilación (Safe, 1998). A su vez, se sabe de la regulación del promotor del gen *CYP1A1* por hormonas como el estradiol, así como por un número de citocinas como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la Interleucina-1  $\beta$  que reprimen la inducción de este gen.

Existen evidencias en cuanto al mecanismo de represión a nivel transcripcional del gen *CYP1A1* mediado por estrés oxidativo. La actividad de este gen es regulado negativamente por  $H_2O_2$  o por el decremento de glutatión (el cual también cambia el estado REDOX celular hacía un estado mas oxidado).

En experimentos realizados en células HepG2 humanas y células de hepatoma de rata H4, el TCDD incrementó los niveles de RNAm del *CYP1A1*. Sin embargo este efecto se inhibió al dar un tratamiento previo con  $H_2O_2$ . De igual manera el uso de L-butionin (S,R)-sulfoximina (BSO), un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamyl sintetasa también inhibió la síntesis de RNAm del *CYP1A1* inducido por TCDD (Morel y Barouki, 1998).

## 2. Antecedentes

Otto y cols en 1997, demostraron en un modelo de trucha arcoiris que la inducción del *CYP1A1* por tetraclobifenilos (TCBs) estaba regulada por los niveles de tioles en varios tejidos. Usando BSO observaron una inhibición en la actividad y expresión de la enzima *CYP1A1* por el decremento en los niveles de GSH, el cual también promovió una disminución en la actividad de las enzimas glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx)

Por otro lado, las infecciones parasitarias crónicas provocan estrés oxidativo, a través de elevar los niveles de glutatión oxidado, o de inhibir la actividad de la GR, como lo observaron Sanchez y cols (1999) en hamsters infectados por *Dicrocoelium dendriticum*, lo que los llevó a proponer que la infección producía una ineficiencia para depurar ROS por las enzimas antioxidantes y síntesis de GSH durante la infección con daño oxidativo al hígado.

Además, Ankrah y cols (1995), demostraron que la infección con *Plasmodium berghei* aumentaba la susceptibilidad al daño por aflatoxina en ratones. Esta potenciación se debía en parte a una disminución en los niveles de GSH hepáticos. Por lo que la infección parasitaria impiden la detoxificación de la aflatoxina y otras toxinas hepáticas, lo que probablemente se traduzca en daño hepático.

Como mencionamos anteriormente los benzimidazoles son metabolizados por la *CYP1A1*, más específicamente, Asteinza (1998) demostró que el antihelmíntico albendazol y su metabolito el sulfóxido de albendazol (ABZSO) son fuertes inductores de la actividad y expresión de la isoforma *CYP1A1*. Se menciona que una elevada actividad metabólica de esta isoforma, transformará más rápidamente al metabolito farmacológicamente activo (sulfóxido) a sulfona lo que implicaría que se tengan que aumentar las dosis del fármaco para alcanzar concentraciones terapéuticas del medicamento.

### 3. Justificación.

Dada la relevancia que tiene la subfamilia *CYP1A1* en el metabolismo y bioactivación de compuestos de importancia farmacológica como es el caso de los benzimidazoles, particularmente el albendazol (Astelza y cols, 2000) y en la detoxificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) para transformarlos en compuestos con actividad carcinogénica, nos interesó estudiar la modulación en la síntesis y en la actividad de esta subfamilia de citocromos por GSH, puesto que diversas condiciones patológicas pueden disminuir los niveles de GSH. Para ello, utilizamos un modelo animal al cual se le disminuyeron los niveles tisulares de glutatión, mediante inyecciones con BSO. Es de esperar que el estado redox celular, así como los niveles de radicales libres puedan modular la expresión del *CYP1A1*, lo que tendría consecuencias fisiológicas para el organismo. Si la actividad de la hidroxilasa se ve inhibida por un decremento en la síntesis de GSH, entonces la actividad farmacológica del albendazol y de otros benzimidazoles, sustratos de esta enzima, será mayor y se requerirán de menores dosis para mantener los niveles terapéuticos de estos fármacos.

#### **Hipótesis**

La inhibición de la síntesis de GSH por BSO afectara negativamente la inducción del *CYP1A1* por albendazol.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Investigar la modulación de la presencia y la actividad del CYP1A1 inducido por albendazol, al disminuir los niveles de GSH y su correlación con la actividad de las enzimas asociadas a su metabolismo.

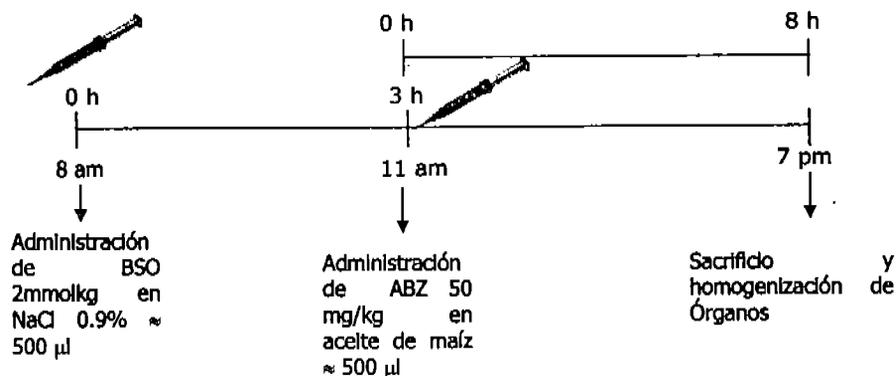
### 4.2 Particulares

- Disminuir los niveles tisulares de GSH, a través de la administración de BSO a varios intervalos de tiempo.
- Estandarizar el tiempo de administración de BSO en donde se observe un decremento de los niveles de GSH
- Medir la concentración de GSH en homogenizados de hígados de rata, por métodos bioquímicos
- Inducir la actividad del CYP1A1 con albendazol al tiempo de disminución de los niveles de GSH en hígado
- Determinar la actividad enzimática del CYP1A1 en los grupos inducidos y no inducidos mediante la prueba de etoxiresorufinas O-deetilasa (EROD)
- Determinar la actividad de una enzima asociadas al glutatión (GR), mediante ensayos enzimáticos en homogenizados de hígado de rata en los grupos inducidos y no inducidos.
- Medir la expresión de la proteína CYP1A1 en homogenizados de hígados de rata de los grupos inducidos y no inducidos, mediante inmunodetección con anticuerpos específicos.
- Comparar la respuesta obtenida para el ABZ con la de un sustrato clásico como el B[a]P.

## 5. Metodología

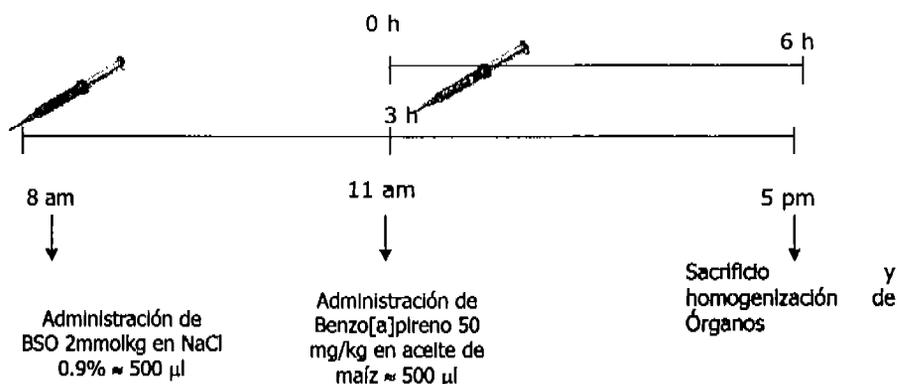
Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 230 a 250 gramos de peso corporal. Para manipular los niveles de GSH *in vivo*, se utilizó L-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO, Sigma) que es un inhibidor específico de la  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa ( $\gamma$ -GCS) (Halliwell y Gutterich, 1992). Se formaron grupos de tratamiento (4 animales por grupo) en los que los animales recibieron por vía i.p.: 1) aceite de maíz (Sigma) 500 $\mu$ l, 2) L-butionin-[S,R]-sulfoximina (BSO, Sigma) 2 mmol/kg de peso en NaCl 0.9%. 3) una dosis única de 50 mg/kg de peso de Albendazol suspendido en aceite de maíz (ABZ, Smith Kline & French) 4) BSO y tres horas después, una dosis única de ABZ 50mg/kg/ por un lapso de 8 horas (Esquema 1)

**Esquema 1**



Dado que los resultados del esquema anterior indican que el tratamiento de BSO+ABZ induce una mayor actividad del CYP1A1 que la producida por el ABZ, nos preguntamos si un efecto similar también ocurriría al utilizar un sustrato clásico del CYP1A1 como es el benzo[a]pireno. Para ello realizamos el esquema 2 utilizando ahora este hidrocarburo en vez del ABZ.

## Esquema 2



Este lote de animales se dividió de forma similar a la descrita arriba: 1) aceite de maíz 500µl, 2) BSO 2mmol/kg por 3h, 3) una dosis única de B[a]P 50 mg/kg por 6h, 4) BSO 2mmol/kg por 3h y después benzo[a]pireno 50 mg/kg por 6h. (Esquema 2)

### 5.1 Obtención de microsomas de los Esquemas 1 y 2 de tratamiento

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se procedió a la extracción de los órganos los cuales se homogenizaron en KCl 0.1M a 4°C. Los homogenizados, se centrifugaron a 9 000 x g por 10 min a 4°C y se obtuvo la fracción S9, la cual se volvió a centrifugar a 105 000 x g por 1hr a 4°C, se recuperó el pellet y se homogenizó en amortiguador de fosfato-potasio (100mM pH 7.4, 4°C), después de lo cual se centrifugó a 105 000 x g por 1h a 4°C y se recuperó el pellet, el cual se homogenizó en un amortiguador fosfato-potasio 100mM pH 7.4 (EDTA 1mM + DTT 0.1mM + glicerol 20%) la fracción microsomal resultante se almacenó en criotubos a -70°C.

Todas las mediciones de GSH, las actividades enzimáticas y los inmunoblots se hicieron por triplicado para cada animal por grupo de tratamiento.

## **5.2 Determinación de actividades O-Dealquilación de alcoxiresorufinas (AROD)**

Para cuantificar la actividad de los citocromos 1A1, 1A2, 2B1 y 2B2 se utilizó la reacción de O-dealquilación de etoxi-resorufina (EROD), metoxi resorufina (MROD), pentoxiresorufina (PROD) y benziloxiresorufina (BROD), respectivamente. Las reacciones para cada determinación se hicieron de la siguiente manera: en una celda de cuarzo para fluorometría se mezclaron: una solución amortiguadora de Tris-HCl 50mM y  $MgCl_2$  25mM a pH 7.6, el sustrato específico (la aloxi-resorufina correspondiente para cada CYP; Burke y Myers, 1975; Burke y cols, 1985; Rodríguez y Prough, 1991; Nerurka y cols, 1993) disuelto en DMSO y la suspensión microsomal. La mezcla se incubó a 37°C durante 3 minutos y se inició agregando 20  $\mu$ l de una solución 50mM de NADPH en Tris-HCl a pH 7.6. La cinética de aparición de resorufina se evaluó cada 15 segundos durante 3 min a 37°C en un fluorómetro. La medición se hizo a una longitud de onda de excitación de 530 nm y 285 nm de emisión (Asteinza y cols., 2000).

## **5.3 Determinación de la actividad enzimática de GR**

Con la fracción citosólica (sobrenadante de 105 000 x g) obtenida en el proceso de aislamiento de microsomas se determinó la actividad de GR según Carlberg y Mannevik (1975). La mezcla de reacción consta de: 500  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos 0.2M, EDTA 0.003M pH 7.0; 50  $\mu$ l de glutatión oxidado 20 mM, 50  $\mu$ l de NADPH 2mM en Tris-HCl 10 mM pH 7.0, la mezcla se incubó a 37°C y la reacción se inició agregando 5  $\mu$ l de la enzima (muestra) llevando a un volumen final de 1ml. La cinética de reacción se siguió cada 15 seg por 3 min a una longitud de onda de 340nm en una cubeta de cuarzo.

## **5.4 Determinación de los niveles de GSH (según Senft y cols, 2000)**

Una fracción de los órganos ( $\approx$  190mg) se homogenizó con amortiguador A (KCl 154mM, DTPA 5mM en amortiguador de fosfatos 0.1M). A un volumen del tejido homogenizado correspondiente al 10% se le agregó un volumen igual de amortiguador B (HCl 40mM, DTPA 10mM, Ácido ascórbico 20mM, TCA 10%) se centrifugaron a 14 000 x g

20 min a 4°C y se filtró el sobrenadante con papel de 0.45µm y se congelaron a -70°C por no más de 4 semanas. Las muestras se analizaron por fluorometría de la siguiente manera, en celdas de cuarzo se agregó una cantidad de homogenizado entre 5 y 10 µl, se agregó TCA-RQB (amortiguador de supresión REDOX) (HCl 20mM, DTPA 5mM, ácido ascórbico 10mM) (TCA 5% en RQB), y se incubaron 5min al final de este lapso se le añadió 1 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M y 150 µl de OPA (O-ptalaldehído). Se incubaron 30min en oscuridad y se leyeron en un fluorómetro a 365nm de excitación y 430nm de emisión

### **5.5 Determinación de proteínas**

Se midió la concentración de proteínas con un reactivo para ensayo de proteínas (Bio Rad) basado en el método de Bradford (Bradford, 1976) en las muestras microsomaes y citosólicas

### **5.6 Electroforesis e Inmunodetección para el CYP1A1/A2 y CYP2B1**

Se colocaron 5 µg de proteína microsomal en cada carril. Las muestras tratadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970) se utilizó un gel de separación de 12.5% y se corrieron a 120 volts por aproximadamente 1 hr. Para la Inmunodetección, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham) durante 1 hora a 100 volts.

Después de la inmunotransferencia los sitios de unión no específica en la membrana se bloquearon con una solución de leche en polvo al 2% w/v y BSA 0.5% w/v en amortiguador de TBS (Tris Buffered Saline) pH 7.6 en agitación constante durante toda la noche a 4°C.

Después se realizaron lavados con TBS (pH 7.6) y TBS-Tween 20 (0.1%) para posteriormente incubar con los antisueros específicos diluidos en PBS/leche en polvo 1%, BSA 1% en dilución 1:1000 (anti-CYP1A1 y anti-CYP2B1) por 1 hora a temperatura ambiente en agitación moderada. Las membranas se lavaron posteriormente con TBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (dilución 1:2000 en PBS/leche en polvo 1%/BSA1%) durante 1.5 horas a temperatura ambiente, después de un

ligeramente lavado con TBS, se revelaron con diaminobenzidina (DAB) y  $H_2O_2$  (30%). Las membranas se analizaron mediante el analizador de imágenes Fluor-S (Bio Rad) y utilizando el programa Quantity One (Bio Rad) para la cuantificación densitométrica de expresión de las proteínas mencionadas.

### **5.7 Análisis de los datos**

Los datos presentados corresponden al promedio de la actividad de los microsomas de cuatro animales de cada uno de los grupos analizados y se obtuvieron, desviaciones y error estándar y para compararlos entre grupos y entre tratamientos, se utilizó un análisis de varianza no paramétrica y un análisis post-hoc de comparación de Dunnett y de Tukey con un  $p < 0.05$  usándose el programa GraphPad InStat Software Inc

## 6. Resultados

### 6.1 Niveles de GSH

El BSO inhibe la síntesis de GSH, pero su exportación continúa (Pastore y cols, 2003) por lo que observamos un continuo decremento del títol a medida que transcurre el tiempo (85%, 62% y 21% de los valores controles a las 3, 6 y 11 horas respectivamente) (Figura 10). Al terminar nuestro experimento (11h) los hígados mostraron niveles significativamente menores que los animales controles. El tratamiento con ABZ no parece afectar la síntesis de GSH. El grupo que recibió BSO y ABZ tuvo el 45% de los niveles controles. Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos con una  $p < 0.05$ . El análisis post hoc de Dunnett mostró que las diferencias significativas eran entre el grupo control y el tratado con BSO por 11 horas ( $p < 0.01^{**}$ ), entre el control y el tratamiento con BSO/ABZ ( $p < 0.05^*$ ) así mismo hubo diferencias significativas entre el grupo de ABZ y el tratado con BSO por 11 horas ( $p < 0.05^*$ ). No hubo diferencias entre el grupo BSO/ABZ y BSO después de 11 horas (Figura 11).

Fig.10

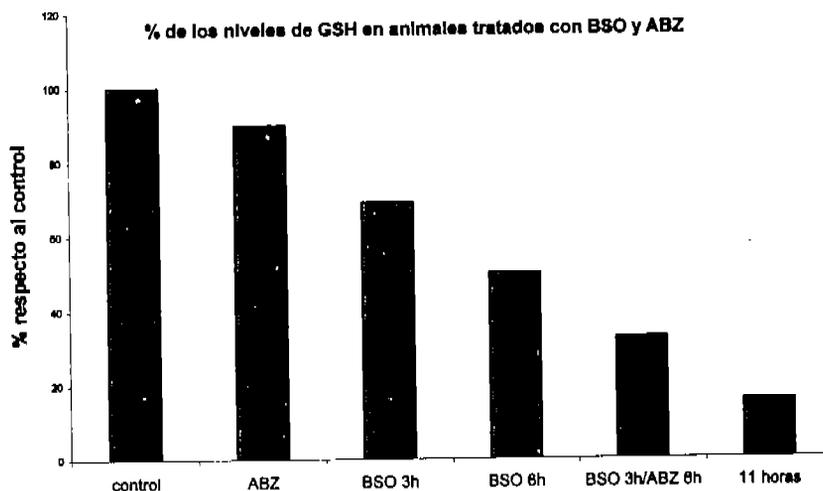
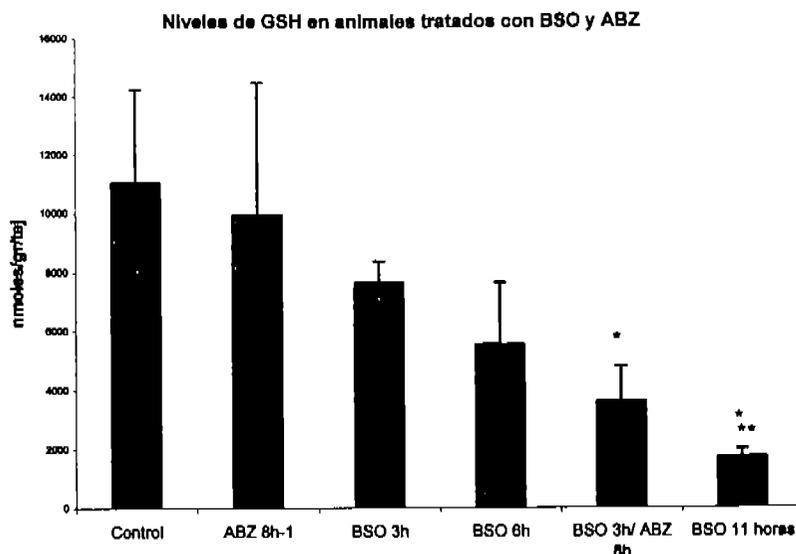


Fig.11



## 6.2 Actividad de Glutatión reductasa

Determinamos la actividad de la glutatión reductasa en el citosol de los homogenizados centrifugados a 105 000 x g. Para el primer grupo de datos se observó una disminución en la actividad de 81% en el grupo de ABZ, de 74% en el grupo de BSO y la mayor disminución se observó en el grupo BSO/ABZ con 65% de disminución respecto al control (Figura12). Se efectuó una ANOVA de una vía la cual arrojó una  $p=0.0253$ , y una post-prueba de Dunnet mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo BSO/ABZ ( $p<0.05$ ), la prueba de comparación entre grupos nos mostró diferencias entre ABZ y BSO/ABZ. (Figura 13)

Fig.12

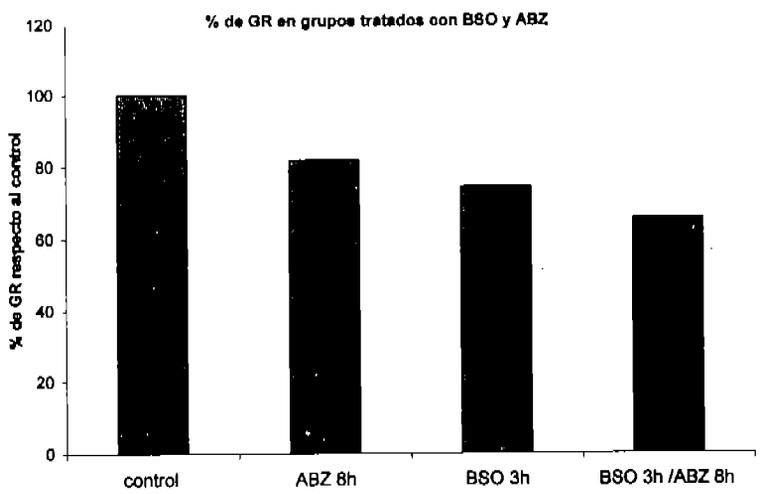
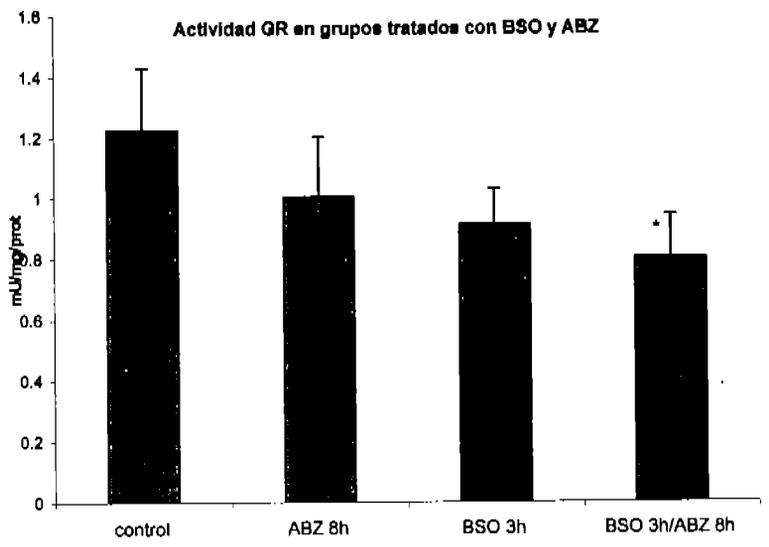


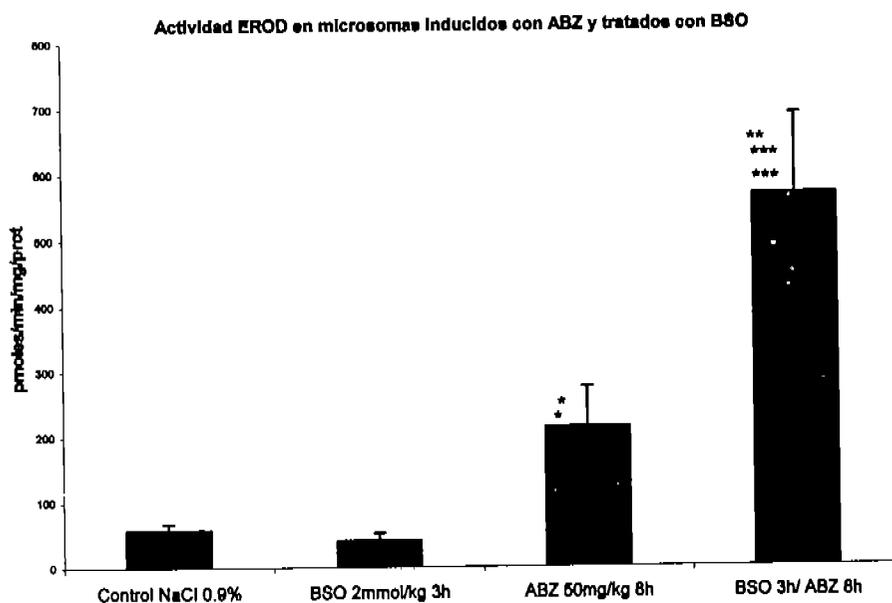
Fig.13



### 6.3 Actividad de Etoxí-Resorufina-O-Deetilasa (EROD)

Para evaluar la actividad del CYP1A1 en los diferentes grupos de tratamiento se utilizó el método EROD la cual es sustrato de este CYP, los resultados del grupo ABZ, BSO/ABZ se muestran en la Figura 14. Existe una marcada diferencia entre la actividad de la enzima hepática cuando los microsomas se obtuvieron de los animales tratados con ABZ solo y cuando fueron extraídos de los que recibieron BSO/ABZ.

Fig.14



Una ANOVA de una vía mostró una  $p < 0.0001$ , y una prueba de Dunnet determinó diferencias significativas entre el grupo control y ABZ ( $P < 0.05^*$ ) control y BSO/ABZ ( $p < 0.01^{**}$ ), una prueba de Tukey mostró diferencias entre los grupos BSO y ABZ ( $p < 0.05^*$ ), BSO y BSO/ABZ ( $p < 0.001^{***}$ ), ABZ y BSO/ABZ ( $p < 0.001^{***}$ ).

#### 6.4 Medición de actividad MROD (1A2), PROD (2B1) Y BROD (2B2).

Determinamos las actividades AROD para los CYPs 1A2, 2B1 y 2B2 y se calculó el incremento de las diferentes actividades de cada grupo con respecto al control. En el caso de MROD se observó un incremento 4.2 y 2.9 veces para ABZ y BSO/ABZ respectivamente. Para la actividad PROD y BROD el incremento respecto al control oscilo entre 0.8 y 1.1 veces en el caso de ABZ, para el grupo BSO/ABZ el incremento fue de 1.1 a 1.4 veces en las respectivas pruebas fue menor teniendo un valor. Comparativamente la actividad EROD mostró el mayor incremento en las ratas tratadas con ABZ y con BSO/ABZ siendo estas de 3.7 y 10 veces respectivamente. (Tabla.1)

Tabla.1. Actividad Enzimáticas MROD, PROD y BROD (Valores promedio  $\pm$  D.E), (pmoles/min/mg/prot).

Actividad	control	BSO/control	ABZ/control	BSO/ABZ/control
MROD (1A2)	12.30 $\pm$ 3.2	12.72 $\pm$ 1.5 (1.0)	52.35 $\pm$ 22.3 (4.2)	36.70 $\pm$ 10.6 (2.9)
PROD (2B1)	8.41 $\pm$ 2.0	8.63 $\pm$ 1.6 (1.0)	9.46 $\pm$ 0.8 (1.1)	11.60 $\pm$ 2.2 (1.4)
BROD (2B2)	32.18 $\pm$ 3.4	30.89 $\pm$ 4.5 (1.0)	26.83 $\pm$ 6.6 (0.8)	31.44 $\pm$ 12.1 (1.0)

Entre paréntesis y negritas se presenta el incremento de actividad respecto al control

### 6.5 Inmunorrélicas

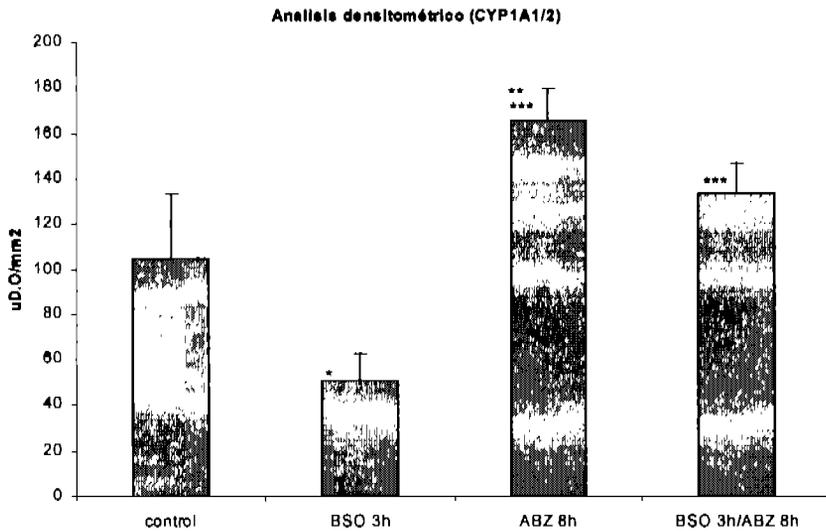
#### 6.5.1 CYP1A1/2

Para correlacionar la actividad del CYP1A1 con la expresión de la proteína, hicimos inmunorrélicas del grupo tratado con ABZ y BSO/ABZ. Cada banda corresponde a un animal tratado por grupo. El análisis densitométrico corresponde al promedio de cuatro animales por grupo. ( Figuras 15, 16 y 17)

Figura15  
 1 2 3 4 1 2 3  
 control BSO

Figura16  
 1 2 3 4 1 2 3 4  
 ABZ BSO/ABZ

Fig.17



Una ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.0001$ ) y un análisis *post hoc* de Dunnet mostró diferencias entre el grupo control y BSO ( $p < 0.05$ ) y control y ABZ ( $p < 0.01^{**}$ ) una prueba de Tukey mostró significativas entre los grupos BSO y ABZ ( $p < 0.001^{***}$ ), y entre BSO y BSO/ABZ ( $p < 0.001^{***}$ ), no hubo diferencias entre los grupos ABZ y BSO/ABZ

### 6.5.2 CYP2B1

Dado que la actividad medida en el ensayo PROD (Figura18), podría traslaparse parcialmente con la actividad medida a través de EROD, decidimos realizar inmunorreplicas para ver la expresión proteínica de la isoforma 2B1.(Figuras 19 y 20).

El análisis densitométrico muestra que la expresión de la proteína no se ve reflejada en el aumento de actividad del CYP2B1 en el tratamiento de BSO/ABZ de manera similar a lo observado con la expresión del CYP1A1. Una ANOVA mostró diferencias significativas ( $p = 0.0077$ ) entre los grupos control y BSO ( $p < 0.05$ ) y entre BSO y ABZ ( $p < 0.05$ ), no hubo diferencias entre el grupo ABZ y BSO/ABZ (Figura21).

Fig.18

Fig. 19

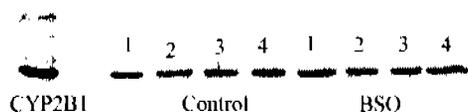


Fig.20

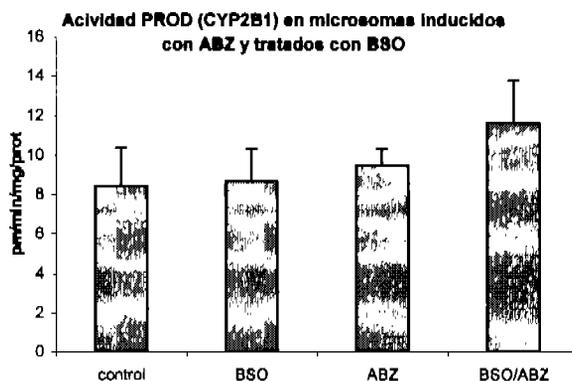
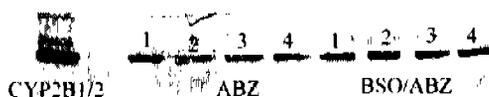
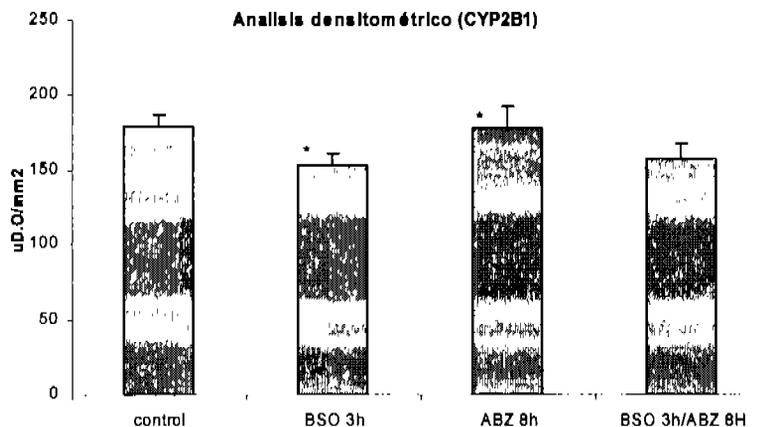


Fig.21



## 6.6 Efecto del BSO sobre la Inducción de CYP1A1 por un sustrato clásico.

El B[a]P por sí solo reduce los niveles de GSH hasta en un 43% y un 36% al administrar conjuntamente BSO (Figura 22). Una ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ( $p < 0.0062$ ) y una post-prueba de Dunnet mostró diferencias entre el grupo control vs BSO 6h ( $p < 0.05^*$ ), control vs BSO/B[a]P ( $p < 0.01^{**}$ ) y entre los grupos BSO3h vs BSO/B[a]P ( $p < 0.05^*$ ) (Figura 23)

Fig.22 % de los niveles de GSH en grupos tratados con BSO, B[a]P y BSO/B[a]P

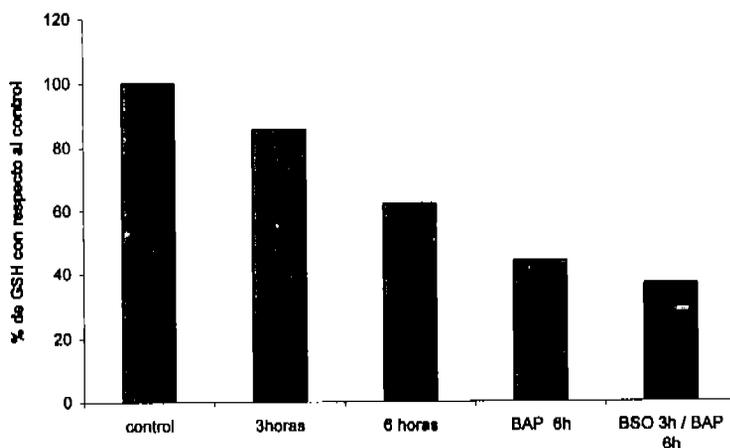
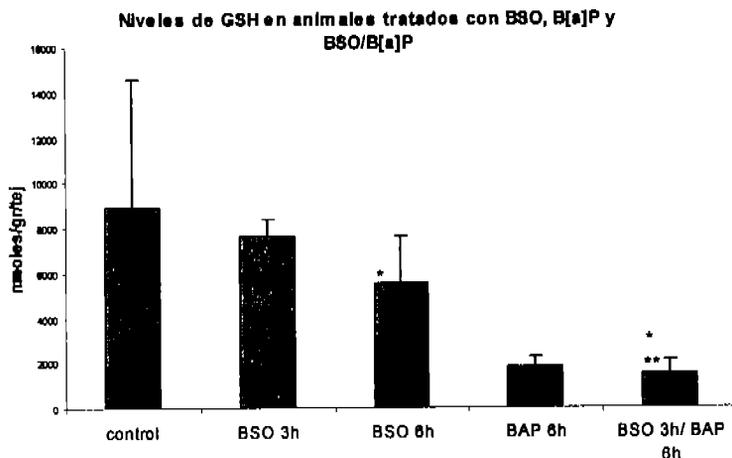


Fig.23



### 6.7 Actividad de GR en citosol de animales tratados con B[a]P y BSO

Por otra parte la actividad de la glutatión reductasa también se afectó por el tratamiento con B[a]P observándose un decremento del 69% y de 81% cuando los animales recibieron solo BSO. Por el contrario el tratamiento BSO/B[a]P indujo un incremento de 145% en la actividad de GR (Figura24). Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ( $p=0.0015$ ) y un análisis *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas entre los grupos control vs B[a]P/BSO ( $p<0.05^*$ ), BSO vs B[a]P/BSO ( $p<0.01^{**}$ ) y B[a]P vs BSO/B[a]P ( $p<0.01^{**}$ ) (Figura25)

Fig.24

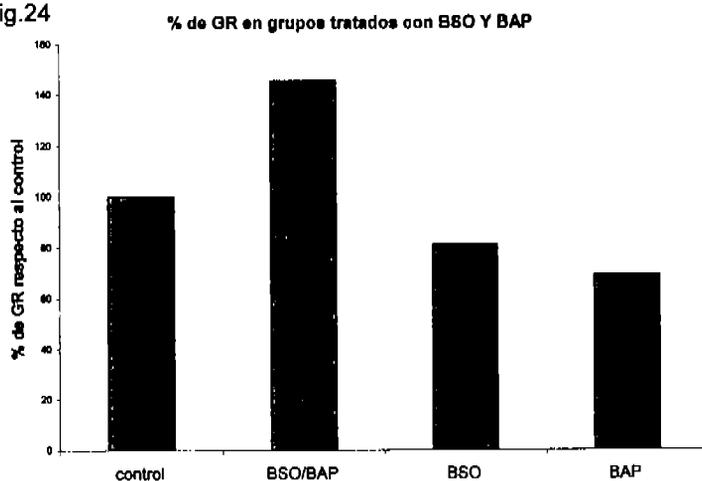
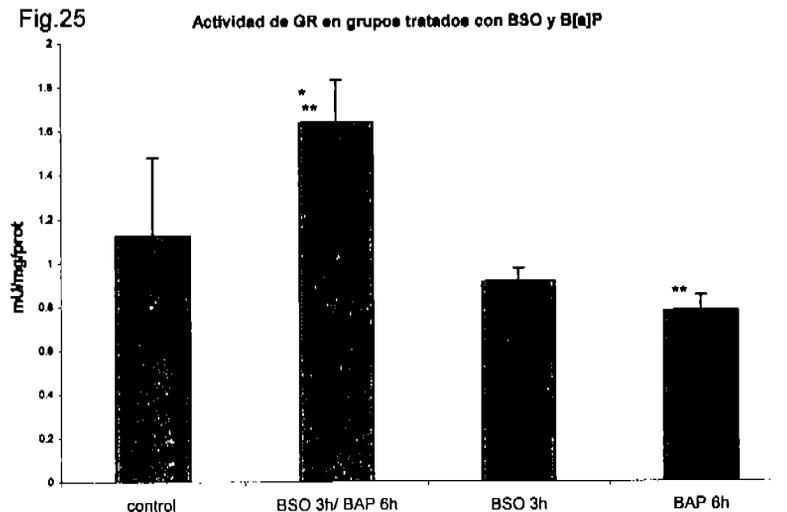


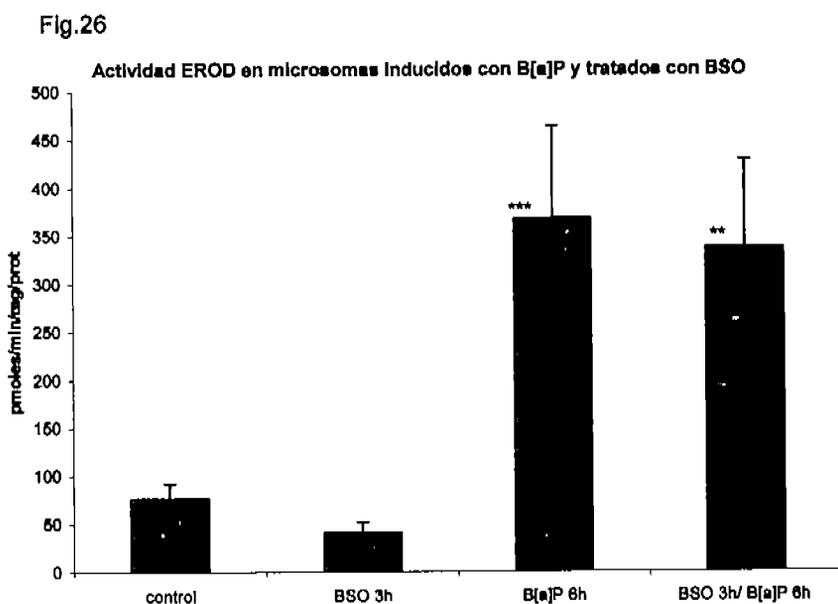
Fig.25



### 6.8 Actividad EROD en microsomas Inducidos con B[a]P

En este no se observó un incremento de actividad similar a la observada cuando el citocromo se indujo con albendazol con tratamiento previo de BSO.

Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) y un análisis *post hoc*, mostró diferencias significativas entre el grupo control vs B[a]P ( $p < 0.001^{***}$ ) y control vs BSO/B[a]P ( $p < 0.01^{**}$ ), no hubo diferencias entre el grupo de B[a]P y BSO/B[a]P. (Figura 26)



### 6.9 Inmunorrélicas del CYP1A1 Inducido por B[a]P

Observamos la inducción proteica del CYP1A1 inducido por B[a]P previo tratamiento con BSO (Figuras 27 y 28).

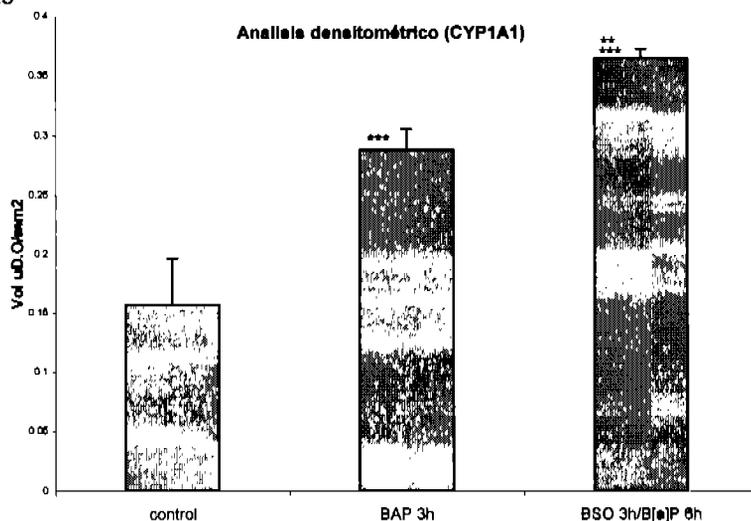
Fig.27

R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Control				Benzo[ <i>a</i> ]pireno 50 mg/kg			

Fig.28

R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
control				BAP 50mg/kg y BSO 2mmol/kg			

Fig.29



De manera similar a la actividad EROD el análisis densitométrico (Figura 31) de las membranas mostró diferencias significativas con un valor de  $p = <0.0001$  y una post-prueba de Tukey mostró diferencias entre el control vs BAP ( $p < 0.001^{***}$ ) y control vs BSO/B[a]P ( $p < 0.001^{***}$ ) así mismo hubo diferencias entre el grupo de B[a]P vs BSO/B[a]P ( $p < 0.01^{**}$ )

## 7. Discusión

El GSH tiene una amplia participación en el metabolismo de xenobióticos, específicamente en aquellos que son bioactivados por las enzimas de fase I como los citocromos. La conjugación con GSH permite su eliminación y disminuyen su reactividad con moléculas endógenas. Existen condiciones patológicas asociadas con un incremento en el estrés oxidativo en donde se ha demostrado que los niveles de GSH se hallan afectados. Los pacientes con VIH, con diabetes tipo II o con desnutrición muestran niveles disminuidos de GSH en sus células sanguíneas (Sen, 1997). Pacientes con neurocisticercosis muestran evidencias de un incremento de estrés oxidativo en el líquido cefalorraquídeo (Herrera y cols., 2003) así como en modelos de roedores se ha demostrado un incremento del estrés oxidativo con alteraciones en los niveles de GSH, debido a infecciones parasitarias (Sanchez-Campos y cols, 1999).

La inhibición de la síntesis de GSH por BSO se ha asociado a una menor inducción del citocromo 1A1 por sustratos clásicos como el benzo[a]pireno (Otto y cols, 1999).

El albendazol es un antihelmíntico de amplio uso en nuestro país cuya bioactivación ocurre a través de los citocromos hepáticos (Astelza y cols, 2000). El albendazol es además un fármaco que resulta ser un sustrato no clásico del CYP1A1, por lo que la inhibición de la inducción del citocromo por niveles disminuidos de GSH, como los que se presentaría en condiciones patológicas podría modificar su farmacocinética. Para investigar esta posibilidad utilizamos un modelo en rata en donde manipulamos los niveles de GSH con BSO.

Encontramos que una sola dosis de 2mmol/kg de BSO disminuye los niveles de GSH sin afectar de modo visible a los animales, los que recibieron posteriormente una dosis de ABZ para poder observar el efecto de los niveles de GSH sobre la inducción del CYP1A1 por ABZ

Encontramos de manera opuesta a lo reportado por Otto y cols (1999) un marcado incremento de la actividad EROD. Este hallazgo es interesante ya que otros autores como Drew y Miners (1984) mencionan que el BSO no tiene efecto ni *in vivo* ni *in vitro* sobre los niveles hepáticos microsomales de citocromos P450.

Este incremento de la actividad EROD cuando es inducido por BSO/ABZ, puede deberse a que el ABZ induce otros citocromos como el CYP2A6, CYP2E1 (Souhali-EI Amri, y cols ,1998a), CYP2B1 Y CYP2B2 (Asteinza y cols, 2000) y en menor medida el CYP3A4 (Souhali-EI Amri, y cols ,1998a y Asteinza y cols 2000). Por ello, y porque no observamos un incremento en la cantidad de enzima en los Inmunoréplicas (Figura17 ) es que creemos que se pueda estar sobreestimando la actividad EROD en los microsomas de ratas tratados con BSO/ABZ, ya que tal vez la actividad del CYP1A1 determinada a través de EROD pueda detectar la actividad de otros citocromos (Burke y cols., 1994). Se ha considerado que la actividad AROD para un determinado citocromo no es completamente selectivo del CYP que se está midiendo. En este contexto Burke y cols. (1994) reportan actividades EROD para los citocromos CYP1A2, CYP2A1 Y CYP2C6 aunque en menor proporción que para el CYP1A1.

Para investigar esta posibilidad, determinamos las actividades de los citocromos CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2. Se observó un incremento en la actividad del CYP1A2 a las ocho horas de inducción por ABZ (4.2 veces) similar a lo reportado por Asteinza y cols, 2000 a las 24 horas (6.0 veces). Sin embargo en el grupo BSO/ABZ solo se observó un incremento de 2.9 veces de esta actividad a diferencia del incremento observado para el CYP1A1 en este mismo grupo (10 veces), esto sugiere que las dos isoformas de la familia CYP1A son inducidas al menos por ABZ.

Por otra parte, la actividad del CYP2B1 y CYP2B2 no mostraron variación alguna de la actividad en los diferentes grupos de tratamientos, ya que el incremento en los tratamientos con ABZ y BSO/ABZ fue de 1.0 a 1.4 veces (PROD) Y de 0.8 y 1.0 veces (BROD) lo cual indica que no hubo inducción de estas isoformas de citocromos por los tratamientos ABZ y BSO/ABZ. Sin embargo, no podemos descartar la inducción de este CYP por ABZ ya que Asteinza y cols (2000) observaron un incremento de 4.1 veces

(PROD) y 14 veces (BROD) pero en un tiempo posterior, a las veinticuatro horas del tratamiento de inducción. No sabemos si en el caso del BSO/ABZ se pudiera observar un incremento mayor en un tiempo posterior al analizado por nosotros.

El incremento de la actividad EROD no fue seguido, como se comentó antes, por un aumento en la proteína detectada por inmunorreplicas, es decir al inducir el CYP1A1 con ABZ en presencia de BSO no observamos aumento en la expresión de proteína en el periodo de tiempo de este tratamiento de manera opuesta a lo reportado por Otto y cols., (1999) en su modelo de trucha arcoiris.

Otros resultados interesantes son los que demuestran que el benzo[a]pireno consume GSH, disminuyendo significativamente los niveles basales, probablemente porque sus metabolitos se conjugan con él y lo consumen como ha demostrado en un modelo *in vitro* Romero y cols., (1996). Estos hallazgos son interesantes ya que demostraría que los metabolitos carcinogénicos disminuyen los niveles hepáticos de GSH y sería relevante conocer si la disminución de GSH ocurre en tejidos blanco de este compuesto aromático como el tejido pulmonar. Otro hallazgo interesante de este experimento es la inducción de la actividad de la GR. Estos datos sugieren una modulación de enzimas de fase II por este carcinógeno ambiental.

Asimismo, el aumento en la actividad del CYP1A1 puede deberse a mecanismos en que los benzimidazoles activarían al *CYP1A1* de una forma alternativa a la ruta clásica que involucra la vía de señalización del receptor AhR, (Delescluse y cols., 2000). Hay evidencias de que tirocinas cinasas de la familia src están involucradas en la inducción del CYP1A1 por compuestos similares al ABZ como el OMZ (omeprazol) y TBZ (tiabendazol) ¿Podrá esta vía alterna propuesta para benzimidazoles interactuar con el GSH en la promoción y actividad del *CYP1A1*?

La evidencia obtenida de este estudio a través de la medición de la síntesis de proteína por inmunorreplicas y la capacidad de bioactivación del benzo[a]pireno (datos no mostrados), nos indica que la modulación del *CYP1A1* por los niveles de GSH reduce

ligeramente la expresión de la proteína cuando se induce por albendazol, a su vez la capacidad de bioactivación de la CYP1A1 también se ve disminuida, por lo que creemos que la inhibición de la síntesis de GSH a las dosis de BSO empleada afecta ligeramente la expresión y capacidad metabólica de este citocromo.

Por otra parte, la explicación dada para el incremento de la actividad de la CYP1A1 promovido por el BSO medido a través del método de EROD, es que está pudiera deberse a una sobre estimación del ensayo como lo han mencionado Chen y Bunce (2004) considerando que el uso de inmunorréplcas es un medio más sensible para medir la concentración de la proteína del CYP1A1 que la del ensayo EROD.

## 8. CONCLUSIONES

- La inhibición de la síntesis de GSH por la administración de BSO 2mmol/kg, parece modular la actividad pero no la cantidad de CYP1A1 inducido por ABZ.
- El ABZ no modifica los niveles de GSH hepático, lo cual indicaría que sus metabolitos no se conjugan con él, ni modula la actividad de la GR.
- El B[a]P disminuye los niveles de GSH hepático, lo cual indicaría que sus metabolitos se conjugan con él y modula la actividad de la enzima GR, lo cual confirmaría el hecho de que los metabolitos del benzo[a]pireno consumen y oxidan GSH.
- El BSO no inhibe ni la inducción del *CYP1A1* ni la actividad de la enzima causada por el B[a]P.
- La respuesta diferencial encontrada en el caso de estos dos inductores (clásico y no clásico), confirma la evidencia de que ocurre por vías diferentes.

## 9.0 REFERENCIAS

1. Adler, V., Z. Yin, et al. (1999). "Regulation of JNK signaling by GSTp." Embo J **18**(5): 1321-34.
2. Ankrah, N. A., A. Sittle, et al. (1995). "Enhanced depletion of glutathione and increased liver oxidative damage in aflatoxin-fed mice infected with *Plasmodium berghei*." Trans R Soc Trop Med Hyg **89**(1): 59-61.
3. Asteinza, J., R. Camacho-Carranza, et al. (2000). "Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat." Environmental Toxicology And Pharmacology **9**(1-2): 31-37.
4. Bailey, H. H. (1998). "L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues." Chem Biol Interact **111-112**: 239-54.
5. Baliharova, V., J. Velik, et al. (2003). "The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P450 activities in mouflon and rat." Res Vet Sci **75**(3): 231-9.
6. Bashir, A., R. N. Perham, et al. (1995). Altering kinetic mechanism and enzyme stability by mutagenesis of the dimer interface of glutathione reductase. Biochem J **312** (Pt 2): 527-33.
7. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
8. Brooks, R. A., N. J. Gooderham, et al. (1999). "The mutagenicity of benzo[a]pyrene in mouse small intestine." Carcinogenesis **20**(1): 109-14.
9. Burke, M. D. and R. T. Mayer (1975). "Inherent specificities of purified cytochromes P-450 and P-448 toward biphenyl hydroxylation and ethoxyresorufin deethylation." Drug Metab Dispos **3**(4): 245-53.
10. Burke, M. D., S. Thompson, et al. (1985). "Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450." Biochem Pharmacol **34**(18): 3337-45.
11. Burke, M. D., S. Thompson, et al. (1994). "Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver." Biochem Pharmacol **48**(5): 923-36.
12. Carlberg, I. and B. Mannervik (1985). "Glutathione reductase." Methods Enzymol **113**: 484-90.

13. Chapple, C. (1998). "Molecular-Genetic Analysis Of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **49**: 311-343.
14. Chen, G. and N. J. Bunce (2004). "Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway." Environ Toxicol **19**(5): 480-9.
15. Daujat, M., B. Peryt, et al. (1992). "Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor." Biochem Biophys Res Commun **188**(2): 820-5.
16. Delescluse, C., G. Lemaire, et al. (2000). "Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?" Toxicology **153**(1-3): 73-82.
17. Delescluse, C., N. Lédircac, et al. (2001). "Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thlabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells." Biochem Pharmacol **61**(4): 399-407.
18. DeLeve, L. D. and N. Kaplowitz (1990). "Importance and regulation of hepatic glutathione." Semin Liver Dis **10**(4): 251-66.
19. Drew, R. and J. O. Miners (1984). "The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation." Biochem Pharmacol **33**(19): 2989-94.
20. Estabrook, R. W. (1996). "The remarkable P450s: a historical overview of these versatile hemeprotein catalysts." Faseb J **10**(2): 202-4.
21. Fargetton, X., P. Galtier, et al. (1986). "Sulfoxidation of albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes." Vet Res Commun **10**(4): 317-24.
22. Goodman y Gillman. (1996) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* 9° ed, McGraw Hill Interamericana, México.
23. Griffith, O. W. (1982). "Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis." J Biol Chem **257**(22): 13704-12.
24. Griffith, O. W. and A. Melster (1979). "Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)." J Biol Chem **254**(16): 7558-60.
25. Halliwell, B., Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine*. 1999, 3°ed. Oxford University Press. New York.
26. Hayes, J. D. and L. I. McLellan (1999). "Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress." Free Radic Res **31**(4): 273-300.

27. Herrera, Luis Alonso (asesor), Rodríguez Ortiz, Ulises. Evaluación de la peroxidación lipídica en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis. Tesis Especialidad (Especialidad en Neurología Pediátrica)-UNAM, 2003 Facultad de Medicina
28. Kazlauskas, A., L. Poellinger, et al. (1999). "Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor." J Biol Chem 274(19): 13519-24.
29. Kehrér, J. P. and L. G. Lund (1994). "Cellular reducing equivalents and oxidative stress." Free Radic Biol Med 17(1): 65-75.
30. Kidd PM, Natural antioxidants first line of defense. In: Kidd PM, Huber W. Living with AIDS Virus: A strategy for Long-Term Survival, Albany, California: PMK Biomedical – Nutritional Consulting; 1991: 115-142
31. Kikuchi, H., A. Hossain, et al. (1998). "Induction of cytochrome P-450 1A1 by omeprazole in human HepG2 cells is protein tyrosine kinase-dependent and is not inhibited by alpha-naphthoflavone." Arch Biochem Biophys 358(2): 351-8.
32. Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1978). "The glutathione status of cells." Int Rev Cytol 54: 109-60.
33. Kramer, R. A., K. Greene, et al. (1987). "Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine." Cancer Res 47(6): 1593-7.
34. Kretschmar, M. (1996). "Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity." Exp Toxicol Pathol 48(5): 439-46.
35. Kumar, M. B. and G. H. Perdew (1999). "Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential." Gene Expr 8(5-6): 273-86.
36. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(259): 680-5.
37. Lewin S. Vitamin C: Its Molecular Biology and Medical Potential, New York Academic Press, 1976 : 42-59.
38. Lewis, D. F. (1997). "Quantitative structure-activity relationships in substrates, inducers, and inhibitors of cytochrome P4501 (CYP1)." Drug Metab Rev 29(3): 589-650.
39. Lomaestro, B. M. and M. Malone (1995). "Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues." Ann Pharmacother 29(12): 1263-73.
40. Meister, A. (1973). "On the enzymology of amino acid transport." Science 180(81): 33-9.

41. Meister, A. and M. E. Anderson (1983). "Glutathione." Annu Rev Biochem **52**: 711-60.
42. Meister, A. and M. W. Bukenberger (1962). "Enzymatic conversion of D-glutamic acid to D-pyrrolidone carboxylic acid by mammalian tissues." Nature **194**: 557-9.
43. Meyer, B. K. and G. H. Perdew (1999). "Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization." Biochemistry **38**(28): 8907-17.
44. Meyer, U. A. (1996). "Overview of enzymes of drug metabolism." J Pharmacokinet Biopharm **24**(5): 449-59.
45. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." Biochim Biophys Acta **1619**(3): 263-8.
46. Morel, Y. and R. Barouki (1998). "Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1." J Biol Chem **273**(41): 26969-76.
47. Moroni, P., T. Buronfosse, et al. (1995). "Chiral sulfoxidation of albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes." Drug Metab Dispos **23**(2): 160-5.
48. Mortelmans, K. and E. Zeiger (2000). "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay." Mutat Res **455**(1-2): 29-60.
49. Nebert, D. W., A. L. Roe, et al. (2000). "Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis." Biochem Pharmacol **59**(1): 65-85.
50. Nerurkar, P. V., S. S. Park, et al. (1993). "Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse." Biochem Pharmacol **46**(5): 933-43.
51. Omura, T. and R. Sato (1964). "The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. I. Evidence For Its Hemoprotein Nature." J Biol Chem **239**: 2370-8.
52. Otto, D. M., C. K. Sen, et al. (1997). "Regulation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl induced cytochrome P450 metabolism by thiols in tissues of rainbow trout." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **117**(3): 299-309.
53. Otto, D. M., C. K. Sen, et al. (1999). "Regulation of cytochrome P4501A metabolism by glutathione." Pharmacol Toxicol **84**(5): 201-10.
54. Park, J. Y., M. K. Shigenaga, et al. (1996). "Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2322-7.

55. Pastore, A., G. Federici, et al. (2003). "Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification." Clin Chim Acta **333**(1): 19-39.
56. Perelman, F.C (2000) Tesis de Licenciatura, Fac. de Quimica UNAM
57. Puntarulo, S. and A. I. Cederbaum (1998). "Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes." Free Radic Biol Med **24**(7-8): 1324-30.
58. Rawden, H. C., G. O. Kokwaro, et al. (2000). "Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes." Br J Clin Pharmacol **49**(4): 313-22.
59. Rodrigues, A. D. and R. A. Prough (1991). "Induction of cytochromes P450IA1 and P450IA2 and measurement of catalytic activities." Methods Enzymol **206**: 423-31.
60. Rolln, S., H. Souhail-el Amri, et al. (1989). "Study of the In vitro bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines." Cell Biol Toxicol **5**(1): 1-14.
61. Romero D, Mounho B, Lauer F, Born J, Burchiel S. (1997). "Depletion of Glutathione by Benzo(a)pyrene Metabolites, Ionomycin, Thapsigargin, and Phorbol Myristate in Human
62. Romero, D. L., B. J. Mounho, et al. (1997). "Depletion of glutathione by benzo(a)pyrene metabolites, ionomycin, thapsigargin, and phorbol myristate in human peripheral blood mononuclear cells." Toxicol Appl Pharmacol **144**(1): 62-9.
63. Safe, S. H. (1998). "Interactions between hormones and chemicals in breast cancer." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 121-58.
64. Sanchez-Campos, S., M. J. Tunon, et al. (1999). "Oxidative stress and changes in liver antioxidant enzymes induced by experimental dicroceliosis in hamsters." Parasitol Res **85**(6): 468-74.
65. Sen, CK. (1999). "Nutritional Biochemistry of cellular glutathione". Nutr Biochem **8**: 660-672
66. Senft, A. P., T. P. Dalton, et al. (2000). "Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde." Anal Biochem **280**(1): 80-6.
67. Souhail-el Amri, H., X. Fargetton, et al. (1988). "Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics." Toxicol Appl Pharmacol **92**(1): 141-9.
68. Spatzenegger, M. and W. Jaeger (1995). Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. Drug Metab Rev. **27**: 397-417.
69. Velik, J., V. Baliharova, et al. (2004). "Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes." Res Vet Sci **76**(2): 95-108.

70. Wang, W. and N. Ballatori (1998). "Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions." Pharmacol Rev 50(3): 335-56.
71. Whitlock, J. P., Jr. (1999). "Induction of cytochrome P4501A1." Annu Rev Pharmacol Toxicol 39: 103-25.
72. Wilson H, Cannan RK. (1937) The glutamic acid- pyrrolidonecarboxylic acid system. J Biol Chem;119:309-405.
73. Xia, C., J. Hu, et al. (1996). "The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status." Biochem J 313 (Pt 1): 155-61.