



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO DE LA ISONIAZIDA SOBRE LA
CONCENTRACION DE CYP2E1 EN CEREBRO
DE RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

PRESENTA:

VALENCIA OLVERA ANA CAROLINA



MÉXICO, D.F.

2007.

**EXAMEN EN TITULO 1997
FACULTAD DE QUIMICA**



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.

Jurado asignado:

Presidente Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal Dr. José Pedraza Chaverri

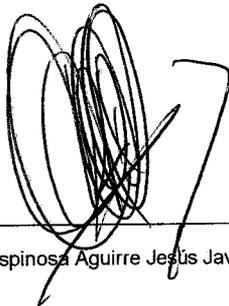
Secretario Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

1er. Suplente Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

2º. Suplente Profa. María Elena Bravo Gómez

Síto en donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNAM



Asesor: Espinosa Aguirre Jesús Javier



Sustentante: Valencia Olvera Ana Carolina

Dedicatorias

Dedico este trabajo con todo mi amor y cariño a mis padres María de los Angeles Olvera Treviño y Germán Valencia Vivanco, quienes me impulsaron exhaustivamente para concluir esta etapa de mi desarrollo y que increíble y exitosamente han soldado una familia feliz y única que ha sido mi motivo de inspiración y esfuerzo.

Mami, gracias por enseñarme lo grande que puede ser una mujer, gracias por fraccionarte en dos para ser una excelente madre y una profesional exitosa, gracias por predicar con el ejemplo, por heredarme el gusto por la ciencia, por ser siempre mi amiga, por tu incondicional entrega.

Papi, gracias por ser tan excepcional, por tu ejemplo, por tu coherencia, por tu calidad, por tus consejos, por compartir tu sabiduría, por demostrarme tu amor en tan incontables veces, gracias por prescindir de ti.

Dedico esta tesis a mis hermanas, princesitas bailarinas, bellos angelitos arquitectos y encantadoras lucecitas serafines, las adoro.

Tita, gracias por tus regaños y por permitirme ser tu amiga.

Lucecita, gracias por ser como eres y darme tantas satisfacciones.

El principal logro de este trabajo es el ejemplo.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente al Dr Javier Espinosa por su temprana confianza, por permitirme adentrar libremente en el conocimiento científico, por orientarme siempre con sus buenos consejos e indicaciones, por inculcarme las bases de la investigación, por ser siempre amable aún cuando mis errores eran evidentemente graves, por su preocupación de que siempre estuviera alguien para apoyarme y por su humildad al acercarse como un amigo en los momentos difíciles.

Agradezco al Dr Rafael Camacho sus enseñanzas tanto académicas como culturales, el haberme permitido escuchar sus mares de conocimientos y actitudes ejemplares, por concienciar un poco más mis pensamientos y por alegrar todo los días el laboratorio.

Agradezco a los miembros del jurado por revisar y comentar este trabajo:

A la Dra Isabel Aguilar Laurents por aceptar ser parte del jurado y por su dedicación como maestra de Química Orgánica.

Al Dr José Pedraza Chaverri por su asesoría y apoyo técnico en la parte de lipoperoxidación y por recibirme siempre tan afablemente.

Al Dr Marco Cerbón por dedicarme ese tiempo tan valioso.

A la Profa Maria Elena Bravo por llevar la docencia de una manera muy profesional y motivarme el gusto por la toxicología.

Agradezco a la Dra Araceli Vences y a los integrantes del laboratorio de toxicología genética del Instituto Nacional de Pediatría por su cordial recibimiento. En particular agradezco al QFB Víctor Dorado González por su paciencia, buena disposición y ejemplar voluntad de compartir sus conocimientos tan apreciables.

Agradezco también al Dr Emilio Rojas y la Dra Mahara Valverde por permitirme trabajar en su laboratorio, de igual forma agradezco a Martín por su apoyo y asesoría.

Agradezco a la Biol Sandra Luz Hernández por su confianza, por sus enseñanzas y por el apoyo constante durante la elaboración de este trabajo.

De una manera muy especial agradezco al Biol. Víctor M. Dávila por su absoluta participación en la parte experimental de la tesis, por sus clases, seminarios, discusiones y enseñanzas de la ciencia de los citocromos P450, por revisar y comentar tan atinadamente este trabajo, por brindarme su tiempo incondicionalmente y por ser tan buen amigo.

Particularmente agradezco a M en C Giovanna Salamanca por ser un factor clave en la elaboración de esta tesis, por contestar siempre mis preguntas, por presionarme en los experimentos, por la revisión meticulosa del trabajo escrito, por estar conmigo en todos los sentidos, por su amistad tan entrañable y principalmente por demostrarme que existen las personas íntegramente admirables.

Dedicatorias

Aprovecho la oportunidad de tanto protagonismo y la perpetuidad de este escrito, para dedicárselo a todas aquellas personas que han sido importantes en mi vida. Esta es mi muy particular manera de demostrarles que a pesar de la distancia y del tiempo que pudiera habernos separado, siempre los he tenido presentes.

Para mis abuelas María Mercedes Treviño[†] y María del Carmen Vivanco por ser mis segundas madres.

Para mi abuelo Germán Valencia P. que me inspiró la pasión por la ciencia biomédica.

Para Memo por acompañarme durante todo este tiempo, por apoyarme, por escucharme, por entenderme como nadie, por su amistad y por todo su amor.

Para Miss Teté que estuvo conmigo en momentos claves y me enseñó a sonreír y ver hacia adelante ante dificultades.

Para Osvaldo Borchi quien siempre confió en mí, me motivó a tener aspiraciones "grandes" y a luchar por alcanzar esa grandeza.

Para Kasan por su ejemplo.

Para Violeta por estar siempre.

Para mi querida madrina Marthe, para Paty "la consen", para Carlos por su sinceridad, para Fer por demostrarme su cariño, para Chepo por su amistad, para Ariadna por sus consejos, para Carlitos por todo su afecto, para Carmela por no quedarse callada, para Jorgito por alegrarnos, para Amanda por su objetividad, para Fernandita y Carla por su ternura y para Ximena y Elvia que se dejan extrañar.

Para Pello por su incondicional amistad y guía.

Para toda la familia Acosta Treviño.

Para mis amigos Caro, Mich, Lix, Rosy, Doug, Adry, Tania, Yeyu, Pit, Ross, Nay, Carla, Ana, Mar, Beto, Martinico y para las tres del 4x.

Finalmente y sin restarle importancia, para Blanquis por enseñarme que aún se pueden encontrar amistades verdaderas y para mis compañeros del laboratorio Conny, Claudis, J.C., Javis, Gio y Andreita por hacerme tan agradable la estancia en el laboratorio.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Ciclo catalítico del citocromo P450	3
2.2 Citocromo P450 y especies reactivas de oxígeno	5
2.3 Citocromo P4502E1 un importante generador de especies reactivas de oxígeno <i>in-situ</i>	7
2.4 Inducción de CYP2E1 por Xenobióticos	9
2.5 Isoniazida como un agente inductor de CYP2E1	11
2.6 CYP2E1 en cerebro	13
2.7 Estrés oxidativo en tejido cerebral y sus consecuencias	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
6. METODOLOGÍA	
6.1 Diagrama de flujo	20
6.2 Reactivos	21
6.3 Animales	21
6.4 Obtención de la fracción microsomal	22
6.5 Determinación de CYP totales	22
6.6 Análisis espectrofotométrico	22
6.7 Actividad específica	
6.7.1 Utilizando p-Nitrofenol	23
6.7.2 Utilizando N-Nitrosodimetilamina	23
6.8 Electroforesis e inmunodetección específica para CYP2E1	24
6.9 Evaluación de la lipoperoxidación	24
6.10 Análisis estadístico	24
7. RESULTADOS	
7.1 Determinación de CYP totales	25
7.2 Análisis espectrofotométrico	28
7.3 Actividad específica	
7.3.1 Utilizando p-Nitrofenol	29
7.3.2 Utilizando N-Nitrosodimetilamina	29
7.4 Electroforesis e inmunodetección específica para CYP2E1	31
7.5 Evaluación de la lipoperoxidación	32
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	34
9. REFERENCIAS	37

1. RESUMEN

El metabolismo *in situ* de compuestos endobióticos y xenobióticos en el tejido cerebral, es en gran parte mediado por enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP). Los CYP conforman un grupo de enzimas con gran versatilidad en la naturaleza que catalizan la inserción de oxígeno molecular estereoespecíficamente a una gran cantidad de compuestos orgánicos. Durante el ciclo catalítico de algunos CYP, en especial del citocromo P450 2E1 (CYP2E1), se forman intermediarios muy reactivos como son las especies reactivas de oxígeno. Una inducción del CYP2E1 en hígado por xenobióticos como el alcohol o el fármaco antituberculoso isoniazida (INH), se puede manifestar en la sobreproducción de especies reactivas y generar con esto daño celular y/o tisular. El daño oxidativo en cerebro ha sido relacionado a su vez con toxicidad en sistema nervioso periférico y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, sin embargo no se sabe a ciencia cierta el origen de este estrés.

Puesto que otros inductores de CYP2E1 hepático también inducen la enzima en cerebro, en el presente trabajo se plantea la posibilidad de que la INH pueda inducir el CYP2E1 en cerebro, que esta inducción esté acompañada de daño por estrés oxidativo y en consecuencia se pueda vincular con un proceso neurodegenerativo. Por otro lado, la INH se ha relacionado con neuropatías periféricas y su mecanismo es aún desconocido. Considerando lo anterior, el objetivo principal de este trabajo es el de inducir CYP2E1 en cerebro de rata con isoniazida, evaluar la inducción regioespecífica y detectar la generación de estrés oxidativo.

Para ello, se administró vía intraperitoneal 200 mg/kg de INH por 5 días a ratas macho Wistar de 250 g de peso corporal. Posteriormente se obtuvo la fracción microsomal de hígado y de diferentes regiones del cerebro. Con el fin de detectar a la enzima, su posible inducción así como la producción de radicales libres, se evaluaron los siguientes parámetros: concentración de CYP totales, inmunodetección de CYP2E1, cuantificación de actividad enzimática utilizando dos sustratos diferentes (N-Nitrosodimetilamina y p-Nitrofenol) y evaluación de la lipoperoxidación (LPO) por medio de la cuantificación del malondialdehído.

Los resultados presentan una aparente reducción en la concentración de CYP hepático total de ratas tratadas con INH. Un estudio de diferencia espectral sugiere que la INH o un metabolito de ella impide una correcta cuantificación de los CYP totales. Por otro lado, se logró detectar un incremento significativo en la actividad de CYP2E1 en el cerebelo e hígado de rata con respecto a su control. Mediante la técnica de western blot, se pudo comprobar la inducción específica del CYP2E1 por la INH en hígado pero no se encontraron niveles detectables de la proteína en ninguna de las regiones del cerebro evaluadas. En el caso de la cuantificación de la lipoperoxidación, no se encontraron diferencias significativas respecto a los testigos en ninguno de los tejidos analizados.

Los resultados muestran que la exposición a isoniazida provoca una inducción de CYP2E1 en hígado y cerebelo de rata. Aunque no fue posible detectar un incremento en la lipoperoxidación, no se puede descartar un posible daño del tejido que, tomando en cuenta las funciones del cerebelo, se puede ver afectado el equilibrio, la postura, los finos movimientos y el aprendizaje motor.

2. INTRODUCCIÓN

Citocromo P450 es el nombre con el que se conoce a una familia de enzimas muy versátiles en la naturaleza involucradas en el metabolismo oxidativo de moléculas orgánicas. Estas proteínas se han conservado ampliamente a lo largo de la evolución y se pueden encontrar en bacterias, hongos, plantas y mamíferos entre ellos los humanos. Los citocromo P450 son hemoproteínas que utilizan oxígeno molecular y dos cofactores para catalizar una gran variedad de inserciones de oxígeno estereoespecíficas y regioselectivas en compuestos exógenos o endógenos. Estos procesos son de vital importancia para los organismos ya que participan en la destoxificación y en la biosíntesis de diversos compuestos.

En eucariontes, los citocromos P450 se encuentran intracelularmente acoplados a una membrana ya sea del retículo endoplásmico liso (citocromo P450 microsomal) o de la membrana interna de la mitocondria, junto con otras enzimas donadoras de electrones como el citocromo P450 reductasa, el citocromo b5, y en caso de la mitocondria la ferredoxina reductasa. Debido a lo anterior, a todo el conjunto de citocromos P450 también se le conoce como el sistema MMO por sus siglas en inglés (Membrane-bound Microsomal Monooxygenase system)

Dependiendo de su función, las diferentes isoformas de los citocromos P450 se pueden encontrar distribuidos en varios tejidos del mismo organismo, por ejemplo, en humanos, las 15 isoformas involucradas en el metabolismo de xenobióticos se encuentran mayoritariamente en el hígado, y minoritariamente en otros tejidos como riñón, próstata, piel, epitelio nasal, gónadas, placenta, cerebro, pulmón, bazo, páncreas y tracto gastrointestinal (Lewis, 2003). Por otro lado, los CYP implicados en la biosíntesis de esteroides se encuentran en órganos productores de esteroides como testículos, ovarios y placenta.

El nombre de Citocromo P450 fue asignado después de que en 1964 Omura y Sato describieron en microsomas la presencia de un pigmento que al acomplejarse con monóxido de carbono y en presencia de un agente reductor (ditiotionita de sodio o NADPH), presentaba un pico máximo de absorción a los 450 nm. Tiempo después se determinó que este pigmento correspondía a un "nuevo" grupo de hemoproteínas que por sus características espectrofotométricas se le denominó citocromos P450, luego se acordó en reducir este nombre a las siglas CYP. Debido al descubrimiento de varias isoformas se procedió a clasificarlas según sus secuencias de aminoácidos.

Los miembros de una familia de CYP poseen más del 40% de similitud entre sus secuencias de aminoácidos y se les ha asignado un número, los números menores a 100, están reservados para eucariontes mientras que los mayores a 100 a procariontes. En una sub-familia sus miembros presentan más del 55% de similitud y se les asigna una letra, finalmente se asigna otro número que indica específicamente al miembro de la subfamilia. Por ejemplo, la isoforma más abundante en hígado humano, el CYP3A4, es la cuarta isoforma encontrada de la subfamilia A, de la familia 3, de los citocromo P450.

Para cada enzima, existen variantes alélicas o polimorfismos. Estas variaciones genéticas pueden manifestarse de diferentes formas en la enzima expresada, por ejemplo, pueden ocasionar que la enzima gane, disminuya o pierda su actividad.

Además de su función fisiológica y metabólica, los CYP están involucrados con procesos de mutagénesis y toxicidad. Existen evidencias de que algunas isoformas son capaces de activar compuestos exógenos (como fármacos o compuestos ambientales) haciéndolos más nucleofílicos y propiciando la formación de aductos con biomoléculas como proteínas o ADN, por otro lado, los CYP producen especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) durante su ciclo catalítico. La cantidad de ROS o el tipo de sustratos "activados" que se generen dependerá de la naturaleza de cada isoforma y de la especificidad del sustrato.

2.1 Ciclo catalítico del citocromo P450

La familia de los citocromo P450 es capaz de metabolizar una enorme gama de sustratos desde moléculas muy grandes y lipofílicas como los esteroides, hasta moléculas muy pequeñas y más polares como el alcohol y la acetona. La afinidad a los diferentes sustratos obedece al tamaño, a la hidrofobicidad y a los aminoácidos que integran cada bolsa catalítica del CYP en cuestión. Una característica común a todas las isoformas es su sitio activo de catálisis que es una protoporfirina IX o grupo hemo unido a una cisteína como quinto ligando.

La mayoría de la información acerca del ciclo catalítico de los CYP, se ha obtenido a partir de estudios cristalográficos de la enzima bacteriana CYP101 o CYPcam que es un citocromo soluble (encargado de metabolizar el alcanfor) aislado de *Pseudomonas putida*.

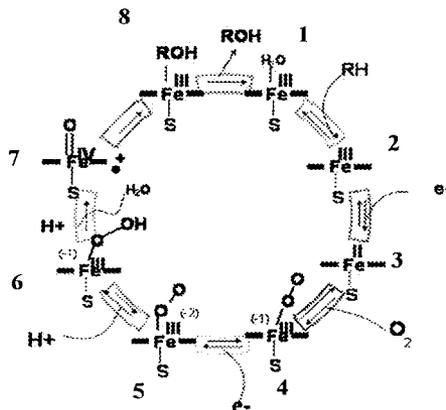


Figura 1 Ciclo catalítico teórico del citocromo P450, RH- Sustrato, ROH- Sustrato oxidado

Es importante señalar que los detalles del ciclo, aún no son comprendidos completamente y en efecto, solamente los cuatro primeros pasos representados en la figura 1 han sido caracterizados.

El hierro del grupo hemo se encuentra en su estado basal hexacoordinado con una molécula de agua (1), y con un estado de oxidación 3+, teniendo solamente un electrón desapareado, es decir tiene un espín de $\frac{1}{2}$, conformación que se conoce como bajo espín. El primer paso de la catálisis consiste en el desplazamiento de esta molécula de agua por el sustrato. El sustrato por lo general se

acomoda en el dominio lipofílico de la bolsa catalítica, incrementando la hidrofobicidad y al desalojar la molécula de agua cambia el espín del Fe arrojando la estructura pentacoordinada (2), a éste se le llama de alto espín ya que los 5 electrones del último orbital se encuentran desapareados (espín = 5/2).

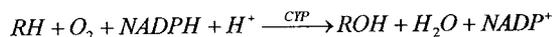
El segundo paso consiste en la reducción del complejo a un estado ferroso 2+ por la entrada de un electrón (3). La procedencia de este electrón dependerá del tipo de célula o de la localización del citocromo dentro de ella. En eucariontes, el electrón proviene de la oxidación de una molécula de NADPH que realiza la enzima NADPH citocromo P450 reductasa.

El tercer paso comprende la unión del oxígeno molecular al citocromo (que ya se encuentra en estado 2+) formando un complejo superóxido (4). A partir del cuarto paso no se tienen estructuras aisladas, sin embargo, se propone que debe ocurrir una segunda reducción en la que posiblemente se forman especies de oxígeno activadas. El origen de este segundo electrón radica también en la localización del citocromo.

En el quinto y sexto paso se adicionan dos protones al oxígeno, y se cree que durante la catálisis, propicia el rompimiento del enlace oxígeno-oxígeno y se libera agua. De este paso surge la especie representada como FeO^{3+} (7). Este complejo de alta valencia también puede ser escrito como $Fe^V=O$ pero su configuración electrónica exacta es desconocida.

El séptimo paso que corresponde a la conversión del sustrato al producto es desconocido. Existen varios mecanismos propuestos, que incluyen que la especie FeO^{3+} debe "extraer" un protón del sustrato y realizar la reacción la cual puede ser hidroxilación, dealquilación, deshidratación, deshidrogenación, isomerización, dimerización, unión carbono-carbono, entre otras.

Finalmente el producto es liberado y la enzima regresa a su estado basal en el octavo paso. La estequiometría de la reacción se puede resumir de la siguiente forma:

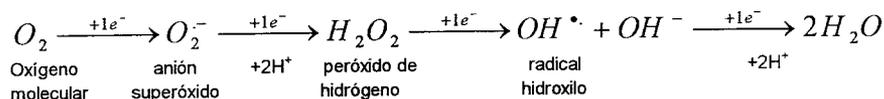


Este ciclo se puede llevar a cabo también en ausencia de sustrato, todo dependerá de la disponibilidad de los donadores de electrones y de la naturaleza de cada isoforma (para revisiones consultar Paul Ortiz de Montellano 2005).

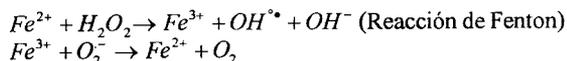
2.2 Citocromo P450 y especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son pequeñas moléculas derivadas del oxígeno altamente inestables. Ejemplo de ellas son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y los peróxidos orgánicos. Los niveles de ROS pueden incrementarse descontroladamente y resultar en un daño celular. Cuando ocurre un desequilibrio donde las especies oxidantes están en mayor proporción que las antioxidantes se conoce como estrés oxidativo (EO) y a éste se le ha relacionado con diversos padecimientos como envejecimiento (Martin y Grotewiel 2006), enfermedades hepáticas (Tanikara y Tomitura 2006), insuficiencia cardíaca (Tsutsui 2006), artritis reumatoide (Hitchon y El-Gabalawy 2004), cataratas (Shichi 2004), carcinogénesis (Toyokuni 2006), enfermedades neurodegenerativas (Halliwell 2006) y daños causados por la isquemia-reperusión (Galaris y col., 2006), entre otros.

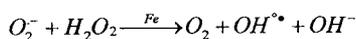
La principal fuente de ROS dentro de la célula es la mitocondria donde ocurre la siguiente transferencia de electrones:



Durante la reducción del oxígeno (cadena respiratoria), algunos productos intermedios son liberados. La especie reactiva de oxígeno liberada más dañina, reactiva o inestable es el radical hidroxilo. Actualmente se considera a las reacciones de Haber-Weiss como la principal fuente de ésta especie:



Reacción general :



Esquema 1. Ciclo de Haber-Weiss. El catión ferroso dona un electrón al peróxido de hidrógeno para formar un ión hidroxilo y un radical hidroxilo. Posteriormente el ión férrico recupera un electrón del superóxido para producir oxígeno y regenerar el catión ferroso (Mladenka y col., 2006).

Sin embargo, la cadena respiratoria no es la única generadora de ROS. Desde las primeras evidencias de la existencia de la familia Citocromo P450, a ésta se le ha asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno (Thurman y col. 1972) tales como el ión superóxido proveniente del peróxido de hidrógeno (Kuthan y col., 1978). Tiempo después se propuso la existencia de productos alternos debido al "desacoplamiento" de la reacción y hasta 1993 Loida y Sligar propusieron 3 desviaciones o vías que resultan en la liberación de productos alternos durante el ciclo catalítico del CYP (Figura 2).

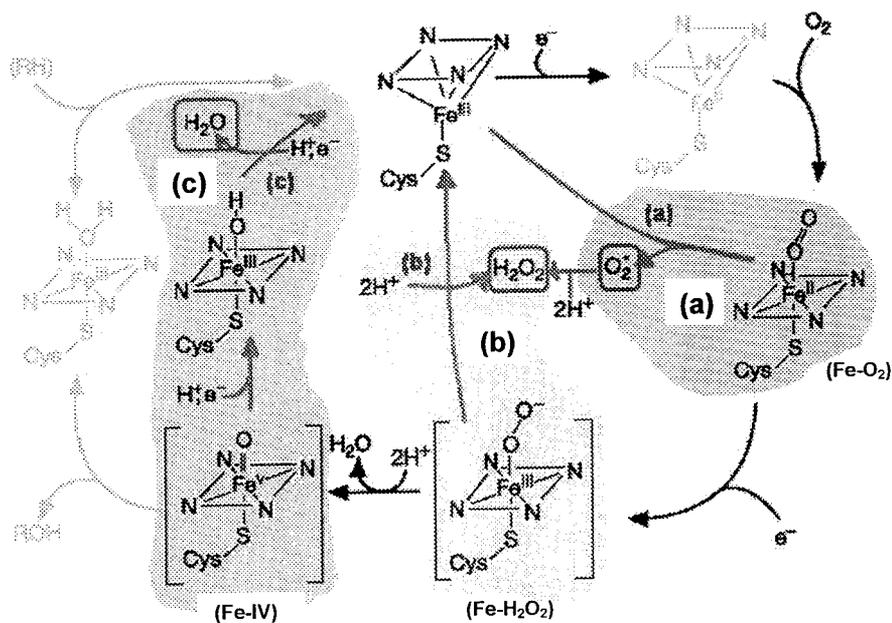


Figura 2. Ciclo catalítico de citocromo P450 con sus ramificaciones. Cada nube representa los puntos de desvío donde ocurre la "fuga" de productos. Modificado de Zangar et al., 2004.

La primera desviación (a) es la producción del radical ión superóxido gracias al decaimiento de un electrón en el complejo terciario "ferro-superóxido" (Fe-O₂). El segundo punto de desvío es debido a la protonación del oxígeno proximal del complejo "ferro-hidroperóxido" (Fe-H₂O₂) formando así peróxido de hidrógeno (b). El tercer punto de desvío requiere la adición de 2 electrones más a la especie FeIV para formar una molécula de agua (c). La continua producción de ROS es un resultado inevitable del consumo de NADPH por los P450 microsomiales ya sea en la presencia o ausencia de sustratos. Sin embargo, el que la reacción siga por sus diferentes ramificaciones dependerá de varios factores como del tipo de isoforma, de sustrato, del pH, de la concentración de oxígeno, fuerza iónica, y otros. (Blanck y col., 1991; Gorsky y col., 1984; Zhukov y Archakov, 1982, 1985).

La mayoría de la especies P450 son poco eficientes en cuanto al grado de acoplamiento o eficiencia de reducción del NADPH, aunque varía según cada citocromo (Gorsky y col., 1984). Aún en la ausencia de cualquier sustrato, la cadena transportadora de electrones microsomal, continúa oxidando NADPH y produciendo ROS. El sistema microsomal, aparentemente contribuye significativamente a la producción de ROS dentro de la célula, aún en condiciones basales. Tomando en cuenta el gran contenido de enzimas microsomiales, se puede inferir que éstas pueden ser una fuente importante de ROS en algunos tejidos (Zangar y col., 2004).

2.3 Citocromo P450 2E1 un importante generador de ROS *in-situ*

El citocromo P4502E1 (CYP2E1) antes conocido como Citocromo P450 Etanol-inducible, fue una de las primeras isoformas identificadas. En 1965 Orme-Johnson y Ziegler postularon la existencia de un sistema metabolizador de etanol distinto al de la alcohol deshidrogenasa. En 1968 Lieber y DeCarli nombraron a esta ruta de metabolismo del etanol como MEOS (por sus siglas en inglés Microsomal Ethanol Oxidizing System) Posteriormente, Ohnishi y Lieber (1973) sugirieron la presencia de un sistema microsomal con propiedades similares a las enzimas de citocromo P450. Finalmente en 1978 Miwa y colaboradores lograron solubilizar y reconstituir el sistema microsomal y contribuyeron con evidencias inequívocas de la función del citocromo P450 como metabolizador del etanol mediante un mecanismo NADPH dependiente.

Ingelman-Sundberg y col. (1981) explican la oxidación del etanol como una consecuencia de la liberación del ión hidroxilo por CYP2E1. Es decir, la producción de ROS como el peróxido de hidrógeno por el CYP2E1 puede desencadenar reacciones de tipo Haber-Weiss en presencia de Hierro libre dentro de la célula y esto en consecuencia producir ión hidroxilo que oxida directamente al etanol formando acetaldehído (fig 3). Aunque posteriormente se comprobó que también ocurre una reacción típica monooxigenasa (Cederbaum 1989) y que la reacción con el hidroxilo ocurre minoritariamente fue sorprendente el hecho de que la isoforma responsable del metabolismo del etanol fuera también una importante productora de ROS.

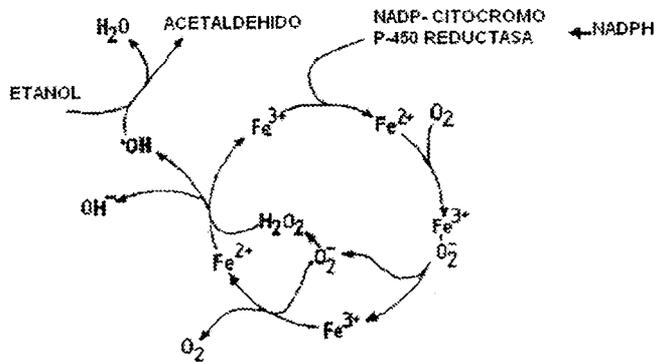


Figura 3. Esquema propuesto por Ingelman-Sundberg 1981 para la oxidación de etanol por CYP2E1

La primera evidencia de que el CYP2E1 produce ROS de forma más abundante que las demás isoformas fue determinada por Gorsky y col. (1984). Estos autores midieron directamente la producción de peróxido en ausencia de sustrato con las isoformas purificadas. Con estos estudios encontraron que el CYP2E1 exhibe una mayor actividad oxidativa ya que había un mayor consumo de oxígeno molecular. Un aumento en la actividad oxidativa resulta en una mayor producción de O₂⁻, H₂O₂ y OH⁻ que puede manifestarse en un incremento de la lipoperoxidación dependiente de NADPH. Posteriormente se comprobó que esta lipoperoxidación puede ser inhibida al utilizar anticuerpos específicos para CYP2E1 (Ekstrom, y col. 1989).

La razón por la cual CYP2E1 genera más especies reactivas que las demás isoformas no está descrita totalmente. Sin embargo, se sabe que a diferencia de las demás isoformas, CYP2E1 contiene una elevada proporción de la hemoproteína en el estado de alto espín aún en la ausencia de sustrato (Koop y col. 1982, Guengerich and Johnson 1997), esto facilita la continua entrada del NADPH al ciclo catalítico reduciendo así al oxígeno en repetidas ocasiones,

La sobreproducción de ROS dependiente de la inducción del CYP2E1 incrementa la lipoperoxidación de membranas biológicas incluyendo la membrana mitocondrial. Cualquier daño en la membrana mitocondrial modifica su permeabilidad y disminuye los niveles de ATP. Esto promueve una muerte celular de tipo necrótico o puede liberar citocromo c al citosol lo cual trae como consecuencia la activación de la ruta de las caspasas y con ello una muerte celular apoptótica (Caro y Cederbaum, 2004) (Figura 4).

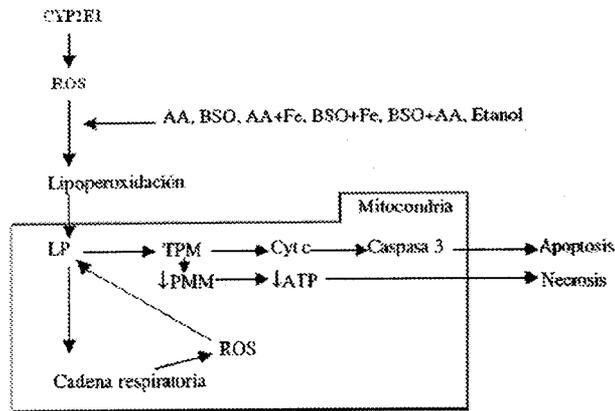


Figura 4. Esquema propuesto por Caro y Cederbaum para la toxicidad dependiente de CYP2E1 en hepatocitos. TPM.- Transición en la permeabilidad de la membrana, PMM.- Potencial de la membrana mitocondrial, Cyt c.- Citocromo c. El ácido araquidónico (AA), la butamina sulfoximina (BSO), el etanol y el Fe se utilizan como inductores de la enzima o de la lipoperoxidación.

Una gran cantidad de estudios evidencian concluyentemente el papel de CYP2E1 en la hepatotoxicidad del etanol (Cederbaum 1991), en la patogénesis de las enfermedades alcohol hepáticas (Nieto y col., 2002) y en la esteatohepatitis no alcohólica (Weltman y col., 1998, Villeneuve y col., 2004).

Además de la generación de ROS también se ha considerado a CYP2E1 como un cofactor carcinogénico hepatocelular ya que está involucrado en la activación metabólica de una gran cantidad de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y halogenados de bajo peso molecular como algunos solventes y monómeros de origen industrial, la mayoría de ellos candidatos a carcinógenos (Guengerich et al, 1991). De hecho, se ha encontrado relación entre los polimorfismos que incrementan la actividad de CYP2E1 con la susceptibilidad al cáncer esofágico, nasofaríngeo, pulmonar, renal, gástrico, colo-rectal, y hepático en algunos grupos étnicos (Danko y Chaschin 2005).

2.4 Inducción de CYP2E1 por Xenobióticos

El CYP2E1 es capaz de inducirse, es decir, aumentar sus niveles normales por acción de un efector. En los primeros estudios de este fenómeno, se tuvo una evidencia clara de que la ingesta crónica del etanol producía la proliferación del retículo endoplásmico liso en células hepáticas de rata (Iseri y col., 1966). Esto indicaba claramente que el CYP2E1 podía inducirse por algunos xenobióticos es decir, cambiar su proporción ante alguna sustancia exógena al organismo involucrado.

La inducción de CYP2E1 puede llevarse a cabo por tres mecanismos: activación de la transcripción (Ueno y González, 1990), estabilización del RNA mensajero (mRNA) (Song y col., 1987) o aumento en la eficiencia de la traducción (Kim y Novak, 1990) y estabilización de la proteína (Koop, Tierney 1990). Sin embargo, en el caso de la exposición a xenobióticos, se ha encontrado que la inducción se lleva a cabo principalmente por los dos últimos mecanismos post-transcripcionales (Novak y Woodcrott 2000).

Los niveles de proteína del CYP2E1 se elevan de 2 a 8 veces en células hepáticas como respuesta a la exposición a diferentes xenobióticos como el etanol, la piridina, el pirazol y la isoniazida sin que se aumenten los niveles de su mRNA (Ryan y col., 1985, Johansson y col., 1998, Palakodety y col., 1988, Kim y Novak, 1990, Zangar y col., 1993). Es por esto que el mecanismo de inducción más conocido o aceptado para CYP2E1 por xenobióticos es mediante la estabilización de la proteína, sin embargo, no todos los estudios coinciden. Por ejemplo, hay quienes reportan un incremento en los niveles de mRNA después de la exposición a etanol (Ronis y col., 1993), pirazol (Kubota y col., 1988) y acetona (Kraner y col., 1993). Este fenómeno se ha explicado como un mecanismo involucrado con la traducción. Kim y col. (1990) encontraron que una exposición a piridina, aumenta los niveles de la proteína de CYP2E1 aún en presencia de inhibidores de la transcripción, y no así en presencia de inhibidores de la traducción, adicionalmente encontraron una disminución en la concentración de colas poliadeniladas de RNA (poly(A)RNA) "libres" o en solución. Posteriormente Kocarek y col. (2000) comprobaron que poly(A)RNA y algunas secuencias que no fueron producto de la traducción, son importantes en la protección del mRNA del CYP2E1 de las RNAsas (enzimas que degradan los mRNA), sugiriendo que el aumento en las concentraciones de proteína del CYP2E1 es debido al incremento en la efectividad de la traducción de mRNA de CYP2E1 que ya existían previamente en la célula.

Por otro lado, la mayoría de las investigaciones arrojan evidencias de que el mecanismo de inducción de CYP2E1 por xenobióticos es debido a una alteración en la degradación natural de su proteína. Una de ellas incluye el estudio realizado por Eliasson y col. (1988) en el cual evaluaron la concentración de CYP2E1 en hepatocitos obtenidos de ratas control y en hepatocitos obtenidos a partir de ratas expuestas a 5 inductores de CYP2E1 (etanol, imidazol, 2-propanol, dimetilsulfóxido [DMSO] e isoniazida). Después de 3 días no se detectó al CYP2E1 en los hepatocitos testigo, sin embargo, en los hepatocitos obtenidos de ratas tratadas, el 50% del contenido inicial de CYP2E1 permaneció sin que se pudiera detectar su mRNA. Luego de esto, evaluaron si los inductores eran capaces de unirse al sitio activo de la enzima mediante estudios de diferencia espectral y cálculos de constantes de unión y encontraron que la habilidad del etanol, imidazol, 2-propanol y DMSO de

mantener los niveles del CYP2E1 correlacionaban con las constantes de unión calculadas a partir de la enzima purificada. Lo anterior sugirió que la unión de un ligando es necesaria para la estabilización de la enzima.

La presencia de un ligando al sitio activo, mantiene a la enzima en una conformación estable que impide su degradación. Como la síntesis (transcripción) no se ve alterada, la estabilización permite la acumulación de la enzima que en comparación con los testigos se manifiesta como una inducción.

A pesar de que el fenómeno de estabilización se planteó desde hace algunos años, hasta la fecha se desconoce con exactitud cómo se lleva a cabo la degradación del CYP2E1. En un principio se pensó que la proteólisis se lleva a cabo mediante un sistema autofagosomal/lisosomal (Ronis e Ingelman Sundberg, 1989, Ronis y col., 1991) ya que se detectó al CYP2E1 en compartimientos lisosomales. Posteriormente estos mismos autores propusieron la participación de una proteinasa (Eliasson y col., 1992) cuya identidad, eficiencia y actividad aún se desconoce.

Por otro lado, la mayoría de los estudios han propuesto una inhibición de la proteólisis mediada por ubiquitinación. Al respecto se ha propuesto que la actividad oxidativa del CYP2E1 modifica considerablemente a la proteína, es decir, los radicales libres producidos por el mismo ciclo catalítico, oxidan a la enzima y la "marcan" para que posteriormente sea degradada por el complejo proteosomal (Yang y Cederbaum, 1997, Goasduff y Cederbaum, 1999, Roberts, 1997). Al parecer en este proceso se encuentran involucradas dos chaperonas moleculares de choque térmico (heat shock Protein), la hsp90 (Goasduff y Cederbaum, 2000) y la hsp70 (Morishima y col., 2005)

Banerjee y col. (2000) realizaron una predicción molecular computarizada del dominio citosólico del CYP2E1, en esta estructura tridimensional encontraron un sitio de reconocimiento para la ubiquitinación y a partir de este estudio se propuso que esta secuencia de aminoácidos pudiera estar relacionada con la interacción de la enzima con el sustrato. Para comprobar esto, desarrollaron un anticuerpo policlonal específico para esta secuencia de aminoácidos. En ensayos *in vitro* encontraron que la exposición al anticuerpo de la enzima purificada inhibe tanto la ubiquitinación como la actividad específica. Estas observaciones sugirieron una asociación entre el dominio citosólico del CYP2E1 que participa en la unión al sustrato para la posterior catálisis y un sitio de reconocimiento para la ubiquitinación.

En contraste con lo anterior, Kim y Novak (1993) reportaron que aunque existe cierta relación entre las constantes de unión y la inhibición de las actividades, ésta no se correlaciona con la inducción por lo menos con los inhibidores estudiados. Por ejemplo, encontraron que el Tiazol inhibe fuertemente la actividad metabólica, exhibe la mayor afinidad por el CYP2E1 e induce 4 veces a la enzima pero, por otro lado, la Piridazina incrementa los niveles proteicos de CYP2E1 hasta 5 veces inhibiendo muy poco la actividad metabólica y uniéndose débilmente a la enzima.

Todas estas evidencias reafirman que la regulación de la expresión de CYP2E1 por xenobióticos involucra diversos mecanismos y que éstos dependen directamente del tipo de inductor.

2.5 Isoniazida como un agente inductor de CYP2E1

La isoniazida (INH), también llamada como la azida del ácido isonicotínico, es el fármaco utilizado como primera opción en el tratamiento y la profilaxis de la tuberculosis tanto en México (NOM-006-SSA2-1993) como en el resto del mundo (*International Standards of Tuberculosis Care (ISTC)*). Su metabolismo hepático consiste primeramente en su acetilación por la N-acetil transferasa produciendo acetil-isoniazida para posteriormente ser hidrolizado y liberar ácido nicotínico y acetilhidrazida.

Este fármaco empezó a utilizarse como antituberculoso a partir de 1952 (Mc Dermoth 1969) generando desde el principio efectos adversos, algunos de ellos metabólicos (Pauly 1953). Debido a esto se desarrollaron varios estudios acerca de su interacción con otros fármacos (Mazze y col., 1982; Rice Talcott 1979) concluyendo que la INH de alguna forma inducía su metabolismo.

Posteriormente en 1985 Ryan y colaboradores, lograron aislar y purificar una enzima que se encontró en mayor concentración en microsomas de rata después de ser tratadas con isoniazida (Ryan y col., 1985). La enzima se trataba del CYP2E1 en aquel entonces llamada P-450j. Un año después estos mismos investigadores lograron comprobar que dicha enzima purificada inducida por INH se trataba de la misma que podía ser inducida por el etanol (Ryan y col. 1986).

En estudios posteriores se sugirió que el mecanismo de la inducción se realiza vía la estabilización de la proteína (Zand y col. 1993, Carroccio y col., 1994) o vía aumento en la efectividad de la traducción (Park y col., 1993).

El mecanismo de inducción post-transcripcional se comprobó con un comportamiento farmacocinético particular donde interaccionan la isoniazida con el paracetamol (Epstein y col., 1991; Chien y col., 1997; Zand y col. 1993) y la hidroxilación de la cloroxazona (O'Shea y col., 1997). Esta interacción farmacocinética se considera especial por su comportamiento inhibidor/inductor que dependerá de la concentración plasmática de INH, es decir, mientras la isoniazida esté presente en el organismo, ésta se coordinará con la enzima en su sitio catalítico e inhibirá su actividad. Por otro lado, esta coordinación estabilizará la enzima impidiendo su degradación y con esto permitiendo su acumulación. Cuando los niveles de INH sanguíneo disminuyen, se libera el sitio catalítico de la enzima y permite que algún sustrato (como la cloroxazona) ingrese en todas las enzimas "estabilizadas" y se oxide. Comparando con un testigo, el resultado de estas interacciones, puede manifestarse como una inducción de la actividad (Figura 5).

Además de los efectos adversos metabólicos, el consumo de la INH está acompañado con hepatotoxicidad (Vasudeva y Woods 1997). Uno de los orígenes de esta hepatotoxicidad puede ser la sobreproducción de ROS en el tejido hepático (Shodi y col., 1997). Diversos estudios han querido adjudicar el posible estrés oxidativo generado a la inducción específica de CYP2E1 por INH (Yue y col., 2004; Huang y col. 2003). Incluso, en un estudio del 2006, se logró correlacionar polimorfismos del CYP2E1 con la susceptibilidad al daño hepatotóxico por INH (Vuilleumier y col., 2006).

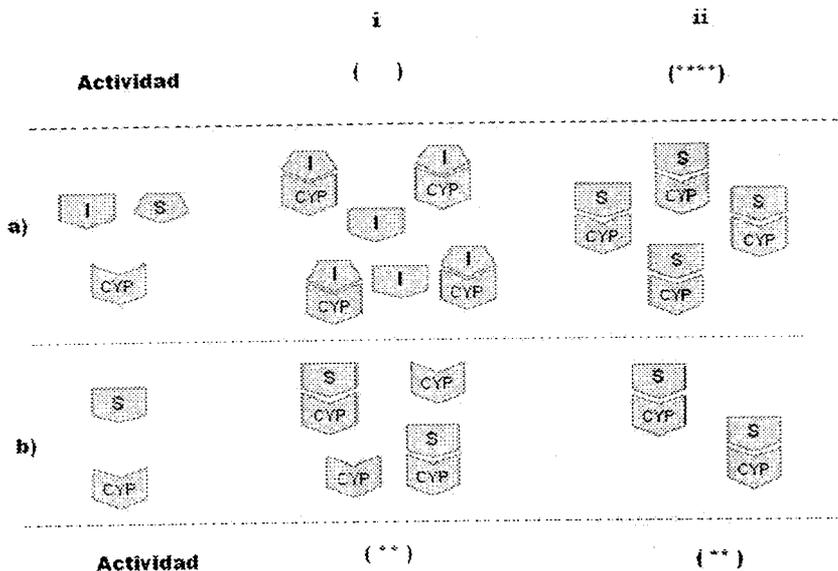


Figura 5. Interacciones del Citocromo P450 (CYP), Sustrato (S) e Inductor/Inhibidor (I) que generan la inducción vía estabilización de la proteína. a) Sistema en presencia de I, b) Sistema en ausencia de I, i) Comparación de los niveles de actividad de CYP en presencia o ausencia de I, en el caso de la presencia de I no se ve reflejada ninguna actividad por lo que se comporta como un inhibidor ii) Comparación de los niveles de actividad después de la presencia de I (a) o en ausencia de I (b). En el caso de la presencia de un I la actividad aumenta, es decir, actúa como un inductor.

Conjuntamente a los daños en hígado, la ingesta crónica de INH se ha asociado con aparición de neuropatía periférica (afección del nervio periférico en cualquiera de sus componentes básicos, la mielina o el axón) (Jacobs 1979) y en casos de sobredosis, con neurotoxicidad (McLay y col., 2005; Lockman y col., 2001). Estos padecimientos se manifiestan desde el inicio del consumo de la INH (Jones Jones 1953, Lubing 1953, Macleod 1954) por lo que ha sido tema de varias publicaciones. Un gran número de investigadores han tratado de explicar el mecanismo que genera las neuropatías, sin embargo, no se ha logrado dilucidar completamente. Entre las investigaciones realizadas, destaca la teoría de que la INH modifica el metabolismo de la piridoxina (Blakemore y col., 1972, Snider 1980), ya que se descubrió desde muy temprano que la piridoxina se comportaba como un antídoto de la neuropatía (Carlson y col. 1956). La piridoxina es una vitamina importante para la síntesis del neurotransmisor GABA, una disminución en la concentración del neurotransmisor, provoca excitación del sistema nervioso que se puede manifestar a su vez, como síntomas característicos la neuropatía periférica (Gammon y col., 1960).

Por otro lado Sanfeliu y colaboradores proponen una posible intervención de ROS (Sanfeliu y col., 1999).

2.6 CYP2E1 en cerebro

Todas las células aeróbicas sufren daño oxidativo, sin embargo, las del cerebro son especialmente sensibles. Considerando que CYP2E1 puede metabolizar y activar una gran cantidad de compuestos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, que tiene una alta actividad oxidativa capaz de generar especies reactivas, y que además interviene en el metabolismo de una gran cantidad de compuestos endógenos, fue de gran interés estudiar si esta enzima se encuentra en cerebro y evaluar así su impacto fisiológico y toxicológico.

La primera evidencia de que el CYP2E1 se expresa en cerebro de rata fue proporcionado por Hannson y col. (1990). Varios estudios se han realizado para detectar la presencia de CYP2E1 en cerebro de varios organismos. La tabla 1 resume algunas de las investigaciones realizadas entre 1990 y 2006. Con estudios de inmunohistoquímica se sabe que la enzima se encuentra distribuida heterogéneamente en los diferentes tipos de células cerebrales encontrándose en mayor proporción en las neuronas (Kapoor y col. 2006). Se ha logrado inducir a la enzima con etanol, estreptozotocina, pirazol, acetona, nicotina y aspartame, medir su actividad mediante diferentes técnicas y en diferentes tejidos y detectar a la proteína por inmunoensayos (Ver Tabla 1). Un dato interesante es que la inducción puede ser exclusiva para tejido cerebral en el caso de la ingesta crónica de nicotina (Anandatheerthavarada y col., 1993) y de aspartame (Vences-Mejía y col., 2006).

Hay que considerar que debido a la "hermeticidad" del cerebro, la presencia de esta enzima puede crear un micro-ambiente independiente de la concentración plasmática y fungir como catalizador de xenobióticos, sintetizador de compuestos y generador de estrés oxidativo *in situ*.

Montoliu y col. (1994) relacionan la generación de especies reactivas en cerebro de rata y astrocitos (Montoliu y col. 1995) con la inducción de CYP2E1 por etanol. Raza y col. (2004) han encontrado esta relación en cerebro de ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) efecto que se logra contrarrestar con ácido ascórbico según un estudio de Ahn y col., (2006).

Por otro lado, la presencia de CYP2E1 en cerebro de rata se ha podido ligar mediante estudios de polimorfismos con una ligera susceptibilidad a la generación de tumores cerebrales como glioma y neuroma acústico (De Roos y col., 2003, Agundez y col., 2004).

Varias evidencias soportan que el mecanismo de inducción de la enzima en cerebro es mediante la estabilización de la proteína. Por ejemplo, transcurrido un tiempo después de la exposición de la nicotina, los valores de CYP2E1 regresan a sus niveles normales (Joshi y Tyndale 2006) sin que se encuentren altos niveles de mRNA (Howard y col., 2001) y además se detecta una inhibición de la degradación (Micu y col., 2003). En este año Joshi y Tyndale proponen en su estudio que el mecanismo de inducción se basa en un incremento en la eficiencia de la traducción como ocurre con la piridina (Kim y Novak, 1990).

Organismo	Localización Antes / Después de inducir	Inducción con...	Técnica utilizada	Referencia
Rata	BO VS CZ T CB SN MB	Sin inducir	IHQ	Hansson y col. 1990
Rata	Cerebro Completo	Sin inducir	WB	Jayyosi y col. 1992
Rata	GB CB / GB CB SN H	Etanol	IHQ	Shoda y col. 1993
Rata	CC / CC	Etanol	PNP NDMA	Anandatheerthavarada y col. 1993
	/ CZ H GB BS		IHQ	
Rata	/ CZ T CB BS H	Nicotina	NDMA e IHQ	Anandatheerthavarada y col. 1993b
Humano	CB CZ	Sin inducir	IHQ RT-PCR	Farin y col., 1993
Rata	Cerebro completo	Sin inducir	PCR	Hodgson y col. 1993
Rata	/ BO	Etanol	WB	Warner y Gustafsson 1994
Rata	/ Cerebro completo	Etanol	WB	Roberts y col. 1994
Rata	/ Mitocondria CC	Etanol	NDMA, PNP	Bhagwat y col. 1995
Rata	/ H	Etanol	CZN	Tindberg y col. 1996
Rata	Cerebro completo	Sin inducir	RT-PCR PCR	Yoo y col. 1997
HumPre	Cerebro completo	Sin inducir	RT-PCR	Boutelet-Bochan y col. 1997
Rata	SN / SN	INH	IHQ	Watts y col. 1998
Rata	CB BS	Sin inducir	NDMA WB SB	Tirumalai y col. 1998
HumPre	Cerebro completo	Gestación	WB CZN	Brzezinski y col. 1999
Rata	CB CZ H BS / CZ H	Etanol	CZN WB NB IHQ	Upadhyay y col. 2000
Humano	CZ CB T H MB	Sin inducir	IHQ CZN WB NB	
Rata	Inhibición CC	LPS	CZN	Renton, Nicholson 2000
Rata	/ BO CF H CB	Etanol	WB IHQ	Howard y col. 2003
Rata	/ BO CZ OB CB BS	Nicotina	WB IHQ	
Humano	CZ H C MB CB H	Alc/Fum	IHQ	
Rata	MitCC CC	STZ-diab	WB	Raza y col. 2003
Ratón	CC GB	Sin inducir	IHQ WB RT-PCR	Vaglini y col., 2004
Humano	Cerebro Completo	Sin inducir	PCR PCR-RT	Choudhary y col. 2005
Primate ¹	CC H CZ T BS CB / CZ CB	Nicotina	WB IHQ	Joshi Tyndale 2006b
Rata	/ CB	Aspartame	WB PNP	Vences-Mejia y col. 2006
Rata	H CB BO Hi / H CB Hi BO	EtOH Pir	NDMA WB	Yadav y col. 2006
		Acetona	RT-PCR	

Tabla 1 Investigaciones que demuestran la presencia de CYP2E1 en cerebro de 4 organismos. En la segunda columna se indica el tejido analizado, si la detección fue antes o después de inducir y en el caso de haber inducción en la tercera columna se indica el nombre del inductor. HumPre-Humano Prenato, BO-Bulbo olfatorio, VS-Vasos sanguíneos, CZ-Corteza, T-Tálamo, CB-Cerebelo, SN-Sustancia negra, MB-Materia blanca, CC-Cerebro completo, GB-Ganglia basal, H-Hipocampo, BS-Tallo cerebral, NT-Núcleo talámico, Hi- Hipotalamo, Pir-Pirazol EtOH- Etanol LPS-Lipopolisacárido IHQ- Inmunohistoquímica WB-Western blot NDMA- Actividad con n-nitrosodimetilamina PNP- Actividad con p-nitrofenol CZN- Actividad con cloroxazona Alc/Fum -Alcoólicos fumadores, PCR-reacción en cadena de la DNAPolimerasa RT-PCR Transcriptasa reversa del PCR NB-Northernblot.

¹ Mono verde africano (African green monkey)

Recientemente Vasiliou y col. (2006) demostraron que la expresión de este CYP afecta directamente la concentración del acetaldehído formado a partir del etanol y que esto correlaciona directamente con la somnolencia de las ratas experimentales, lo cual coincide con lo obtenido por Zimatkin y col., (2006) en donde describen que el CYP2E1 tiene un papel más importante que la alcohol deshidrogenasa en la oxidación del etanol en cerebro. Con el estudio de Boutelet-Bouchan se demuestra la inducción del CYP2E1 en cerebro de feto humano lo que aportaría información sobre la patogénesis del Síndrome alcohólico fetal (FAS) que afecta principalmente al tejido nervioso del feto (Boutelet-Bouchan y col., 1997).

En el cerebro humano, los niveles de CYP2E1 se encuentran mayoritariamente en las neuronas piramidales de la corteza frontal, en las neuronas piramidales del hipocampo, en las células granulares del giro dentado y en las células Purkinje del cerebelo (Howard y col., 2003). Todas estas regiones son las que más sufren daño por el abuso del alcohol (Fadda y Rosetti, 1998)

Especialistas en la enfermedad de Parkinson (PD) encontraron la expresión y la inducción de CYP2E1 en la sustancia negra (Riedl y col., 1996, Watts y col., 1998). Este hallazgo fue de gran interés porque la patología de PD se caracteriza por la pérdida de por lo menos el 60% de las neuronas dopaminérgicas localizadas en esta zona, además, explicó de cierta forma el fenómeno de parkinsonismo (expresión de síntomas motores del parkinson) por la exposición a n-hexano (Pezzoli y col., 1995). El CYP2E1 localizado en las células contenedoras de dopamina en la sustancia negra puede metabolizar al n-hexano produciendo la 2,5-hexanodiona y a la vez degenerar las neuronas contenedoras del CYP (Jenner 1998). La localización específica de esta enzima en la sustancia negra genera preguntas en cuanto a su papel fisiológico. Una de estas preguntas corresponde a si el CYP2E1 interviene en la generación de ROS y con ello participa en la transducción de señales como es el caso de las especies reactivas de nitrógeno. Otra de ellas es si el CYP2E1 está involucrado en la síntesis o metabolismo de la dopamina, lo que fue contestado con las investigaciones de Nissbrandt y col. (2001) donde encuentran que una inhibición de CYP2E1, aumenta la concentración de dopamina y asumen que el CYP2E1 participa de manera importante en el metabolismo de este neurotransmisor.

La degeneración de las células dopaminérgicas de la sustancia negra en pacientes con PD es provocada aparentemente por la combinación de factores genéticos y ambientales. El hecho de que CYP2E1 se encuentre precisamente en las neuronas dopaminérgicas, puede ser relevante debido a que el CYP oxida el alcohol a acetaldehído y éste puede a su vez condensarse con la dopamina o la serotonina formando así isoquinolonas neurotóxicas (Han y col., 1996) y con ello daño celular. El aumento en la formación de ROS por el CYP2E1 puede contribuir al estrés oxidativo que degenera a la sustancia negra en la patogénesis del PD. Por otra parte, Patel y col., (2006) lograron detectar una inducción del CYP2E1 después de una administración crónica del paraquat, insecticida que se ha relacionado con parkinsonismo.

En contraste con lo anterior, Tyndale y Miskys proponen que la presencia de CYP2E1 en cerebro contribuye a la neuroprotección contra el PD, ellas se basan en la inducción de la enzima por la nicotina y la terapia con nicotina para disminuir el progreso de la enfermedad. (Miskys y Tyndale, 2006). Hay algunas evidencias que soportan esta teoría. Entre ellas la relación del CYP2E1 con la

destoxificación de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Vaglini y col., 2004) que se utiliza para inducir la degeneración de la sustancia negra y así desarrollar el PD en ratones experimentales. Además a la fecha, no se ha encontrado una relación entre PD y polimorfismos de CYP2E1 en estudios realizados con pacientes ingleses (Bandmann y col., 1997), chinos (Wang y col., 2000), y taiwaneses (Wu y col., 2002).

Por otro lado en humano, no se han detectado la proteína de CYP2E1 en SN aunque sí en escasa proporción el mRNA (Farin y Omienciski 1993).

2.7 Estrés oxidativo en tejido cerebral y sus consecuencias

El consumo de oxígeno en cerebro es alrededor del 20% del consumo total del organismo. En la literatura se mencionan varias "situaciones" en el cerebro que lo hacen más vulnerable al daño oxidativo. Ejemplo de estas situaciones son: la presencia de aminoácidos excitotóxicos (como el glutamato) producto de la muerte celular de otras células; la generación de O_2^- mitocondrial que aumenta con la edad; la propiedad que tienen muchos neurotransmisores como la dopamina de auto-oxidarse y producir conjugados o radicales neurotóxicos; el alto contenido de hierro libre en varias regiones cerebrales; los lípidos de la membrana neuronal que son de alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); la generación de una alta concentración de H_2O_2 vía superóxido dismutasa, monoamino oxidasa, flavoenzimas, etc.; la escasez de defensas antioxidantes; la presencia de macrófagos dentro de algunas células glia; la gran cantidad de CYPs (Halliwell 2006); la ubicuidad de óxido nítrico dentro de las neuronas; la escasez de catalasa, glutatión peroxidasa y vitamina E en comparación con el hígado y por último el hecho de que las neuronas no se dividen y cualquier daño al tejido cerebral tiende a ser acumulativo conforme transcurre el tiempo (Cui y col., 2004).

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas presentan diferentes síntomas, afectan diferentes regiones del cerebro y surgen por diferentes causas, sin embargo, estos padecimientos tienen en común la evidencia de la participación del estrés oxidativo (EO) (Simonian 1996), entre ellas se encuentran la Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Huntington, Esclerosis Amiotrófica Lateral y Ataxia de Friedrich siendo las dos últimas de origen hereditario.

Envejecimiento cerebral y EO

El factor de riesgo más consistente relacionado a enfermedades neurodegenerativas es el propio envejecimiento de las células. Durante dicho envejecimiento, el cerebro sufre modificaciones tanto morfológicas como funcionales afectando las células dendríticas, las sinapsis, la neurotransmisión, la circulación y el metabolismo que se ve reflejado en alteraciones del sistema motor, sensorial, de sueño, memoria y aprendizaje.

Se ha propuesto que el decaimiento de las funciones mitocondriales en relación con el desacoplamiento de la cadena respiratoria y la "fuga" de ROS está directamente relacionado con el

deterioro progresivo de las funciones cerebrales. Esto se ha comprobado con un aumento, conforme a la edad, de: deleciones del DNA mitocondrial, concentración de la especie 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH'dG) que es producto de la oxidación de la deoxiguanosina por diferentes ROS, la concentración de proteínas y lípidos oxidados y un decremento en la concentración de glutatión que es una molécula de defensa antioxidante. (Para revisiones ver Schulz y col., 2000, Cui y col., 2004, Mariani y col., 2005)

Enfermedad de Parkinson y EO

El parkinson se caracteriza por temblor, lentitud de movimientos voluntarios y rigidez muscular. Fisiológicamente se produce por la pérdida de neuronas dopaminogénicas en la sustancia negra. El mecanismo de esta muerte celular aún no está totalmente elucidado sin embargo, datos experimentales soportan una intervención del aumento de estrés oxidativo, de la disfunción mitocondrial y excitotoxicidad.

Varias evidencias han permitido relacionar el EO con la enfermedad, por ejemplo hay una generación normal de ROS durante el metabolismo de la dopamina y además la oxidación de ésta puede generar semiquinonas muy tóxicas; en la sustancia negra de cerebros post mortem se ha encontrado un alto contenido de depósitos de hierro, un decremento en el glutatión, productos de la lipoperoxidación, oxidación del DNA (8OH'dG) y oxidación del RNA (8OHG). En pacientes que aún no evidencian el fenotipo del padecimiento, se ha encontrado agregación de proteínas dependientes de EO lo que demuestra que es un rasgo característico temprano de la enfermedad. Adicionalmente, se ha encontrado en pacientes microglías activadas conocidas por liberar radicales y citocinas inflamatorias y además se ha encontrado disfunción mitocondrial particularmente en el complejo I de la cadena respiratoria. (Para revisiones ver Schulz y col., 2000, Cui y col., 2004, Mariani y col., 2005, Halliwell y col., 2006, Koutsilieri 2002)

Enfermedad del Alzheimer y EO

El Alzheimer (AD) se caracteriza por deterioros cognitivos y trastornos conductuales. Algunos síntomas son la pérdida de la memoria, la pérdida del idioma, desorientación en tiempo y espacio. Histopatológicamente, se caracteriza por la pérdida de sinapsis, pérdida de células neuronales (principalmente en la corteza cerebral, hipocampo y amígdala), deposición extracelular de la proteína β -amiloide (que forma placas seniles) y la precipitación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada (que forma "marañas" neurofibrilares). El mecanismo de la patogénesis aún es desconocido, sin embargo, existen dos teorías importantes, la primera propone una pérdida masiva de la acetilcolina y la segunda una posible implicación del EO.

Las evidencias son las siguientes: desaceleración de los síntomas de la enfermedad por la ingesta de vitamina E; disfunción mitocondrial por la disminución del complejo IV de la cadena respiratoria; acumulación de hierro en las placas seniles; incremento en la concentración de 8OH'dG,

proteínas oxidadas, y 8OHG. (Para revisiones ver Aslan 2004, Schulz y col., 2000, Cui y col., 2004, Mariani y col., 2005, Halliwell y col., 2006).

Esclerosis lateral amiotrópica (ALS) y EO

La ALS se caracteriza por una degeneración progresiva de las neuronas motoras de la médula espinal, corteza y tallo cerebral que se manifiestan en debilidad y atrofia muscular. El 10% de los casos son hereditarios y el resto esporádicos. En casi todos los casos estudiados de esta enfermedad hereditaria se ha encontrado una mutación en el gen que codifica para la superóxido dismutasa SOD (otra de las enzimas de defensa antioxidativa) pero aún no está claro si la enfermedad está relacionada con la inactivación de la enzima o con la aparición de otras funciones como respuesta a la mutación. Evidentemente, hay varios estudios que señalan esta oxidación excesiva en el tejido, como por ejemplo: disfunción mitocondrial en los complejos I y IV de la cadena respiratoria; deposición de hierro en las neuronas motoras; y un aumento en los niveles de 8OH'dG, HNE y 3-nitrotirosina (producto de la reacción entre especies reactivas de nitrógeno y tirosina). (Para revisiones ver Cui y col., 2004, Mariani y col., 2005, Halliwell y col., 2006).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas involucran al estrés oxidativo como una consecuencia o un factor clave en su etiología (Halliwell y col., 2006). Son muchas las propuestas que pudieran explicar el origen del estrés oxidativo en el tejido cerebral, sin embargo, no se han encontrado evidencias contundentes.

El CYP2E1 es una enzima presente en el tejido cerebral (Yadav y col., 2006) involucrada en el metabolismo de sustancias endógenas y exógenas que, durante su ciclo catalítico, tiene una fuga considerable de especies reactivas de oxígeno capaces de desencadenar estrés oxidativo (Lieber 1997).

El presente estudio pretende explorar la posibilidad de que el CYP2E1 presente en cerebro, es capaz de generar estrés oxidativo después de la exposición a un inductor específico tal como la isoniazida, la cual es el fármaco utilizado como primera elección en el tratamiento y la profilaxis de la tuberculosis. En algunos casos, la ingesta de este fármaco se ha relacionado con daño en el sistema nervioso y hasta la fecha no se ha elucidado perfectamente su mecanismo de acción (Sanfeliu y col., 1999).

4. HIPÓTESIS

La isoniazida será capaz de inducir CYP2E1 y estrés oxidativo en diferentes regiones del cerebro de rata.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Encontrar una inducción regioespecífica de CYP2E1 por la exposición a isoniazida en cerebro de rata mediante la detección de la proteína específica, la actividad enzimática y la producción de daño oxidativo.

Objetivos particulares

- Obtener fracción microsomal de corteza, cerebelo, hipocampo, tallo cerebral, bulbo olfatorio y de hígado tanto de ratas testigo como tratados con INH
- Cuantificar la concentración de CYP totales en los microsomas de hígado y corteza
- Medir la actividad específica de CYP2E1 en microsomas.
- Detectar la concentración de CYP2E1 en los microsomas.
- Detectar lipoperoxidación en los microsomas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama de flujo

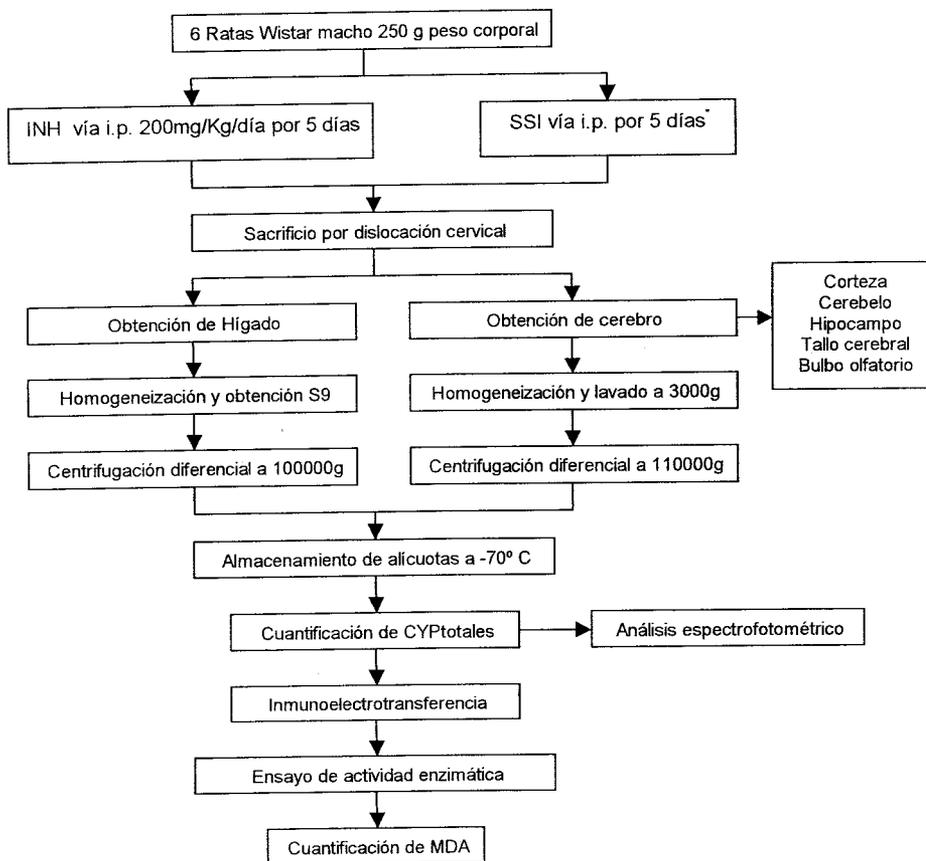


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología realizada. SSI- Solución salina isotónica; INH- Isoniazida; MDA-Malondialdehído. * Se administró el mismo volumen que las tratadas con INH

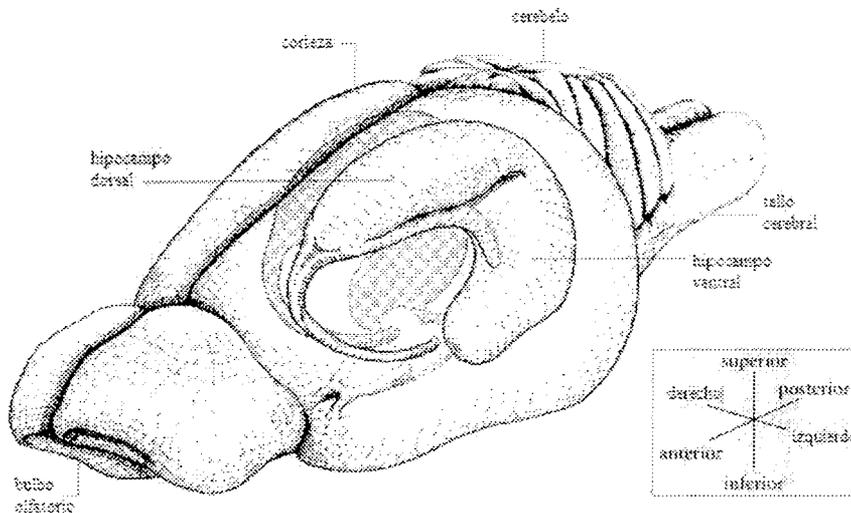
6.2 Reactivos

La isoniazida (INH), NADPH, ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 4-nitrofenol (PNP), 4-nitrocatechol, N-nitrosodimetilamina (NDMA), ácido etilenediamintetracético (EDTA), Ditiotrietol DTT, Triton X-100, 3,3-diaminobenzidina y el trimetoxipropano fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). El ácido tiobarbúrico fue adquirido en Fluka Chemicals. El anticuerpo policlonal de cabra anti-CYP2E1 y el segundo anticuerpo anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa fueron adquiridos de BD-Gentest (Woburn, MA, USA)

6.3 Animales

Se utilizaron 6 ratas macho cepa Wistar con un peso corporal promedio de 250 g (Bioterio Instituto de Investigaciones Biomédicas). Se les dividió en dos grupos, a uno de ellos se le administró por vía intraperitoneal INH a una dosis de 200 mg/kg/día por 5 días (Watts y col., 1998) y al grupo restante, se le administró solución salina isotónica (SSI) durante el tratamiento. Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical tres horas después de la última administración e inmediatamente se les decapitó y se obtuvo el tejido hepático y cerebral.

El cerebro se disectó en 5 regiones: corteza, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatorio y tallo cerebral tomando en cuenta los cortes descritos por Glowinski e Iversen 1965 (Dibujo 1).



Dibujo 1. Dibujo modificado de Cheung y Cardinal 2005. Aquí se indican las regiones del cerebro disectadas.

6.4 Obtención de la fracción microsomal

El hígado fue homogeneizado en una solución de KCl 0.15 M, se centrifugó a 9000 g para obtener la fracción postmitocondrial (S9). Posteriormente, esta fracción se resuspendió en una solución de fosfatos con sacarosa 0.32 M y se centrifugó a 100,000 g por 1 hora a 4°C para la obtención de fracción microsomal. El botón se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 20%. Se dividió el volumen en pequeñas alícuotas para su conservación a -70°C hasta su uso.

Para cerebro se utilizó el método descrito por Howard y col., 2003 con la intención de recuperar la mayor cantidad posible de membrana. Para ello se homogeneizaron todas las regiones por separado en 100 mM de Tris (pH 7.4) con 0.1 mM de EDTA, 0.32 M de sacarosa y 0.1 mM DTT, posteriormente se centrifugó dos veces a 3000 g por 3 minutos para luego centrifugar el sobrenadante a 110 000 g por una hora y media. Los botones resultantes se resuspendieron en 100 mM de Tris (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 1.15% p/v KCl y glicerol al 20% v/v. El volumen se dividió en pequeñas alícuotas para su almacenamiento a -70° C hasta su uso.

La cantidad de proteína total se midió por el método de Bradford (Bradford, 1979) utilizando el protocolo descrito por el proveedor.

6.5 Determinación de Citocromos P450 totales

Se utilizó el método de Omura y col., 1972, el cual se basa en la detección a 450 nm de un cromóforo producto de la unión del monóxido de carbono (CO) al Fe^{2+} del grupo hemo del citocromo. Los microsomas fueron ajustados a una concentración de 1 mg/mL en un amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M pH 7.4, EDTA 1mM, 20%(v/v) glicerol y 0.4% (v/v) TRITON N-101, luego se distribuyó la solución en dos celdas para establecer en el espectrofotómetro una línea base de 400 – 500 nm que se usa como blanco. Posteriormente a una de las celdas se le burbujeó CO y se agregó a ambas celdas trazas de ditionita de sodio ($Na_2S_2O_4$) para leer de nuevo un barrido espectral de 400-500 nm. El estudio de CYP totales se llevó a cabo solamente en microsomas de hígado y corteza.

6.6 Análisis espectrofotométrico.

Se utilizó el método descrito por Schenkman y col. (1967) el cual consiste en comparar el espectro de una solución de microsomas obtenidos del grupo testigo contra una solución de los mismos microsomas con compuesto. Este procedimiento permite detectar el estado de oxidación del átomo de hierro presente en las hemoproteínas. Para ello se preparó una solución de microsomas testigo a una concentración final de 1 mg/mL en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4,

con EDTA 1mM, 20%(v/v) glicerol y 0.4% (v/v) TRITON N-101, luego se colocaron dos celdas con la solución en un espectro de doble haz luminoso y se corrió una línea base de 350 a 500nm. Posteriormente se agregó a una de las celdas 5, 10, 15, 20 y 25 mmoles de INH.

6.7 Actividad específica

6.7.1 Utilizando p-Nitrofenol

La actividad se evaluó mediante la hidroxilación del p-nitrofenol como sustrato específico de CYP2E1 y la formación de 4-nitrocatecol como producto (Reinke y Moyer 1985, Koop 1986). La reacción se llevó a cabo en un amortiguador de Tris HCl MgCl₂ pH 7.4 adicionado con p-nitrofenol a una concentración de 2mM. La reacción se inició con la adición de NADPH 50mM y después de 10 minutos a 37° C, se detuvo con HClO₄ 0.6 N. Posteriormente toda la mezcla se centrifugó por 5 min a 3000 rpm y se tomó el sobrenadante para mezclarlo con 100 µl de NaOH 10 N. Finalmente esta mezcla se centrifugó a 15000 rpm por 10 min y se recolectó el sobrenadante para medir su absorbancia a 510 nm.

Para conocer la concentración del producto de reacción, se preparó una solución estándar de 4-nitrocatecol (5-50 nmol/ml). En el caso de hígado se procuró alcanzar una concentración de 1mg/ml de proteína mientras que en cerebro se utilizó una concentración de 0.2 mgprot/ml

6.7.2 Utilizando N-nitrosodimetilamina

Esta técnica se basa en la medición del formaldehído, producto formado durante la desmetilación de la nitrosodimetilamina (NDMA) catalizada por CYP2E1 (Tu y Yang 1985). El medio de reacción contuvo TrisHCl 70mM pH 7.4, semicarbazida 10 mM, MgCl₂ 14 mM y KCl 215 mM, 1 mM de NADPH y 4 mM de NDMA en un volumen total de 1 ml. Se agregaron los microsomas (0.4 mg proteína) y se dejó incubar por 30 min a 37° C. Posteriormente se detuvo la reacción con 100 µl de Sulfato de Zinc 25% y 100 µl de solución saturada de Hidróxido de Bario. Luego de centrifugar la mezcla por 10 minutos a 2000 rpm se mezcló 0.7 ml del sobrenadante con la misma cantidad de reactivo de Nash. Esta mezcla se calentó a 70° C por 20 min y el formaldehído resultante se midió en el espectrofotómetro a 415 nm (Yang y col., 1991).

6.8 Electroforesis e inmunodetección específica para CYP2E1

Se realizó una electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida dodecil sulfato (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Se manejaron concentraciones de 4% para el gel concentrador y 8% para el gel separador. En los carriles se cargaron 50 µg de proteína total para microsomas de cerebro, 5 µg de proteína total para hígado y como testigo positivo 1 µg de microsomas de hígado inducidos con acetona y 40 µg de microsomas de cerebelo tratados con piretroides. La electroforesis se realizó a 200 volts por una hora y la electrotransferencia de proteína a la membrana de nitrocelulosa por toda la noche. Luego de esto, las membranas se bloquearon por tres horas con una solución de albúmina al 3% w/v en amortiguador salino de Tris (TBS), se lavaron las membranas con TBS-Tween20 al 1%, se incubaron con antisuero específico de cabra contra CYP2E1 diluido 1:3500 (Howard y col. 2003) con TBS-Albúmina al 0.3% por una hora y media a temperatura ambiente agitación constante. Luego de un segundo lavado con PBS-Tween, se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa (dilución 1:1500 en TBS-Albúmina 0.3%). Las membranas se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina y H₂O₂ al 30%. Los análisis de densitometría se realizaron con el programa ID Kodak versión 3.6.3.

6.9 Evaluación de la lipoperoxidación

La lipoperoxidación se evaluó mediante la cuantificación del producto colorido resultante de la reacción entre el malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico (Draper-Hadley 1990). Para esto se mezcló 0.4 mg de proteína microsomal con 1ml del reactivo de TBARS (HCl 2%, ácido Tiobarbitúrico 0.375%, ácido tricloroacético 15% y mesilato de deferoxamina 0.066%) y se hirvieron por 15 min. Luego de enfriarse, se agregó 1.5 mL de una mezcla de butanol/piridina (15:1 v/v) para agitarse y posteriormente obtener la capa superior que se centrifugó a 1500g por 10 min. Finalmente se leyó esta mezcla a 532 nm usando un tubo con TBARS como blanco. Para calcular la concentración de MDA se realizó una curva estándar con Trimetoxipropano (0.25-5 nmol/ml).

6.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa XLSTAT bajo la prueba de t de student y una alfa de 0.01 ó 0.05 según se indica en cada resultado

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de CYP totales

El barrido espectral de las muestras después de haber realizado el ensayo, describe curvas como las figuras 6a y 6b. Para conocer la cantidad de citocromos P450 se considera la absorbancia a 490nm como punto de referencia y se utiliza un coeficiente de extinción molar de (450-490) $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omura y Sato 1964) el cual se calculó utilizando preparaciones de CYP450 altamente purificadas

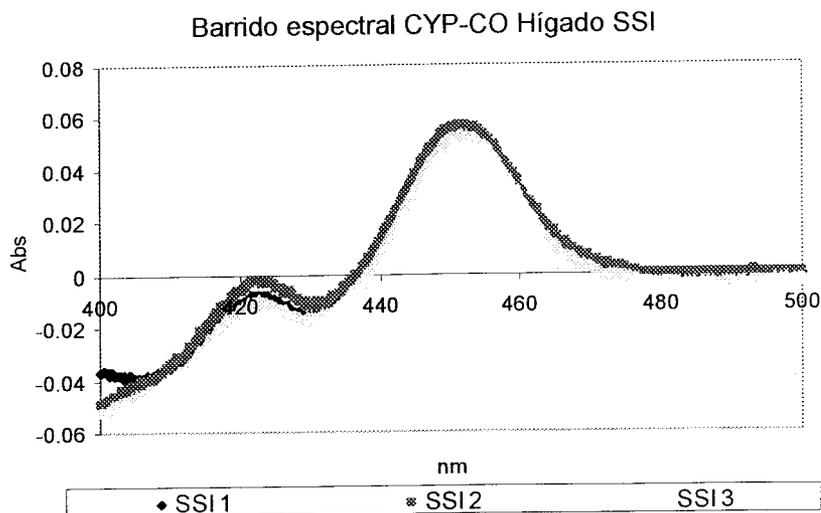


Figura 6a. Barrido espectral del método de cuantificación de Citocromos P450 totales con monóxido de carbono. Las curvas representan la medición por triplicado de 0.8 mg de proteína de microsomas de hígado de rata tratados con SSI por 5 días.

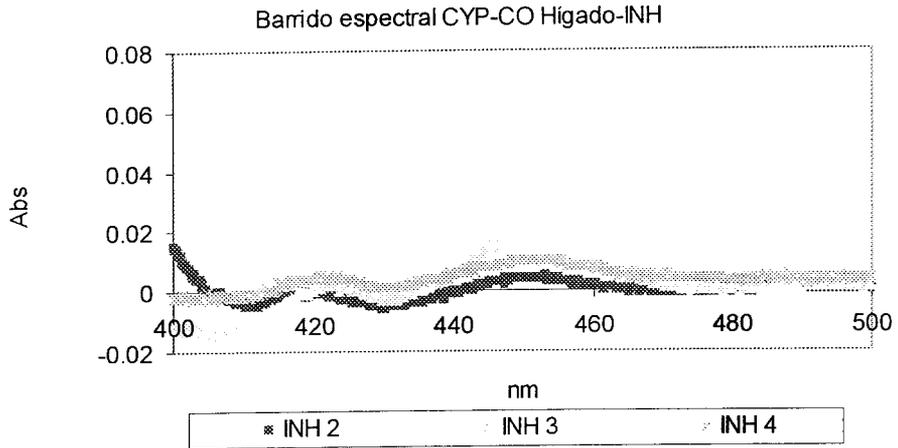


Figura 6b. Barrido espectral del método de cuantificación de Citocromos P450 totales con monóxido de carbono. Las curvas representan la medición por triplicado de 0.7 mg de proteína de microsomas de hígado de rata tratados con INH por 5 días.

Considerando los valores de absorbancia de 420, 450 y 490 nm, los valores de CYP totales por mg de proteína se presentan a continuación.

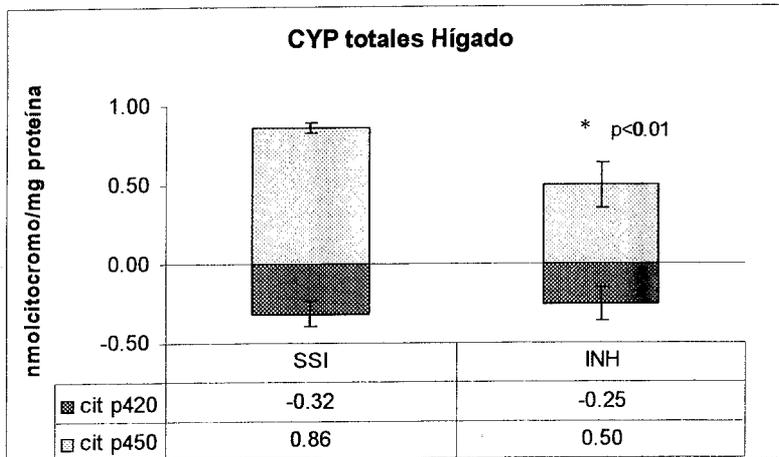


Figura 7. Contenido de CYP totales en microsomas de hígado de rata. Los resultados son el promedio de 3 ratas por cada tratamiento. Existe un decremento en la concentración de CYP totales estadísticamente significativo considerando una alfa de 0.01 con la prueba t de student.

En ninguna de las muestras de corteza analizadas, se detectó un pico claro en el barrido de 400 a 500 nm (figura 8).

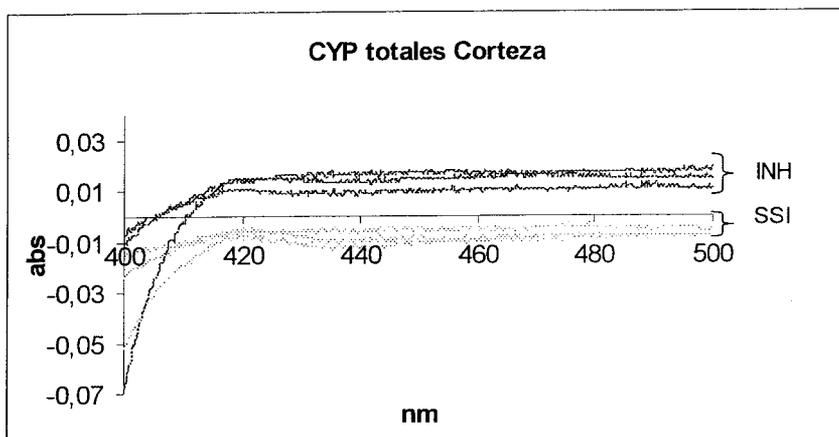


Figura 8. Barrido espectral resultado de la metodología para cuantificar citocromos P450 totales de microsomas de corteza. Las líneas negras representan los valores de absorbancia de 2.6 mg de proteína de microsomas tratados con INH y las grises representan los valores de absorbancia de 2.8 mg de proteína de microsomas tratados con SSI.

7.2 Análisis espectrofotométrico

Para identificar el tipo de interacción de la INH con los citocromo P450 se realizó un estudio de diferencia espectral. Con el cambio de comportamiento en el barrido espectral, se puede identificar si el compuesto se une directamente con el átomo de hierro de la hemoproteína (espectro tipo II) o si interactúa con la bolsa catalítica (espectro tipo I). La figura 9 representa los barridos espectrales de este estudio. Cada una de las líneas representa los valores de absorbancia después de llegar a diferentes concentraciones de INH. Aunque el barrido espectral no es muy claro, se puede sospechar de un espectro tipo II.

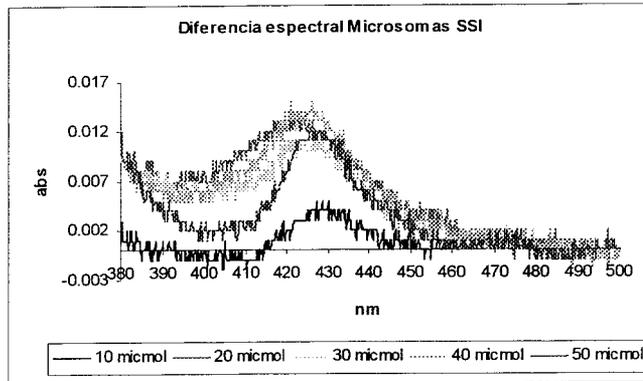


Figura 9. Barridos espectrales de 0.1 mg de proteína de microsomas de rata testigo con diferentes concentraciones de INH

La INH modifica considerablemente el comportamiento de absorción del CYP (Figura 10) por lo que los cálculos de constantes de disociación espectral (k_d) no se realizaron. Sin embargo, los resultados sugieren una interacción de la INH con el átomo de hierro de la hemoproteína P450.

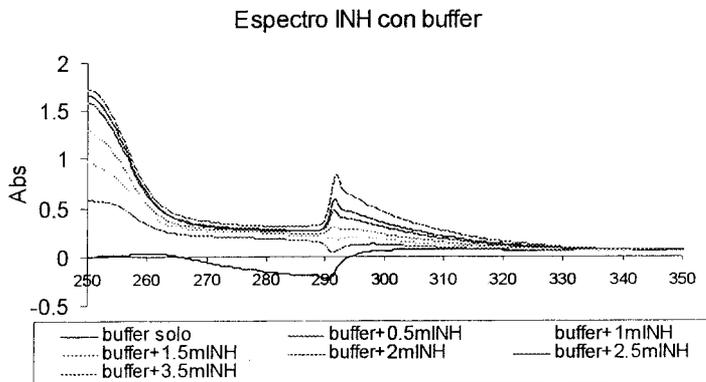


Figura 10. Barrido espectral de la INH a diferentes concentraciones con el amortiguador utilizado en los experimentos

7.3 Actividad específica

Para evaluar la actividad específica de CYP2E1 se utilizaron 2 sustratos, el p-nitrofenol y la N-nitrosodimetilamina.

7.3.1 Utilizando p-Nitrofenol

La tabla 2 resume los resultados de actividad. Sólo se analizó en 2 secciones del cerebro. Ninguno de los tratamientos a excepción de hígado, muestran una diferencia significativa con respecto a los controles

Tabla 2. Actividad específica de CYP2E1 tomando como sustrato el PNP. Para los ensayos se utilizó 0.4 mg de proteína de microsomas de hígado y 0.1mg de proteína de microsomas de cerebelo y corteza.

Microsomas	SSI		INH	
	nmol catOH/min/mg	±D.S.	nmol catOH/min/mg	±D.S.
Hígado	1.61	0.21	3.39 *	0.13
Cerebelo	5.26	1.02	5.37	0.56
Corteza	4.05	0.27	5.15	0.96

*Diferencia significativa con un valor de alfa menor a 0.01. catOH - catecol

7.3.2 Utilizando N-Nitrosodimetilamina

Para evaluar la linealidad de la reacción, se realizaron varias mediciones de actividad cambiando la concentración de proteína microsomal total obtenida de animales tratados con INH (figura 11).

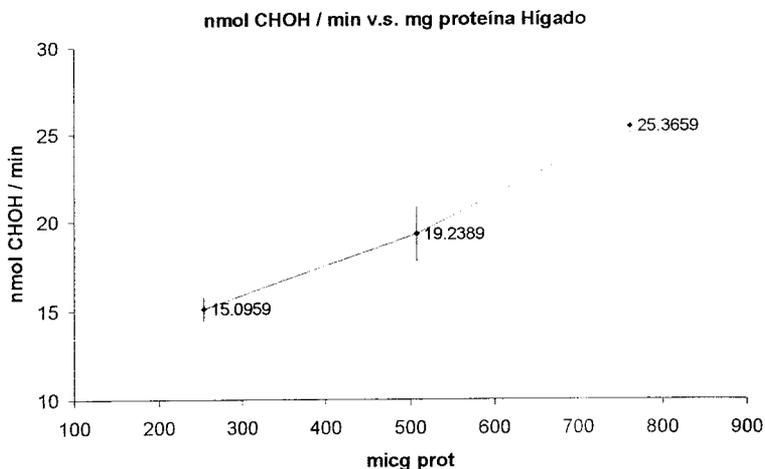


Figura 11. Actividad enzimática de CYP2E1 a diferentes concentraciones de proteína.

En base a estos resultados, se decidió trabajar con 0.5 mg de proteína para hígado. La figura 12 resume los resultados de actividad obtenidos en hígado.

Actividad CYP2E1 Hígado

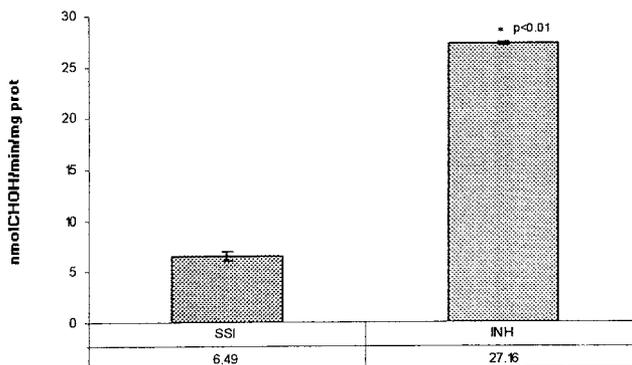


Figura 12. Actividad de CYP2E1 de microsomas de hígado de rata tratadas con SSI e INH. El ensayo se realizó con 0.5mg de proteína total.

Este mismo experimento se realizó con los microsomas de las diferentes regiones del cerebro disectadas. Es importante señalar que se tenía poca cantidad de proteína por lo que se utilizó alrededor de 0.2 mg de proteína para cada ensayo. Para bulbo olfatorio se utilizó 0.15 mg de proteína total, para hipocampo y tallo cerebral 0.25mg de proteína, y para corteza y cerebelo se utilizaron 0.2mg de proteína total. Cerebelo es el único tejido que presenta diferencia entre los tratados y los controles con un valor de α menor a 0.01.

Actividad CYP2E1 Cerebro por secciones

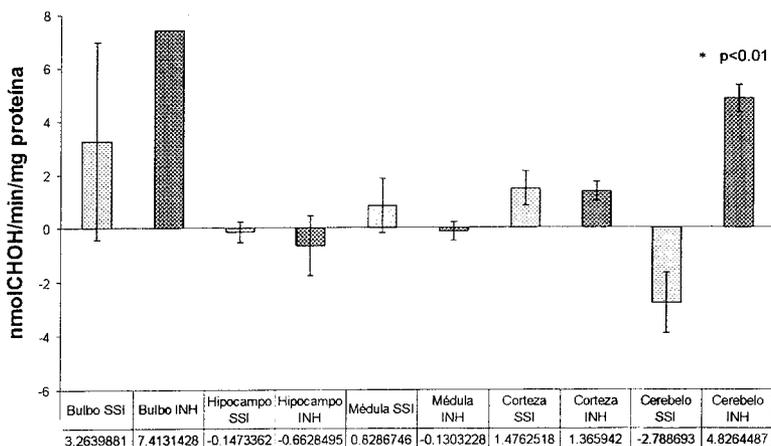


Figura 13. Actividad de CYP2E1 de microsomas de diferentes regiones de cerebro de rata.

7.5 Electroforesis e inmunodetección específica para CYP2E1

Se realizaron ensayos de inmunodetección para hígado y cerebro de cada una de las ratas tratadas. La figura 16 resume los resultados a partir de los microsomas obtenidos de hígado. Los microsomas tratados con INH tienen una mayor concentración de CYP2E1 que en ratas tratadas con SSI.

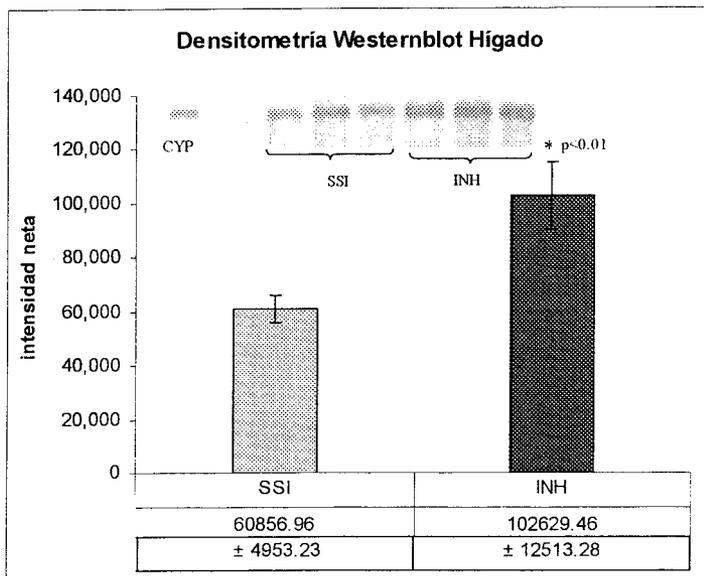


Figura 14. Densitometría de la inmunodetección de CYP2E1 en hígado de rata. En la parte superior de la figura se puede observar la fotografía de la membrana de nitrocelulosa. La banda izquierda es el control positivo para CYP2E1, las tres bandas siguientes corresponden a los microsomas tratados con SSI y los tres restantes los tratados con INH. Cada uno de los carriles fue llenado con 5 μ g de proteína a excepción del control positivo que se cargó 1 μ g.

Los ensayos de inmunodetección en microsomas de las diferentes regiones de cerebro, no pudieron detectar al CYP2E1. Los experimentos se realizaron hasta con 60 μ g de proteína

La figura 15 es una fotografía de un ensayo realizado con microsomas de cerebro completo de ambos tratamientos. Se incluyó un control positivo de cerebelo de ratas tratadas con piretroides.

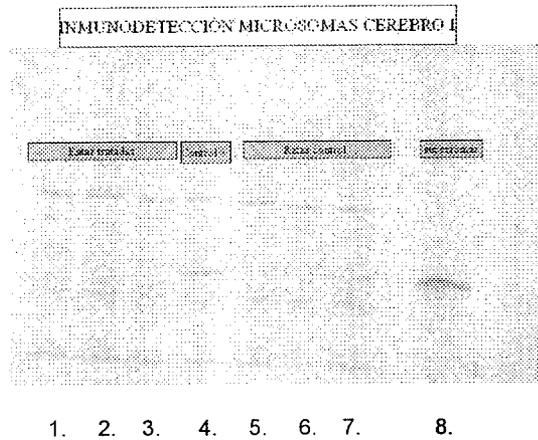


Figura 15. Inmunodetección de CYP2E1 en cerebro completo. Los primeros tres carriles corresponden a 40 μg de microsomas de ratas tratadas con INH, el cuarto carril corresponde a 20 μg de cerebro tratado con insecticida y los tres restantes a 40 μg de microsomas de ratas testigo. El último carril corresponde a 1 μg de supersomas conteniendo CYP2E1.

7.6 Evaluación de la lipoperoxidación

Los resultados de los niveles de lipoperoxidación en hígado se resumen en la figura 16. En cada uno de los ensayos se utilizó 1 mg de proteína hepática de 3 ratas tratadas con SSI y con INH. No se observa diferencia significativa entre los resultados.

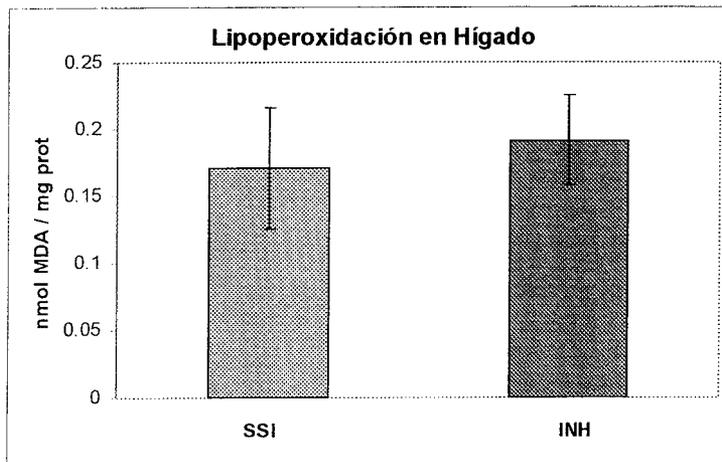


Figura 16. nmol MDA / mg de proteína de Hígados tratados con SSI o con INH.

En cerebro los resultados fueron muy similares, no se encontró diferencia alguna entre los controles y los tratados en ninguna de las secciones analizadas. Para cada prueba se utilizó 0.1mg de proteína (Tabla 3)

Tabla 3. Evaluación de la lipoperoxidación en diferentes regiones del cerebro de rata tratados con SSI o INH

Microsomas	SSI \pm D.S.	INH \pm D.S.
Bulbo	Sin datos	1.005 \pm 0.104
Cerebelo	1.212 \pm 0.107	1.096 \pm 0.001
Hipocampo	0.790 \pm 0.133	0.895 \pm 0.221
Tallo cerebral	1.032 \pm 0.062	1.200 \pm 0.001
Corteza	0.469 \pm 0.262	0.441 \pm 0.261

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aún después de 50 años de su introducción como un agente antituberculoso, la isoniazida es imprescindible en la lucha contra la tuberculosis. Se utiliza como profiláctico en niños, genera poca resistencia en comparación con los otros fármacos y es poco costosa. Su consumo ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a la reincidencia de la tuberculosis como resultado a la co-epidemia con el virus de inmunodeficiencia humano (VIH) (Charles y Pape, 2006). La INH es comúnmente administrada en conjunto con otros medicamentos y además se consume por largos periodos de tiempo lo que de alguna forma facilita interacciones farmacocinéticas (Grange y col., 1994).

En el presente estudio se demostró que la INH es capaz de inhibir los citocromos totales en hígado de ratas tratadas por 5 días con una dosis de 200mg/kg/día (Figura 7). La inhibición puede suprimir el metabolismo de otros fármacos como en el caso de la fenitoína (Millel y col., 1979) la carbamazepina (Wright y col., 1982), el diazepam (Ochs y col., 1981) el triazolam (Ochs y col., 1983) y el acetaminofén (Crippin 1993) ya que su co-administración con INH reduce su depuración manifestándose como cuadros de toxicidad.

Hay que considerar que estos resultados pueden reflejar la inhibición de los citocromos más abundantes en hígado, en el caso de la rata el CYP2C (Zuber y col., 2002), que representa de cierta forma al CYP3A4 humano, ya que oxidan los mismos sustratos como dihidropiridinas, aflatoxina B1 y algunos esteroides (Nedlecheva y col., 1994).

La inhibición encontrada en este estudio coincide de cierta forma con las investigaciones *in vitro* donde se muestra que la INH es capaz de inhibir la actividad enzimática de las isoformas humanas: CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP3A4 (Desta y col., 2001), CYP2C9 y CYP2E1 (Nishimura y col., 2004). La inhibición puede explicarse por el tipo de interacción que tiene la INH con el grupo hemo de los Citocromos P450.

Para explorar este tipo de interacción, se realizaron estudios de diferencia espectral (Figura 9) y aunque no se obtuvieron resultados concluyentes, se sospecharía que la INH se coordina directamente con el hierro de la hemoproteína ya que los cambios espectrales presentan un máximo de absorción en 425-435nm y un mínimo en 390-405nm, comportamiento típico de una interacción directa tipo II (Shenkman y col., 1967). Al coordinarse la INH actúa como un inhibidor de la actividad (Figura 5). Los resultados no son definitivos puesto que el mínimo de absorbencia reportado para compuestos que generan un espectro de absorción tipo II, no se ve con claridad en la Figura 9. Una explicación de ello puede ser que la isoniazida presenta un pico de absorción a 290nm (Figura 10) y éste enmascara la disminución en la absorbencia del espectro tipo II.

El hecho de que la actividad se inhiba no quiere decir que también vayan a disminuir los niveles de las enzimas. Considerando que la inhibición se da siempre a nivel post-transcripcional (no hay investigaciones previas que indiquen una inhibición a nivel transcripcional) la permanencia de la INH o de alguno de sus metabolitos presentes en los microsomas podría interferir con la metodología de la cuantificación de CYP totales (ver materiales y métodos).

En el caso de la cuantificación de CYP totales en corteza, los resultados no muestran la presencia de los CYP (Fig. 8).

Pese a que los niveles de CYP totales se vieron inhibidos en hígado, la concentración de CYP2E1 aumenta (Fig. 14) así como su actividad (Fig. 12), lo que concuerda con lo reportado por Ryan y col. 1986. En cambio, en ninguna de las regiones analizadas de cerebro se detecta al CYP2E1 por la técnica de Western blot (Fig. 15). Warner y Gustafsson (1994) tampoco pudieron detectar esta enzima en las regiones cerebrales analizadas, sin embargo, Howard y col. (2003) logran cuantificarlo aún en tejido de ratas testigo. Comparando los experimentos realizados en este estudio con los hechos por Howard y col., la principal diferencia es que ellos utilizan otra técnica de revelado que incluye fluorescencia que es una técnica más sensible. Considerando que la concentración de CYP2E1 en cerebro es 1000 veces menor que en hígado, (Tinberg e Ingelman-Sundberg 1996), es probable que la técnica realizada en este estudio no fuera lo suficientemente sensible.

No obstante los resultados obtenidos por Western blot, se detectó actividad específica de CYP2E1 en cada una de las regiones analizadas. Dicha actividad se ve inducida únicamente en cerebelo de rata tratada con INH (Fig. 13), lo cual coincide parcialmente con otros estudios donde se muestra la actividad de la enzima en cerebelo, bulbo olfatorio e hipocampo después del tratamiento con etanol (Tabla 1).

Un incremento en la actividad de CYP2E1 en cerebelo, podría conducir a daño oxidativo (Figuras 3 y 4). Por ello, se exploró la presencia de malondialdehído (MDA), producto más abundante de la lipoperoxidación (LPO), en los microsomas obtenidos de hígado y cerebro (Figura 16 y Tabla 3). Los resultados muestran que los índices de lipoperoxidación en hígado y cerebro de animales expuestos a INH son iguales a los obtenidos en tejidos de animales testigo.

Por otro lado, Choi y col. (2002) expresan que la INH inhibe la producción de especies reactivas ya que al pegarse al sitio activo del CYP2E1, no permite que se desarrolle el ciclo oxidativo y esto impide la liberación de ROS; también observan que la INH de alguna forma actúa como un "atrapador" de estas especies.

En estudios previos, se ha encontrado un incremento en la LPO en hígado de ratas después de una exposición crónica a INH semejante a los tratamientos de pacientes con tuberculosis (Sodhi y col., 1997). Por lo anterior es posible que la dosis utilizada en este estudio no fuera suficiente para generar niveles detectables de MDA por la exposición a INH o que las defensas antioxidantes son suficientes para contender con las especies reactivas generadas.

Tomando en cuenta que el cerebro es más vulnerable a la LPO que el hígado, una inducción de la actividad de CYP2E1 en cerebelo podría desencadenar un desequilibrio oxidativo en sus células. Tal es el caso de la ingesta crónica de etanol donde el cerebelo e hipocampo son las regiones más afectadas (Fadda y Rossetti 1998).

Como se mencionó anteriormente, el consumo de la INH está asociado con neurotoxicidad. Estos efectos secundarios neurotóxicos ocurren en aproximadamente el 15% de los pacientes con tuberculosis (Bal'tseva y col., 1990) e incluyen mareos y hormigueo en las extremidades. En casos de sobredosis ésta puede ocasionar convulsiones, acidosis, coma e inclusive la muerte (Shannon y

col., 1990). El mecanismo de estas reacciones aún no está claro, existen principalmente dos propuestas, una de ellas la relaciona con estrés oxidativo (EO). Por ejemplo Cicek y col. (2005) muestran una intervención de EO en el daño de los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) del hipocampo después de una exposición crónica a INH. La propuesta más aceptada y más antigua es la intervención de la INH en la formación del neurotransmisor ácido- γ -aminobutírico (GABA) inhibidor del Sistema Nervioso Central (SNC). Se ha demostrado que la INH puede conjugarse con la piridoxina disminuyendo así los niveles normales de esta vitamina (Wood y Pesker, 1972). El piridoxal, un metabolito de la piridoxina, actúa como co-factor en la síntesis del GABA, por lo que una disminución en los niveles de piridoxina se manifiesta en un decremento en los niveles de GABA y con ello un aumento en la excitabilidad del SNC, signo característico de los efectos secundarios de la INH.

La síntesis de GABA se realiza en ciertas neuronas llamadas GABAérgicas. En cerebelo particularmente se encuentran las células purkinje que tienen una actividad GABAérgica importante. Considerando que el CYP2E1 se expresa en las células purkinje del cerebelo (Howard y col. 2003), su inducción podría ocasionar un daño a estas neuronas disminuyendo la concentración de GABA en el organismo y ocasionando la neurotoxicidad del fármaco antituberculoso.

CONCLUSIONES

- Un tratamiento de 200 mg/kg/día por 5 días con INH reduce significativamente la concentración de CYP totales en hígado de rata cuantificados por el método de Omura y Sato.
- La exposición a INH induce significativamente la proteína y la actividad de CYP2E1 en hígado de rata.
- La exposición a INH bajo el tratamiento estudiado induce la actividad de CYP2E1 en cerebelo de rata
- El esquema de tratamiento que se realizó no genera lipoperoxidación en hígado ni en cerebro cuantificada a través del MDA con el ácido tiobarbitúrico.

9. REFERENCIAS

- Agundez JA. (2004) Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab.* 5(3): 211-24.
- Ahn T, Yun CH, Oh DB. (2006) Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Lett.* 166(1): 27-36.
- Anandatheerthavarada HK, Shankar SK, Bhamre S, Boyd MR, Song BJ, Ravindranath V. (1993) Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.* 601(1-2): 279-85.
- Anandatheerthavarada HK, Williams JF, Wecker L. (1993) Differential effect of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A1/2 and P4502E1. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(1): 312-8.
- Aslan M, Ozben T. (2004) Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 1(2): 111-9.
- Baltseva LB, Mel'nik GV, Man'ko VP. (1990) The elimination of chemotherapy side effects in pulmonary tuberculosis patients *Vrach Delo.* (4): 71-3.
- Bandmann O, Vaughan J, Holmans P, Marsden CD, Wood NW. (1997) Association of slow acetylator genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *Lancet.* 350(9085): 1136-9.
- Banerjee A, Kocarek TA, Novak RF. (2000) Identification of a ubiquitination-Target/Substrate-interaction domain of cytochrome P-450 (CYP) 2E1. *Drug Metab Dispos.* 28(2): 118-24.
- Bhagwat SV, Boyd MR, Ravindranath V. (1995) Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Arch Biochem Biophys.* 320(1): 73-83.
- Blakemore WF, Palmer AC, Noel PR. (1972) Ultrastructural changes in isoniazid-induced brain oedema in the dog. *J Neurocytol.* 1(3): 263-78.
- Blanck J, Ristau O, Zhukov AA, Archakov AI, Rein H, Ruckpaul K. (1991) Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. *Xenobiotica.* 21(1): 121-35.

Bradford MM. (1979). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brzezinski MR, Boutelet-Bochan H, Person RE, Fantel AG, Juchau MR. (1999) Catalytic activity and quantitation of cytochrome P-450 2E1 in prenatal human brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 289(3): 1648-53.

Boutelet-Bochan H, Huang Y, Juchau MR. (1997) Expression of CYP2E1 during embryogenesis and fetogenesis in human cephalic tissues: implications for the fetal alcohol syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 238(2): 443-7.

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangiameli A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA. (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci.* 233(1-2): 145-62.

Carlson HB, Anthony EM, Russell WF Jr, Middlebrook G. (1956) Prophylaxis of isoniazid neuropathy with pyridoxine. *N Engl J Med.* 255(3): 119-22.

Caro AA, Cederbaum AI. (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44: 27-42.

Carroccio A, Wu D, Cederbaum AI. (1994) Ethanol increases content and activity of human cytochrome P4502E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 203(1): 727-33.

Cederbaum AI. (1989) Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity *Free Radic Biol Med.* 7(5): 559-67.

Cederbaum AI. (1991). Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1: 291-96.

Charles M, Pape JW. (2006) Tuberculosis and HIV: Implications in the developing world. *Curr HIV/AIDS Rep.* 3(3): 139-44.

Cheung TH., Cardinal RN., (2005) Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neuroscience.* 6(1): 36.

Chien JY, Peter RM, Nolan CM, Wartelle C, Slattery JT, Nelson SD, Carithers, Jr RL, and Thummel KE (1997) Influence of polymorphic N-acetyltransferase phenotype on the inhibition and induction of acetaminophen bioactivation with long-term isoniazid. *Clin Pharmacol Ther.* 61: 24-34.

- Choi D, Leininger-Muller B, Kim YC, Leroy P, Siest G, Wellman M. (2002) Differential role of CYP2E1 binders and isoniazid on CYP2E1 protein modification in NADPH-dependent microsomal oxidative reactions: free radical scavenging ability of isoniazid. *Free Radic Res.* 36(8): 893-903.
- Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. (2005) Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys.* 436(1): 50-61.
- Cicek E, Sutcu R, Gokalp O, Yilmaz HR, Ozer MK, Uz E, Ozcelik N, Delibas N. (2005) The effects of isoniazid on hippocampal NMDA receptors: protective role of erdoosteine. *Mol Cell Biochem.* 277(1-2): 131-5.
- Crippin JS (1993) Acetaminophen hepatotoxicity: potentiation by isoniazid. *Am. J. Gastroenterol.* 88: 590-2.
- Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. (2004) Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28(5): 771-99.
- Danko IM, Chaschin NA. (2005) Association of CYP2E1 gene polymorphism with predisposition to cancer development. *Exp Oncol.* 27(4): 248-56.
- De Roos AJ, Rothman N, Inskip PD, Linet MS, Shapiro WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Pittman GS, Bell DA. (2003) Genetic polymorphisms in GSTM1, -P1, -T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(1): 14-22.
- Desta Z, Soukhova NV, Flockhart DA. (2001) Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(2): 382-92.
- Draper HH, Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186: 421-31.
- Ekstrom G, Ingelman-Sundberg M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem Pharmacol.* 38(8): 1313-9.
- Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. (1988) Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 150(1): 436-43.

Eliasson E, Mkrтчian S, Ingelman-Sundberg M. (1992) Hormone- and substrate-regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the endoplasmic reticulum membranes. *J Biol Chem.* 267(22): 15765-9.

Epstein M. M., Nelson S. D., Slattery J. T., Kalhorn T. F., Wall R. A., and Wright J. M. (1991) Inhibition of the metabolism of paracetamol by isoniazid. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31: 139-42.

Fadda F, Rossetti ZL. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol.* 56(4): 385-431.

Farin FM, Omiecinski CJ. (1993) Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *J Toxicol Environ Health.* 40(2-3): 317-35.

Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. (2006) Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds. *Curr Pharm Des.* 12(23): 2875-90.

Gammon GD, Gumnit RP, Kamrin A. In: *Inhibition in the Nervous System and Gamma-Aminobutyric Acid.* New York: Pergamon, 1960, p. 328-30.

Guengerich FP, Johnson WW. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry.* 36(48): 14741-50.

Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. (1991) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol.* 4(2): 168-79.

Glowinski J, Iversen L. (1965) Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. *J. Neurochem* 13: 655-69.

Goasduff T, Cederbaum AI. (1999) NADPH-dependent microsomal electron transfer increases degradation of CYP2E1 by the proteasome complex: role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 370(2): 258-70.

Goasduff T, Cederbaum AI. (2000) CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90. *Arch Biochem Biophys.* 379(2): 321-30.

Gonzalez FJ, Ueno T, Umeno M, Song BJ, Veech RL, Gelboin HV. (1991), Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1: 97-101.

Gorsky, L.D., Koop, D.R., Coon, M.J., (1984). On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J. Biol. Chem.* 259: 6812-7.

Grange JM, Winstanley PA, Davies PD. (1994) Clinically significant drug interactions with antituberculosis agents. *Drug Saf.* 11(4): 242-51.

Halliwell (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97(6): 1634-58.

Han QP, Dryhurst G. (1996) Influence of glutathione on the oxidation of 1-methyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline: chemistry of potential relevance to the addictive and neurodegenerative consequences of ethanol use. *J Med Chem.* 39(7): 1494-508.

Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M, Kohler C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 34(2): 451-63.

Hargreaves MB, Jones BC, Smith DA, Gescher A. (1994) Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules. *Drug Metab Dispos.* 22(5): 806-10.

Hitchon CA, El-Gabalawy HS. (2004) Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6(6): 265-78.

Hodgson AV, White TB, White JW, Strobel HW. (1993) Expression analysis of the mixed function oxidase system in rat brain by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Biochem.* 120(2): 171-9.

Howard LA, Miksys S, Hoffmann E, Mash D, Tyndale RF. (2003) Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br J Pharmacology.* 138: 1376-86.

Huang YS, Chern HD, Su WJ, Wu JC, Chang SC, Chiang CH, Chang FY, Lee SD. (2003) Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology.* 37(4): 924-30.

Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (1981) The mechanism of cytochrome P-450-dependent oxidation of ethanol in reconstituted membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 256(12): 6321-6.

International Standards of Tuberculosis Care (ISTC) en
http://www.who.int/tb/publications/2006/istc_report.pdf

Iseri OA, Lieber CS, Gottlieb LS. (1966) The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am J Pathol.* 48(4): 535-55.

Jacobs JM, Miller RH, Whittle A, Cavanagh JB. (1979) Studies on the early changes in acute isoniazid neuropathy in the rat. *Acta Neuropathol (Berl).* 47(2): 85-92.

Jayyosi Z, Cooper KO, Thomas PE. (1992) Brain cytochrome P450 and testosterone metabolism by rat brain subcellular fractions: presence of cytochrome P450 3A immunoreactive protein in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 298(1): 265-70.

Jenner P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord. Suppl 1:* 24-34.

Johansson I, Ekstrom G, Scholte B, Puzycki D, Jornvall H, Ingelman-Sundberg M. (1998) Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry.* 27(6): 1925-34.

Jones WA, Jones GP. (1953) Peripheral neuropathy due to isoniazid; report of two cases. *Lancet.* 1(22): 1073-4.

Joseph P. David, Bengt Mannervik and Ortiz de Montellano Paul (2005)., *Cytochrome P450. Molecular toxicology*, Chapter 14 Oxford University Press, pp. 209-60.

Joshi M, Tyndale RF. (2006) Induction and recovery time course of rat brain CYP2E1 after nicotine treatment. *Drug Metab Dispos.* 34(4): 647-52.

Joshi M, Tyndale RF. (2006b) Regional and cellular distribution of CYP2E1 in monkey brain and its induction by chronic nicotine. *Neuropharmacology.* 50(5): 568-75.

Kapoor N, Pant AB, Dhawan A, Dwivedi UN, Gupta YK, Seth PK, Parmar D. (2006) Differences in sensitivity of cultured rat brain neuronal and glial cytochrome P450 2E1 to ethanol. *Life Sci.* 79(16): 1514-22.

Kim SG, Novak RF. (1990) Induction of rat hepatic P450IIE1 (CYP2E1) by pyridine: evidence for a role of protein synthesis in the absence of transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 166: 1072-9.

Kim SG, Novak RF. (1993) The induction of cytochrome P4502E1 by nitrogen- and sulfur-containing heterocycles: expression and molecular regulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 120(2): 257-65

Kocarek TA, Zangar RC, Novak RF. (2000) Post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 expression: role of CYP2E1 mRNA untranslated regions in control of translational efficiency and message stability. *Arch Biochem Biophys.* 376(1): 180-90.

Koop DR, Morgan, ET, Torr GE and Coon MJ. (1982) Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J Biol Chem* 257: 8472- 80.

Koop DR. (1986) Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isoenzyme 3A. *Mol. Pharmacology.* 29: 399-404.

Koop DR, Tierney DJ. (1990) Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *Bioessays.* 12(9): 429-35.

Koutsilier E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J, Riederer P. (2002) Free radicals in Parkinson's disease. *J Neurol.* 249 Suppl 2: I11-5.

Kraner JC, Lasker JM, Corcoran GB, Ray SD, Raucy JL. (1993) Induction of P4502E1 by acetone in isolated rabbit hepatocytes. Role of increased protein and mRNA synthesis. *Biochem Pharmacol.* 45(7): 1483-92.

Kuthan H, Tsuji H, Graf H, Ullrich V. (1978) Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide in a reconstituted monooxygenase system. *FEBS Lett.* 91(2): 343-5.

Kubota S, Lasker JM, Lieber CS. (1988) Molecular regulation of ethanol-inducible cytochrome P450-IIE1 in hamsters. *Biochem Biophys Res Commun.* 150(1): 304-10.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-5.

Lewis David F. V. (2001) *en Guide to Cytochromes P450. Structure and Function.* Chapter 1. Taylor & Francis. pp 1-20

Lieber CS. (1997) Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev.* 77(2): 517-44.

- Lockman R, Shum S, Allen D, Case Report (2001) Visual Toxicity in Acute Isoniazid Overdose *Int J Med Toxicol.* 4(3): 21.
- Loida PJ, Sligar SG. (1993) Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry.* 43: 11530-8.
- Lubing HN. (1953) Peripheral neuropathy in tuberculosis patients treated with isoniazid. *Am Rev Tuberc.* 68(3): 458-61.
- Lucas D, Berthou F, Dreano Y, Lozac'h P, Volant A, Menez JF. (1993) Comparison of levels of cytochromes P-450, CYP1A2, CYP2E1, and their related monooxygenase activities in human surgical liver samples. *Alcohol Clin Exp Res.* 17(4): 900-5.
- Macleod EK. (1954) Isoniazid neuropathy; report of a case with a review of twenty-five patients under treatment. *N Z Med J.* 53(294): 165-8.
- Mladenka P, Simunek T, Hubl M, Hrdina R. (2006) The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. *Free Radic Res.* 40(3): 263-72
- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 827(1): 65-75.
- Martin I, Grotewiel MS. (2006) Oxidative damage and age-related functional declines. *Mech Ageing Dev.* 127(5): 411-23.
- Mazze RI, Woodruff RE, Heerdt ME. (1982) Isoniazid-induced enflurane defluorination in humans. *Anesthesiology.* 57(1): 5-8.
- McDermott W. (1969) The story of INH. *J Infect Dis.* 119(6): 678-83.
- McLay RN, Drake A, Rayner T (2005) Persisting dementia after isoniazid overdose *Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 17(2): 256-7.
- Micu AL, Miksys S, Sellers EM, Koop DR, Tyndale RF. (2003) Rat hepatic CYP2E1 is induced by very low nicotine doses: an investigation of induction, time course, dose response, and mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 306(3): 941-7.
- Miksys S, Tyndale RF. (2006) Nicotine induces brain CYP enzymes: relevance to Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* (70): 177-80.

Miller, R. R., J. Porter, and D. J. Greenblatt. (1979) Clinical importance of the interaction of phenytoin and isoniazid: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *Chest* 75: 356-8.

Miwa GT, Levin W, Thomas PE, Lu AY. (1978) The direct oxidation of ethanol by a catalase- and alcohol dehydrogenase-free reconstituted system containing cytochrome P-4501. *Arch Biochem Biophys.* 187(2): 464-75.

MODIFICACION A LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SSA2-1993, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA ATENCIÓN PRIMARIA A LA SALUD

Montoliu C, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. (1994) Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem.* 63(5): 1855-62.

Montoliu C, Sancho-Tello M, Azorin I, Bungal M, Valles S, Renau-Piqueras J, Guerri C. (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem.* 65(6): 2561-70.

Morishima Y, Peng HM, Lin HL, Hollenberg PF, Sunahara RK, Osawa Y, Pratt WB. (2005) Regulation of cytochrome P450 2E1 by heat shock protein 90-dependent stabilization and CHIP-dependent proteasomal degradation. *Biochemistry.* 44(49): 16333-40.

Nedelcheva V, Gut I, (1994) P450 in the rat and man: Methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*, 24(12): 1151-75.

Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. (2002) Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology.* 35(1): 62-73.

Nishimura Y, Kurata N, Sakurai E, Yasuhara H. (2004) Inhibitory effect of antituberculosis drugs on human cytochrome P450-mediated activities. *J Pharmacol Sci.* 96(3): 293-300.

Nissbrandt H, Bergquist F, Jonason J, Engberg G. (2001) Inhibition of cytochrome P450 2E1 induces an increase in extracellular dopamine in rat substantia nigra: a new metabolic pathway? *Synapse.* 40(4): 294-301.

Novak RF, Woodcroft KJ. (2000) The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch Pharm Res.* (4): 267-82.

Ochs HR, Greenblatt DJ, Roberts GM, Dengler HJ (1981) Diazepam interaction with antituberculosis drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29: 671-8.

Ochs HR, Greenblatt DJ, Knuchel M (1983) Differential effect of isoniazid on triazolam and oxazepam conjugation. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 16: 743-6.

Orme-Johnson WH, Ziegler DM. (1965) Alcohol mixed function. Oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 21(1): 78-82.

Omura y Sato (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-8.

Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y. Tokio : Thurman RG, Heinz GL, Scholz R. (1972) Hepatic Microsomal Ethanol Oxidation. *Hydrogen Kodansha.* 1-15.

O'Shea D, R. B. Rim, and G. R. Wilkinson (1997) Modulation of CYP2E1 activity by isoniazid in rapid and slow N-acetylators. *Br. J Clin Pharmacol.* 43: 99-103.

Palakodety RB, Clejan LA, Krikun G, Feierman DE, Cederbaum AI. (1988) Characterization and identification of a pyrazole-inducible form of cytochrome P-450. *J Biol Chem.* 263(2): 878-84.

Park KS, Sohn DH, Veech RL, Song BJ. (1993) Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur J Pharmacol.* 248(1): 7-14.

Patel S, Singh V, Kumar A, Gupta YK, Singh MP. (2006) Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: mechanism of neurodegeneration. *Brain Res.* 1081(1): 9-18.

Pauly W. (1953) Diabetic metabolic disorders occurring during thiosemicarbazone and isoniazid therapy. *Munch Med Wochenschr.* 95(44): 1180-1.

Pezzoli G, Antonini A, Barbieri S, Canesi M, Perbellini L, Zecchinelli A, Mariani CB, Bonetti A, Leenders KL. (1995) n-Hexane-induced parkinsonism: pathogenetic hypotheses. *Mov Disord.* 10(3): 279-82.

Raza H, Prabu SK, Robin MA, Avadhani NG. (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes.* 53(1): 185-94.

Reinke LA, Moyer MJ. (1985) p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos.* 13(5): 548-52.

Renton KW, Nicholson TE. (2000) Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(2): 524-30.

Riedl AG, Watts PM, Edwards RJ, Boobis AR, Jenner P, Marsden CD. (1996) Selective localization of P450 enzymes and NADPH-P450 oxidoreductase in rat basal ganglia using anti-peptide antisera. *Brain Res.* 743(1-2): 324-8.

Riedl AG, Watts PM, Jenner P, Marsden CD. (1998) P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. *Mov Disord.* 13(2): 212-20.

Rice SA, Talcott RE. (1979) Effects of isoniazid treatment on selected hepatic mixed-function oxidases. *Drug Metab Dispos.* 7(5): 260-2.

Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ. (1994) Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(2): 1064-71.

Roberts BJ. (1997) Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J Biol Chem.* 272(15): 9771-8.

Ronis MJ, Huang J, Crouch J, Mercado C, Irby D, Valentine CR, Lumpkin CK, Ingelman-Sundberg M, Badger TM. (1993) Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 264(2): 944-50.

Ronis MJ, Ingelman-Sundberg M. (1989) Acetone-dependent regulation of cytochrome P-450j (IIE1) and P-450b (IIB1) in rat liver. *Xenobiotica.* 19(10): 1161-5.

Ronis MJ, Johansson I, Hultenby K, Lagercrantz J, Glaumann H, Ingelman-Sundberg M. (1991) Acetone-regulated synthesis and degradation of cytochrome P450E1 and cytochrome P4502B1 in rat liver. *Eur J Biochem.* 198(2): 383-9.

Ryan DE, Ramanathan L, Iida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS, Levin W. (1985) Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *J Biol Chem.* 260(10): 6385-93.

- Ryan DE, Koop DR, Thomas PE, Coon MJ, Levin W. (1986) Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Arch Biochem Biophys.* 246(2): 633-44.
- Sanfeliu C, Wright JM, Kim SU. (1999) Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line. *Neurotoxicology.* 20(6): 935-44.
- Schenkman JB, Remmer H, Estrabook RW (1967). Spectral Studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol.* 3(2): 113-23.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. (2006) Glial modulation of GABAergic and glutamate ergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem.* 6(10): 929-34.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 267(16): 4904-11.
- Shah BR, Santucci K, Sinert R, Steiner P. (1995) Acute isoniazid neurotoxicity in an urban hospital. *Pediatrics.* 95: 700-4.
- Shannon MW, Lovejoy FH Jr. Isoniazid. In: Haddad LM, Winchester JF, eds. *Clinical management of poisoning and drug overdose.* 2d ed. Philadelphia: Saunders. 1990: 970-5.
- Shichi H. (2004) Cataract formation and prevention. *Expert Opin Investig Drugs.* (6): 691-701.
- Simonian NA, Coyle JT. (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36: 83-106.
- Snider D Jr. (1980) Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy. *Tubercle.* 61(4): 191-6.
- Sohda T, Shimizu M, Kamimura S, Okumura M. (1993) Immunohistochemical demonstration of ethanol-inducible P450 2E1 in rat brain. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1B: 69-75.
- Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphei K, Attari S, Mehta S. (1997) Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. *Drug Chem Toxicol.* 20(3): 255-69.
- Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. (1987) Stabilization of cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol.* 1(8): 542-7.

Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1988) Structure and regulation of the ethanol-inducible cytochrome P450j. *Adv Alcohol Subst Abuse*. 7(3-4): 205-7.

Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. (1989) Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem*. 264(6): 3568-72.

Steenken W Jr, Wolinsky E. (1952) Isoniazid in experimental tuberculosis. *Trans Annu Meet Natl Tuberc Assoc*. 48: 425-30.

Tanikawa K, Torimura T. (2006) Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol*. 39(1): 22-7.

Thurman RG, Ley HG, Scholz R. (1972) Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem*. 25(3): 420-30.

Tindberg N, Ingelman-Sundberg M. (1996) Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *J Neurochem*. 67(5): 2066-73.

Tirumalai PS, Bhamre S, Upadhyya SC, Boyd MR, Ravindranath V. (1998) Expression of multiple forms of cytochrome P450 and associated mono-oxygenase activities in rat brain regions. *Biochem Pharmacol*. 56(3): 371-5.

Toyokuni S. (2006) Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. (7-8): 1373-7.

Tsutsui H (2006) Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Intern Med*. 45(13): 809-13.

Tu YY, Yang CS. (1985) Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. *Arch Biochem Biophys*. 242(1): 32-40.

Ueno T, Gonzalez FJ. (1990) Transcriptional control of the rat hepatic CYP2E1 gene. *Mol Cell Biol*.;10(9): 4495-505.

Upadhyya SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. (2000) Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys*. 373(1): 23-34.

Vaglioni F, Pardini C, Viaggi C, Bartoli C, Dinucci D, Corsini GU. (2004) Involvement of cytochrome P450 2E1 in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 91(2): 285-98.

Vasiliou V, Ziegler TL, Bludeau P, Petersen DR, Gonzalez FJ, Deitrich RA. (2006) CYP2E1 and catalase influence ethanol sensitivity in the central nervous system. *Pharmacogenet Genomics.* 16(1): 51-8.

Vasudeva R, Woods B. (1997) Isoniazid-related hepatitis. *Dig Dis.* 15(6): 357-67.

Vences-Mejia A, Labra-Ruiz N, Hernandez-Martinez N, Dorado-Gonzalez V, Gomez-Garduno J, Perez-Lopez I, Nosti-Palacios R, Camacho Carranza R, Espinosa-Aguirre JJ. (2006) The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. *Hum Exp Toxicol.* 25(8): 453-9.

Villeneuve JP, Pichette V. (2004) Cytochrome P450 and liver diseases *Curr Drug Metab.* 5(3): 273-82.

Vuilleumier N, Rossier MF, Chiappe A, Degoumois F, Dayer P, Mermillod B, Nicod L, Desmeules J, Hochstrasser D. (2006) CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *Eur J Clin Pharmacol.* 62(6): 423-9.

Wang J, Liu Z, Chan P. (2000) Lack of association between cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Chinese population. *Mov Disord.* 15(6): 1267-9.

Warner M, Gustafsson JA. (1994) Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(3): 1019-23.

Watts PM, Riedl AG, Douek DC, Edwards RJ, Boobis AR, Jenner P, Marsden CD. (1998). Co-localization of P450 enzymes in the rat substantia nigra with tyrosine hydroxylase. *Neuroscience.* 86: 511-9.

Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C, (1998), Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology.* 27(1): 128-33.

Wright JM, Stokes EF, Sweeney VP. (1982) Isoniazid-induced carbamazepine toxicity and vice versa: a double drug interaction. *N Engl J Med.* 307: 1325-7.

Wood JD, Peesker SJ. (1972) The effect on GABA metabolism in brain of isonicotinic acid hydrazide and pyridoxine as a function of time after administration. *J Neurochem.* 19: 1527-37.

Wu D, Cederbaum AI. (2005) Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207(2 Suppl): 70-6.

Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Shan DE, Kuo JW, Ho YF, Chern HD. (2002) Genetic polymorphism of the CYP2E1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Taiwanese. *J Neural Transm.* 109(11): 1403-14.

Yadav S, Dhawan A, Singh RL, Seth PK, Parmar D. (2006) Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Mol Cell Biochem.* 286(1-2): 171-80.

Yang MX, Cederbaum AI. (1997) Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. *Arch Biochem Biophys.* 341(1): 25-33.

Yang CS, Patten CJ, Ishizaki H, Yoo JS. (1991) Induction, purification, and characterization of cytochrome P450IIE. *Methods Enzymol.* 206: 595-603.

Yoo M, Ryu HM, Shin SW, Yun CH, Lee SC, Ji YM, You KH. (1997) Identification of cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(2): 254-6.

Yue J, Peng RX, Yang J, Kong R, Liu J. (2004) CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 25(5): 699-704.

Zand R, Nelson SD, Slattery JT, Thummel KE, Kalthorn TF, Adams SP, Wright JM. (1993) Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 54(2): 142-9.

Zangar RC, Springer DL, Buhler DR. (1993) Alterations in cytochrome P-450 levels in adult rats following neonatal exposure to xenobiotics. *J Toxicol Environ Health.* 38(1): 43-55.

Zangar RC, Davydov DR, Verma S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 *Toxicol Appl Pharmacol.* 199(3): 316-31.

Zhukov, A.A., Archakov, A.I., (1982). Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 109: 813-8.

Zhukov, A.A., Archakov, A.I., (1985). Stoichiometry of microsomal oxidation reactions. Distribution of redox-equivalents in monooxygenase and oxidase reactions catalyzed by cytochrome P450. *Biokhimiia.* 50(12): 1939-52.

Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA. (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 30(9): 1500-5.

Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 6(2): 189-98.