



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACIÓN DEL CITOCROMO P-450 EN
TRACTO GASTROINTESTINAL DE RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
NANCY LETICIA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. ARACELI VENCES MEJÍA

2006



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



ACADEMIA NACIONAL
DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS

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

NOMBRE: Nancy Leticia Hernández Martínez

FECHA: 18 de Enero, 2006

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Jefe de la División de Estudios Profesionales de la

Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **Modulación del Citocromo P-450 en Tracto Gastrointestinal de Rata.**

realizado por **Nancy Leticia Hernández Martínez**

con número de cuenta **09636132-0**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **Biol. Araceli Vences Mejía**

Propietario **Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre**

Propietario **Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte**

Suplente **M. en C. Marco Antonio Martínez Avila**

Suplente **M. en C. Jorge Humberto Linón Pacheco**

Consejo Departamental de Biología

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

Esta tesis va con una muy especial dedicatoria a mi padre **Elías** y mi madre **María** por su paciencia y completo apoyo.

A mi hermana **Karla**, por estar conmigo incondicionalmente; a **Erika**, por conservar siempre mis confidencias y a los pequeños **Dulce** y **Erick** por secundar todas mis locuras.

A mis abuelas por su fortaleza; a mi tía **Rosa** por ser la mujer más chévere de mi familia; a mi primo **Pablo**, que siempre será nuestro hermano y a la pequeña **Andrea**, por iluminar mi vida cada vez que la veo.

A mi tío **Juan** y a **Karen** por ser parte importante de mi familia aunque se encuentren lejos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Maria** y **Elías** por darme todo su apoyo y libertad.

A mis hermanos **Karla**, **Erika**, **Dulce**, **Erick** y **Pablo** por demostrarme que somos un buen equipo.

A mi novio **Tonatiuh** por todos sus consejos y compartir su vida conmigo, y a **Julia** por enseñarme que no existen límites.

A toda la familia Álvarez del Castillo, **Carlos**, **Elba**, **Julia**, **Maria** y **Emilio** y especialmente a las **Tías**, por considerarme parte de su familia desde el primer momento.

A **Sergio** por estar en muchos momentos difíciles de mi vida y ayudarme a resolverlos, y por todos los conciertos a los que asistimos.

A mi asesora **Araceli Vences** por darme la oportunidad de trabajar en un proyecto tan ambicioso.

A todo el equipo de Toxicología Genética: **Víctor**, **Norma**, **Israel**, **Gaby**, **Alejandra**, **Josefina**, **Silvia**, **Rosario** y **Emilio**, por su paciencia, consejos, amistad y por su colaboración en esta tesis.

A mis sinodales, **Dr. Espinosa**, **Dra. Gonsebatt**, M. en C. **Marco Martínez** y Biol. **Jorge Limón**, por todo el apoyo y sugerencias para mejorar este documento.

Al personal del **Instituto Nacional de Pediatría** por darme las facilidades para concluir con este *proyecto*.

A **Karla**, a **Vero** y a **David Jehil** por todos los momentos que hemos compartido desde la secundaria.

A **Alma**, **Ana Luisa**, **Mauricio** y **Pamela** por ser amigos incondicionales en éxitos y fracasos.

A **Yurik** por escucharme y darme consejos en todo momento, por ser una persona incomparable.

A **Bety** y a **Wendy** por ser mis compañeras y amigas desde el principio de la carrera.

A **Edwin**, **Memo**, **Carlos**, **Nayelli**, **Liliana**, **C. Christopher**, **Elisa**, **Diana**, **David**, **Luz**, **Paulina**, **Eugenia**, **Gaby**, **Rocío**, **Sara** y **Lee** por apoyarme y participar en momentos importantes de mi vida, por probar cosas diferentes, por los viajes y poder compartirlo.

A **Sandra Denice** y **Tonatiuh V.** por ser unos excelentes amigos, por su apoyo y sus consejos.

A **Fabiola**, **Nancy**, **Alejandra**, **Martha**, **Miguel**, **Rafa**, **Joram**, **Shariff**, **Roberto**, **Olga** y **Cynthya** por festejar todos nuestros triunfos.

A **Lizabeth** (Licha), **Olga**, **Rafael**, **Luis**, **Mike**, **Chucho**, **Paola**, **Abraham**, **Jaime**, **Julio**, **Yoatzin** y **Carlos** por su disposición, por las risas, por los festejos y por las despedidas.

A **Dora**, **Sergio E.** y **César** por sus consejos y consideraciones que han tenido conmigo, y por todo lo que hemos festejado.

A **Leticia**, **Javier** y **Shahid** por compartir viajes y por todos los desayunos.

A **Gaby E.**, **Aline**, **Mariano** y **Raúl** y a el grupo de **Neuroquímica** por todas las charlas, la comida y los festejos, por los consejos y el apoyo que me han brindado.

	Pag.
ÍNDICE GENERAL	
Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	ii
Índice de Abreviaturas	iii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN.	
1. Biotransformación	2
2. Citocromo P-450	
2.1 Generalidades	4
2.2 Nomenclatura	4
2.3 Estructura	5
2.4 Función	7
2.5 Mecanismo de acción	8
2.6 Polimorfismo genético	9
3. Inhibición	10
4. Inducción	11
4.1 Regulación de la inducción	13
5. Familias del Citocromo P-450	15
5.1 Familia CYP1	15
Subfamilia CYP1A: CYP1A1 y CYP1A2	16
5.2 Familia CYP2	18
Subfamilia CYP2B: CYP2B1 y CYP2B2	18
Subfamilia CYP2E: CYP2E1	19
5.3 Familia CYP3	21
Subfamilia CYP3A: CYP3A2	21
6. Tracto Gastrointestinal	22
7. Citocromo P-450 en Tracto Gastrointestinal	24
7.1 Citocromo P-450 en Esófago	24
7.2 Citocromo P-450 en Estomago	25
7.3 Citocromo P-450 en Intestino Delgado	25
7.4 Citocromo P-450 en Intestino Grueso	26
8. Citocromo P-450 en Hígado	27
9. Agentes inductores	28

III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. OBJETIVO	32
V. HIPÓTESIS	33
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Tratamiento de Ratas	34
2. Preparación de Fracción Microsomal	34
3. Determinación de Proteínas	35
4. Electroforesis y análisis de inmunodetección	35
5. Actividad enzimática	37
5.1 Dealkilación de Alkoxiresorufina (AROD)	37
5.2 Hidroxilación de p-Nitrofenol (PNPH)	37
5.3 Demetilación de Eritromicina (END)	38
6. Análisis Estadístico	38
VII. RESULTADOS	
1. Citocromo P-450 en Hígado	39
2. Citocromo P-450 en Esófago	42
3. Citocromo P-450 en Estomago	45
4. Citocromo P-450 en Intestino Delgado	48
5. Citocromo P-450 en Intestino Grueso	51
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. REFERENCIAS	59

Índice de Figuras.

	Pag.
1. Estructura tridimensional del Citocromo P-450.	6
2. Mecanismo de oxidación.	8
3. Regulación de los receptores nucleares relacionados con CYP.	13
4. Mecanismo molecular regulado por el receptor Ah.	14
5. Capas que conforman al Tracto Gastrointestinal.	23
6. Algunos inductores importantes de enzimas CYP en hígado.	30
7. Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas hepáticos, y su representación gráfica.	40
8. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas hepáticos.	41
9. Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de esófago, y su representación gráfica.	43
10. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de esófago.	44
11. Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas gástricos, y su representación gráfica.	46
12. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas gástricos.	47
13. Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de duodeno, y su representación gráfica.	49
14. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de duodeno.	50
15. Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de colon, y su representación gráfica.	52
16. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de colon.	53

Índice de Tablas

1. Familias CYP en humanos y su principal función.	15
2. Características estructurales de los miembros de la subfamilia CYP1A	16
3. Distribución de la subfamilia CYP2B en tejidos de rata.	18
4. Características estructurales de la enzima CYP2E1 en diferentes especies.	20

Índice de Abreviaturas.

3-MC	3-metilcolantreno	MROD	O-desalquilación de metoxiresorufina
Aa	Aminoácido	NAPQI	N-acetil-p-benzoquinoneimina
ABZSO	Albendazol sulfóxido	Nf	β -Naftoflavona
ABZSO2	Albendazol sulfona	O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
ADN	Acido desoxirribonucleico	PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
AHR	Receptor anil hidrocarburo	Phe	Fenilalanina
Al	Albendazol	PM	Peso molecular
ARNT	Receptor Ah nuclear (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)	PNIPH	Hidroxilación de p-nitrofenol
B[a]P	Benzo- α -pireno	PPAR	Receptor de proliferación de peroxisomas
BROD	O-desalquilación de benzoxiresorufina	PROD	O-desalquilación de pentoxiresorufina
CAR	Receptor constitutivo a androstano	PXR	Receptor X al pregnano
Cl	Ciclohexanol	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
CYP	Citocromo P450	SDS	Dodecilsulfato de sodio
Cys	Cisteina	Ser	Serina
DMSO	Dimetilsulfóxido	SRF	Sitio de respuesta a fenobarbital
DTT	Ditiotritol	T	Tolueno
EDTA	Ácido etilendiaminotetraácetico	TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
END	N-demetilación de eritromicina	TGI	Tracto gastrointestinal
EROD	O-desalquilación de etoxiresorufina	Thr	Treonina
Fb	Fenobarbital	Trp	Triptofano
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogeno	Val	Valina
Hsp90	Proteína chaperona Hsp90	XRE	Elemento de respuesta al xenobiótico
I.p.	Intraperitoneal		
Lys	Lisina		
mRNA	Acido ribonucleico mensajero		

I. Resumen

El citocromo P-450 (CYP) representa una familia de enzimas microsomales que catalizan el metabolismo oxidativo de muchos compuestos. Sus sustratos son tanto compuestos endógenos como exógenos. El metabolismo de xenobióticos por el CYP puede resultar en la disminución de la toxicidad del compuesto original o en la activación de éste, generando metabolitos intermediarios más tóxicos y reactivos. Los principales CYPs que participan en el metabolismo de xenobióticos pertenecen a las familias 1, 2 y 3, y están localizadas principalmente en el hígado, aunque algunas formas específicas del CYP se expresan en tejidos extrahepáticos normales y en neoplasias. Las diferencias en la expresión de enzimas CYP en los diversos tejidos pueden afectar la biotransformación de agentes químicos potencialmente carcinógenos, que pueden finalmente influir en la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer. Por lo anterior, consideramos importante conocer la modulación de las principales familias del CYP involucrados en el metabolismo de xenobióticos del tracto gastrointestinal (TGI) ante el tratamiento con diferentes inductores de CYPs hepáticos. Para lo cual se administraron los diferentes tratamientos: fenobarbital / β - naftoflavona; ciclohexanol / albendazol y tolueno, por separado a ratas macho Wistar, al término fueron sacrificadas, extrayendo hígado, esófago, estómago, duodeno y colon. Se obtuvieron fracciones microsomales y se determinó la presencia de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 (Western Blot) y su respectiva actividad catalítica. En este trabajo se demostró que los órganos del TGI no solo son capaces de expresar las enzimas CYPs involucradas en el metabolismo de xenobióticos, sino también de inducir estas enzimas ante el tratamiento con poderosos inductores.

II. Introducción

1. Biotransformación

Todos los seres vivos, incluidos el hombre, estamos expuestos a diferentes sustancias químicas, productos de síntesis natural y fármacos, a todos ellos se les llama xenobióticos. Los xenobióticos, entran en contacto y atraviesan las superficies epiteliales del tracto gastrointestinal (TGI), del aparato respiratorio o de la piel, y cuando alcanzan el torrente sanguíneo se considera que el compuesto penetró el organismo. Desde el contacto con el epitelio, los xenobióticos empiezan a ser transformados por las distintas enzimas del organismo de las que pueden ser sustrato. Se sabe que el órgano que realiza la mayor transformación es el hígado, sin embargo, se ha observado que los tejidos que son portal de xenobióticos, como el aparato respiratorio y el TGI, contienen enzimas que participan en esta transformación.

Al conjunto de reacciones enzimáticas que convierten a los xenobióticos en especies químicas distintas y que pueden ser menos o más dañinas que el compuesto original, se le da el nombre de biotransformación. Este proceso de biotransformación que experimenta el xenobiótico, desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos blanco, consta de cuatro pasos: absorción, distribución, metabolismo y excreción (Peña, 2001).

La absorción de un xenobiótico se define como el proceso por medio del cual éste atraviesa membranas y capas celulares hasta llegar al torrente sanguíneo. La distribución del xenobiótico se refiere a la localización y concentración de éste en los diferentes tejidos, es decir, una vez que el xenobiótico ha llegado al torrente sanguíneo, se distribuye al órgano blanco, a uno o varios almacenes de depósito (sitios donde se puede acumular el compuesto) o a diversos órganos para su biotransformación; la distribución del xenobiótico es regulada por el flujo sanguíneo, la velocidad de difusión en las interfaces sangre-tejido, la permeabilidad de la membrana y de la afinidad del tejido por el compuesto. Finalmente, es durante la excreción donde disminuye la concentración del xenobiótico. Todas las secreciones corporales excretan compuestos químicos, aunque las tres principales vías son la orina, las heces y el aire exhalado (Peña, 2001).

Durante el metabolismo de los xenobióticos, se incrementa la polaridad de los mismos, para hacerlos menos difundibles a través de las membranas biológicas y más solubles en el

agua, facilitando así su excreción. Este proceso pretende reducir la cantidad de xenobiótico que llega al tejido blanco, así como, el tiempo de permanencia del xenobiótico dentro del organismo. Si son transformados en sustancias más dañinas, se dice que el compuesto sufrió una bioactivación.

La Biotransformación de xenobióticos se lleva a cabo en dos grandes fases. En la Fase I se incluyen reacciones de reducción, oxidación e hidrólisis, a través del sistema enzimático citocromo P-450, que tienen como función principal introducir en el sustrato un átomo de oxígeno proveniente del oxígeno molecular, para hacer compuestos más polares e hidrofílicos (Peña, 2001).

En la Fase II se llevan a cabo principalmente reacciones de conjugación, catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citosol, como son las sulfotransferasas, metiltransferasas o glutatión-S-transferasa. Las reacciones consisten en agregar un grupo polar de tamaño relativamente grande a los productos de las reacciones de la Fase I o a los xenobióticos originales que contienen los grupos funcionales apropiados para ser sustratos de las reacciones de conjugación. Los donadores de los grupos polares tienen que ser compuestos de alta energía, ya que las reacciones de conjugación no son termodinámicamente favorables. El resultado que se logra con estas reacciones es un gran incremento de la solubilidad del xenobiótico en agua, por lo que son fácilmente excretados. (Peña, 2001).

2. Citocromo P-450

2.1. Generalidades

Citocromo P-450 (CYP) es el principal sistema enzimático de fase I. Esta es una superfamilia génica que codifica enzimas metabolizadoras de compuestos endobióticos y xenobióticos, las cuales tienen un amplio intervalo de especificidad de sustratos.

Una característica importante de las enzimas CYP es que metabolizan numerosos agentes químicos endobióticos de diversas estructuras (esteroides, ácidos biliares, prostaglandinas, ácidos grasos) y xenobióticos, incluyendo fármacos, contaminantes ambientales, mutágenos y carcinógenos (González, 1990; Hukkanen, 2000; González-Jasso, 2003).

Las enzimas CYP fueron descritas por primera vez en 1958 por Martín Klingenberg, quien descubrió un pigmento microsomal en hígado de rata, el cual se reducía en presencia de monóxido de carbono, con un único pico de absorción a una longitud de onda de 450nm. Por lo que a estas enzimas se les denominó P (por pigmento) y 450 (por la absorción de longitud de onda). Después se nombraron Citocromo P-450, al ser caracterizadas como hemoproteínas P-450 por Omura y Sato (Estabrook, 1996, 1998; Hukkanen, 2000).

Este sistema CYP se encuentra en todos los eucariontes, siendo más estudiado en mamíferos por la importancia que tiene para el humano. Se encuentra representado principalmente en hígado, que es el órgano más involucrado en la desintoxicación de xenobióticos y en el metabolismo de endobióticos, aunque también se ha encontrado una notable cantidad en intestino delgado, y en menor concentración en otros órganos extrahepáticos. En eucariontes las enzimas CYP se encuentran en el retículo endoplásmico y en la mitocondria de la célula. En organismos procariontes, se encuentran en citosol, por lo cual se les llama CYP solubles.

2.2. Nomenclatura

El sistema de nomenclatura actual para clasificar las enzimas CYP se realiza en relación con su evolución y se designa en árboles filogenéticos derivados de la secuencia de aminoácidos. Para obtener un mejor resultado, se acordó utilizar solo las partes del gen que codifican características tridimensionales importantes de la proteína. Estas secuencias de referencia son pocas en la región N - terminal, y más abundantes en la C - terminal. (Nelson, 1998)

Los genes del citocromo P-450 son nombrados con la raíz CYP. La familia es designada por un número, la subfamilia se representa por una letra y el número siguiente representa a la isoforma individual. Una familia exhibe hasta el 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos en comparación con genes de otra familia y las enzimas de la misma subfamilia concuerdan en más del 55%. La superfamilia CYP comprende alrededor de 20 familias génicas, de las cuales 10 están presentes en mamíferos. Las subfamilias representan uniones fuertes de agrupación de genes y no necesariamente su funcionalidad. El número en las familias por debajo de 100 están reservadas para eucariontes, y sobre 100 son designadas como enzimas de origen procarionte. (González, 1990; Josephy, 1997; Nelson, 1998)

Hasta el momento, se han determinado alrededor de 90 genes CYP, y de estos se han estimado 53 diferentes genes funcionales y 24 pseudogenes, para humanos. (Hukkanen, 2000; Ingelman-Sundberg, 2002)

En mamíferos, las familias del CYP 1-4, 7, 17, 19 y 21 se encuentran en retículo endoplásmico, y en mitocondria se encuentran las familias 11 y 27. Las enzimas de las familias CYP1, CYP2 y CYP3 son más activas en el metabolismo de xenobióticos, y las restantes tienen funciones importantes en el metabolismo de compuestos endógenos. (Hukkanen, 2000)

2.3. Estructura

La superfamilia enzimática CYP, consiste en una gran variedad de isoformas que tienen selectividad inter- e intrasustrato, y se caracterizan por ser hemoproteínas capaces de transportar electrones. Al ser hemoproteínas, poseen una parte proteica (apoproteína), la cual es responsable de su amplio intervalo de especificidad a el sustrato, y un grupo hemo (grupo prostético) donde se localiza un solo átomo de hierro, protoporfirina del grupo prostético IX (Figura.1). (Josephy, 1997; Lin, 1999)

La estructura primaria de las enzimas CYPs cuentan con alrededor de 400 a 550 aminoácidos, con los cuales se realizan alineamientos de regiones homólogas, y se obtienen cuatro regiones conservadas con importancia estructural o funcional. Las cuatro regiones son: la región N-terminal, dos regiones con aminoácidos característicos en la parte media y una en la región C-terminal.

En la región N-terminal, se encuentra una secuencia responsable de la inserción de la proteína en la membrana, por lo que con esta secuencia se puede diferenciar entre citocromos microsomales, mitocondriales y solubles. En la parte media se conserva la treonina de la posición 302 (Thr³⁰²), y se asume que entra en contacto directo con el oxígeno molecular. También se conservan los residuos 402 y 413, que se caracterizan por tener un aminoácido aromático, y terminar con fenilalanina (Phe) en las proteínas CYP microsomales y con triptófano (Trp) en los citocromos mitocondriales; el cambio en el aminoácido aromático se relaciona con la interacción de la proteína con su donador de electrones. Por último, en la región C-terminal se encuentran de cinco a diez posiciones comunes para todos los CYPs de vertebrados, la más importante es la cisteína de la posición 436 (Cys⁴³⁶), la cual se encuentra unida al grupo hemo (Ruckpaul, 1989).

Para obtener la estructura secundaria de estas enzimas se utilizan aproximaciones teóricas, como análisis estadísticos, estereoquímica, entre otros. Sin embargo, las distintas funciones son determinadas por la estructura en tercera dimensión. (Ruckpaul, 1989)

De las enzimas CYPs en bacterias las que están bien identificadas son: P-450_{cam} (CYP101), P-450_{temp} (CYP108) y el dominio que contiene el grupo hemo de P-450_{BM-3} (CYP102). Diversos experimentos físicos, químicos y bioquímicos, así como la comparación de secuencias de aminoácidos, hacen suponer que la estructura de los CYPs eucariontes (de membrana) es similar a estos CYPs procariontes.

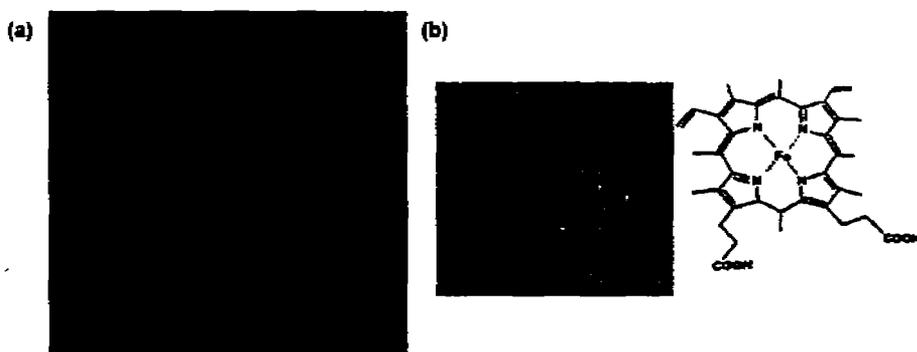


Figura.1. (a) Estructura tridimensional del Citocromo P-450, se visualiza la parte apoproteica y el grupo prostético, (b) con su átomo de hierro (Fe). (Williams, 2004)

2.4. Función

Como ya he mencionado, la principal función del citocromo P-450 es transformar compuestos xenobióticos lipofílicos a compuestos polares, reduciendo la velocidad de difusión en el organismo, y facilitando su excreción. La distribución celular definida de estas enzimas sugiere funciones endógenas específicas, donde actúan sobre el metabolismo de esteroides, ácidos grasos y sales biliares, entre otros. También, están involucrados en la síntesis de óxido nítrico gaseoso simple, usado, entre otras funciones, como toxina antipatógenos.

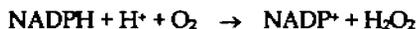
Las enzimas CYP, dependiendo del sustrato y las condiciones del medio, catalizan al menos tres diferentes actividades: actividad monooxigenasa, actividad oxidativa y actividad reductasa. (Vermeulen, 1996)

La actividad monooxigenasas de las hemoproteínas CYPs catalizan reacciones en donde un átomo de oxígeno molecular (di) oxígeno es insertado dentro del sustrato, y el otro es reducido a agua (Josephy, 1997), cuya reacción es:



Dentro de esta actividad se pueden llevar a cabo reacciones de hidroxilación; N-, O- y S-desalquilación; desaminación, desulfuración, deshalogenación oxidativa, así como la epoxidación, donde se añade un oxígeno a una unión π carbono-carbono (Vermeulen, 1996).

La segunda actividad del sistema CYP es el liberarse de especies de oxígeno reducido, la cual se conoce como actividad oxidativa, ésta involucra la transferencia de electrones de CYP reducido al oxígeno molecular con la formación de radicales superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta actividad se relaciona con la oxidación microsomal de catecol y la oxigenación microsomal de xenobióticos como la anilina y benceno (Vermeulen, 1996). La reacción global es:



La actividad reductasa generalmente se observa donde el suministro de oxígeno molecular es limitado o si un aceptor de electrones está disponible; esta actividad produce radicales libres intermediarios. Esta reacción se produce bajo condiciones subcelulares de baja tensión de oxígeno, en presencia de NADPH. Las reacciones de reducción más comunes

son la transformación de nitroderivados aromáticos a aminas, la azoreducción de aminas primarias y la deshalogenación reductiva (Vermeulen, 1996; Peña, 2001).

2.5. Mecanismo de acción.

La estructura de las enzimas CYP posee dos sitios para atrapar moléculas, uno de oxígeno (O_2) en el sitio hemo, y otro en el sustrato que se une justo sobre el grupo hemo. La conversión de una sustancia en una especie más polar es mediante la incorporación de oxígeno molecular (Hukkanen, 2000).

El ciclo de la reacción de oxidación del xenobiótico catalizada por Citocromo P-450, en términos generales es el siguiente (Fig.2):

1. Se inicia cuando el sustrato se une al citocromo férrico (Fe^{3+}).
2. Un electrón es transferido al átomo Fe^{3+} , pasando a su estado ferroso (Fe^{2+}).
3. La forma ferrosa se une a una molécula de O_2 .
4. Se vuelve a realizar una reducción agregándose un electrón y además un protón.
5. Se pierde una molécula de agua dejando un complejo $(FeO)^{3+}$.
6. El complejo $(FeO)^{3+}$ en forma directa oxida el sustrato.

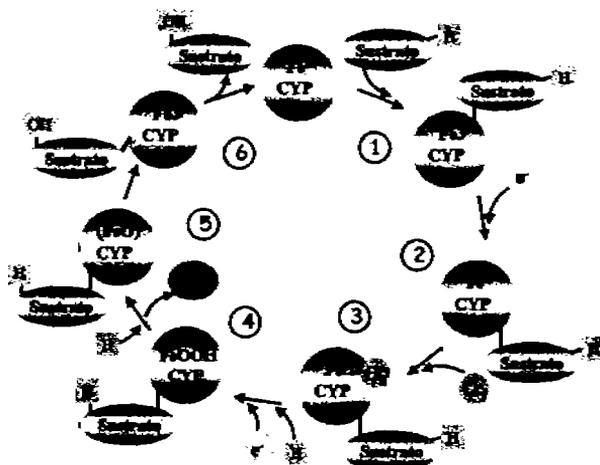


Figura.2. Mecanismo de oxidación. Los números corresponden a los pasos explicados en el texto. (Guengerich, 1993)

Las enzimas citocromo P-450 pueden tener ciclos de oxidación - reducción durante el metabolismo de endobióticos y xenobióticos, sin apreciable daño estructural. Sin embargo, la participación del CYP la termina un proceso que se clasifica como inactivación, el

mecanismo más común es la interacción reversible como resultado de la competencia por el sitio activo del CYP e involucra el primer paso del ciclo catalítico. Por otro lado, los agentes que actúan durante o después del paso de transferencia del oxígeno son interacciones generalmente irreversibles o quasi-irreversibles, estos pueden incluir la alquilación del grupo hemo y unión covalente a la apoproteína.

2.6. Polimorfismo Genético

La alteración en la expresión de una enzima ocurre como resultado tanto de polimorfismo genético como de la exposición a compuestos que inducen o reprimen las isoenzimas de manera individual (González, 1990).

El polimorfismo de las enzimas citocromo P-450 es un factor importante en las diferencias interindividuales del metabolismo de fármacos y la toxicidad por diferentes compuestos, a pesar de esto la influencia del polimorfismo de CYP y la susceptibilidad a cáncer es menos evidente. La mutación en el gen para una enzima específica puede dar como resultado una enzima con alta, baja o nula actividad enzimática, o la ausencia de la enzima. Un polimorfismo en humanos con implicaciones clínicas importantes que está relacionado con la oxidación de medicamentos es el encontrado para CYP2D6 y CYP2C19. Se sabe que el nivel de CYP2D6 es menor en la población caucásica (de 5 a 10% de la población), representando a metabolizadores lentos del medicamento debrisoquina (antihipertensivo) (Josephy, 1997; Lin, 1998; Ingelman-Sundberg, 2002).

Otra implicación del polimorfismo genético, es la susceptibilidad a carcinógenos químicos para definir el riesgo a padecer cáncer. Muchos factores como el sistema de reparación del DNA o mutaciones en la línea germinal de algunos supresores de genes, junto con la variabilidad genética en la activación metabólica de carcinógenos están asociados con diferentes predisposiciones a cáncer. Con esto, el riesgo relativo es estimado por fenotipos y genotipos, así como por el nivel de exposición a carcinógeno (Kawajiri, 1996).

3. Inhibición

Existen *inhibidores* específicos para las diferentes isoenzimas CYP, los cuales tienen importancia no solo como agentes terapéuticos, insecticidas o herbicidas, sino también como sondas para determinar estructuras, mecanismos y el papel biológico de estas enzimas.

El ciclo catalítico del citocromo P-450 incluye tres etapas en las cuales es particularmente vulnerable a la inhibición:

- La unión al sustrato.
- La unión subsecuente a oxígeno molecular para la primera transferencia de electrones.
- El paso catalítico en el cual el sustrato es oxidado.

Los inhibidores de CYP se pueden dividir en tres grupos principales: (a) agentes que se unen reversiblemente (interfieren en el ciclo catalítico antes del evento oxidativo), (b) agentes que forman complejos quasi-irreversibles con el átomo de hierro y (c) agentes que se unen de forma irreversible a las proteínas o al grupo hemo (Lin, 1998).

Los agentes que actúan durante o después del paso de transferencia de oxígeno, generalmente son inhibidores irreversible o quasi-irreversibles, y muchas veces, caen dentro de la categoría de inhibidores catálisis-dependientes.

La actividad de los agentes que inhiben al CYP está gobernada por su carácter hidrofóbico y por la fuerza de la unión entre su heteroátomo y el grupo prostético. Los agentes menos efectivos incluyendo alcoholes, éteres, cetonas, lactosas y otras estructuras en las cuales el átomo de coordinación es un oxígeno, se coordinan débilmente al grupo prostético hemo-hierro. En contraste, los inhibidores reversibles más efectivos interactúan fuertemente tanto con las proteínas como el grupo prostético, ya que poseen, en su mayoría compuestos nitrogenados aromáticos. Los derivados de piridina e imidazoles son los más utilizados (González, 1998).

La inhibición de enzimas CYP puede reducir la eficiencia de algunos medicamentos, esto ocurre cuando el medicamento requiere de activación metabólica, ya que después de una inhibición puede reducir su efecto o su activación es bloqueada. Un ejemplo es la codeína, la cual es metabolizada a morfina por CYP2D6, la inhibición de este CYP por otro

medicamento tiene efectos significativos en la formación de morfina, alterando la eficiencia de la anestesia. (Lin, 1998)

4. Inducción

Existen enzimas que no están presentes o bien lo están en cantidades mínimas y que ante la presencia de una sustancia, que suele ser su sustrato, la célula aumenta considerablemente la cantidad de esta enzima, a la sustancia que incrementa la síntesis *de novo* se le llama inductor. A esta forma de regulación de la expresión de genes se llama inducción.

Desde el punto de vista biológico, la inducción de enzimas CYP es una respuesta adaptativa para proteger a las células de xenobióticos, por medio del incremento en la desintoxicación (Lin, 1998).

La inducción de las proteínas CYP es el aumento en la concentración de enzimas en uno o más tejidos, dando como resultado el incremento en su actividad metabólica, y disminuyendo la concentración del xenobiótico en plasma. La inducción es de gran importancia, principalmente clínica por las implicaciones farmacológicas que representa, como es el tiempo de metabolización de medicamentos, así como, en relación con xenobióticos que al ser metabolizados pueden llegar a ser pro-carcinógenos, carcinógenos o mutágenos.

Por esto, es importante reconocer el estado basal de la concentración de una proteína CYP, el valor de las síntesis y el valor de la degradación. Los niveles basales de enzimas están determinados por una variedad de factores, incluyendo género, edad, estado hormonal y nutricional, y la presencia o ausencia de enfermedad. Algún cambio en los valores basales, relativamente estables de un CYP, debido a la exposición a un inductor puede reflejar cambios en cualquiera de estos procesos, o en todos a la vez: niveles, síntesis y degradación (Josephy, 1997; Guengerich, 2002).

El aumento en la concentración puede tomar horas o días hasta llegar al máximo. Esta elevación depende de la continuidad de la exposición, de la presencia del agente inductor, es decir, si el agente inductor es retirado, la actividad enzimática regresa lentamente a su estado basal, debido a la degradación y producción normal de la proteína. La inducción de enzimas generalmente exhibe una típica relación dosis-respuesta (Josephy, 1997; Guengerich, 2002).

La inducción de las enzimas CYP está relacionada con propiedades físicas y estructurales de los compuestos a los que se encuentra expuesto, particularmente de lipofilicidad y persistencia. Estos inductores pueden presentar dos características importantes: (i) son sustratos de las enzimas que inducen, y (ii) esta inducción de enzimas, frecuentemente, aumentan la desintoxicación. Por lo tanto, las enzimas CYP inducidas son capaces de unirse y oxidar al agente causante de su aumento, en la mayoría de los casos (Josephy, 1997, González-Jasso, 2003).

Aunque la inducción de enzimas CYP puede ser ventajosa, en muchos casos puede tener una variedad de consecuencias farmacológicas nocivas, incluyendo alteraciones en la eficacia de medicamentos, interacción medicamento-medicamento, y en el incremento en la activación metabólica de procarcinógenos, o dar metabolitos altamente tóxicos diferentes del compuesto original. Además, si las enzimas CYP inducidas catalizan la activación metabólica de una toxina o carcinógeno, la exposición del organismo a este compuesto, seguido de una inducción, puede aumentar su toxicidad (Guengerich, 2002). Dependiendo del balance entre desintoxicación y activación, la inducción puede dar como resultado una respuesta benéfica o nociva.

El incremento de enzimas CYP puede estar dado como consecuencia de un incremento en la expresión del gen respectivo y/o de la baja degradación de proteína. (Baliharová, 2003)

El incremento en los niveles de enzima es regulado mediante diferentes mecanismos: incremento en la velocidad de transcripción del gen adecuado, estabilización del RNA mensajero (mRNA) derivado de la transcripción, o por la estabilización de la proteína (Josephy, 1997).

Aunque hay pocas excepciones, los inductores de enzimas CYP generalmente ocasionan síntesis de *pro*. El valor de esta síntesis es dependiente de la concentración mRNA, reflejando el valor de transcripción del gen específico para cada enzima. Sin embargo, aunque el aumento en la concentración del mensajero específico se relaciona con el aumento en la actividad transcripcional, el mRNA es degradado relativamente lento y, por lo tanto, es acumulado, los niveles se quedan elevados después de una recuperación de la actividad transcripcional a niveles basales. Por lo anterior, no podemos considerar que la concentración de CYP específico es el valor de la degradación de mRNA, y viceversa, el mRNA no es reflejo de la actividad enzimática del CYP inducido (Guengerich, 2002).

4.1. Regulación de la inducción

Las proteínas receptoras son responsables de la activación transcripcional de los genes correspondientes de enzimas CYP. Los receptores nucleares son factores dependientes del ligando y regulan la transcripción de genes de proteínas CYP y otros genes que generan respuestas celulares específicas a ligandos. En ausencia de un ligando, el receptor nuclear está asociado en un complejo receptor nuclear co-represor, dando como resultado la inhibición de la transcripción. Después de la exposición a un ligando, los receptores nucleares tienen cambio conformacional que libera el complejo co-represor y refuerza la activación (Fig.3). Estos receptores nucleares son factores de respuesta a elementos específicos en el ADN, como a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) (Josephy, 1997; Honkakoski, 2000; Xie, 2002).

El receptor mejor caracterizado es el receptor aril hidrocarburo (AhR), el cual es mediador de la inducción de los genes *CYP1A1*, *CYP1A2* y *CYP1B1*. El ligando más potente del AhR es TCDD (2, 3, 7, 8 - tetraclorodibenzo - p - dioxina), y pertenece a los PAHs (Josephy, 1997).

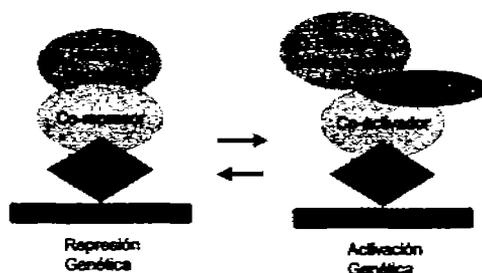


Fig.3. Regulación de los receptores nucleares relacionados con CYP (Honkakoski, 2000)

El proceso de inducción de la enzima *CYP1A1*, por la exposición a TCDD se muestra en la Figura.4. El AhR, en ausencia de TCDD, existe en el citosol en un complejo con la proteína chaperona Hsp90. La unión de un agente inductor (TCDD) al receptor, disocia este complejo (AhR - Hsp90), llevando a la translocación del AhR dentro del núcleo al formar un segundo heterodimero con el AhR nuclear transportado (ARNT). Este heterodimero (TCDD - AhR - ARNT) se une a un elemento de respuesta en el ADN (XRE), el cual presenta múltiples copias en la región 5' del gen *CYP1A1* y funciona como un activador y estimulador de la transcripción de este gen, aumentando el mRNA para esta proteína, así como la concentración de esta (Guengerich, 2002; Miao, 2004).

Los receptores nucleares llamados receptores "orphan", citados así porque aun no ha sido identificado su ligando específico, se relacionan estructuralmente con receptores nucleares hormonales, y en los últimos años, ha surgido evidencia que apunta a que su único papel es la regulación de enzimas CYP metabolizadoras de xenobióticos. Tres miembros de esta familia de receptores nucleares han sido descritos: el receptor constitutivo de androstano (CAR), el receptor X al pregnano (PXR) y el receptor de proliferación de peroxisomas (PPAR), los cuales juegan un papel crucial en la inducción de familias CYP2, CYP3 y CYP4 hepáticos, respectivamente, seguido de la exposición de inductores prototipo, como fenobarbital (Fb) (utiliza CAR), rifampicina y pregnenolona 16 α -carbonitrilo (PXR) (Guengerich, 2002; Xie, 2002).

El receptor CAR es constitutivo y sus ligandos endógenos incluyen androstanol y androstenol. Los ligandos endógenos que estimulan a PXR incluyen corticosterona y pregnenolona y para PPAR incluyen ácido linoleico y ácido araquidónico (Guengerich, 2002).

En humanos y en ratones, el receptor nuclear PXR (hPXR y mPXR, respectivamente) se encuentra altamente expresado en el hígado y en el intestino delgado, y comparten propiedades funcionales, en particular, para la regulación de CYP3A. Sin embargo estos dos ortólogos son farmacológicamente distintos. Por ejemplo, la rifampicina es un potente activador de hPXR, tanto *in Vivo* como *in Vitro*, pero presenta un efecto limitado en mPXR *in Vitro* y una pequeña inducción de CYP3A *in Vivo* (Xie, 2002).

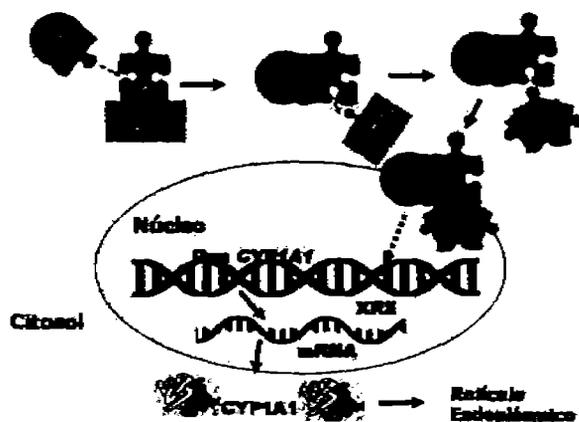


Figura.4. Mecanismo molecular regulado por el receptor Ah para la subfamilia CYP1A. (Guengerich, 1993)

5. Familias del Citocromo P-450

Hasta el momento, se han caracterizado 17 familias diferentes en humano. Las enzimas de las familias 1, 2 y 3 son las más activas en el metabolismo de xenobióticos, mientras que las otras tienen importantes funciones endógenas. En la Tabla.1, se muestran las familias CYP encontradas en humanos y su función principal (Hukkanen, 2000).

Familia	Función
CYP1	Metabolismo de Xenobióticos
CYP2	Metabolismo de Xenobióticos. Metabolismo de Ácido Araquidónico
CYP3	Metabolismo de Xenobióticos
CYP4	Hidroxilación de Ácidos Grasos
CYP5	Síntesis de Tromboxano
CYP7	7 α - Hidroxilación de Colesterol
CYP8	Síntesis de Prostaciclina Rompiamiento del sitio de unión al colesterol.
CYP11	Hidroxilación 7 β de esteroides Síntesis de aldosterona
CYP17	Hidroxilación 17 α de esteroide
CYP19	Aromatización de andrógeno
CYP21	21-Hidroxilación de esteroide
CYP24	24 -Hidroxilación esteroídica
CYP26	Hidroxilación del ácido retinoico
CYP27	27-Hidroxilación esteroídica
CYP39	Se desconoce
CYP46	24-Hidroxilación del Colesterol
CYP51	Biosíntesis de esterol

5.1. Familia CYP1

La familia CYP1 está compuesta de dos subfamilias, CYP1A y CYP1B, y está constituida por tres genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, y no existen pseudogenes. Los tres comparten la característica de ser activados por PAHs, y estar regulados por AhR, además de estar involucradas en el metabolismo de hidrocarburos policíclicos, aminas heterocíclicas y aminas aromáticas, generando metabolitos altamente reactivos capaces de unirse covalentemente con macromoléculas, involucrándose así en el desarrollo de carcinogénesis de tipo químico (Kawajari, 1996; Hukkanen, 2000; Santiago, 2002).

Subfamilia CYP1A: CYP1A1 y CYP1A2

La subfamilia CYP1A, se ha caracterizado por biotransformar sustratos con moléculas lipofílicas planas poliaromáticas y heteroaromáticas, como algunos compuestos naturales. Todos los genes caracterizados hasta hoy se componen de seis exones, incluyendo un primer exón no codificante. Los genes CYP1A1 y CYP1A2 parecen estar localizados en conjunto en el cromosoma 9 en ratón, en el cromosoma 8 en rata, en el cromosoma 4 de hámster y en el cromosoma 15 de humano. Las secuencias están codificadas completamente para CYP1A1 y CYP1A2 en humano, perro, conejo, ratón, rata y hámster. En la tabla.2 se enlistan las características estructurales de estos dos miembros en varias especies. (Kawajari, 1996)

Tabla.2. Características estructurales de los miembros de la subfamilia CYP1A. (Tomado de Kawajari, 1996)

Especie	CYP1A1			CYP1A2			% similitud entre CYP1A1/2
	Aas	PM	% similitud	Aas	PM	% similitud	
Humano	512	58 165	100	516	58 082	100	71.7
Mono	512	58 155	94.1				
Perro	524	59 209	81.2	502	56 632	81.3	73.6
Conejo	518	58 277	76.3	516	58 343	77.5	71.5
Rata	524	59 393	78.6	513	58 259	74.4	68.9
Ratón	524	59 230	79.4	513	58 183	72.1	70.9
Hámster	524	59 148	78.5	513	58 082	73.1	67.6
Cobayo	516	58 570	78.4				
Trucha	522	59 181	56.0				

Aas = Aminoácidos; PM = Peso Molecular; % similitud = Porcentaje de similitud entre la secuencia de aminoácidos de la especie particular en comparación con la de humano.

Tanto CYP1A1 como CYP1A2 poseen una alta similitud en su estructura primaria así como en sus propiedades fisicoquímicas, pero hay una clara diferencia en los sustratos específicos. Los ejemplos típicos de metabolismo de sustratos específicos para CYP1A1 y CYP1A2 son benzo[a]pireno (B[a]P) y acetanilida, respectivamente. En cuanto a la alineación de aminoácidos, la tercera parte central es mucho más variable en ambos CYP's que el resto de las regiones, y esto puede estar determinando la especificidad del sustrato de la subfamilia. Estos dos miembros de la subfamilia CYP1A son conservados estructuralmente en mamíferos.

La enzima CYP1A1 constituye el principal CYP extrahepático. En humanos, se ha encontrado una considerable cantidad de mRNA y proteína en pulmón, linfocitos y

placenta de fumadoras activas. Esta isoenzima contribuye a la toxicidad de muchos carcinógenos, especialmente por PAHs (Kawajari, 1996; Santiago, 2002).

Para el gen CYP1A1 se ha descrito un polimorfismo que se relaciona con el cáncer de pulmón. El polimorfismo da lugar a dos alelos. Uno más frecuente, denominado m1 con una lisina en la posición 462 (Lys⁴⁶²) de la proteína; y el mutante m2 con una Valina (Val⁴⁶²). La enzima CYP1A1 (Val) posee mayor actividad que la CYP1A1 (Lys), de forma que el alelo m2 está relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón (Santiago, 2002).

La inducción de mRNA para CYP1A1 y la formación de aductos en el ADN por B[a]P en tejido pulmonar de fumadores activos sugiere que los niveles de la expresión de CYP1A1, en pulmón son importante en la etiología del cáncer (Kawajiri, 1996).

Por otro lado, al ser utilizado β -naftoflavona (Nf) como inductor de CYP1A1 en cultivo de tejido de piel de ballena (*Physeter macrocephalus*), se ha demostrado aumento en sus niveles, por lo que sugieren utilizar la expresión de CYP1A1, en biopsias de piel, como biomarcador a la exposición de xenobióticos en cetáceos (Godard, 2004).

La enzima CYP1A2 se expresa primordialmente en hígado y constituye del 10 al 15% de la actividad total de CYP hepático. Esta enzima activa PAHs, nitrosaminas, aflatoxina B1 y especialmente arilaminas generando compuestos que se pueden unir a DNA provocando mutaciones. Su expresión es inducida por el humo de cigarro, la carne cocinada directamente al fuego, algunos vegetales, rifampicina y omeprazol. Los niveles de CYP1A2 hepático pueden ser importantes en la determinación de la susceptibilidad para desarrollar cáncer, inducido por arilaminas en humanos (Kawajari, 1996; Santiago, 2002).

Existen 6 variantes alélicas del gen CYP1A2, de las cuales dos de ellas están correlacionadas con los niveles de inducción por el hábito de fumar. Estas variantes podrían explicar, parcialmente, las diferencias interindividuales observadas en la actividad enzimática cuando se evalúa con cafeína como sonda. Existen algunos reportes en donde se han clasificado a los asiáticos como metabolizadores pobres y a los caucásicos como metabolizadores extensos, por la diferencia en el tiempo de metabolismo de algunos medicamentos. (Hukkanen, 2000; Galli, 2002; Santiago, 2002)

La proteína CYP1A2, al igual que CYP1A1, puede ser inducida por PAHs, pero el gen no está coordinado con el gen CYP1A1. Diversos estudios han mostrado que la inducción de mRNA de CYP1A2 por hidrocarburos no ocurre por mecanismos transcripcionales, y han

sugerido que la inducción de CYP1A2 es el resultado de una estabilización de mRNA (Smith, 1997).

Podemos ver la importancia de CYP1A en ratones knockout, los ratones knockout para CYP1A2 (-/-) presenta una vida fértil y viable, a diferencia de un ratón knockout para CYP1A1 (-/-) que son animales poco saludables e incluso llegan a morir en etapas tempranas de la embriogénesis (Dey, 1999).

5.2. Familia CYP2

La familia 2 del citocromo P-450 contiene a siete subfamilias: CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP2F y CYP2J. Originalmente se le conocía como "familia inducible por fenobarbital", sin embargo se ha comprobado que solo induce a las subfamilias 2B y 2C (Hukkanen, 2000; Santiago, 2002).

Subfamilia CYP2B: CYP2B1 y CYP2B2

La subfamilia CYP2B está constituida por dos miembros CYP2B1 y CYP2B2 en rata, el homólogo en humano de CYP2B1 es CYP2B6, el cual presenta 78% de similitud. Los genes CYP2B en humano están localizados en el cromosoma 19 en la región 19q13.1-q13.2, y están constituidos por 9 exones, 377 aminoácidos y 43148 Da. Las enzimas CYP2B1 y CYP2B2 tienen un 97% de homología entre ellas y a pesar de esto muestran propiedades electroforética y cromatográficas distintas. Ambas enzimas comparten sustratos, aunque su afinidad y actividad son diferentes (Asteinza, 1998).

Tabla.3. Distribución en los tejidos de la expresión de miembros de la subfamilia CYP2B en rata. (Nims, 1996)

Tejido	CYP2B1		CYP2B2	
	Constitutivo	Inducido	Constitutivo	Inducido
Hígado	+/-	+	+	+
Intestino delgado	+/-	+	-	-
Pulmón	+	+/-	+/-	+/-
Adrenal	+	+	+	+
Riñón	+/-	+/-	-	+/-
Testículo	+	-	-	-

+ Todos los estudios han encontrado la expresión de la isoforma.
 - Ningún estudio reporta la isoforma en el tejido.
 +/- Algunos estudios reportan la expresión y otros no.

El inductor prototipo de la subfamilia CYP2B es Fb. La inducción está mediada por el receptor nuclear CAR y probablemente por PXR. Algunos estudios dirigidos a la

inducción de CYP2B en ratas se han realizado con xenobióticos de diversas estructuras, que incluyen, pesticidas halogenados, medicamentos, hidrocarburos volátiles como las cetonas, xilenos y piridina, y varios bifenilos polihalogenados (Nims, 1996; Hukkanen, 2000).

La subfamilia CYP2B se encuentra expresada constitutivamente en pulmón, glándula adrenal, testículos y ciertas regiones del cerebro. La inducción de estas isoformas con Fb es reconocida en hígado, en algunas regiones del cerebro, cerebelo y en la glándula adrenal (Nims, 1996).

Subfamilia CYP2E: CYP2E1

La subfamilia CYP2E contiene un único miembro, la isoenzima CYP2E1. Ha recibido mucha atención, por su importancia en la activación de agentes químicos a productos citotóxicos o carcinogénicos y por su participación activa en el metabolismo de etanol, originando hepatotoxicidad. (Ronis, 1996; Galli, 2002)

El gen *CYP2E1*, contiene nueve exones, en el humano está localizado en el cromosoma 10, región 10q24.3-qter, midiendo 11413 pares de bases; en el ratón, está localizado en el cromosoma 7, y en rata, se localiza en el cromosoma 1. La Tabla.4 muestra algunas de las características importantes de esta enzima. (Ronis, 1996)

La enzima CYP2E1, biotransforma un amplio intervalo de agentes químicos, en particular compuestos hidrofóbicos y pequeños, oxida el etanol y otros alcoholes primarios. Además, tiene la capacidad de reducir dióxígeno a radicales oxi-reactivos, iniciando la peroxidación de membranas lipídicas, también se relaciona con la toxicidad por la producción de radicales libres y, por lo tanto, al estrés oxidativo. Su inducción contribuye a una tolerancia del alcohol y otros fármacos (Ronis, 1996; Santiago, 2002).

Se ha reportado que la isoenzima CYP2E1 se encuentra en altas concentraciones en retículo endoplásmico, y también está presente en membrana celular y vesículas lisosomales. La expresión de CYP2E1 constituye el 5% de la actividad total en el hígado, se ha registrado mayor expresión en la región perivenosa, y está presente en riñón. Existen bajos niveles de CYP2E1 expresados en mucosa nasal, pulmón, testículos y ovarios, intestino delgado, colon, células endoteliales de la vena umbilical y linfocitos, así como en cerebro, específicamente en hipocampo y corteza. El mRNA de CYP2E1 ha sido detectado en

sistema nervioso central de humano y de rata. La distribución celular definida implica importancia y funciones endógenas específicas (Ronis, 1996)

El tratamiento con etanol induce la expresión de esta enzima en linfocitos y en intestino grueso, principalmente en colon. La regulación nutricional no parece afectar la concentración de CYP2E1 en intestino grueso y en linfocitos, aunque hay una disminución de la expresión en intestino delgado. En pacientes con diabetes dependientes de insulina se aprecia un incremento en la expresión de CYP2E1 en linfocitos, también se ha demostrado la inducción de CYP2E1 en el pulmón con isoniazida, aunque esta expresión es afectada por la tensión con el oxígeno (Ronis, 1996).

El metabolismo del acetaminofen por el CYP2E1 produce un metabolito hepatotóxico: N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI) que en circunstancias normales el hígado lo desintoxica rápidamente por acción de la N-acetilcisteína estimulando la conjugación del metabolito con el glutatión. Pero en caso de sobredosis de acetaminofen o frente a la inducción del CYP2E1 provocada por etanol se puede producir hepatotoxicidad ya que aumenta la producción del intermediario tóxico disminuyendo la concentración del glutatión por el uso excesivo y por ende su acción desintoxicante. Por lo anterior, las personas con hábitos alcohólicos tienen un alto riesgo de predisposición a hepatotoxicidad aun consumiendo dosis terapéuticas de acetaminofen (Galli, 2002).

Tabla.4. Características estructurales de la enzima CYP2E1 en diferentes especies. (Adaptado de Ronis, 1996)

Especie	Aas	PM	% Similitud	No. Exones	Cromosoma
Rata	493	56916	75	9	1
Conejo	492	56634	78	9	
Humano	493	56820	100	9	10

Aas = Aminoácidos; PM = Peso Molecular; % similitud = Porcentaje de similitud entre la secuencia de aminoácidos de la especie particular en comparación con la de humano; No. Exones =Numero de exones.

Se han descrito varios polimorfismos genéticos que afectan al gen CYP2E1; el primero de ellos se localiza en la región anterior del extremo 5', dando lugar a dos alelos, uno frecuente que se le conoce como c1 y otro raro llamado c2. El alelo mutante c2 tiene una tasa transcripcional mayor que el alelo c1, lo que parece estar relacionado con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Sin embargo, parece que es el genotipo c1/c1 el factor que confiere la susceptibilidad para desarrollar cáncer pulmonar, con una aparente

asociación al hábito de fumar, y en el desarrollo de otros tipos de cáncer en el tracto aerodigestivo en alcohólicos crónicos (Santiago, 2002).

La regulación del CYP2E1 es altamente compleja, ocurre a nivel transcripcional y/o post-transcripcional. La máxima inducción de CYP2E1 es alcanzada en una forma coordinada por la combinación de diferentes mecanismos transcripcional, pre-transcripcional, de traducción y post-traducción. La exposición a xenobióticos, como la pirimidina, incrementa la eficiencia transcripcional, la acetona regula la inducción con un mecanismo de post-transcripción el cual es a través de la interacción con la serina de la posición 129 (Ser¹²⁹) dañando la fosforilación y degradación, por lo que se estabiliza la proteína; el benceno estabiliza la proteína CYP2E1, por la inhibición en la degradación de esta. Se ha demostrado que con otros sustratos como el etanol y la isoniazida, protegen contra la fosforilación y estabilizan la proteína CYP2E1, contra la degradación. (Ronis, 1996; González-Jasso, 2003)

5.3. Familia CYP3

La familia CYP3 posee solo una subfamilia: CYP3A, que a su vez comprende cuatro genes: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43 (este último identificado recientemente). Los genes CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7 codifican para enzimas que metabolizan prácticamente los mismos sustratos. La diferencia entre ellos se encuentra en el lugar de expresión. El CYP3A4 es el principal citocromo en hígado, CYP3A5 y CYP3A7 se expresan esencialmente en tejidos extrahepáticos y en hígado fetal, respectivamente. Por otro lado, CYP3A4 y CYP3A7 están regulados por un receptor orphan que es PXR y CYP3A5 por un receptor de glucocorticoides (Hukkanen, 2000; Santiago, 2002).

Subfamilia CYP3A: CYP3A2

Las enzimas CYP3A4 están involucradas en el metabolismo de más de la mitad de los medicamentos que se conocen hoy en día. Del 25 al 30% de las enzimas CYP en el hígado son CYP3A4 y más de la mitad de las enzimas CYP totales en mucosa intestinal. Su gen está localizado en el cromosoma 7 en humano. La enzima CYP3A4 tiene su homóloga en rata llamada CYP3A2 (Galli, 2002).

El gen CYP3A2, también llamado testosterona 6 beta-hidroxilasa, abarca alrededor de 25kb y contiene 13 exones, el cual es el mayor número reportado para genes CYP.

La enzima CYP3A2 cataliza el metabolismo oxidativo de gran variedad de sustancias con marcadas diferencias estructurales. Está implicada en el metabolismo de más de 60% de los fármacos en uso entre los que se incluyen agentes inmunosupresores (ciclosporina), antimicóticos (clotrimazol) y antibióticos macrolidos (eritromicina). Actúa en la hidroxilación de algunos esteroides como la testosterona, la progesterona y el cortisol. Los medicamentos antiepilépticos son generalmente inductores de esta enzima CYP y pueden reducir particularmente la eficacia de los anticonceptivos orales. Todo esto, pone de manifiesto una de las bases en la interacción entre fármacos en pacientes con terapias en las que se combinan varios medicamentos afectando su eficacia y toxicidad (Santiago, 2002).

La variabilidad en expresión de CYP3A se debe a múltiples factores entre los que se encuentra la inducción por medicamentos, compuestos ambientales, y los factores genéticos. En los últimos años, se han descrito varios polimorfismos genéticos que afectan a este gen, sin embargo, no hay reportes de la evidencia definitiva de que este polimorfismo genético tenga relación con su actividad catalítica (Guengerich, 1999; Santiago, 2002).

6. Tracto Gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) está constituido básicamente por cuatro órganos: esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e ileón) e intestino grueso (ciego, colon y recto); cada uno varía en el tipo celular, su flora bacteriana, y su función (almacenamiento, digestión, secreción, absorción, metabolismo, barrera activa y eliminación).

Los órganos del TGI son tubulares y están conformados por cuatro capas, como se muestra en la Figura 6, con las siguientes características (Lesson, 1988):

1. La mucosa, contiene un epitelio plano poliestratificado no queratinizado, que descansa sobre una capa de tejido conectivo subyacente, lamina propia. La mucosa consta de células superficiales que producen moco, células parietales (producen ácido clorhídrico manteniendo el pH gástrico), células cimógenas o principales (liberan enzimas hacia el lumen gástrico), y células entero-endocrinas (sintetizan, almacenan y secretan hormonas). En algunas regiones, la mucosa forma proyecciones (vellosidades) o se invagina para formar las glándulas o criptas intestinales revestidas de epitelio. La lamina propia produce anticuerpos, en

especial IgA, en respuesta a antígenos y microorganismos que se encuentran en el intestino.

2. La capa submucosa, permite la movilidad de la mucosa y contiene tejido conectivo laxo que soportará muchos vasos sanguíneos de gran calibre y un plexo nervioso. En algunas regiones, hay glándulas submucosas y cúmulos de tejido linfático.
3. Capa muscular. También llamada túnica muscular, consta al menos de dos capas de fibras musculares lisas: una capa circular interna, la cual estrecha la luz, y una longitudinal externa (que acorta el intestino y amplía la luz). El plexo mientérico de Auerbach se localiza entre estas dos capas musculares y regula la propulsión del alimento (peristaltismo).
4. La serosa o adventicia, es la capa más externa y está formada por tejido conectivo relativamente denso y elástico. Cuando se mezcla con el tejido conectivo de las estructuras vecinas recibe el nombre de adventicia, pero en muchas otras regiones está cubierta por el peritoneo y se le denomina serosa. Contiene vasos sanguíneos y linfáticos.



Figura.6. Capas que conforman al Tracto gastrointestinal.

El TGI contiene sus propios reguladores hormonales. Las principales hormonas que controlan las funciones del TGI se producen y liberan a partir de células de la mucosa del estómago y del intestino delgado. Estas hormonas estimulan la producción de los jugos digestivos y provocan el movimiento de los órganos. Las hormonas que controlan la digestión son la gástrica, la secretina y la colecistocinina. Además, existen dos clases de

reguladores nerviosos que ayudan a controlar el TGI, los nervios extrínsecos, los cuales inervan a los órganos digestivos desde el cerebro o desde la médula espinal y provocan la liberación de dos sustancias químicas: la acetilcolina y la adrenalina, y los nervios intrínsecos, que forman una red densa incrustada en las paredes del esófago, el estómago, el intestino delgado y el colon, estos desencadenan su función cuando las paredes de los órganos huecos se estiran con la presencia de los alimentos, liberando muchas sustancias diferentes que aceleran o retrasan el movimiento de los alimentos y la producción de jugos en los órganos digestivos.

7. Citocromo P-450 en Tracto Gastrointestinal

Los tejidos extrahepáticos, especialmente los que son portales de entrada de xenobióticos, como lo es el TGI, también expresan enzimas CYP. En estos órganos, los CYPs, no solo contribuyen al metabolismo de primer paso, sino también, influyen en la viabilidad de agentes terapéuticos y pueden afectar la eficiencia de una sustancia activa por activación o una inactivación de un pro-fármaco, ya que la mayoría de los medicamentos tienen su blanco en tejidos extrahepáticos. La magnitud y características de la biotransformación de medicamentos, entre tejido y blanco, pueden tener un impacto significativo en la eficiencia del tratamiento. La toxicidad química en tejidos extrahepáticos, frecuentemente resulta de la activación metabólica *in situ* mediada por CYP, en el órgano blanco, y por la toxicidad que tiene el compuesto.

El TGI sirve de portal de entrada de xenobióticos de forma oral, incluyendo medicamentos y alimentos. Se ha probado que existen niveles limitados de expresión de enzimas CYP en el tracto digestivo, a excepción del intestino delgado. En cambio, en tejido neoplásico en los diferentes órganos de este tracto se incrementa significativamente la expresión y actividad de enzimas CYP.

7.1. Citocromo P-450 en Esófago

El esófago no es considerado como un órgano que posea actividad metabólica alguna, sin embargo en forma constitutiva expresa bajos niveles de mRNA de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2E1. La cantidad de citocromo que posee el esófago representa solo un 7% del contenido hepático (Murray, 1994; Dey, 1999; Ribero, 2001; Ding, 2003).

Se ha demostrado que en neoplasias de esófago (adenocarcinomas y tumores de células escamosas) se incrementan significativamente los niveles de CYP1A1/2 y CYP2E1, y CYP3A4/5 (Murray, 1994; Lechevrel, 1999; Ding, 2003).

7.2. Citocromo P-450 en Estómago

La evidencia de expresión de CYP en el estómago humano es muy limitada, principalmente porque sería difícil de explicar el significado biológico de la presencia de CYP en un órgano cuya función es secretoria más que absorbente, y porque en condiciones normales, la superficie del estómago esta cubierta con una barrera mucosa que impide el contacto de las células epiteliales con posibles agentes genotóxicos presentes en el alimento.

En la mucosa gástrica normal de ratón, solo se han encontrado niveles de mRNA de CYP1A1 inducida por 3-metilcolantreno (3-MC) (Dey, 1999). La aplicación de diferentes métodos (inmunohistoquímica, inmunodetección y RT-PCR) han permitido identificar al CYP3A en el epitelio gástrico normal. Sin embargo, en condiciones patológicas de metaplasia intestinal y de adenocarcinoma gástrico, se ha evidenciado la inducción, principalmente de los CYP's 1A y 3A. Esto hace suponer la participación de los CYP's en el proceso de carcinogénesis gástrica. Además, durante el proceso de carcinogénesis, la mucosa gástrica sufre una serie de alteraciones histológicas haciendo permeable la superficie de la misma al transporte y penetración de xenobióticos lipofílicos como PAHs, nitrosaminas y aminos heterocíclicas; mismos que podrían ser bioactivados si se expresan y son funcionales los CYP's en mucosa gástrica (Tatemichi, 1999; Vences-Mejia, 2005).

7.3. Citocromo P-450 en Intestino Delgado

La principal función del intestino delgado es absorber nutrientes y agua. Una función secundaria es la biotransformación de compuestos dando como resultado la bioactivación o desintoxicación, por lo que es un órgano que expresa altos niveles de CYPs.

La caracterización de los niveles de mRNA de CYP en el intestino delgado humano, por Northern blot y/o RT-PCR, han revelado la expresión de mRNA de CYP1A1 (Ding, 2003; Zhang, 1999), CYP1B1 (Zhang, 1999), CYP2E1 (Ronis, 1996; Zhang, 1999; Ding, 2003) y CYP3A4 (McKinnon, 1995; Zhang, 1999; Ding, 2003).

Estudios recientes, muestran que el contenido de CYP se incrementa ligeramente de duodeno a yeyuno, y disminuye agudamente al pasar a ileón, a pesar de que estas

regiones no son anatómicamente distintas si hay diferencia en su capacidad de absorción y secreción (Lin, 1999; Zhang, 1999; Ding, 2003). La localización de CYP1A1, CYP2B1/2 y CYP3A1/2 se observa en mayor proporción en duodeno. La actividad enzimática de demetilación de eritromicina (END), que es catalizada por CYP3A4, ha confirmado la expresión predominante de CYP3A4 en el intestino delgado humano, y se ha reconocido que la mayor actividad de esta enzima se localiza en la región proximal del intestino delgado (Zhang, 1999). Las enzimas CYP1A2 y CYP2E1 en microsomas intestinales, no se han detectado (Lin, 1999).

El metabolismo mediado por CYP en intestino delgado puede servir como una barrera para la captación sistémica de xenobióticos, facilitando su excreción al lumen del intestino o la bioactivación de xenobióticos y como consecuencia unirse a macromoléculas de los enterocitos. (Ding, 2003) La regeneración de las células epiteliales de la mucosa intestinal tiene un tiempo de vida programado, y esto puede tener como consecuencia, por ejemplo, que cuando la enzima CYP3A4 intestinal metaboliza aflatoxina B1 de la dieta, forma metabolitos reactivos que a su vez forman aductos en macromoléculas dentro de los enterocitos. Estos aductos pasan inadvertidos porque estos enterocitos se mudan como resultado de una rápida migración, entonces se puede pensar que esta migración y maduración provee un mecanismo de protección contra toxinas carcinogénicas (Lin, 1999). Por lo que, altas concentraciones de CYP3A4 en intestino delgado sugiere una función protectora contra el desarrollo de cáncer. (Murray, 1994)

7.4. Citocromo P-450 en Intestino Grueso.

La principal función del intestino grueso es la absorción de agua y electrolitos, además de la excreción. En intestino grueso, el tiempo de almacenamiento es elevado, además, la propulsión retrograda del colon puede ayudar a demorar el paso de compuestos tóxicos y prolongar así la exposición de estos con varias enzimas de biotransformación encontradas en la mucosa, también la presencia de la microflora intestinal ayuda a la digestión y a la biotransformación.

Se ha demostrado a través de hibridación *in situ* la presencia de mRNA de CYP3A4 en todas las secciones de colon (McKinnon, 1995). El análisis con RT-PCR en biopsias de colon, identificaron la expresión de mRNA de CYP1A1 y CYP1A2 y CYP3A4, en contraste

con estudios anteriores, en donde no se detectaron miembros de la subfamilia CYP1A (McKay, 1993).

Se ha demostrado que el tratamiento con etanol induce la expresión de la enzima CYP2E1 en intestino grueso, principalmente en colon (Ronis, 1996). Además, el tratamiento con inductores como Nf, 3-MC y Fb, han inducido significativamente la expresión del CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1, respectivamente, en microsomas de colon. (Rosenberg, 1991; Dey, 1999)

En cuanto a presencia de enzimas CYPs en tejido neoplásico de colon, el grupo de Massaad, en 1992, realizó una comparación entre tejido normal y tumores de colon, y encontraron la inducción de CYP3A en tejido neoplásico. En contraste, en 1993, McKay y colaboradores encontraron la inducción de CYP1A y CYP3A solo en tejido neoplásico.

8. Citocromo P-450 en Hígado

Se han realizado numerosos estudios de Citocromo P-450 en hígado, por ser el principal órgano implicado en la biotransformación de compuestos exógenos y endógenos. En hígado de mamíferos, se han caracterizado la mayor cantidad de CYPs. A la fecha, existen cerca de 20 mil reportes de caracterización, regulación, inducción e inhibición de esta enzima en hígado de diferentes especies, en muchos de ellos por su relación en el metabolismo de fármacos, compuestos carcinógenos, mutagénicos o tóxicos o por la activación de estos.

Dentro de los citocromos P-450 que se han identificado en hígado se encuentran CYP1A1, CYP1A2, CYP2A, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A (Maya, 1995; Pelkonen, 1997; Smith, 1997; Lin, 1998; Galli, 2002; Santiago, 2002; Ding, 2003). Además se ha demostrado la inducción de estas enzimas después de la exposición a diferentes inductores, entre ellos el aroclor, inductor de CYP1A, y 3-MC, induce CYP2B, que al comprobar su poder carcinogénico o mutagénico se ha limitado su uso, por lo que se ha buscado otros inductores con los mismos resultados.

9. Agentes inductores

El compuesto β -naftoflavona (Nf, fig.5.) es el inductor prototipo de la subfamilia CYP1A en hígado de ratas. Se ha demostrado que la expresión y actividad de CYP1A1/2 aumenta en hígado cuando a los organismos se les ha expuesto previamente a este potente inductor. Baliharová y cols (2003) demostraron que el tratamiento con β -Nf aumenta la expresión y actividad enzimática de CYP1A en cultivos de hepatocitos de rata y de carnero. El equipo de Lakshmi, en 1997, realizaron experimentos para asentar el riesgo y prevenir la tumorigénesis por el metabolismo de N-acetilbencedina y N,N'-diacetilbenzidina en microsomas de hígado de rata con y sin el tratamiento de β -Nf, encontrando que el metabolismo aumenta 8 veces en microsomas hepáticos de ratas tratadas con β -Nf, estas mismas ratas presentaron una mayor cantidad de aductos en el ADN por los metabolitos resultantes, por lo tanto CYP1A juega un papel fundamental en el metabolismo de estos compuestos.

El fenobarbital (Fb, fig.5.), es otro inductor potente de CYPs, como alternativa al uso de 3-MC (Masaki, 1984). Fb es un barbitúrico de acción prolongada, y es utilizado en el tratamiento de crisis epilépticas y/o como sedante. Se ha considerado al Fb como el inductor prototipo de la subfamilia CYP2B en hígado (Nims, 1996) y se ha identificado el sitio de respuesta a fenobarbital (SRF) en la región 5' del ADN, y a pesar de que no se ha caracterizado por completo la actividad de este sitio se encuentra cerca de gen para CYP2B1/2 por lo que se propone como un regulador y activador de este gen. Fb también, puede activar receptores nucleares orphan como CAR y PXR e inducir enzimas de las subfamilias CYP2B y CYP3A, respectivamente, en hígado de mamíferos. Recientemente, se ha demostrado que Fb tiene la capacidad de regular genes e inducir enzimas CYP2H en hígado de pollo, CYP102 y CYP106 en *Bacillus megaterium*, CYP6A2 en *Drosophila melanogaster*, CYP6D en *Musca domestica*, y en mamíferos también induce los genes CYP2A1, CYP2A5 y CYP2A14 (Czekaj, 2000; Sueyoshi, 2001).

Actualmente, ya se demostró que la combinación de Fb y β -Nf aumenta la expresión de las enzimas CYP1A, CYP2B, CYP2E1 y CYP3A en microsomas hepáticos (Escobar-García, 2001).

El ciclohexanol (Ci, fig.5) se ha empleado como otro potente inductor de las enzimas CYP2B1/2 y CYP2E1 en microsomas hepáticos de rata. Este inductor es un solvente de uso

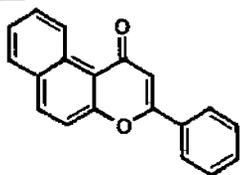
común en lacas y pinturas, también se ha utilizado como intermediario en la preparación de plásticos y otros compuestos químicos (Espinosa-Aguirre, 1997; González, 1998).

El albendazol (Al, fig.5) es otro agente inductor, el cual es un medicamento de amplio espectro antihelmíntico en humanos y en la medicina veterinaria, es de gran eficiencia en el tratamiento de neurocisticercosis. Los pasos de biotransformación de este medicamento por los microsomas de hígado de rata involucra una S-oxidación inicial por flavinas (FMO) y CYP3A, produciendo albendazol sulfóxido (ABZSO), y una segunda S-oxidación por CYP1A1 dando como resultado albendazol sulfona (ABZSO2). La actividad antihelmíntica y embriotóxica de Al en ratas es debido al metabolito ABZSO. Un estudio realizado por Asteinza y cols (2000) demostró un incremento en la expresión de CYP1A1/2 después del tratamiento con Al, e inducción en la actividad enzimática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 por el tratamiento de Al y de ABZSO, en microsomas hepáticos de rata. En algunos otros estudios realizados en hepatocitos de carnero y rata tratados con Al, han sido capaces e inducir la expresión de CYP1A y CYP2B (Baliharová, 2003).

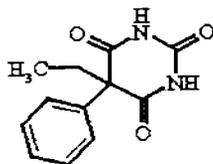
La combinación de Cl-Al (Escobar-García, 2001), ha sido una combinación eficaz para la inducción de CYP1A, CYP2B, CYP2E1 y CYP3A.

El tolueno (Tol, fig.5) es otro compuesto químico inductor de CYPs, es un compuesto químico que actúa como solvente y que se incorporó a la industria en reemplazo del benceno, el cual es altamente tóxico. Tol es utilizado como disolvente en la fabricación de pinturas, resinas y tintas, además de ser materia prima de colorantes, explosivos y otros compuestos orgánicos. Es líquido y se absorbe muy poco a través de la piel, pero a través del tracto gastrointestinal el hidrocarburo entra en la sangre rápidamente. Los vapores de Tol se absorben rápidamente por inhalación, así que la intoxicación sistémica puede presentarse en pocos segundos dependiendo de la concentración. Debido a la solubilidad del tolueno en las grasas, este hidrocarburo tiende a acumularse en los tejidos en proporción al contenido de grasa. Los efectos de una exposición crónica pueden incluir daños en el hígado y / o riñones. Por todas las características de Tol y los efectos que produce, se han llevado a cabo estudios en relación con la inducción de CYP hepático en ratas. El metabolismo del tolueno está relacionado con el metabolismo del bencil-álcohol, dependiente de CYP2E1. Se ha comprobado que se inducen CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A (Gut, 1993; Nakajima, 1994, 1997; González-Jasso, 2003).

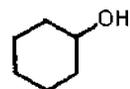
Figura.5. Algunos Inductores importantes de enzimas CYP en hígado.



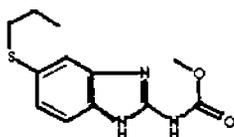
β -Naftoflavona



Fenobarbital



Ciclohexanol



Albendazol



Tolueno

III. Justificación

La modulación de enzimas CYP en Tracto Gastrointestinal es poco conocida, aun cuando este constituye una de las principales vías de entrada de xenobióticos. Los niveles constitutivos de enzimas CYP en TGI se encuentran extremadamente bajos en comparación con el hígado, sin embargo, se ha demostrado una inducción significativa de enzimas CYP en estadios neoplásicos de los tejidos del TGI. Por lo que es de gran importancia conocer si estos tienen la capacidad de responder a inductores de enzimas CYPs que ya han sido estudiados en el hígado.

IV. Objetivo

Conocer la modulación de las principales familias del Citocromo P-450 involucrados en el metabolismo de xenobióticos de tracto gastrointestinal ante el tratamiento con diferentes inductores.

V. Hipótesis

Si los órganos que constituyen el tracto gastrointestinal son capaces de sintetizar constitutivamente enzimas del Citocromo P-450 involucradas en el metabolismo de xenobióticos, entonces podrían tener la capacidad de inducción, ante el tratamiento con diferentes inductores.

VI. Material y Métodos

1. Tratamiento de Ratas

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar, de 200 a 250 g de peso corporal. Se dividieron de forma aleatoria en cuatro grupos de 12 ratas cada uno. Cada grupo recibió agua y alimento *ad libitum*. El esquema de tratamiento para cada grupo fue el siguiente:

- **Grupo Control.** Cada rata de este grupo recibió por tres días consecutivos 1 ml de aceite de maíz por vía intraperitoneal (i.p.).
- **Grupo Fenobarbital - β -Naftoflavona (Fb/Nf).** Este tratamiento se realizó basado en el esquema de inducción reportado por Matsushima, et al. (1979), el cual consiste en la administración de fenobarbital (60 mg/kg de peso, vía i.p.) disuelto en aceite de maíz, por tres días consecutivos. Al tercer día, se aplicó β -naftoflavona (80 mg/kg de peso, vía i.p.), disuelto en aceite de maíz.
- **Grupo Ciclohexanol - Albendazol (Ci/Al).** Este grupo fue tratado con 2.5% (v/v) de ciclohexanol en agua de bebida por cuatro días. En el tercer día, se les administró una dosis única de albendazol (50 mg/kg de peso) por vía i.p., disuelto en aceite de maíz (Escobar-García, 2001).
- **Grupo Tolueno (ToI).** A este grupo se le administró tolueno al 2.5% (v/v) diluido en agua destilada por vía i.p., por tres días consecutivos (González-Jasso, 2003).

Veinticuatro horas después de haber finalizado cada tratamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, con un ayuno previo de 12 hrs. Los animales se perfundieron por vía intracardiaca, con una solución de 0.9% de cloruro de sodio (NaCl), y enseguida, se extrajeron los órganos (esófago, estómago, intestino delgado (duodeno), intestino grueso (colón) e hígado, colocándose por separado en 50 ml de una solución 0.15 M de cloruro de potasio (KCl). Todo el procedimiento se realizó en completa esterilidad y los órganos fueron manejados en frío, así como las soluciones.

2. Preparación de Fracción Microsomal

La fracción S9 se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Maron y Ames (1983), para lo cual se agruparon en una sola muestra cada órgano por sistema de tratamiento y fueron homogenizados en una solución 150 mM de cloruro de potasio, (3ml por gramo de peso del órgano). La homogenización de los tejidos se llevo a cabo en un aparato Potter-

Elvehjem con pistilo de teflón. Posteriormente, cada homogenado se centrifugó a 9000 g por 10 min a 4° C en una centrifuga Marathon 21K/R. El sobrenadante (fracción S9) fue centrifugado a 100 000 g por 60 min a 4° C, en la ultracentrifuga Beckman XL-90, para obtener la fracción microsomal. El botón se resuspendió con amortiguador fosfato-potasio 100 mM (pH 7.4), con un homogenizador manual de vidrio y se centrifugó nuevamente a 100 000 g por 1 hr a 4° C.

A continuación, la pastilla se resuspendió con amortiguador fosfato-potasio 100 mM (pH 7.4), ditiotritol (DTT) 0.1 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y 20% de glicerol. La fracción microsomal se almacenó en alícuotas de 500 µl en ultracongelación hasta su uso.

3. Determinación de Proteína

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry (1951), donde se colocaron diluciones de cada fracción microsomal, en un primer tubo se realizó una dilución 1:300 y en el segundo la dilución de 1:600. A ambas diluciones se les agregó 3 ml que contenían 2.94 ml de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 1% disuelto en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, 30 µl de tartrato de sodio-potasio al 2% y 30 µl de sulfato de cobre (CuSO_4) al 1%. Se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron 0.3 ml de la solución fenol-fofin diluida 1:3 en agua destilada, y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU650 a una longitud de onda (λ) de 550 nm. La determinación de la concentración se realizó interpolando los valores en una curva estándar de albúmina (0 a 1 mg).

4. Electroforesis y análisis de inmunodetección (Western Blot)

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida a temperatura ambiente en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) utilizando un sistema de amortiguador discontinuo. Se utilizó un peine de 10 pozos en el gel concentrador (2 x 8 x 0.075 cm) al 4% de acrilamida, y un gel separador (7 x 8 x 0.075 cm) con una concentración de acrilamida al 7.5% y bis-acrilamida al 0.2%. (Laemmli, 1970) Las muestras microsomales se tiñeron con pironina Y, como indicador de migración límite.

Se utilizaron para cada CYP control comercial 1 µg de proteína, y por cada tratamiento 5µg de proteína microsomal hepática, y 20 µg de proteína microsomal de cada uno de los

órganos del tracto gastrointestinal. En cada pozo se colocaron las muestras teñidas en el siguiente orden:

CYP control comercial
Vacío
Grupo Control
Vacío
Grupo Fb/Nf
Vacío
Grupo Ci/Al
Vacío
Grupo Tol
Vacío

Una vez colocada las muestras, la electroforesis se realizó a 100v durante 40min, con una solución amortiguadora de Tris - HCl 0.05 M, glicina 0.38 M y SDS al 0.1%, pH 8.3. En seguida, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 8 x 6 cm, realizándola a 200 v por 60 min (Towbin, 1979).

Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos salino (PBS), durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.3% por 10 min cada lavado, y se incubaron con agitación con el primer anticuerpo anti-CYP contra rata hecho en cabra, diluido 1:2000 con PBS-BSA al 1.5%, por 2 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron, tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3%, para eliminar el exceso del anticuerpo, enseguida se incubaron las membranas con el segundo anticuerpo conjugado de conejo anti-cabra, diluido 1:2000 con PBS, por 60 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS, de 10 min cada uno. Las bandas fueron reveladas con 3-3'diaminobencidina y peróxido de hidrógeno.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anticuerpos policlonales contra CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 de rata, desarrollados en cabra, obtenidos por el laboratorio Daiichi Pure Chemicals; y el segundo anticuerpo utilizado fue anti IgG de cabra (monoclonal) desarrollado en conejo, unido a una peroxidasa de rábano, purificado por Sigma Chemical Co.

Una vez terminado el revelado de bandas, las membranas de nitrocelulosa fueron analizadas para obtener datos de densitometría, en el fotodocumentador y analizador de imágenes de la marca Herolab.

5. Actividad enzimática.

Las actividades enzimáticas dependientes de enzimas CYP fueron determinadas mediante la dealquilación de alcoxiresorufinas (CYP1A y CYP2B), la hidroxilación de p-nitrofenol (CYP2E1) y la hidroxilación de eritromicina (CYP3A2). Tanto los sustratos como sus productos que fueron utilizados para cada evaluación, se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

5.1. Dealquilación de Alcoxiresorufinas (AROD)

La actividad de AROD se midió a través de la formación de resorufina de acuerdo al método de Burke (1985). Esta determinación consiste en realizar la siguiente mezcla (volumen final de 2 ml):

- Solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM y cloruro de magnesio (MgCl₂) 25 mM (pH 7.6),
- Sustrato específico (etoxiresorufina 0.05mM - CYP1A1, metoxiresorufina 0.5 mM - CYP1A2, pentoxiresorufina 1mM - CYP2B1 y bensiloxiresorufina 1mM - CYP2B2), disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO)
- Proteína microsomal de cada órgano (10 µl - EROD; 20 µl - MROD; 40 µl - PROD; 30 µl - BROD).

Dicha mezcla se incubó por 3 min a 37 °C, iniciándose la reacción al adicionar 20 µl de NADPH 50 mM, esta mezcla se mantuvo a 37° C durante 10 min. Las mediciones se realizaron en un fluorómetro Versa Fluor BioRAD, a una λ de excitación de 530 nm, y de emisión de 585 nm. La determinación de la actividad enzimática se realiza interpolando los valores en una curva patrón de resorufina (10 a 640 pM). Los resultados se reportan en pmoles de resorufina / mg de proteína / min.

5.2. Hidroxilación de p-Nitrofenol (PNPH)

La actividad de CYP2E1 se evaluó mediante la hidroxilación del sustrato p-Nitrofenol para obtener la formación de 4-nitrocatecol, de acuerdo al método descrito por Koop (1986). A una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 6.8), se le añadió p-nitrofenol 100 mM y 100 µl de proteína microsomal de cada órgano, obteniendo un volumen final de 1 ml, esta mezcla se incubó a 37° C por 5 min. La reacción se inició con la adición de 20 µl de NADPH 10 mM disuelto en amortiguador, esta reacción se conservó durante 10 min a 37° C. Terminado el tiempo, se agregó 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0.5 M y se

realizó una centrifugación a 3500 rpm durante 15 min, se tomó 1 ml de sobrenadante y se agregó 0.1 ml de NaOH 10 N. La absorbancia se leyó en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU650 a una λ de 510 nm. Los datos se obtuvieron interpolando los resultados en una curva de 4-nitrocatecol de la concentración 0 a 50 nM y los resultados son expresados en nmoles de 4-nitrocatecol / mg de proteína / min.

5.3. Demetilación de Eritromicina (END)

La actividad de CYP3A2 se determinó mediante la producción del formaldehído por la N-demetilación de eritromicina, de acuerdo al método de Alexidis et al. (1996). La mezcla contuvo amortiguador (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM), eritromicina 10 mM, y 100 μ l de suspensión microsomal. Esta mezcla se incubó durante 3 min a 37° C, la reacción se inició al agregar 100 μ l de NADPH 10 mM y se mantuvo a la misma temperatura por 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético al 12.5%. Posteriormente, se centrifugó a 5700 rpm, a 1 ml del sobrenadante se agregó 1 ml del reactivo de NASH (solución de acetato de amonio 2 M, ácido acético (CH₃COOH) 50 mM y acetil-acetona 20 mM, en agua destilada), y se incubó a 50° C por 30 min. Finalmente, se midió la producción de formaldehído en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU650 a una λ = 412 nm. Los resultados se obtuvieron por la interpolación de datos de una curva estándar de formaldehído con concentraciones entre 0 - 160 nM y son expresados como nmoles de formaldehído / mg de proteína / min.

6. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos de las actividades catalíticas dependientes de cada CYP fueron evaluadas con un análisis de varianza (ANOVA) y para los casos donde de encontraron variabilidad entre el grupo testigo y los grupos experimentales se empleó la prueba de t de Student para muestras independientes y se considera una $p \leq 0.05$.

VII. Resultados

1. Citocromo P-450 en Microsomas Hepáticos

Los resultados correspondientes a la modulación de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas hepáticos se muestran en las figuras 7 y 8.

La mayor expresión y la más alta actividad catalítica de CYP1A1/2 se registró en los microsomas hepáticos tratados con Fb/Nf. Como se puede apreciar en el grupo tratado con Ci/Al el aumento en la expresión fue menor y en el grupo tratado con Tol, aun cuando no hubo incremento de la expresión de la enzima CYP1A1/2, ambos grupos si presentaron un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) en la actividad catalítica de EROD y MROD dependiente de CYP1A1 y CYP1A2.

La expresión de CYP2B1/2, tuvo una mayor expresión en microsomas de hígado tratados con Fb/Nf, seguida de los microsomas tratados con Ci/Al, y a pesar de esto, la actividad catalítica de ambas enzimas, CYP2B1 y CYP2B2, se incrementó significativamente en todos los grupos experimentales al ser comparados con la actividad del grupo control, con un valor de $p \leq 0.05$.

La expresión de la proteína CYP2E1 aumento en los microsomas de los grupos tratados con Fb/Nf y Ci/Al, y la actividad enzimática en microsomas hepáticos no se modificaron con ninguno de los tratamientos.

El tratamiento con Fb/Nf indujo la expresión de CYP3A2 en microsomas hepáticos. La actividad enzimática de dimetilación de eritromicina se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) con los tres tratamientos, obteniendo la mayor actividad catalítica en el grupo tratado con Fb/Nf.

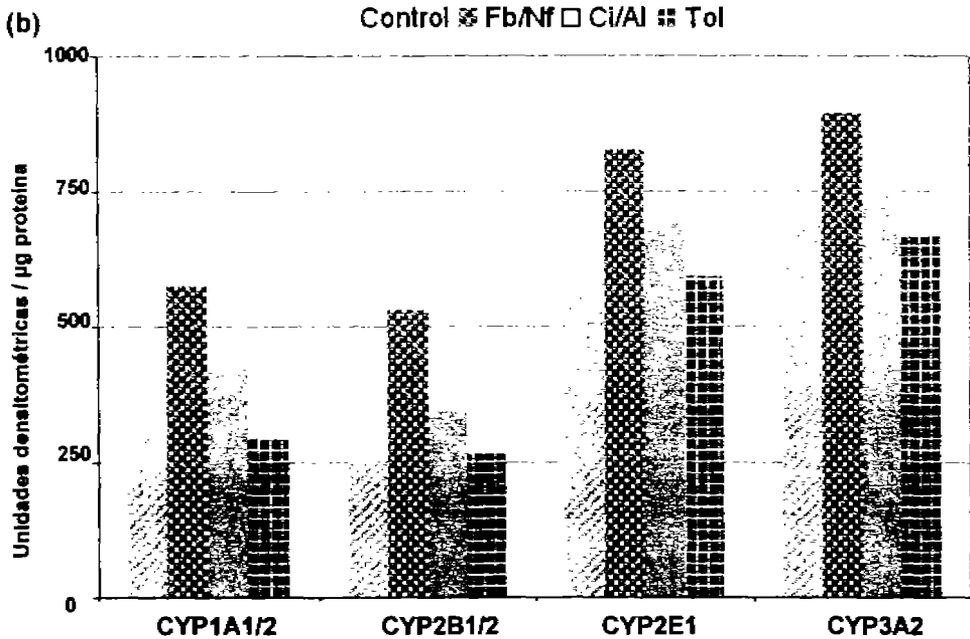
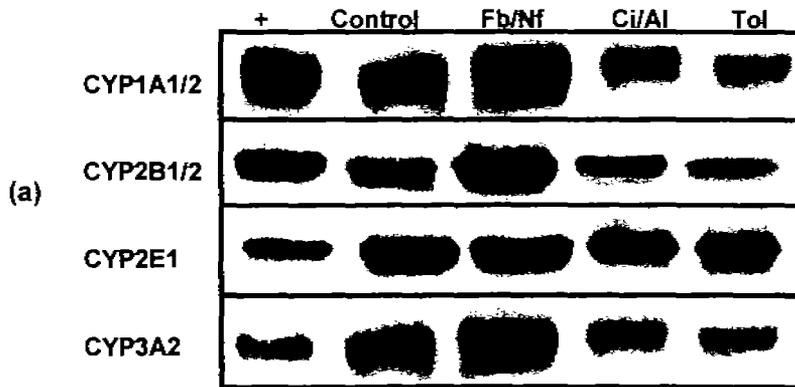


Figura.7. (a) Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas hepáticos, con los diferentes tratamientos. (b) Representación gráfica del incremento relativo de la expresión de cada uno de los CYPs en cada tratamiento.

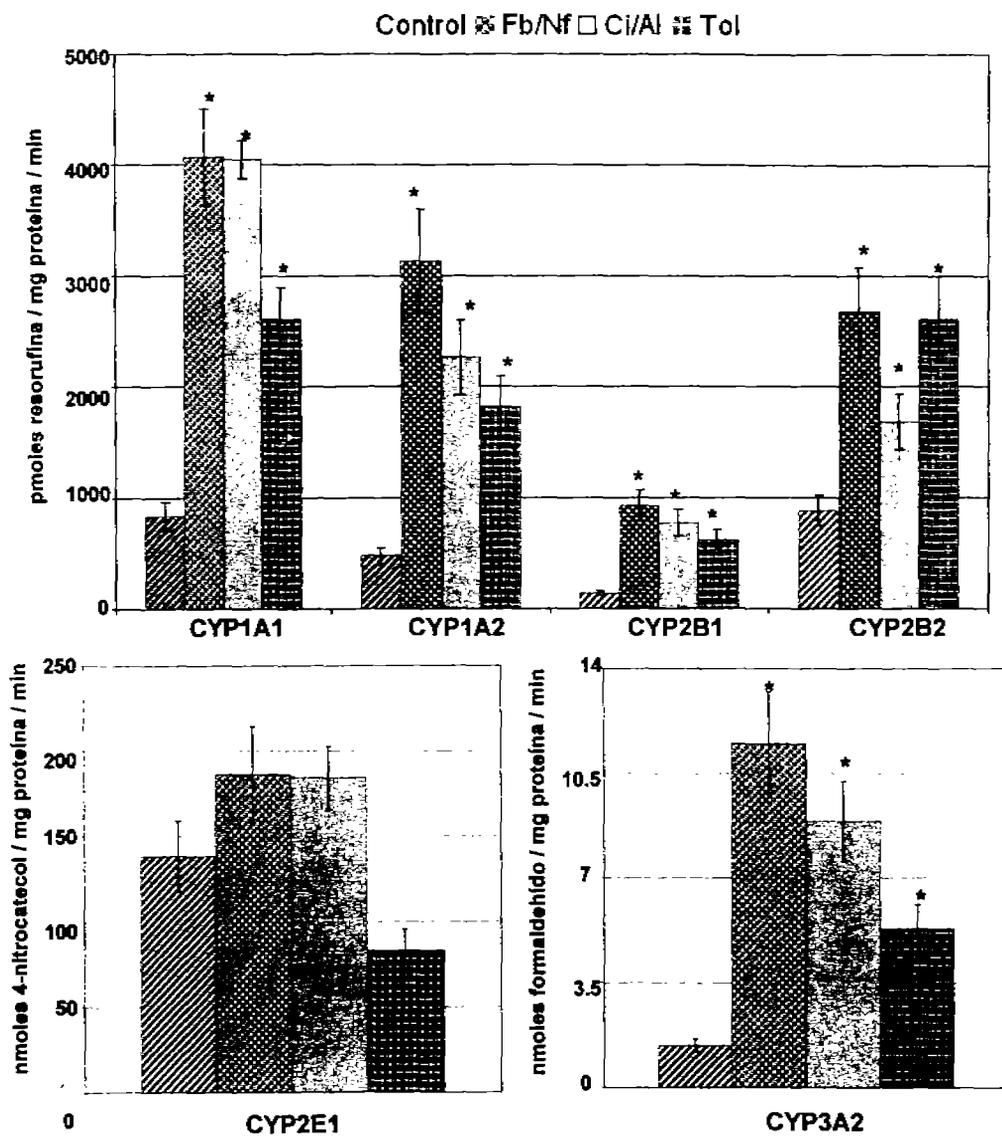


Figura.8. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1 (PROD), CYP2B2 (BROD), CYP2E1 (PNPH) y CYP3A2 (END) en microsomas hepáticos, con los diferentes tratamientos. * $p \leq 0.05$.

2. Citocromo P-450 en Microsomas de Esófago

En la figura 9a y 9b, se muestra el inmunoblot y su análisis densitométrico, respectivamente, de la expresión de las proteínas CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de esófago. La figura 10 corresponde a la actividad catalítica de cada una de estas enzimas.

Como se puede apreciar en el grupo control existe expresión constitutiva de cada uno de los CYPs evaluados. El tratamiento con Fb/Nf indujo significativamente la expresión de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2. Este incremento en la expresión se acompañó con el aumento de las actividades catalíticas correspondientes para cada una de las enzimas. Los tratamientos Ci/AI y Tolueno no modificaron la expresión de las proteína ni la actividad dependiente de cada CYP.

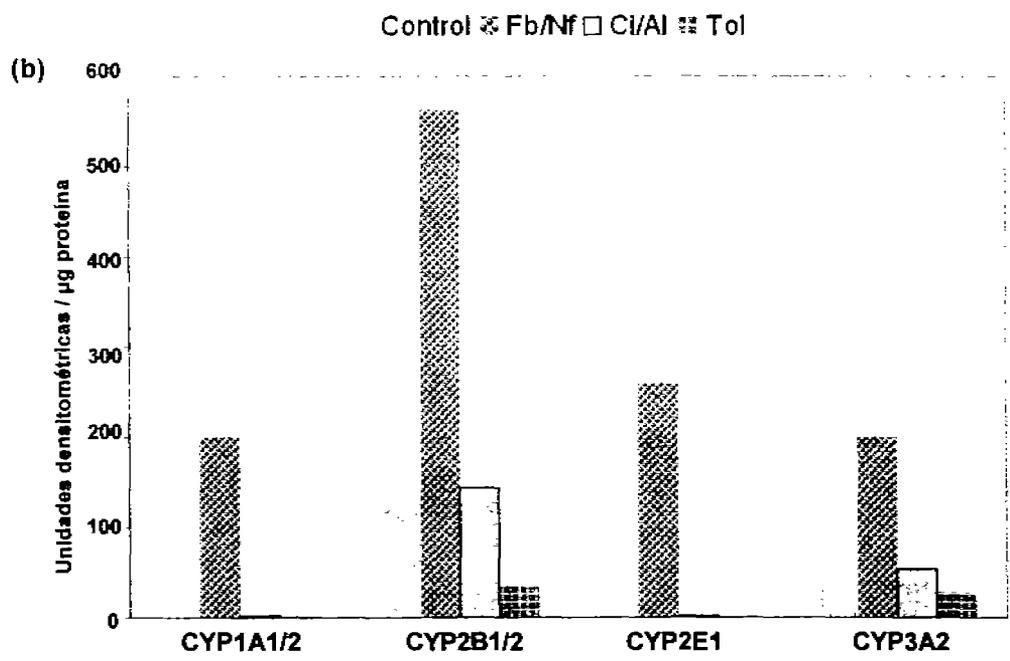
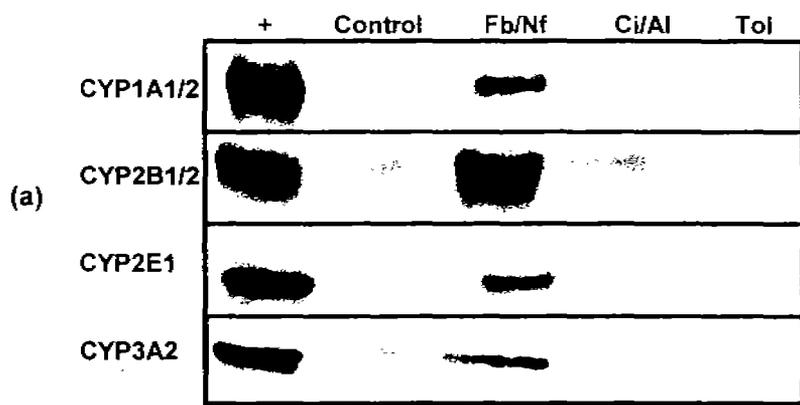


Figura. 9. (a) Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de esófago, con los diferentes tratamientos. (b) Representación gráfica del incremento relativo determinado por densitometría de la expresión de cada uno de los CYPs en los diferentes tratamientos.

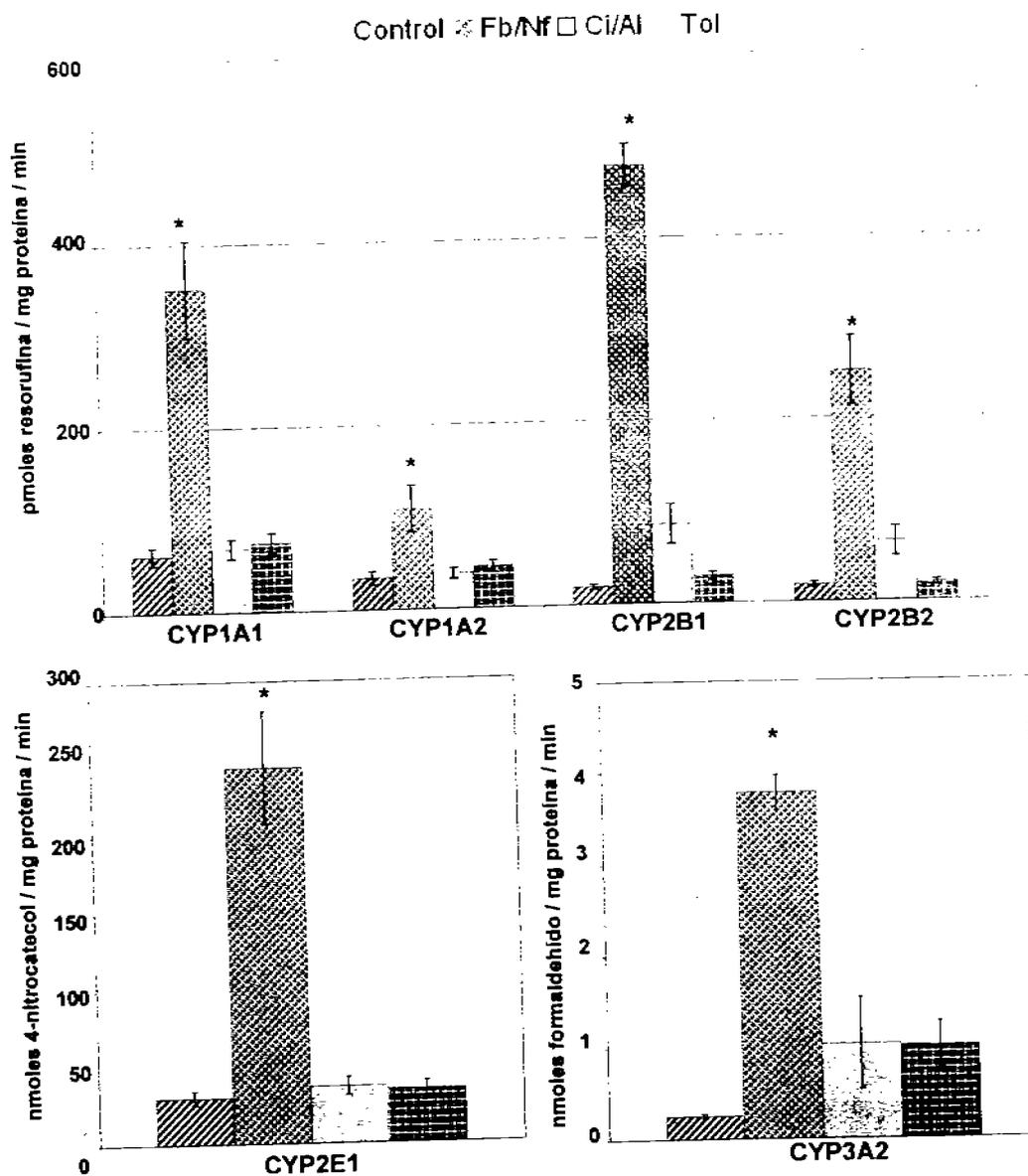


Figura.10. Representación grafica de la actividad catalítica dependiente CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1 (PROD), CYP2B2 (BROD), CYP2E1 (PNPH) y CYP3A2 (END) en microsomas de esofago, con los diferentes tratamientos. * $p \leq 0.05$.

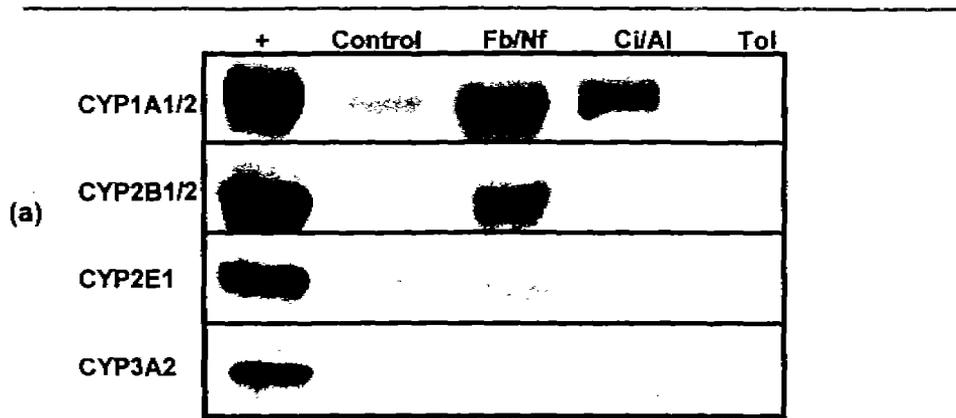
2. Citocromo P-450 en Microsomas de Estómago

Las enzimas CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 se expresaron constitutivamente en microsomas de estómago del grupo control (Fig. 11).

En microsomas gástricos de los grupos tratados con Fb/Nf y Ci/Al, presentaron aumento de la expresión de CYP1A1/2, obteniendo mayor inducción con el primer tratamiento. El tratamiento de tolueno no modificó la expresión basal de estas enzimas. Las actividades EROD y MROD dependientes de CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente, se incrementaron significativamente ($p \leq 0.05$) ante el tratamiento de Fb/Nf (Fig.12).

Tanto la expresión como la actividad de CYP2B1/2 se incrementaron en microsomas de estómago con el tratamiento Fb/Nf. La actividad catalítica de CYP2B2 también se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) en el grupo tratado Ci/Al, aun cuando su expresión no tuvo aumento con este tratamiento.

La expresión de las enzimas CYP2E1 y CYP3A2 no se modificaron con ningún tratamiento, la actividad catalítica de CYP2E1 aumentó significativamente, en los grupos tratados de Fb/Nf y Ci/Al; y la actividad enzimática de CYP3A2 también se incrementó con los tratamientos de Fb/Nf y Tol ($p \leq 0.05$).



▨ Control ▩ Fb/Nf ■ CVAI ■ Tol

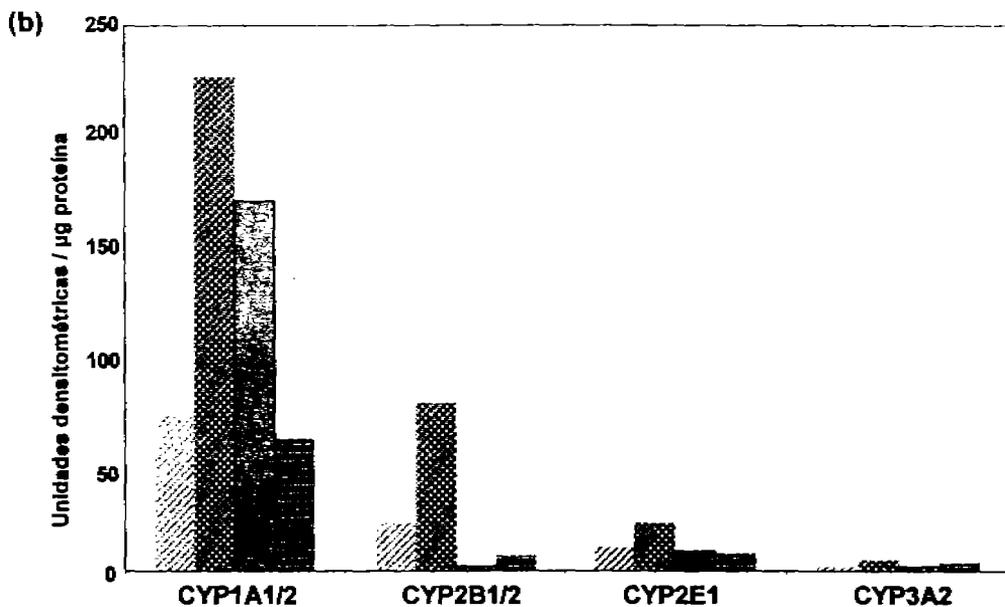


Figura.11. (a) Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas gástricos, con los diferentes tratamientos. (b) Representación gráfica del incremento relativo determinado por densitometría de la expresión de cada uno de los CYPs en los diferentes tratamientos.

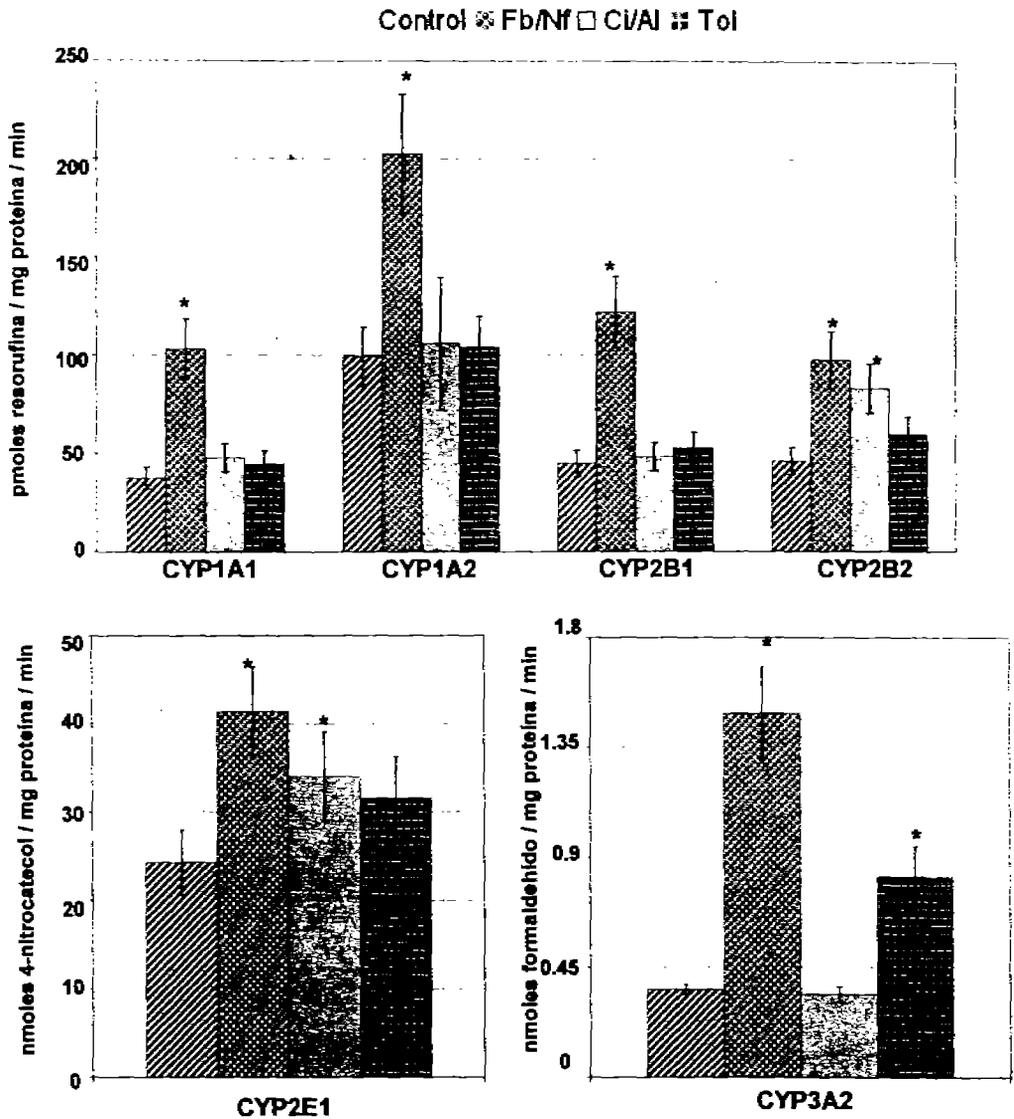


Figura.12 Representación grafica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1 (PROD), CYP2B2 (BROD), CYP2E1 (PNPH) y CYP3A2 (END) en microsomas gástricos, con los diferentes tratamientos. * $p \leq 0.05$.

3. Citocromo P-450 en Microsomas de Duodeno

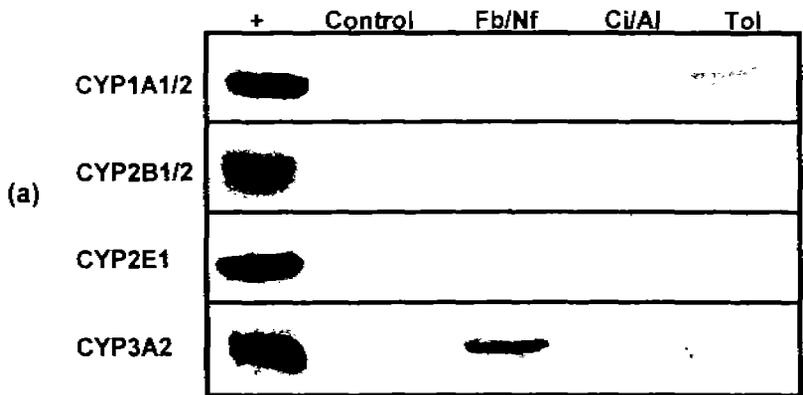
En microsomas de duodeno solo se expresa en forma constitutiva el CYP3A2 (Fig. 13).

La expresión de CYP1A1/2 se incrementó ante los tratamientos con Fb/Nf y Tol. En cuanto a la actividad enzimática, aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) la actividad EROD de CYP1A1 ante los tres tratamientos y no hubo diferencias significativas en la actividad MROD dependiente de CYP1A2 (Fig. 14).

En microsomas de duodeno no se expresa CYP2B1/2 con ningún tratamiento. Sin embargo, la actividad PROD (CYP2B1) aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) en los microsomas de duodeno del grupo tratado con Fb/Nf, y la actividad BROD, dependiente de CYP2B2, se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) con los tratamientos de Fb/Nf y Tol.

La expresión y actividad catalítica de CYP2E1 no fueron modificadas con ningún tratamiento.

Aun cuando, la expresión de la enzima CYP3A2 se indujo solo con el tratamiento con Fb/Nf, la actividad catalítica dependiente de esta proteína se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) con todos los tratamientos.



Control ☒ Fb/Nf □ Ci/AI ☒☒ Tol

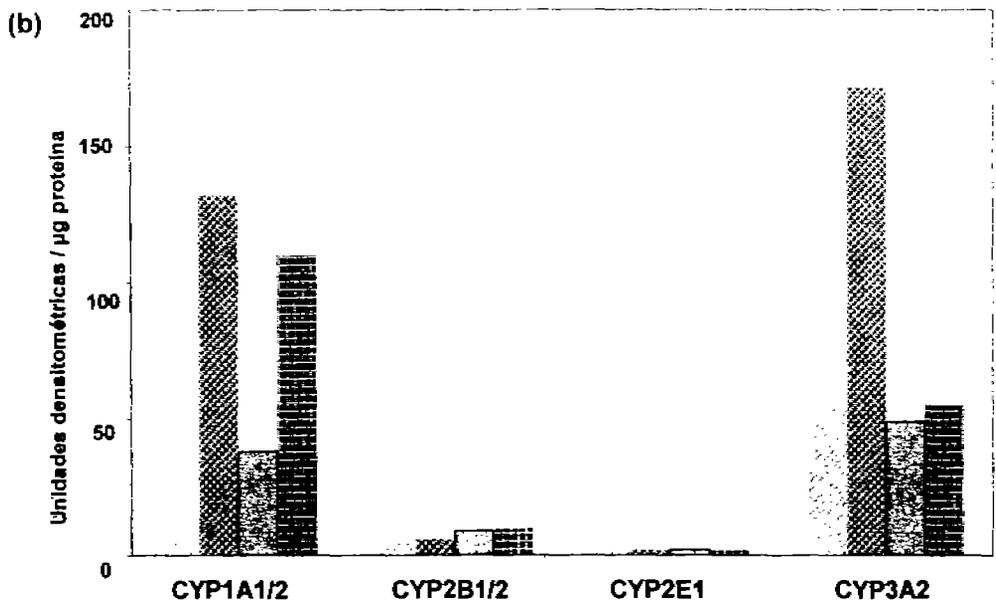


Figura.13. (a) Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de duodeno, con los diferentes tratamientos. (b) Representación gráfica del incremento relativo determinado por densitometría de la expresión de cada uno de los CYPs en los diferentes tratamientos.

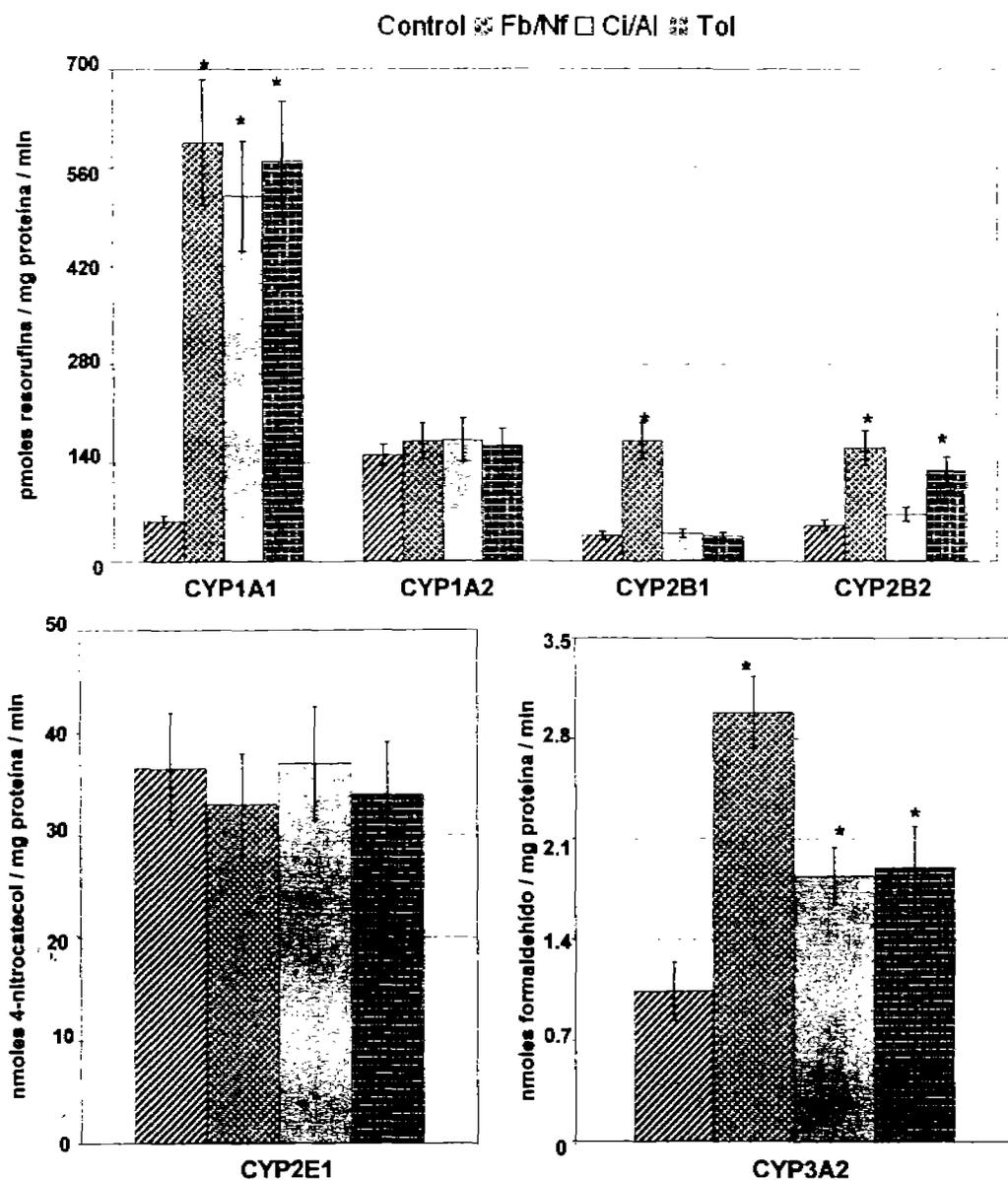


Figura.14. Representación gráfica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1 (PROD), CYP2B2 (BROD), CYP2E1 (PNPH) y CYP3A2 (END) en microsomas de duodeno, con los diferentes tratamientos. * $p \leq 0.05$.

4. Citocromo P-450 en Microsomas de Colon

En microsomas de colon del grupo control no se expresan en forma constitutiva ninguna de las enzimas CYPs evaluadas en este estudio (Fig. 15). El tratamiento con tolueno incrementó la expresión de las enzimas CYP2E1 y CYP3A2 en colon, esta última también se indujo con el sistema Fb/Nf.

Las actividades catalíticas de los CYPs en microsomas de colon se muestran en la figura.16, donde se puede apreciar que las actividades dependientes de CYP1A2, CYP2B2 y CYP3A2 se incrementaron significativamente ($p \leq 0.05$) en el grupo tratado con Fb/Nf. El tratamiento con Ci/Al aumentó la actividad catalítica de CYP2B2 y CYP3A2; y el tratamiento con Tol solo incrementó significativamente la actividad de CYP2E1.

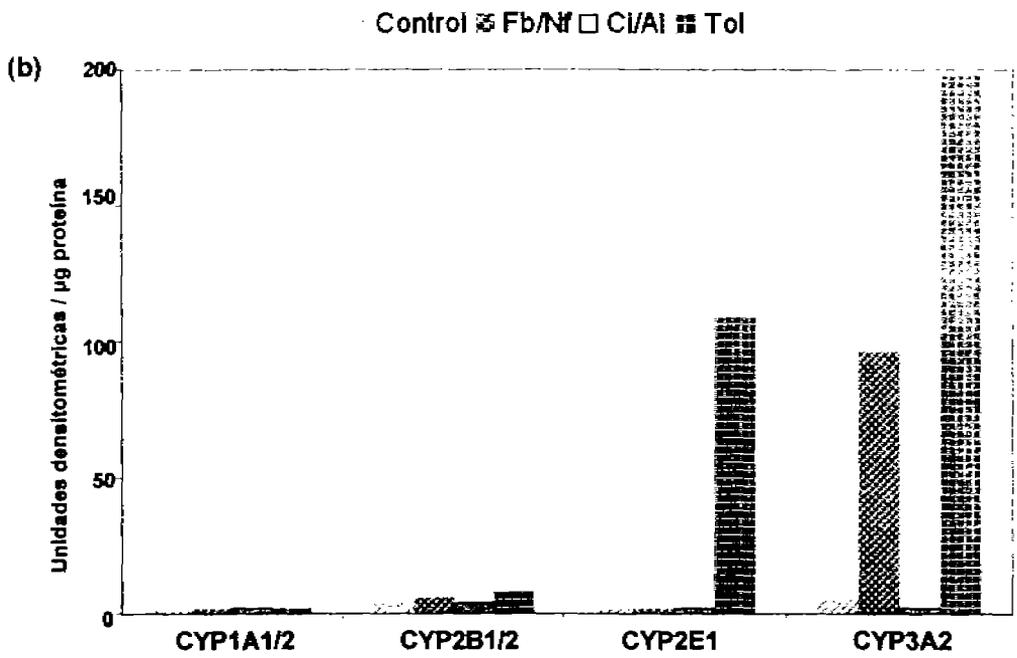
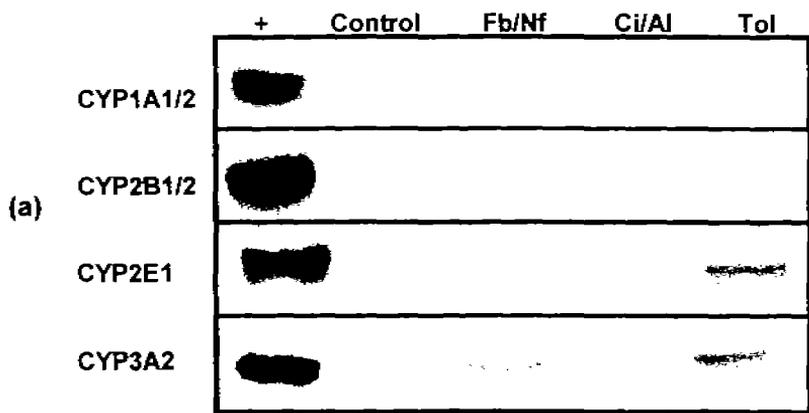


Figura 15. (a) Inmunoblot de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de colon, con los diferentes tratamientos. (b) Representación gráfica del incremento relativo determinado por densitometría de la expresión de cada uno de los CYPs en cada tratamiento.

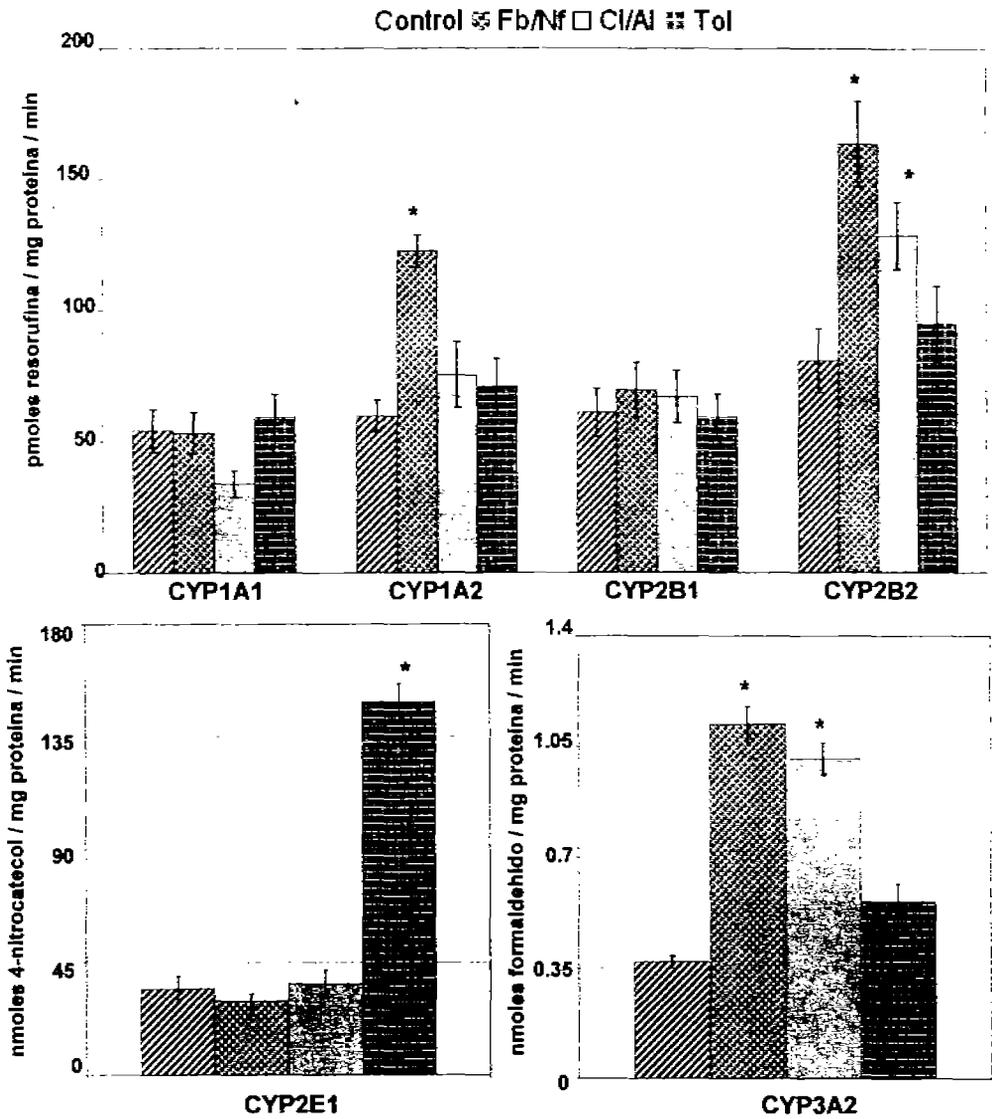


Figura.16. Representación grafica de la actividad catalítica dependiente de CYP1A1 (EROD), CYP1A2 (MROD), CYP2B1 (PROD), CYP2B2 (BROD), CYP2E1 (PNPH) y CYP3A2 (END) en microsomas de colon, con los diferentes tratamientos. * $p < 0.05$.

VIII. Discusión

Las enzimas CYP, particularmente las familias 1, 2 y 3, catalizan la biotransformación de una amplia variedad de compuestos exógenos. Las enzimas incluidas en este estudio (CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2) son de gran importancia para el ser humano. Las enzimas CYP1A1 y CYP1A2 activan principalmente PAHs, además, pueden metabolizar nitrosaminas, aflatoxina B1 y arilaminas, generando compuestos que se pueden unir a ADN provocando mutaciones. Las enzimas de la subfamilia CYP2B (CYP2B1 y CYP2B2) se han caracterizado principalmente por ser inducidas con Fb y son capaces de metabolizar diversos compuestos entre ellos pesticidas halogenados y organoclorados, medicamentos como el tamoxifen (utilizado como anticancerígeno), así como hidrocarburos volátiles, y varios bifenilos polihalogenados. La enzima CYP2E1, biotransforma un amplio intervalo de productos químicos, en particular compuestos hidrofóbicos y pequeños, oxida etanol y otros alcoholes primarios. Además, tiene la capacidad de reducir dióxigeno a radicales oxi-reactivos, iniciar la peroxidación de lípidos de membrana, producir radicales libres y, por lo tanto, estrés oxidativo. Finalmente, la enzima CYP3A2 está implicado en el metabolismo de más de 60% de los medicamentos incluyendo agentes inmunosupresores, antimicóticos y antibióticos. Puede reducir particularmente la eficacia de los anticonceptivos orales, y se ha demostrado que activa pro-carcinógenos como la aflatoxina B y PAHs.

El órgano que expresa las mayores concentraciones de enzimas CYP es el hígado, siendo este el órgano predominante en el metabolismo de xenobióticos. En tejidos extrahepáticos han desarrollado el sistema activo para metabolizar xenobióticos.

La capacidad metabólica que puede llegar a tener el tracto gastrointestinal puede influir profundamente en el destino metabólico de los agentes químicos ingeridos, dependiendo de la isoformas de CYP presentes así como de sus niveles funcionales. Con excepción del intestino delgado, el resto de los órganos que conforman el TGI expresan en forma constitutiva niveles relativamente bajos de CYP. Sin embargo, es importante destacar que en procesos neoplásicos de esófago, estómago y colon los niveles de CYPs se encuentran claramente inducidos, además, está comprobado que el metabolismo de xenobióticos por el sistema enzimáticos CYP juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis de tipo químico. Diversos estudios epidemiológicos reportan un incremento en el riesgo de

desarrollar cáncer en tejidos del TGI por compuestos asociados con la dieta y el humo del tabaco.

Aunque la inducción de enzimas CYP puede ser ventajosa, en muchos casos, tiene una variedad de consecuencias farmacológicas adversas, incluyendo alteraciones en la eficiencia de medicamentos, interacción medicamento - medicamento e incremento en la activación metabólica de procarcinógenos o toxinas. El metabolismo, en términos de activación o desintoxicación, dependerá de la localización celular, cantidad y la actividad de las diferentes enzimas metabolizadoras presentes en un tejido particular. Por esto, en este trabajo, se evaluó la capacidad de inducción de CYPs en tracto gastrointestinal, el cual representa una de las principales vías de entrada de xenobióticos al organismo.

El hígado, al ser el órgano que posee la mayor cantidad y diversidad de enzimas CYP, también ha sido el órgano más utilizado como evidencia de los procesos de inducción de diversos CYPs. El grupo de García Franco, en 1999, propone la inducción de enzimas CYPs a través del tratamiento Fb/Nf, el cual posee una mayor capacidad de inducción al administrarlo en conjunto que por separado. Este tratamiento combinado Fb/Nf es un potente inductor de CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2, en microsomas hepáticos (Escobar-García, 2001). Otros dos exitosos esquemas de inducción en hígado son, por una parte, el sistema combinado de Ci - Al (Escobar-García, 2001) con el cual se inducen los CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP3A2; y el segundo esquema, es el tratado con Tolueno, el cual tiene la capacidad de inducir principalmente CYP2E1 (Nakajima, 1994, 1997; González-Jasso, 2003) Al contar con estos antecedentes, se utilizaron estos sistemas prototipo de inducción para tener como referencia interna al hígado.

En este trabajo se evidenció la expresión constitutiva de las enzimas CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en microsomas de esófago. El tratamiento con Fb/Nf incrementó significativamente la concentración y actividad de enzimas CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2E1 y CYP3A2 en estos microsomas, en comparación con en el tratamiento de Ci/Al que solo indujo la expresión de la subfamilia CYP2B y la actividad catalítica de CYP3A2 y el tratamiento Tol, el cual, no modificó la expresión de proteínas CYP.

Ribeiro y cols, en el 2001, reportan un incremento de cerca del 4% de CYP1A1 en microsomas de esófago al exponer a ratas a 3-MC, en comparación con la inducción en hígado. En el presente estudio obtuvimos un incremento en la expresión del CYP1A1/2 de

cerca del 33% en microsomas de esófago en el grupo expuesto al sistema de Fb/Nf en comparación con microsomas hepáticos.

A pesar de que la principal función del esófago es conducir el alimento de la cavidad oral hacia el estómago, al parecer tiene una capacidad metabólica importante a través de las enzimas CYP, y esto puede estar relacionado con la resistencia a medicamentos en casos de cáncer, ya que en adenocarcinomas de esófago se ha mostrado la inducción de las subfamilias CYP1A, CYP2E y CYP3A (Murray, 1994; Lechevreil, 1999; Ding, 2003).

En mucosa gástrica, tan solo se ha reportado la expresión basal de CYP3A4 en humanos (homólogo de CYP3A2 en rata) (Ding, 2003). En el presente estudio, obtuvimos niveles basales de CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1, en microsomas gástricos, estos niveles se incrementaron después de la exposición a sistemas específicos de tratamiento, es decir, el tratamiento de Fb/Nf incrementó significativamente a CYP1A y CYP2B, el sistema Ci/Al modificó los niveles de CYP1A, CYP2B y CYP2E1, y el grupo tratado con Tolueno solo aumentó la actividad de CYP3A2. Estos datos son fundamentales para explicar la existencia de biotransformación en mucosa gástrica, y cabe la posibilidad de que algunos cambios patológicos podrían tener un impacto en la activación de carcinógenos.

El intestino delgado provee el primer paso metabólico importante para xenobióticos orales y muchas de las enzimas pueden activarse por constituyentes normales de la dieta, además el que sus células tengan un tiempo de vida corto (2 días en rata) confiere una ventaja ya que en muchas ocasiones los metabolitos resultantes puede causar daños a el DNA o en otras macromoléculas. Estudios anteriores confirman que las enzimas CYP1A1 y CYP3A4 son predominantes en intestino delgado e indican que solo existen un número limitado de otras enzimas en comparación con el hígado, las cuales se detectan en mayor concentración por inducción que en forma constitutiva (Zhang, 1999).

En trabajos previos en ratas, el tratamiento con 3-MC aumentó la actividad la enzima CYP1A1 (Lin, 1999), y los tratamientos por separado con Nf y Fb fueron capaces de inducir la expresión de CYP1A1 y CYP2B1, respectivamente (Rosenberg, 1991). En este trabajo se demostró la inducción del CYP1A1/2 y CYP1B1/2 en microsomas de duodeno, después de la exposición al tratamiento combinado de Fb/Nf se incrementaron los niveles de CYP1A1/2 y CYP2B1/2. En microsomas que fueron tratados con Ci/Al tuvieron un incremento en la expresión de CYP1A1/2 así como aumento en la actividad dependiente de CYP1A1 y CYP3A2. Por otro lado, al exponer a las ratas a tolueno se observó una

potente inducción de CYP1A1/2 en microsomas de duodeno. Se ha demostrado que la inducción de CYPs en intestino delgado es más rápida que en hígado, aun cuando los agentes son administrados por vía intraperitoneal, estos niveles se mantienen por corto tiempo y puede deberse a su corto tiempo de vida, por lo que también se puede encontrar niveles altos de mRNA sin encontrar aumento en la expresión (Zhang, 1997).

Por último, en colon no existe evidencia de expresión constitutiva de isoformas CYP, sin embargo, experimentalmente se han inducido la expresión y la actividad enzimática del CYP1A1 con Nf (Rosenberg, 1991). En esta tesis se demostró la inducción de la enzima CYP3A2 por el sistema Fb/Nf en microsomas de colon, en el grupo con el tratamiento de Ci/Al solo se presentaron cambios significativos en la actividad catalítica dependiente de CYP2B2 y CYP3A2 y ante el tratamiento de tolueno se incrementó la expresión de CYP2E1 y CYP3A2. McKay (1993) sugiere que al inducirse enzimas CYP en tejido normal de colon podría incrementarse el riesgo de desarrollar cáncer en este tejido. En tejido neoplásico se ha demostrado que la enzima CYP3A2 es predominante, y en menor concentración CYP1A1 (Massaad, 1992; McKay, 1993). Con esto el sistema metabolizador puede influir en la sensibilidad de este órgano para desarrollar citotoxicidad y/o carcinogenicidad ante medicamentos y otros xenobióticos, y también puede determinar la respuesta a agentes anticancerígenos.

Pensando en el paradigma de activación por CYP como un mecanismo básico para cambiar la estructura de un compuesto y ser un compuesto activo, se podría proveer una explicación para la unión de muchos compuestos químicos a ADN y otras macromoléculas, y se obtendría conocimiento en corto tiempo de la susceptibilidad a desarrollar genotoxicidad y/o carcinogénesis, ya que la aducción del ADN da por resultado la transformación de las células normales en cancerosas. Así, la expresión selectiva de isoformas CYP puede contribuir a entender la causa del daño tejido específico ante diferentes xenobióticos. Por esto es relevante nuestro trabajo, ya que contribuimos a entender la primera parte del paradigma al evidenciar la expresión constitutiva de algunas proteínas CYPs en los órganos del TGI de rata y al demostrar su capacidad de incrementar estas enzimas en presencia de diversos inductores.

En este trabajo demostramos que los órganos del tracto gastrointestinal desarrollan una inducción de enzimas CYP tejido específica y, con esto, se podría hablar de cierta susceptibilidad de estos órganos a los efectos tóxicos de un metabolismo *in situ*. Por lo que

probablemente el proceso de inducción en el tracto gastrointestinal podría ser un paso inicial en el desarrollo de cáncer de tipo químico.

Es importante resaltar que una inducción de enzimas CYP previa a la administración de un fármaco, puede tener consecuencias en la farmacodinámica y farmacocinética del medicamento reduciendo su actividad o su tiempo de vida dentro del organismo.

Otro punto importante, es que en muchas ocasiones se refieren generalmente a inducción restringiéndola a casos donde la síntesis de proteína ó mRNA es estimulada, sin embargo, en este trabajo demostramos que no siempre hay una relación entre la síntesis de proteína y la actividad enzimática, por lo que es de gran importancia evaluar la actividad enzimática para que se pueda considerar que el aumento en la concentración de las enzimas CYPs tiene actividad catalítica y no solo es el resultado de una acumulación de esta enzima. Sin embargo, un problema en la determinación de la actividad enzimática radica en la selección de sustratos para una enzima, ya que pocas veces estos sustratos son específicos para una sola enzima. Por esto, es necesario realizar diferentes técnicas cuantitativas, concentración de mRNA, concentración de proteína y actividad enzimática, para tener un estudio mas completo del efecto de un inductor sobre las enzimas en diferentes órganos en un estudio *in vivo*.

En conclusión, en este trabajo se demostró que los órganos del TGI no solo son capaces de expresar las enzimas CYPs involucradas en el metabolismo de xenobióticos, sino también de inducir estas enzimas ante el tratamiento con potentes inductores.

IX. Referencias

- Alexidis AN, Commandeur JN and Rekka EA. 1996. Novel piperidine derivatives: inhibitory properties towards cytochrome P-450 isoforms, and cytoprotective and cytotoxic characteristics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1: 81-88.
- Asteinza J. 1998. Efecto de Albendazol y Mebendazol en la Actividad del Citocromo P-450 de Hígado de Rata. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México: 1-11.
- Asteinza J, Camacho-Carranza R, Reyes-Reyes RE, Dorado-González V. and Espinosa-Aguirre JJ. 2000. Induction of Cytochrome P-450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9:31-37.
- Baliharová V, Velfk J, Lamka J, Balarinová R. and Skálová L. 2003. The effects of albendazole and its metabolites on hepatic cytochromes P-450 activities in mouflon and rat. *Research in Veterinary Science*, 75: 231-239.
- Burke MD, et al. 1985. Etoxi-, pentoxy-, y benzyloxazones and homogues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology*. 34: 3337-3345.
- Czekaj P. 2000. Phenobarbital-induced expression of cytochrome P-450 genes. *Acta Biochimica Polonica*, 47(4): 1093-1105.
- Dey A, Jones JE and Nebert DW. 1999. Tissue- and Cell Type-Specific Expression of Cytochrome P450 1A1 y Cytochrome P450 1A2 mRNA in the Mouse Localized *in situ* Hybridization. *Biochemical Pharmacology*, 58: 525-537.
- Ding X and Kaminsky LS. 2003. Human Extrahepatic Cytochrome P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology*, 43:149-173.
- Escobar-García D, Camacho-Carranza R, Pérez I, Dorado V, Arriaga-Alba M and Espinosa-Aguirre JJ. 2001. S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole. *Mutagenesis*, 16(6): 523-528.

-
- Espinosa-Aguirre JJ, Rubio J, Lopez I, Nosti R y Asteinza J. 1997. Characterization of the CYP isozyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis*, 12(3): 159-162.
- Estabrook RW. 1996. Cytochrome P-450: From a Single Protein to a Family of Proteins - with Some Personal Reflections. En: *Cytochromes P-450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides, C. New York, CRC Press: 3-28.
- Estabrook RW. 1998. The Role of Methods in the Discovery of the Cytochromes P-450. En: *Methods in Molecular Biology, Vol. 107: Cytochrome P-450 Protocols*. Editado por: Phillips, IR y Shephard, EA. New Jersey: Humana Press Inc: 1-13.
- Galli E y Feijoo L. 2002. Citocromo P-450 y su importancia clínica: Revisión Actualizada. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 65; 187-201.
- Godard CAJ, Smolowitz RM, Wilson JY, Payne RS and Stegeman JJ. 2004. Induction of Cetacean Cytochrome P-4501A1 by β -Naphthoflavone Exposure of Skin Biopsy Slices. *Toxicological Sciences*, 8: 268-275.
- Gonzalez FJ and Nebert DW. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plants "warfare", molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends in Genetics*, 6(6): 182-186.
- González BL 1998. Papel del ciclohexanol en la Regulación de la actividad de la isoenzima CYP2E1. Tesis Profesional Químico Fármaco-Biólogo, Universidad de la Salle, México: 3-52.
- González-Jasso E, López T, Lucas D, Berthou F, Manno M, Ortega A and Albores A. 2003. CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicology letters*, 144: 55-67.
- Guengerich FP. 1993. Cytochrome P-450 Enzymes. *American Scientist*, 81 (5): 440-447.
- Guengerich FP. 1999. Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, 39: 1-17.
- Guengerich FP. 2002. Update information on human P-450s. *Drug Metabolism Reviews*, 34 (1&2): 7-15.
-

-
- Gut I, Terelius Y, Frantik E, Linhart I, Soucek P, Filipcova B and Kluckova H. 1993: Exposure to various benzene derivatives differently induces cytochrome P-450 2B1 and P-450 2E1 in rat liver. *Arch Toxicol*, 67(4): 237-243.
- Honkakoski P and Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochemical Journal*, 347: 321-337.
- Hukkanen J. 2000. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P-450 enzymes in human lung. Oulu University Press, D621: 1-68. Disponible en: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514258649/pdf> (citado Abril, 2004)
- Josephy PD. 1997. Cytochrome P-450. En: *Molecular Toxicology*. Editado por: Josephy PD, Mannervik B and Ortiz de Monte Ilano P. New York, Oxford University Press: 209-252.
- Kawajari K and Hayashi S. 1996. The CYP1 family. En: *Cytochromes P-450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides C. New York, CRC Press: 77-97.
- Koop DR. 1986. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Molecular Pharmacology*, 29(4): 399-404.
- Laemmli UK. 1970. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *Nature*, 227: 680-685.
- Lakshmi VM, Zenser TV and Davis BB. 1997. Rat liver cytochrome P450 metabolism of N-acetylbenzidine and N,N'-diacetylbenzidine. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(4): 481-488.
- Lesson TS, Lesson C y Paparo AA. 1990. Capitulo 11 Aparato Digestivo. En: *Texto/Atlas de Histología*. Traducido por Hernández C, México, Editorial Interamericana: 419-463.
- Lechevrel M, Casson AG, Wolf CR, Hardie LJ, Flinterman MB, Montesano R and Wild CP. 1999. Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa. *Carcinogenesis*, 20 (2): 243-248.
- Lin JH and Lu AYH. 1998. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*, Nov 35(5): 361-390.
-

-
- Lin JH, Chiba M and Baillie TA. 1999. Is the Role of the Small Intestine in First-Pass Metabolism Overemphasized? *Pharmacological Reviews*, 51(2): 135-157.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.
- Masaki R, Matsuura S and Tashiro Y. 1984. A biochemical and electron microscopic study of changes in the content of cytochrome P-450 in rat livers after cessation of treatment with phenobarbital, beta-naphthoflavone or 3-metilcholanthrene. *Cell Struct Funct*, 9(1): 53-66.
- Massaad L, de Waziers I, Ribrag V, Janot F, Morizet J, Beaune PH, Gouyette A and Chabot GG. 1992. Comparison of Mouse and Human Colon Tumors with Regard to Phase I and Phase II Drug-metabolizing Enzyme Systems. *Cancer Research*, 52: 6567-6575.
- Matsushima T, Sawamura M, Hara K and Sugimura T. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. En: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. Editado por: DeSerres FJ, Fouts JR, Bend JR and Philot RM. Elsevier / North-Holland, Amsterdam: 85-88.
- Maya JF. 1995. Citocromo P450 2E1 y diabetes. *Colombia Med*, 26: 26-9.
- McKay JA, Murray GI, Weaver RJ, Ewen SW, Melvin WT and Burke MD. 1993. Xenobiotic metabolising enzyme expression in colonic neoplasia. *Gut*, 34: 1234-1239.
- McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Roberts-Thomson SJ, Gonzalez FJ and McManus ME. 1995. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*, 36: 259-267.
- Miao W, Hu L, Kandouz M, Hamilton D and Batist G. 2004. A cell-based system to identify and characterize the molecular mechanism of drug-metabolizing enzyme (DME) modulators. *Biochemical Pharmacology*, 67(10):1897-1905.
- Murray GI, Shaw D, Weaver RJ, McKay JA, Ewen SW, Melvin WT and Burke MD. 1994. Cytochrome P450 expression in oesophageal cancer. *Gut*, 35: 599-603.
-

-
- Nakajima T and Wang RS. 1994. Induction of cytochrome P-450 by toluene. *International Journal of Biochemistry*, 26(12): 1333-1340.
- Nakajima T. 1997. Cytochrome P-450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass. *J Occup Health*, 39: 83-91.
- Nelson DR. 1998. Cytochrome P-450 Nomenclature. En: *Methods in Molecular Biology Vol 107: Cytochrome P-450 Protocols*. Editado por: Phillips IR and Shephard EA. New Jersey, Humana Press Inc: 15-24.
- Nims RA and Lubet RA. 1996. The CYP2B Subfamily. En: *Cytochromes P-450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides C. New York, CRC Press: 135-160.
- Pelkonen O and Raunio H. 1997. Metabolic Activation of Toxins: Tissue-Specific expression and metabolism in target organs. *Environmental Health Perspectives*, 105 (Suppl 4): 767-774.
- Peña C, Carter D y Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distribuido en Internet por Southwest Hazardous Waste Program en el sitio <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>. (Citado Abril, 2004)
- Ribeiro LP, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T and Lang MA. 2001. Rat Oesophageal Cytochrome (CYP) monooxygenase system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22 (11): 1877-1883.
- Ronis MJJ, Lindros KO and Ingelman-Sundberg M. 1996. The CYP2E Subfamily. En: *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides C. New York, CRC Press: 211-239.
- Rosenberg DW. 1991. Tissue-Specific induction of the Carcinogen Inducible Cytochrome P450 Isoform, P450IA1, in Colonic Epithelium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 284(1): 223-226.
- Ruckpaul K. 1989. Structural Aspects of cytochrome P-450, an introduction. En: *Cytochrome P450*. Editado por: Shuster, I. Inglaterra: Taylor & Francis Printers: 21-29.
-

-
- Santiago C, Bandrés F y Gómez-Gallego, F. 2002. Polimorfismos de Citocromo P450: Papel como Marcador Biológico. *Medicina del Trabajo*, 11(3): 130-140.
- Sharp PE and La Regina MC. 1998. *The laboratory rat*. CRC Press, USA: 4-15.
- Smith DA, Ackland MJ and Jones BC. 1997. Properties of cytochrome P450 isoenzymes and their substrates. Part 1: active site characteristics. *Drug Discovery Today*, Oct 2(10): 406-414.
- Sueyoshi T and Negishi M. 2001. Phenobarbital Response Elements of Cytochrome P450 genes and Nuclear Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41: 123-143.
- Tatemichi M, Nomura S, Ogura T, Sone H, Nagata H and Esumi, H. 1999. Mutagenic Activation of Environmental Carcinogens by Microsomes of Gastric Mucosa with Intestinal Metaplasia. *Cancer Reserch*, 59: 3893-3898.
- Towbin H, Staebelin T and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.
- Vermeulen NPE. 1996. Role of Metabolism in Chemical Toxicity. En: *Cytochromes P-450 Metabolic and Toxicological Aspects*. Editado por: Ioannides C, New York, CRC Press: 29-53.
- Vences-Mejía A, Caballero-Ortega H, Dorado-Gonzalez V, Gamboa-Dominguez A, Gomez-Ruiz C, Camacho-Carranza R and Espinosa-Aguirre JJ. 2005. Cytochrome P450 expression in rat gastric epithelium with intestinal metaplasia induced by high dietary NaCl levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20: 57 - 64.
- Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, Day PJ, Vorrhein C, Tickle IJ and Jhoti H. 2004. Crystal Structure Of Human Cytochrome P450 3a4. Pubmed. MIMDB 28823. Se encuentra en la siguiente dirección en internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&ruid=28823> (Citado Noviembre, 2005)
-

Wu X, Shi H, Jiang H, Kemp B, Hong WK, Delclos GL and Spitz MR. 1997. Associations between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, 18(5): 967-973.

Zhang Q, Wikoff J, Dunbar D, Fasco M and Kaminsky L. 1997. Regulation of Cytochrome P4501A1 in Rat Small Intestinal. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(1): 21-26.

Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J and Kaminsky LS. 1999. Characterization of Human Small Intestinal Cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, 27(7): 804-809.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.oxfordbiomed.com/help%20&%20specs/cyp1.htm> (Citado el 02 de septiembre, 2004)

www.cancer-genetics.org