



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTOS DEL ACETAMINOFEN EN EL SISTEMA  
GLUTATIÓN Y ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN  
DIFERENTES ÓRGANOS DE RATÓN"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ROXANA MICHEL NAVARRETE LEÓN



DIRECTOR DE TESIS: BIÓL. JORGE HUMBERTO LIMÓN PACHECO

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



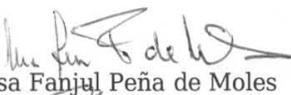
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente.**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**"Efectos del acetaminofen en el sistema glutatión y enzimas antioxidantes en diferentes órganos de ratón"**

realizado por **Navarrete León Roxana Michel**, con número de cuenta **097131478** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	 María Luisa Fajul Peña de Moles
Propietario	Dr.	 Jacinto Santiago Mejía
Tutor(a) Propietario	Biól.	 Jorge Humberto Limón Pacheco
Suplente	Dra.	 Julieta Rubio Lightbourn
Suplente	Dra.	 María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Univeritaria, D. F., a 9 de agosto del 2007  
**EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA**

**DR. ZENÓN CANO SANTANA**

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## **DEDICATORIA**

A mis papás Tere y Lalo, que siempre me han apoyado en cada circunstancia que se ha presentado en mi vida, buena o mala y han estado ahí para escucharme. Aunque hayan padecido carencias en sus vidas, han aprendido de ellas, nos enseñaron y ofrecieron sus mejores recursos, tiempo, dedicación para ser mejores personas. No tengo palabras para agradecerles.

A Lalo, que ha sabido salir delante de situaciones adversas y es un ejemplo de que no importa que tan profundo sea el hoyo en el que uno cae, puedes salir y continuar tú camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y mi hermano, por estar siempre ahí.

A mi Universidad, por dejarme conocer a través de ella la vida académica, y aprender que el gusto por el conocimiento no se da en un momento determinado, sino que se vuelve un estilo de vida.

A Gabriela Berenice Jiménez González, gracias por permitirme ser tu amiga, el tiempo que compartimos (y seguiremos compartiendo), gracias por escucharme y por seguir aprendiendo juntas.

A Edith Molina, por ser tu amiga, por el tiempo que hemos compartido y ver que nunca hay carencias ni limitaciones, solo las que uno se pone.

A mis amigos de la Facultad Gaby, Edith, Vero, Silvia, Minerva, Alma, Paul.

A Jorge H. Limón Pacheco, por haber confiado en mi y brindarme la oportunidad de dirigirme la tesis, y por cada uno de los consejos que me ofreciste.

A la Dra Ma. Eugenia Gonsebatt Bonapate, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme realizar la tesis ahí.

A mis compañeros de laboratorio, Elsa, Gerardo, Wendy, Valeria, Paty Guzmán.

A mis amigos del museo, Vanesa, Rocío, Ruth, Miguel, Pilar, Fernanda, Alma, a todos mis compañeros de sala.

## ÍNDICE

### LISTA DE ABREVIATURAS

### LISTA DE TABLAS

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMEN

1

### INTRODUCCIÓN

2

1. Acetaminofén.....	2
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Toxicidad.....	2
1.3 Importancia.....	4
2. Sistema del glutatión.....	5
2.1 Distribución de glutatión en el hígado, riñón y cerebro.....	8
3. Metabolismo de xenobióticos.....	9
3.1 Reacciones de fase I y fase II.....	10
4. Estrés oxidante .....	10
4.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	11
5. Oxidación de proteínas, lípidos y DNA.....	14
6. Sistemas antioxidantes.....	15
6.1. Glutarredoxina.....	16
6.2 Tiorredoxina.....	18
6.3 Distribución de la tiorredoxina en hígado, riñón y cerebro.....	20
6.4. Patologías asociadas a la deficiencia de los sistemas GSH y Trx.....	20
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>25</b>
1.Tratamiento a animales. ....	25
2.Procesamiento de las muestras.....	25
3. Determinación de glutatión .....	26
4. Preparación de proteínas.....	27
4.1 Preparación de albúmina oxidada.....	27
4.2 Determinación de proteínas.....	28
4.3 Determinación de proteínas oxidadas.....	29
5. Extracción de RNA.....	30
6. RT-PCR.....	31
7. Análisis estadístico.....	34
<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>

1. Efecto del acetaminofén en los niveles de glutatión y proteínas oxidadas en hígado de ratón.....	35
2. Efecto del acetaminofén en los niveles de glutatión y proteínas oxidadas en riñón de ratón.....	36
3. Efecto del acetaminofén en los niveles de glutatión y proteínas oxidadas en cerebro de ratón.....	38
4. Efecto del acetaminofén en los niveles de mRNA de tiorredoxina y glutarredoxina en tejidos de ratón.....	39
4.1 Efecto de acetaminofén en Hígado.....	39
4.2 Efecto del acetaminofén en Riñón.....	41
4.3 Efecto del acetaminofén en Cerebro.....	43
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APAP</b>	N-acetil- $\rho$ -aminofenol: Acetaminofén
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante, por sus siglas en ingles: Antioxidant Responsive Element
<b>GGT</b>	$\gamma$ -glutamyltranspeptidasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>MRP</b>	Proteínas resistentes a fármacos, por sus siglas en inglés: Multidrug resistance protein
<b>NADP</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido, en forma reducida
<b>NAPQI</b>	N-actil- $\rho$ -benzoquinona-imina
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>•NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	Ión nitronio
<b>NOS</b>	Especies reactivas del nitrógeno (por sus siglas en inglés: Reactive species of nitrogen)
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno en singulete
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical superóxido
<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxígeno
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozono
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (por sus siglas en inglés: Reactive species of oxygen)
<b>TrxR</b>	Tioredoxina reductasa
<b>Trx</b>	Tioredoxina
<b>UGT</b>	UDP-glucuronil transferasa

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Comparación entre los diferentes tipos de reacciones en Fase I y Fase II

Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno y daños que generan

Tabla 3. Productos de oxidación que son reducidos por sistemas antioxidantes

Tabla 4. Patologías asociadas a deficiencia en glutatión y tiorredoxina.

Tabla 6. Preparación de las muestras para las lecturas de glutatión para curva estándar

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Representación de los metabolitos formados en el metabolismo del acetaminofén

Figura 2. Transporte de glutatión, glutatión en forma oxidada y conjugados con glutatión fuera de la célula a través de las MRP1

Figura 3. Reacción de Fenton.

Figura 4. Formación del radical peroxinitrito, involucrado en la formación de otras NOS

Figura 5. Representación del sistema glutarredoxina

Figura 6. Representación del sistema tiorredoxina

Figura 7. Curva de ciclos para glutarredoxina de 20 a 40 ciclos. Con solución amortiguadora de reacción para PCR con salinidad media (2mM)

Figura 8 Curva de ciclos para *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* de 20 a 43 ciclos. Con solución amortiguadora de reacción para PCR con salinidad media (2mM)

Figura 9. Niveles de glutatión en hígado de ratón

Figura 10. Proteínas oxidadas en hígado

Figura 11. Niveles de glutatión en riñón de ratón.

Figura 12. Proteínas oxidadas en riñón

Figura 13. Niveles de glutatión en cerebro de ratón.

Figura 14. Proteínas oxidadas en cerebro

Figura 15. RNA en hígado de ratón

Figura 16. Expresión de mRNA *glutaredoxina 1* y *tiorredoxina 1* en hígado de ratón.

Figura 17. Integridad de RNA en riñón

Figura 18. Expresión de mRNA *glutaredoxina 1* y *tiorredoxina 1* en riñón de ratón

Figura 19. RNA en cerebro de ratón

Figura 20. Expresión de mRNA *glutaredoxina 1* y *tiorredoxina 1* en cerebro de ratón

## RESUMEN

El Acetaminofén es utilizado como un fármaco seguro por sus propiedades analgésicas y antipiréticas. En el metabolismo de APAP se forman conjugados glucurónicos y sulfatos como vía de eliminación del fármaco. Si es ingerido en dosis mayores a las terapéuticas genera N-acetil- $\rho$ -benzoquinona-imina (NAPQI), metabolito tóxico que se conjuga con glutatión y forma conjugados de GSH-APAP, lo cual disminuye los niveles de glutatión, que permiten las uniones covalentes con proteínas, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. El GSH es el tiol más abundantes dentro de la célula que ayuda a mantener un estado redox, participa en la detoxificación de xenobióticos, entre otras funciones que puede llevar a cabo. El GSH es un tripéptido sintetizado *de novo* en hígado, y es distribuido a los demás órganos a través del plasma sanguíneo, donde el riñón lo toma de la vena renal mientras que en cerebro es mantenido por reciclamiento y por la entrada de aminoácidos precursores como el glutamato y cisteína que atraviesan la barrera hematoencefálica. Dentro del sistema glutatión participa la enzima glutaredoxina (Grx), la cual puede ceder tioles gracias a su centro activo que contiene dos grupos cisteína que se encuentra muy conservado al igual que la enzima tiorredoxina (Trx) que los contiene también. La importancia de estas dos enzimas es que pueden reducir proteínas oxidadas. Por lo anterior se utilizó APAP a una dosis tóxica en ratones machos Balb/c, se extirparon hígado riñón y cerebro, a los cuales se les midieron los niveles de GSH, proteínas oxidadas y expresión de Grx y Trx. En este estudio se observó que hay una respuesta diferente ante el tratamiento con APAP, disminuyó los niveles de glutatión en hígado y riñón, mientras que en cerebro se mantuvo igual durante el tratamiento. No se detectaron proteínas oxidadas por detección de carbonilos y se observó la expresión de Grx y Trx producida por el tratamiento.

# INTRODUCCIÓN

## 1. Acetaminofén

### 1.1 Generalidades

El acetaminofén (N-acetil-*p*-aminofenol, APAP) es un fármaco ampliamente utilizado como antipirético y analgésico, ambos efectos parecen tener relación con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, sin propiedades antiinflamatorias útiles y, a diferencia del ácido acetilsalicílico, no produce efecto lesivo sobre la barrera de la mucosa gastrointestinal. Administrado en dosis terapéuticas (10–15 mg/kg) es bien tolerado y tiene una biodisponibilidad del 100% la unión a proteínas plasmáticas es baja (25%) y su vida media de eliminación es menor de tres horas (Montoya 2006; Rodríguez *et al.*, 2006)

### 1.2 Toxicidad

Se ha encontrado que la concentración plasmática de paracetamol mayor a 300 mg/L, 4 horas después de la ingesta, está asociado con un daño severo, mientras que a niveles de 120 mg/L de paracetamol no causa daño hepático (Kozar *et al.*, 2001). Algunas de las consecuencias manifestadas después de la sobredosis incluyen un aumento en los niveles de transaminasa, un leve incremento en bilirrubina en suero, necrosis hepática centrolubular, y daño renal (Kozar *et al.*, 2001).

Como resultado del metabolismo del paracetamol se produce ácido glucurónico y conjugados de sulfato, productos inactivos que los cuales representan un 80% de la eliminación del paracetamol (Park *et al.*, 2005). El resto del paracetamol que no es eliminado por las vías anteriores, se elimina a través del sistema de citocromos P-450 en el hígado, produciendo N-acetil-*p*-benzoquinona-imina (NAPQI), metabolito tóxico (vía importante que en caso de sobredosis es capaz de producir necrosis tisular -hepática,

tubulorenal-) que reacciona con GSH, para formar conjugados paracetamol-GSH. La importancia del GSH en la protección contra NAPQI mediada por su hepatotoxicidad radica en: 1) el GSH puede actuar como nucleófilo como en el caso de la NAPQI para dar 3-(glutatión-S-il) acetaminofén; 2) el GSH es un nucleófilo reductor en el cual dos moléculas de GSH pueden reducir NAPQI para dar APAP y GSSG. (ROSEN et al, 1984). Finalmente este compuesto es convertido en conjugados de cisteína y conjugados de N-acetil, los cuales son excretados por la orina (Graham *et al.*, 2005).

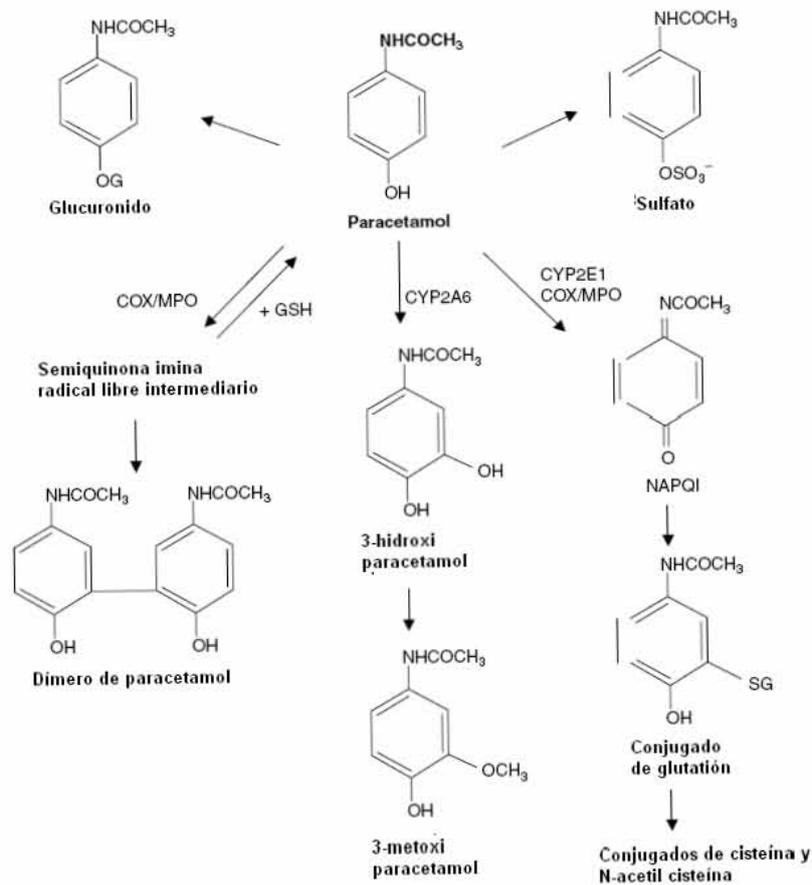


Figura 1. Representación de los metabolitos formados en el metabolismo del APAP. Tomado de Graham (1995).

En estudios *in vitro* con enzimas microsomales de hígado se vio que existe la unión covalente de las proteínas con el APAP y que es dependiente de la conversión del

metabolito activo del APAP producido por la acción de citocromos P-450 (Potter *et al.*, 1973). En estudios con humanos a los cuales se les dio un pretratamiento con disulfiram (utilizado en el tratamiento para dejar de tomar alcohol, ya que inhibe la producción del acetaldehído e inhibe CYP2E1) y rifampicina (antibiótico utilizado para tratar la tuberculosis el cual induce CYP3A4) y posteriormente un tratamiento con APAP, se observó que CYP2E1 contribuye marcadamente con el metabolismo del acetaminofén, mientras que la contribución en la formación de NAPQI por el CYP3A4 es pequeña (Manyike *et al.*, 2000).

### **1.3 Importancia**

De acuerdo a Montoya (2006), en la ciudad de México se ha observado que más del 70% de las intoxicaciones pediátricas son causadas por accidentes con medicamentos.

El primer lugar lo ocupan los analgésicos como el acetaminofén. (Montoya, 2006).

Se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* la formación de uniones covalentes del metabolito reactivo del APAP con proteínas en células de hígado de ratón (Jollow *et al.*, 1973; Potter *et al.*, 1973). También se ha visto que en riñón de ratón el metabolito reactivo contribuye a uniones covalentes que generan nefrotoxicidad (Honsglo *et al.*, 1994)

Se ha visto que es capaz de penetrar barrera hematoencefálica, en algunos estudios realizados por Lambrecht y colaboradores, en el cual administran acetaminofén con  $I^{131}$  observan que la cantidad de este APAP marcado radiactivamente se encuentra en mayor proporción en corteza frontal y en región media del cerebro a los 15 minutos, la cual también reporta Courade *et al.*, 1999, donde se encuentra [ $^3H$ -APAP] a los 15 minutos en corteza e hipocampo y a los 45 minutos en célula estriadas e hipotálamo.

La mayoría de estudios relacionados con la toxicidad generada por APAP están enfocados en el daño a hígado que produce, algunos se enfocan al daño en riñón, más no hay alguno que compare la respuesta de ambos dados por el mismo tratamiento, o lo comparen con cerebro generados por los efectos de NAPQI.

## **2, Sistema del Glutación**

Uno de los principales antioxidantes es el tiol glutación (GSH), que se encuentra presente en todas las células. Es un tripéptido que está compuesto por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. El glutamato y la cisteína están unidos por un enlace  $\gamma$ -peptídico, lo cual hace que el GSH no sea hidrolizado por la acción de la mayoría de las peptidasas (Anderson, 1998). Es uno de los tioles más abundantes en la célula, ya que se encuentra a concentraciones que van de 0.2-10 mM (Anderson, 1998), está relacionado en el mantenimiento del ácido ascórbico, mantenimiento de la vitamina E y los carotenos (Meister, 1994). También es importante en la síntesis y reparación del DNA ya que está involucrado en la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y en el plegamiento de las proteínas sintetizadas (Anderson, 1998). Otra de sus funciones es la desintoxicación de xenobióticos, ya que puede reaccionar con compuestos tóxicos reactivos para formar conjugados de GSH y proteger de los daños que pueden causar a

las especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno NOS. (Meister, 1994).

La síntesis de GSH es catalizada y mediada por dos procesos enzimáticos, el primero participa la enzima  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS), la cual une a la cisteína y la glicina mediante una reacción dependiente de ATP:

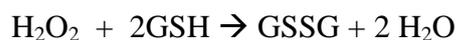


El segundo por GSH sintasa (GS) que añade glicina a  $\gamma$ -glutamilcisteína para formar GSH, y es dependiente de ATP:



El GSH puede tener una función como nucleófilo, cediendo electrones a especies que carecen de ellos o como agente reductor dentro de la célula. Cuando el GSH es oxidado (GSSG), vuelve a su estado reducido gracias a la enzima glutatión reductasa (GSSG-Rd) que emplea NADPH como cofactor (Hayes, 1999).

La glutatión peroxidasa (GPX) remueve  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduciéndolo a agua y oxidando al GSH



cataliza la reducción de hidroperóxidos de ácidos grasos, colesterol  $7\beta$ -hidroperóxido reduciéndolo a alcoholes (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La glutatión S-transferasa (GST) también está involucrada en el metabolismo de herbicidas, pesticidas y xenobióticos, incluidos cloroformo, nitratos orgánicos, bromobenceno, aflatoxinas, DDT, naftaleno y acetaminofén. Muchos xenobióticos son metabolizados por conjugación con GSH catalizado por GST:



Está encargada de la protección contra carbonilos reactivos, epóxidos e hidroperóxidos (Halliwell, 1999)

Cuando se presenta un aumento en los niveles de GSSG se ha visto en ratones que MRP1 además de transportar conjugados de GSH, puede transportar GSH y GSSG ayudando a mantener el estado redox previniendo la reacción de GSSG con los tioles celulares a través de su salida de la célula (Leslie *et al.*, 2001). Una consecuencia del transporte del GSH es que puede proteger la membrana celular contra daño oxidante además de reducir a los compuestos que estén próximos a la membrana celular o facilitar el transporte de ciertos compuestos como los disulfuros (Meister, 1989).

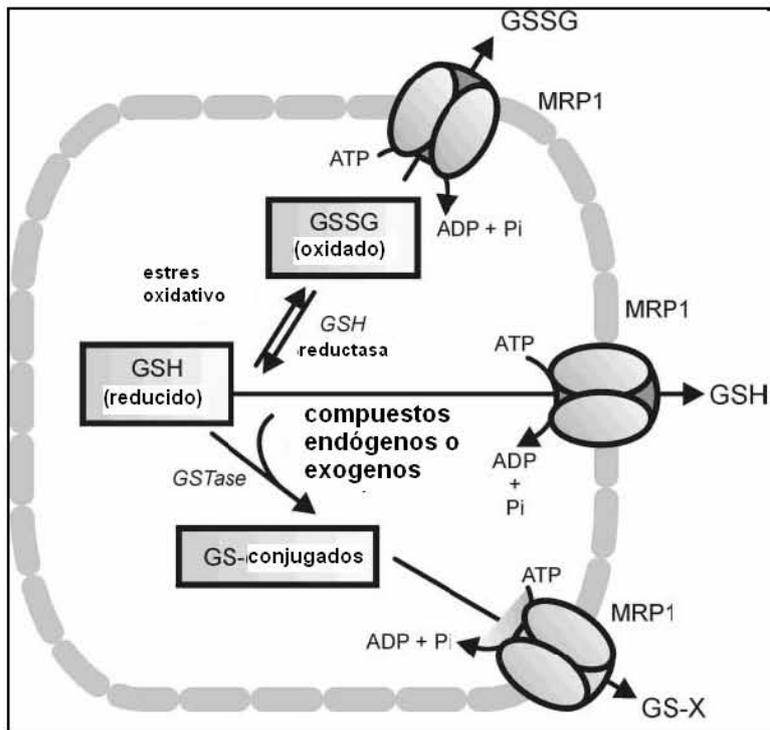


Figura 2. Transporte de GSH, GSSG y conjugados con GSH fuera de la célula a través de las MRP1. Tomado de Leslie *et al.*, (2001).

## 2.1 Distribución de GSH en hígado, riñón y cerebro

El hígado es el órgano encargado de la síntesis *de novo* de GSH aportando del 90% de GSH circulante (Leeuwenburg *et al.*, 1995). El GSH que se encuentra en el hígado normalmente pasa al plasma sanguíneo de donde es distribuido a los tejidos periféricos (Meister *et al.*, 1983). El GSH en plasma es degradado a aminoácidos por acción de la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa (GGT), los cuales pueden ser reincorporados a las células y usados para la síntesis de GSH (Meister *et al.*, 1983). En el riñón aproximadamente del 80-90% de GSH en plasma es catabolizado por la actividad de GGT, mientras que en otros órganos (como el músculo esquelético y el corazón) este proceso ocurre en menor proporción, (Leeuwenburg *et al.*, 1995).

El GSH en el hígado es transportado a través de la bilis y de la vena hepática hacia el plasma sanguíneo (Meister *et al.*, 1983). Aproximadamente un 20% de GSH encontrado en riñón proviene de la vena renal, lo cual indica que hay otro mecanismo por el cual lo obtiene (Meister

*et al.*, 1983), del lado de cepillo de la membrana celular del túbulo proximal se da la mayor actividad de GGT (*Meister et al.*, 1983).

En cerebro el mantenimiento de GSH está dado básicamente por reciclamiento del mismo, algunos precursores de su síntesis pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica, como el glutamato y la cisteína. Se ha encontrado una actividad alta de la  $\gamma$ -GCS y la GS en el plexo coroideo. La concentración de GSH es mayor en astrocitos que en neuronas (*Dringen*, 2000). Aunque no es claro si GSH es transportado de forma íntegra o por rompimiento de GSH, se han encontrado transportadores dependientes de sodio que contribuyen al transporte de GSH de sangre al cerebro (*Dringen*, 2000).

### **3. Metabolismo de xenobióticos**

. El metabolismo consiste en la serie de cambios bioquímicos que sufre la sustancia en un organismo por acción enzimática, para producir energía, la síntesis de biomoléculas y/o finalmente productos de desecho que van a ser excretados.

El metabolismo en toxicología es muy importante, ya que una sustancia tóxica es transformada por algunos procesos metabólicos en otros compuestos que usualmente son menos tóxicos y más fáciles de ser eliminados por el organismo. Este fenómeno se conoce como biotransformación y es el proceso mediante el cual los compuestos químicos sufren modificaciones enzimáticas convirtiéndolos en compuestos más hidrosolubles facilitando su excreción. (*Manahan*, 1992).

### 3.1 Reacciones de fase I y fase II

Los procesos por los cuales los compuestos xenobióticos sufren cambios en nuestro organismo se clasifican en reacciones de fase I y fase II. Las reacciones de fase I son aquéllas en las cuales se introducen grupos funcionales polares a moléculas lipofílicas tóxicas. Con el grupo funcional añadido, el producto de la reacción de fase I es usualmente más soluble en agua que la especie del xenobiótico y es “químicamente manejable” y puede ser eliminado por el cuerpo (Manahan, 1992).

En las reacciones de fase II los intermediarios reactivos generados en la fase I son conjugados por lo que se aumenta la solubilidad en agua (Manahan, 1992) . A continuación en la tabla 1 se muestran las diferencias entre las reacciones de fase I y fase II.

**Tabla 1. Comparación entre reacciones en Fase I y II**

<b>Enzima</b>	<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>
Tipo de reacciones	Hidrólisis Reducción Oxidación	Conjugaciones
Polaridad de la sustancia	Baja	Alta
Mecanismo general	Modificación de un grupo funcional	Adición de un compuesto polar al grupo funcional
Consecuencias	Puede resultar en la bioactivación del compuesto	Facilita la excreción

### 4. Estrés oxidante

Durante la respiración, los organismos aeróbicos requieren oxígeno para producir energía. Sin embargo durante este proceso se producen intermediarios del oxígeno que pueden alterar la homeostasis celular generando estrés oxidante (Halliwell, 1994). Según Sies (1997), el estrés oxidante se define como una alteración en el balance entre moléculas antioxidantes a favor de las oxidantes lo cual lleva hacia un estado de

oxidación asociado al daño celular

El estrés oxidante está implicado en la oxidación de diferentes moléculas dentro de la célula, en las que se incluyen el DNA, los azúcares, los ácidos grasos y las proteínas. La oxidación de estas moléculas tiene dos consecuencias: 1) que los sistemas antioxidantes entren en función para reparar las moléculas dañadas, siendo éste un efecto reversible; y 2) que los daños ocasionados no puedan ser reparados y que las moléculas oxidadas pierdan su función celular, siendo esto un efecto irreversible y que en la mayoría de los casos lleva a la muerte celular (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

Entre los factores que pueden causar estrés oxidante se encuentran factores ambientales como la radiación ionizante, la luz ultravioleta, los agentes químicos, la exposición a metales pesados, la biotransformación de medicamentos, la respiración y el proceso inflamatorio, donde se pueden generar intermediarios altamente reactivos del oxígeno o del nitrógeno.

#### **4.1 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno**

El estrés oxidante genera moléculas intermediarias del oxígeno altamente reactivas. A estas moléculas se les ha denominado ROS y dentro de éstas se incluyen los radicales libres. Un **radical libre** es cualquier átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, lo que hace una entidad altamente reactiva. Un ejemplo de lo anterior es el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), que cuenta con un electrón y un protón (que están desapareados), la reacción en cadena comenzaría con quitar un  $\text{H}^\bullet$  a otra molécula (Halliwell, 1994). La importancia que representan estas moléculas es el daño que

pueden causar a nivel celular. Durante el estrés oxidante, los radicales libres reaccionan con moléculas cercanas como proteínas o azúcares, quitándoles electrones para quedar estables pero generando a su vez otro radical libre y así sucesivamente.

Durante la respiración, se generan los radicales superóxido- $O_2^{\bullet-}$  y  $HO^{\bullet}$ . El radical  $HO^{\bullet}$  es uno de los más reactivos, pero su vida media es corta, sin embargo tiene el potencial de iniciar la peroxidación de lípidos de las membranas celulares (Reed, 1990). Existen ROS que no tienen electrones desapareados como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ) aún así tienen la capacidad de interactuar con macromoléculas celulares y generar daños o pueden producir ROS más reactivos (Hansberg, 2002). Como ya se mencionó, las especies que tienen electrones desapareados son muy reactivas y por lo general causan daño en DNA, proteínas y lípidos de las membranas celulares. Por otra parte, la reactividad de estas moléculas varia, por ejemplo, el  $H_2O_2$  y el  $O_2^{\bullet-}$  son compuestos que reaccionan poco, sin embargo su toxicidad está asociada a la generación de otras ROS como el  $^1O_2$  y el  $HO^{\bullet}$ . Esto se conoce como reacción de Fenton y es la interacción de las ROS con un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^{2+}$  (Hansberg, 2002).



**Figura 3. Reacción de Fenton. Los metales como el Fe son capaces de reaccionar con el  $H_2O_2$  resultando en un cambio en el estado de oxidación del Fe y la generación de radicales libres.**

**Tabla 2. Especies reactivas de oxígeno y daños que generan. (Tomado de Hansberg, 2002).**

Radical libre	Procedencia	Daño
<b>O</b> Oxígeno atómico	Cadena respiratoria	Se une a quinonas, fenoles y proteínas con hierro libre
<b>O<sub>3</sub></b> Ozono	Se genera en la superficie terrestre por efecto de la luz en NO• que produce la combustión orgánica de los automotores	Reacciona con proteína, lípidos, causa inflamación y muerte de los bronquios y alvéolos pulmonares
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b> Oxígeno en singlete	Formado cuando uno de los 2 electrones libres capta energía, cambia de giro y se aparea con otro electrón libre	Reacciona con membrana plasmática, lípidos, Es muy reactivo, producido fuera de la célula reacciona fuertemente con membranas plasmáticas, dentro de la célula reacciona con DNA y proteínas
<b>O<sub>2</sub>•<sup>-</sup></b> Superóxido	Dismutación espontánea del oxígeno de la descomposición del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Daño a pulmones, fluido sinovial, mucosas
<b>HO•</b> Radical hidroxilo	Proceso de radiólisis	Peroxidación de lípidos
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> Peróxido de hidrógeno	Producido por oxidasas	Forma aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. es muy lipofílico, lo que le permite atravesar membranas plasmáticas

El óxido nítrico (•NO) está involucrado en varias funciones fisiológicas como la transmisión neuronal, la regulación de relajación vascular y el proceso inflamatorio. La generación de •NO está catalizada por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Las especies reactivas del nitrógeno (NOS), también están implicadas en daños a nivel celular causando apoptosis. Bajo circunstancias patológicas O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> puede reaccionar directamente con •NO para generar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). El ONOO<sup>-</sup> puede dañar proteínas y formar otros productos tóxicos como el dióxido de nitrógeno (NO<sup>•</sup><sub>2</sub>), el ión nitronio (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) y el radical hidroxilo (Flint, 2002).



**Figura 4. Formación del radical peroxinitrito, involucrado en la formación de otras NOS.**

## 5. Oxidación de proteínas, lípidos y DNA

Está bien establecido que la exposición de proteínas con ROS produce modificación en las cadenas de aminoácidos, la conversión de proteínas de alto peso molecular (uniones cruzadas) y fragmentación de la cadena polipeptídica. (Stadman *et al.*, 1997).

Las reacciones son iniciadas por  $\text{OH}^\bullet$  principalmente. En el transcurso del proceso de la oxidación está determinada por la disponibilidad de  $\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  o esta última en forma protonada. El  $\text{OH}^\bullet$  necesario para esta reacción puede ser obtenido por radiólisis del agua o la división catalizada por metales del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Berlett *et al.*, 1997).

La oxidación catalizada por metales en los residuos de las cadenas de lisina, arginina, prolina y treonina pueden producir derivados carbonilos (Stadman *et al.*, 1997). Los carbonilos pueden ser introducidos en las proteínas por reacciones con aldehídos (4-hidroxi-2-nonenal, malondialdehído) producidos durante la peroxidación lipídica o con derivados carbonilos reactivos (cetoaminas, cetoaldehídos) generados como consecuencia de la reacción o reducción de azúcares o sus productos de oxidación con residuos de lisina de proteínas (reacciones de glicación y glicoxidación) (Berlett *et al.*, 1997).

Los carbonilos en las proteínas son marcadores generados por procesos oxidantes. Se ha visto que hay un incremento de éstos como consecuencia del envejecimiento y enfermedades como la de Alzheimer, de Parkinson, la diabetes, la artritis reumatoide, y la distrofia muscular, entre otras (Stadman *et al.*, 2000). En humanos se ha visto el aumento de carbonilos y de proteínas oxidadas asociados al envejecimiento en el cerebro, el músculo esquelético, y el desarrollo de cataratas, principalmente. También han sido descritos en enfermedades como la de Alzheimer, donde se ha visto un

incremento en los carbonilos en el hipocampo y en el lóbulo parietal inferior consistente con la región histopatológica de la enfermedad (Flint, 2002).

Las membranas celulares contienen fosfolípidos, que tienen ácidos grasos poliinsaturados que son propensos a oxidación por los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder un hidrógeno por acción de  $\text{HO}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , una vez generado el radical carbono en un ácido graso reacciona con el oxígeno para formar un radical peroxilo y así propagar la reacción (Hansberg, 2002). La peroxidación lipídica es una consecuencia biológica importante de daño celular oxidante, la destrucción de ácidos grasos insaturados están asociados con la alteración en membrana e inactivación enzimática. La descomposición de ácidos grasos poli-insaturados peroxidados también genera compuestos carbonilos reactivos tales como malondialdehído (MDA) e hidroxialquenos (Reed, 1990).

Durante la tensión oxidativa el DNA puede sufrir alteraciones generada por ROS. El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se puede unir a metales de transición como el Fe y generar  $\text{HO}^\bullet$  que puede atacar las bases nitrogenadas y producir rupturas en DNA. El  $^1\text{O}_2$  causa aductos en guanina provocando 8-hidroxiguanina. Los cambios en bases nitrogenadas pueden formar mutaciones, la 8-hidroxiguanina puede hacer puentes de hidrógeno con una adenina en lugar de una citosina y la 8-hidroxiadenina se une con una guanina en lugar de una citosina (Hansberg, 2002).

## 6. Sistemas antioxidantes

Ante los diferentes daños que pueden causar las ROS, las células cuentan con sistemas de defensa para contender contra la tensión oxidativa y mantener un estado fisiológico adecuado. Estos sistemas se conocen como **antioxidantes**. Los antioxidantes son aquellas moléculas que pueden reaccionar con los oxidantes, reducirlos y permanecer estables (Halliwell, 1994). Hay diferentes moléculas que funcionan como antioxidantes celulares en las células como el ácido ascórbico, los carotenos, la vitamina E, y los sistemas enzimáticos como la catalasa, súper óxido dismutasa, GSH, glutarredoxina, tiorredoxina (Trx), entre otras (Halliwell, 1994).

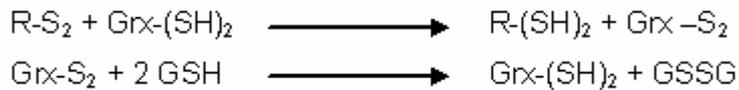
### 6.1 Glutarredoxina

La Grx fue descubierta como donadora de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa en *E. coli* con cepas carentes de la enzima Tiorredoxina (Trx) (Holmgren, 1989). La secuencia de Grx muestra que está formada por 85 aminoácidos, incluyendo el sitio activo que tiene una secuencia de Cys-Pro-Tyr-Cys que se encuentra altamente conservada, localizada en la posición 11 y 14 de la molécula y dando como resultado un peso de 10 kDa en *E. coli*. Se purificó y secuenció en células de mamíferos como en timo de ternera al igual que en hígado de cerdo encontrándose una semejanza del 87% entre ambas y con respecto a la bacteriana se encontró una semejanza del 29% (Holmgren, 1989; Holmgren *et al.*, 1995).

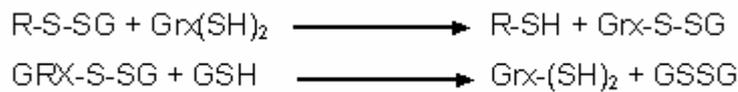
El sistema consta de Grx, GSH y GSSG-Rd. GRX cuando cede sus tioles y se encuentra en forma oxidada, vuelve a su estado reducido a través del GSH, produciendo

GSSG que será reducido por GSSG-Rd (Holmgren, 1989; Holmgren *et al.*, 1995). La Grx puede catalizar reacciones por 2 mecanismos: uno, vía ditiol (como Trx) y otro vía monotiol (la cual es necesaria para la reducción de proteínas que forman disulfuros con GSH-Glutationilación):

Mecanismo ditiol:



Mecanismo Monotiol:



donde R-S-SG es un disulfuro con GSH (Holmgren *et al.*, 2005).

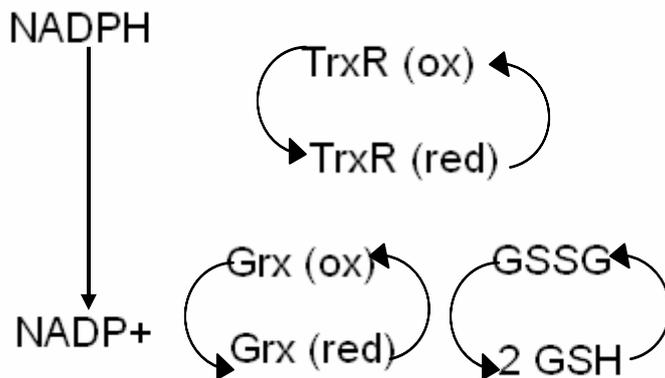


Figura 5. Representación del sistema Grx. Modificado de Holmgren (2005).

En humanos se han detectado dos isoformas de Grx, Grx 1 que es citosólica y Grx2 que se encuentra en mitocondria y en núcleo (Lundberg *et al.*, 2001).

La importancia del sistema GSH-Grx reside en la capacidad que tiene de reducir las uniones disulfuro, no sólo para la ribonucleótido reductasa, sino también para otras funciones celulares, como el mantenimiento redox en la célula, la reducción de tioles

oxidados en proteínas (Riestch *et al.*, 1998). Cuando se privaron de glucosa para producir estrés oxidante células cancerosas humanas MCF-7 MDR y DU-145, se observó que la sobre expresión de Grx actúa como regulador negativo de ASK asociándose con la porción C-terminal e inhibiendo su actividad de cinasa protegiendo con ello la activación de la vía de muerte celular por el estrés oxidante (Song *et al.*, 2002).

**Tabla 3. Productos de oxidación que son reducidos por sistemas antioxidantes.**

<b>Sistema antioxidante</b>	<b>Productos de oxidación</b>
<b>GSH</b>	Disulfuros en proteínas y ácidos sulfénicos
<b>Trx</b>	Disulfuros en proteínas, S-nitrozotioles, ácido sulfénico
<b>Grx</b>	Disulfuros en proteínas (mono y ditiol), S-nitrozotioles, ácidos sulfénicos, ácidos sulfínicos.

## 6.2 Tiorredoxina

El sistema Trx contiene enzimas que realizan funciones óxido reductoras. La proteína Trx fue descubierta como donadora de hidrógeno importante para la ribonucleótido reductasa en *E. coli* (Holmgren, 1989). La enzima es un proteína de 108 aminoácidos, con un peso de aproximadamente de 12 kDa y su sitio activo esta compuesto por la secuencia consenso Cys-Gly-Pro-Cys, lo cual le confiere la acción donadora de hidrógeno (Holmgren, 1989). La Trx cataliza la reducción de uniones disulfuro en el citosol, a través de su sitio activo, dando como resultado Trx oxidada.

En el sistema de Trx se incluye a la Tiorredoxina reductasa (TrxR), una enzima que es capaz de regresar a su estado reducido a la Trx. Cuando la Trx es oxidada, la TrxR la reduce usando NADPH como cofactor (Carmel-Harrel *et al.*, 2000). (Figura 2). Cabe mencionar que la NADPH y la NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) son utilizadas en la biosíntesis reductora y en la producción de energía respectivamente en

la mitocondria además de que el NADPH es un recurso crucial en el mantenimiento de tios como la Trx y el GSH dentro de la célula (Kerer *et al.*, 1994).

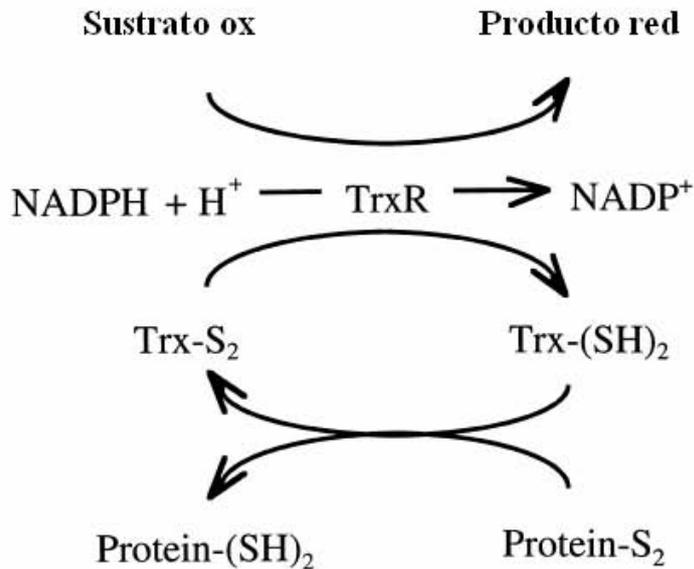


Figura 6. Representación del sistema tiorredoxina. Tomada de Amer (2000).

En humanos se han descrito dos isoformas de Trx1 que es citosólica y Trx2 mitocondrial. Trx 1 puede modular la unión de DNA de algunos factores de transcripción como NF-κB y AP-1 (Vlami-Gardikas y Holmgren, 2002).

La Trx reduce proteínas oxidadas al unirse a la proteína blanco y formar un intermediario disulfuro con la proteína que se reduce, mientras se oxidan los dos grupos cisteína-SH a cistina (disulfuro) de la Trx. La Trx además funciona como donador de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa, dona electrones a metionina sulfóxido reductasa, enzima que repara daño oxidante a los residuos de cisteína en proteínas (Halliwell y Gutierrez, 1999).

### **6.3 Distribución de Trx en el hígado, en el riñón y en el cerebro**

Se ha estudiado *in vivo* la distribución del sistema Trx en los tejidos y se ha observado en riñón que las enzimas se encuentran en el túbulo proximal y distal en mayor cantidad, pero también en las células del túbulo colector distal y en las células del epitelio transicional (Oberley, 2001). Trx1 se encuentra ampliamente expresada en cerebro y en especial en regiones con alta actividad metabólica como sustancia nigra y núcleo subtálmico (Patenaude *et al.*, 2005). La inducción parece estar relacionada con la presencia de ROS, involucrando a la secuencia de elementos de respuesta antioxidante (ARE) y al factor de transcripción Nrf2 (Patenaude *et al.*, 2005). La expresión de Trx2 se encuentra en áreas que presentan radicales libres producidos por la acción de sustancias tóxicas o por el metabolismo de neurotransmisores (aminácidos, dopamina, NO), o por la presencia de metales de transición, en regiones como es el telencéfalo, el bulbo olfatorio, en el piriforme, en la corteza entorinal, en la neocorteza y en la amígdala vasolateral, que son zonas con altos niveles neuronales de NO sintasa (Rybnikova *et al.*, 2000).

### **6.4. Patologías asociadas a la deficiencia de los sistemas GSH y Trx**

La deficiencia de los sistemas anteriores al interior celular está asociada a diferentes patologías. Por ejemplo, se ha descrito que la deficiencia de GSH promueve la sensibilidad de las células al efecto de la radiación, reacciones oxidativas a varios compuestos tóxicos (Meister, 1994). Por otra parte, se ha reportado que la deficiencia de GSH puede llevar a daño mitocondrial. Esto ocurre debido a que el GSH está involucrado en la regulación de la permeabilidad interna de la membrana manteniendo el estado reducido y su modificación puede alterar la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y llevar a la muerte celular (Reed, 1990).

En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se encontró un decremento significativo en los niveles de Trx y TR en amígdala, hipocampo y cerebelo (Lovell *et al.*, 2000).

La importancia del sistema GSH-Grx en cerebro se demostró recientemente *in vivo* con el modelo de rata y la administración de 1-metil-1,4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP1), una neurotoxina que causa síntomas semejantes a los de la enfermedad de Parkinson. En este trabajo se generó la supresión de Grx en corteza frontal y tejido estriado lo cual produjo la inhibición de complejo I mitocondrial, el cual se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas cuando se encuentra dañado (Kenchappa *et al.*,2003).

**Tabla 4 . Patologías asociadas a deficiencia en GSH y Trx.**

Sistema	Patologías
GSH	HIVHepatitis C <sup>a</sup> , diabetes tipo II <sup>a</sup> , colitis ulcerativa <sup>a</sup> , fibrosis pulmonar <sup>a</sup> , cataratas <sup>a</sup>
Trx	Infecciones retrovirales <sup>b</sup> , artritis reumatoide <sup>c</sup>

Tomado de Anderson (1998)<sup>b</sup>; Lemarechal *et al.*<sup>b</sup>, (2007), Masutani H K<sup>c</sup> *et al.*, (2005).

## JUSTIFICACIÓN

El contenido de GSH varía considerablemente en los diferentes tejidos de un organismo. Por ejemplo, se ha descrito que el hígado es uno de los órganos con elevado contenido de GSH a diferencia del riñón, que contienen una concentración moderada, o baja como en el caso del cerebro donde el contenido de GSH es menor que el de los órganos ya mencionados. Por otra parte, se ha demostrado que el metabolismo del GSH en un organismo es un proceso dinámico, e involucra la exportación, el catabolismo y la redistribución de los aminoácidos precursores en los diferentes tejidos para la síntesis *de novo*. Aunque existen modelos *in vivo* en los que se han explorado los efectos de la intoxicación con APAP en los diferentes tejidos, estos estudios sólo han investigado los efectos del APAP en un tejido u órgano de manera individual. Es por ello que el propósito de este estudio es conocer el efecto de la intoxicación por APAP en los sistemas GSH y Trx a nivel sistémico y si esto activa algún mecanismo de respuesta específico en cada tejido en estudio.

## **HIPÓTESIS**

Dado que la regulación del GSH en un organismo es un proceso dinámico, la intoxicación aguda con acetaminofén (APAP) disminuirá el GSH a nivel sistémico promoviendo la generación de proteínas oxidadas y la expresión de los sistemas GSH-GRX y TRX.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERALES**

Estudiar el efecto de la intoxicación con APAP en los sistemas GSH-Grx y Trx en hígado, riñón y cerebro de ratones BalbC/AnN.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar los niveles de GSH en hígado, riñón y cerebro de los ratones tratados con APAP a una dosis de 300 mg Kg<sup>-1</sup>.

Analizar en los tejidos de ratón la oxidación de proteínas mediante la formación de carbonilos por efecto de la exposición al APAP.

Determinar el efecto del APAP en los niveles de mRNA de Grx y Trx en los diferentes tejidos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Tratamiento a animales

Se usaron ratones de la cepa BALB/c los cuales fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les inyectó el APAP vía intraperitoneal (IP), a una dosis de 300 mg kg<sup>-1</sup> disuelto en NaCl 0.9% (Enomoto *et al.*, 2001). A los organismos control se les administró sólo NaCl 0.9%. Se emplearon tres individuos por grupo. Los organismos fueron sacrificados por dislocación cervical a 1, 2 y 3 horas después de la inyección con APAP. El hígado, el riñón y el cerebro fueron disecados rápidamente, lavados con NaCl 0.9 % a 4 °C para eliminar el exceso de sangre, finalmente almacenados a -70 °C hasta su posterior utilización.

## 2. Procesamiento de las muestras

La porción de tejido para la determinación de GSH se lavó con solución salina al 0.9%. Con este se preparó un homogenizado al 10% con solución amortiguadora A (KCl 154 mM, DTPA 5 mM en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M). A éste se le agregó un volumen igual de solución amortiguadora B (HCl 40mM, DTPA 10 mM, ácido ascórbico 20 mM y TCA 10%). Se centrifugó a 14, 000 g por 20 minutos a 4 °C se filtró el sobrenadante a través de una membrana con un poro de 0.45 µm y se almacenó -70 °C.

### 3. Determinación de glutatión

Se determinó glutatión de acuerdo a Senft *et al.*, (2000) cuyo principio se basa en la utilización del fluoróforo *o*-ptaldialdehído (OPA) que reacciona con glutatión a través de la reacción con aminas primarias en presencia de un tiol para dar un producto fluorescente. Además se emplea el compuesto N-etilmaleimida (NEM) que actúa como secuestrador de glutatión (Senft *et al.*, 2000).

Para cada lectura se hicieron dos tubos. El tubo A que contenía 5  $\mu$ l de homogenizado, 145  $\mu$ l de TCA-RQB (ácido tricloroacético, 5%, HCl 20 mM, DTPA 5 mM y ácido ascórbico 10 mM), 20  $\mu$ l de NEM 7.5 mM en RQB, y 250  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 1 M. El tubo B contenía 5  $\mu$ l de homogenizado, 165  $\mu$ l de TCA-RQB y 150  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 1 M. Ambos tubos se incubaron 5 minutos y después se adicionó a todos 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y 150  $\mu$ l de OPA (5mg/ml en metanol). Se incubaron 30 minutos en la oscuridad y se leyó en el fluorómetro a 365 nm de excitación y 430 nm de emisión en un fluorómetro Turner 450 (Labsen scientific Co.)

Las unidades fluorométricas obtenidas por la lectura del tubo A se restaron a las del tubo B, para obtener los valores de la curva y los de las muestras. Se usó una curva estándar de GSH 0.1 mM en TCA-RQB, como se muestra en la tabla 6. Se correlacionaron los valores de la curva con los de las muestras para obtener finalmente nmoles/ g de tejido, empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Nmol curva}}{\mu\text{L muestra}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \mu\text{L}} \times \frac{100 \text{ mL}}{5 \text{ g}} = \frac{\text{nmoles}}{\text{g tejido}}$$

**Tabla 6. Preparación de las muestras para las lecturas de GSH para curva estándar.**

	Tubo A						Tubo B					
GSH 0.1mM (μL)	0	5	10	15	20	25	0	5	10	15	20	25
TCA-RQB (μL)	150	145	140	135	130	125	170	165	160	155	150	145
*GSH nm/μg	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5						
NEM	20 (μL)						-----					
Solución amortiguadora fosfatos 1M	250 (μL)						250(μL)					

\*cantidad de GSH nm/μg, para curva estándar.

Se tomaron 5 μL para hígado, 15 μL para riñón y 20 μL cerebro por cada muestra para ser analizadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **4. Preparación de proteínas**

Se obtuvo una fracción del tejido que fue homogeneizada con solución amortiguadora A. Los homogenados de proteínas se centrifugaron a 14,000 x g, 20 minutos. Se recuperó un volumen aproximado de 500 μL de la fracción citosólica y se tomaron 30 μl de cada muestra para colocarlos en un tubo de microcentrífuga y hacer un concentrado citosólico. Se completó a un volumen de 290 μl con solución amortiguadora A.

##### **4.1 Preparación de albúmina oxidada**

Se preparó una solución de albúmina a una concentración de 1μg μl<sup>-1</sup> en Tris 20mM. Esta

solución se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final 1 mM por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron precipitadas con un volumen igual de solución de TCA al 20 % por 30 minutos. Se centrifugó a 1,000 x g por 10 minutos. Se dio un lavado con TCA al 20% y se resuspendió la pastilla en 1 mL de solución amortiguadora para proteínas oxidadas [85.7 mM Tris, 0.857 mM EDTA y 20 mM NaOH a pH 8.5]. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### 4.2 Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas por el método de Bradford, el cual emplea el colorante azul de Coomasie que se une a los aminoácidos básicos como la arginina y a los aminoácidos aromáticos como fenilalanina y triptofano presentes en las proteínas, generando un cambio de coloración cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra (Bradford M, 1976). Se utilizó albúmina como proteína estándar a una concentración de 0.5 mg/ml. Se realizó una curva estándar usando las siguientes concentraciones de albúmina:

Albúmina (µl)	NaCl 0.15% (µl)	[albúmina](µg)
0	100	0
5	95	2.5
10	90	5.0
15	85	7.5
20	80	10.0
25	75	12.5
30	70	15.0
35	65	17.5

A esta concentración de albúmina se agregó 1 ml del reactivo de Bradford (BIORAD) y se incubó por 2 minutos para posteriormente leer a 595 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). De las muestras se tomaron 3  $\mu$ l de hígado, 5  $\mu$ L de riñón y 6  $\mu$ L de cerebro para las lecturas, siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras de albúmina. Se generó la curva con valores de concentración de proteína y la absorbancia correspondiente a cada una. Los valores de absorbancia de las muestras se interpolaron para finalmente obtener la concentración de proteínas de cada muestra.

### **4.3 Determinación de proteínas oxidadas**

El análisis de las proteínas oxidadas se llevó a cabo mediante una técnica inmunoquímica para cuantificar grupos de carbonilos en muestras de proteínas oxidadas de acuerdo al método descrito por Robinson *et al.*, (1999). Se utilizaron 10 y 40  $\mu$ g de proteína, a los cuales se agregó una solución amortiguadora para proteínas oxidadas [85.7 mM Tris, 0.857 mM EDTA y 20 mM NaOH a pH 8.5] y otra solución amortiguadora para proteínas reducidas [85.7 mM Tris, 0.857 mM EDTA, 20 mM NaOH, 20 mM NaBH<sub>4</sub> a pH 8.5]. El NaBH<sub>4</sub> de la solución anterior funciona como agente reductor lo que permite reducir grupos carbonilo como aldehídos, cetonas y cetoácidos a alcoholes (Levine *et al.*, 1990). Se ajustó cada muestra a un volumen final de 100  $\mu$ L, se incubó por 30 minutos a 37 °C y posteriormente las muestras se colocaron en un Bio Dot Blot (BIORAD). Se aplicó vacío para que las proteínas se transfirieran a una membrana de nitrocelulosa. Se le dio un lavado con 80% TBS-20% etanol, un lavado con HCl 2N por 5 minutos y se incubó con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) por 5 minutos. La DNPH reacciona con grupos carbonilo de

las proteínas generando la producción de grupos estables hidrazona que pueden ser leídos por espectrofotometría o detectados mediante anticuerpos por western blot. Posteriormente se dieron tres lavados con 2N HCl 5 minutos, luego se lavaron 5 veces con 80% TBS-20% etanol y se bloqueó la membrana con leche blotto 5% por 1 hora. La membrana fue incubada con un anticuerpo primario específico para grupos 2,4-dinitrofenil (Molecular Probes) a una dilución 1:500 disuelto en 5% leche 1% TBS-Tween por 1 hora, seguido de tres lavados con 5% leche 1 % TBS-Tween por 5 minutos. Posteriormente la membrana fue incubada con un anticuerpo secundario anti-IgG conejo (Zymed Labs.) 1:2000 acoplado a peroxidasa por 1 hora. Se hicieron 6 lavados con 5% leche TBS-Tween y se reveló la presencia de proteínas oxidadas incubando la membrana con diaminobencidina (DAB) [0.005g DAB, 2 $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 ml TBS].

## **5. Extracción de RNA**

Se tomaron 50 mg de cada muestra de tejido y se colocaron en un tubo de microcentrífuga, se les agregó 1 ml de TRIZOL<sup>®</sup>. Se incubó por 5 minutos y luego se agregaron 200  $\mu$ L de cloroformo. Se agitó 30 segundos en un vortex, se incubó 5 min y se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen equivalente de isopropanol, se dejó precipitar por 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos a 4 °C y se lavó con etanol al 75 %. La pastilla fue resuspendida en agua libre de RNAsas y se almacenó a -20°C hasta su uso. Se probó la integridad del RNA mensajero observando los mRNA 28 y 18 s en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico y 2 mM EDTA). La pureza se determinó por

espectrofotometría tomando lecturas a 260 y 280 nm y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza} = \text{Abs } 260 \text{ nm} / \text{Abs } 280 \text{ nm}$$

La relación de las absorbancias  $\text{Abs } 260 \text{ nm} / \text{Abs } 280 \text{ nm}$  se utiliza para determinar la pureza de la muestra. La  $\text{Abs } 260 \text{ nm}$  nos da los valores para determinar ácidos nucleicos y la  $\text{Abs } 280 \text{ nm}$  nos da la impureza dada por proteínas. Cuando la relación  $\text{Abs } 260 \text{ nm} / \text{Abs } 280 \text{ nm}$  es de 1.8 es la pureza del DNA y 2.0 es la pureza del RNA (Laboratory reference 2002).

La concentración de ácidos nucleicos puede medirse a través de su absorbancia a  $\text{Abs } 260 \text{ nm}$ , en una solución de DNA o RNA con una densidad óptica de 1.0 (1.0 Unidad de Absorbancia) se tiene una concentración de 50  $\mu\text{g}$  para DNA y 40  $\mu\text{g}$  RNA:

$$\text{Concentración de RNA total} = \text{Abs } 260 \text{ nm} \times 40 \text{ ug/uL}$$

## 6. RT-PCR

Para obtener cDNA se tomaron 2 $\mu\text{g}$  de RNA total por cada órgano de cada uno de los tratamientos. Se agregó 1 $\mu\text{l}$  oligo dT, 1 $\mu\text{L}$  dNTP's 10Mm (Invitrogen) para llevar finalmente a un volumen de 12  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ , se incubó 5 minutos a 65 °C y se agregaron 4  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora 5x, 2 $\mu\text{l}$  DDT (PROMEGA) y 1 $\mu\text{l}$  de retrotranscriptasa de virus de leucemia murina (MMLV- RT, Invotrogen). Se dejó la reacción a 37 °C durante 50 minutos, seguido de 5 minutos a 50 °C para inactivar a la enzima.

Para analizar los niveles de mRNA de la enzima glutarredoxina (*GRX 1*), se usó como oligo sentido 5' TGC AGA AAG ACC CAA GAA ATC CTC AGT CA 3' y el antisentido 5'TGG AGA TTA GAT CAC TGC ATC CGC CTA TG 3' (Jurado, et al., 2003). A un tubo de microcentrífuga de 200 µl se agregó 1 µl de bufer de PCR (500 mM Tris, 5.2mg BSA, 5% Ficoll, 5mM rojo cresol y 2 mM de MgCL<sub>2</sub>). El producto de amplificación esperado fue de 181 pb aproximadamente. Se realizó una curva de ciclos 20, 25, 30,35 y 40 (Fig .1). Para realizar el PCR se utilizó un termociclador Rapid Cyclor (Idaho Technologies). Se usaron 30 ciclos durante la reacción de PCR cada uno de: 95 °C 30 seg para desnaturalización, 60 °C 30 seg de alineamiento y 72 °C 30 seg de extensión. Para *TRX1* la secuencia del oligo sentido es 5'CGT GGT GGA CTT CTC TGC TAC GTG GTG 3' y el antisentido 5' GGT CGG CAT GCA TTT GAC TTC ACA GTC 3'(Jurado, et al., 2003), se usaron las mismas condiciones que para *GRX1* obteniendo un amplicón de 159 pb. Como control de expresión se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. *GADPH* con un oligo sentido 5' -TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3'- y otro antisentido 5' -CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC -3' (NIIDA et al., 2004). Se usaron las mismas concentraciones de solución amortiguadora de PCR y se obtuvo un producto de amplificación de 974 pb. La PCR para *TRX1* y *GADPH* se realizó utilizando 25 ciclos de 95 °C por 30 segundos de desnaturalización, -60 °C 1 min de alineamiento y -72 °C de elongación.

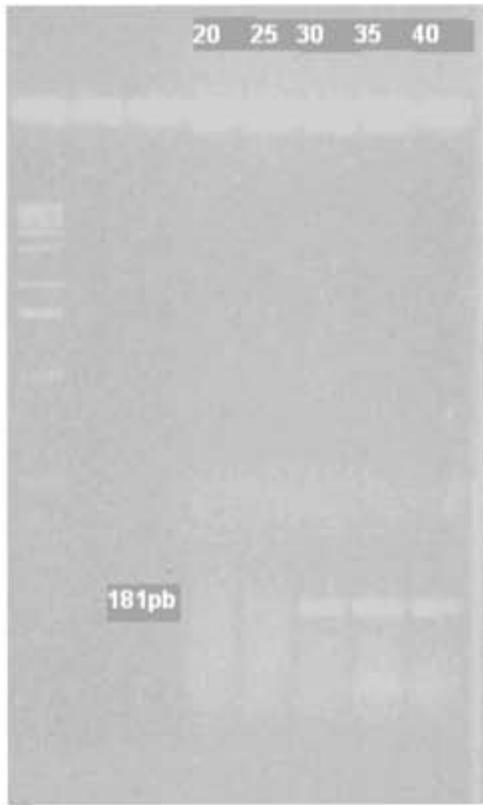


Figura 7. Curva de ciclos para *GRX1* de 20 a 40 ciclos. Con solución amortiguadora de reacción para PCR con salinidad media (2mM)

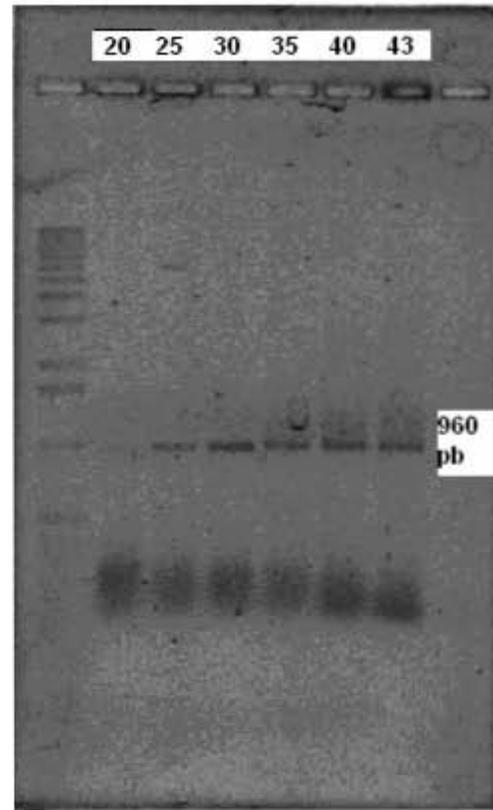


Figura 8 curva de ciclos para *GAPDH* de 20 a 43 ciclos. Con solución amortiguadora de reacción para PCR con salinidad media (2mM).

## **7. Análisis estadístico**

Para el análisis de datos se usó el programa GraphPad InStat 3. Los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar. La comparación entre grupos se llevó a cabo por un análisis de ANOVA empleando la prueba *post hoc* de Dunnet, tomando como significativo el resultado cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

### 1. Efecto del APAP en los niveles de GSH y proteínas oxidadas en hígado de ratón

Los niveles de glutatión en el hígado disminuyeron a un 85%, una hora después de la administración del APAP a 300 mg/Kg ( $p < 0.01$ ), a un 73% a las dos horas ( $p < 0.01$ ) y a un 55% ( $p < 0.01$ ) a la tres horas (Figura 9).

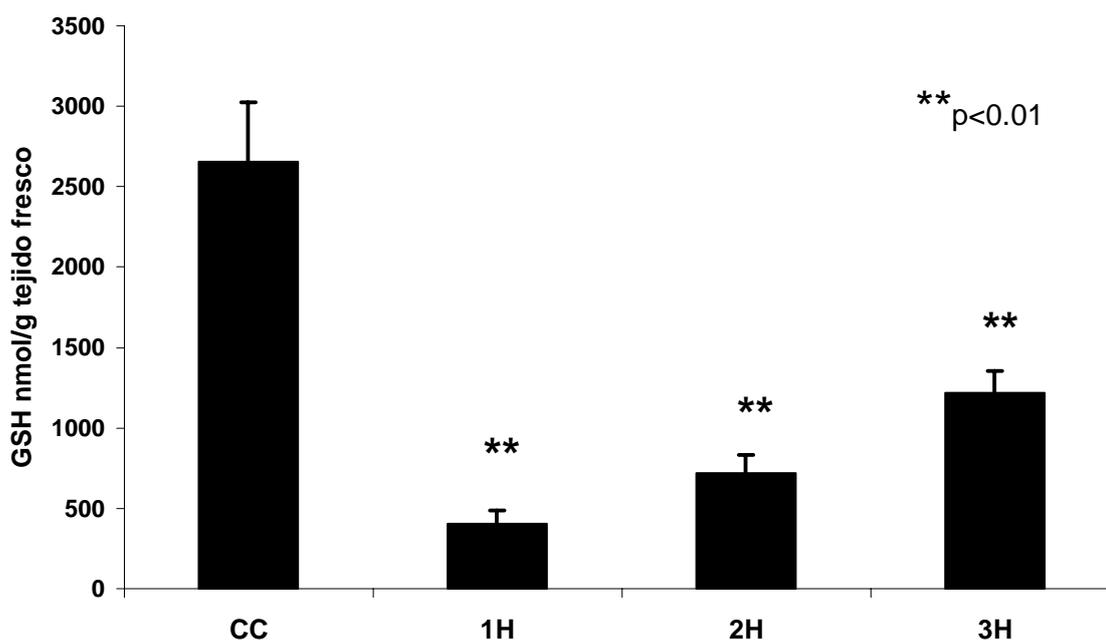


Figura 9. Niveles de GSH en hígado de ratón. Hay diferencias significativas del tratamiento a 1 h, 2 h y 3h con  $p < 0.01$  (\*\*). CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Se utilizó la prueba de Dunnet, para comparar las diferencias de los tratamientos contra el control,  $n=3$  por tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado  $\pm$ E.E.

No hubo un efecto significativo del tratamiento sobre los niveles de proteínas oxidadas en ninguno de los tiempos en los que se efectuaron las determinaciones. En la figura 10 panel superior se muestra una imagen representativa del análisis por Dot Blot de las proteínas oxidadas, y en la parte inferior un gráfico de sus densidades ópticas.

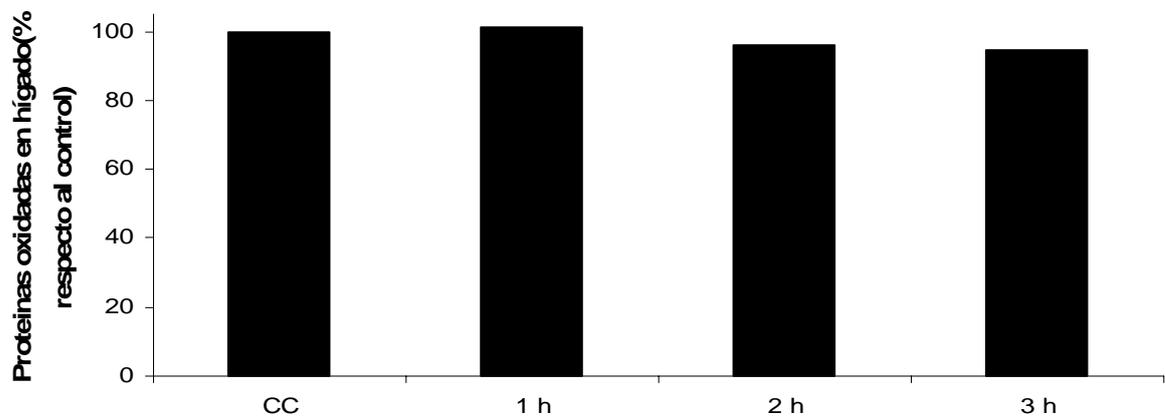
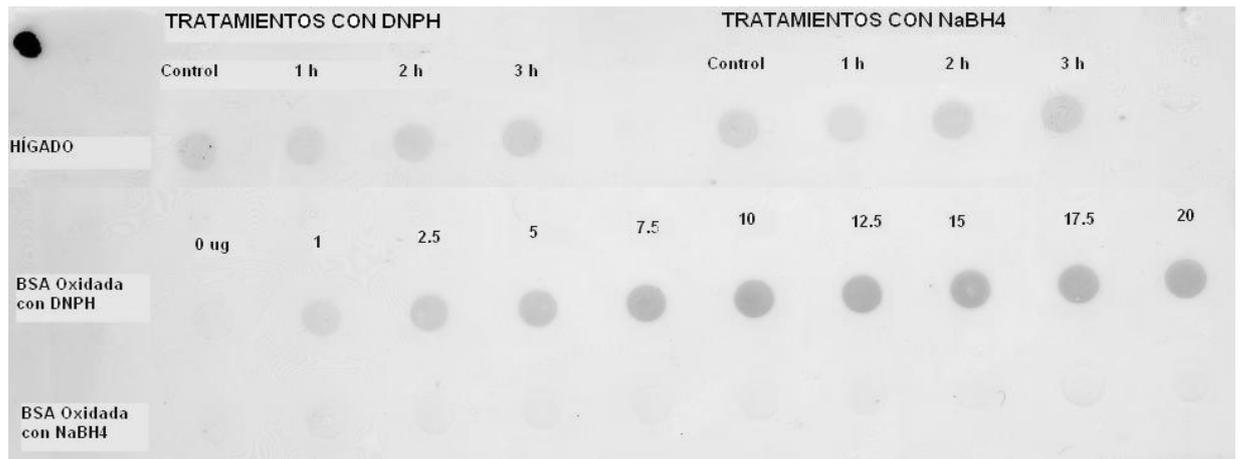


Figura 10. Proteínas oxidadas en hígado. a) Dot blot de proteínas oxidadas en hígado. Tratamientos: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento, Control positivo BSA oxidada. b) Representación gráfica del tratamiento analizado por densitometría. Las lecturas se hicieron por duplicado, n=3 por tratamiento

## 2. Efecto del APAP en los niveles de GSH y proteínas oxidadas en riñón de ratón

Los niveles de GSH en riñón disminuyeron 27% a la primera hora, 32% a la segunda hora ( $p < 0.01$ ) y 28% ( $p < 0.05$ ) a la tercera con respecto al control (Figura 11).

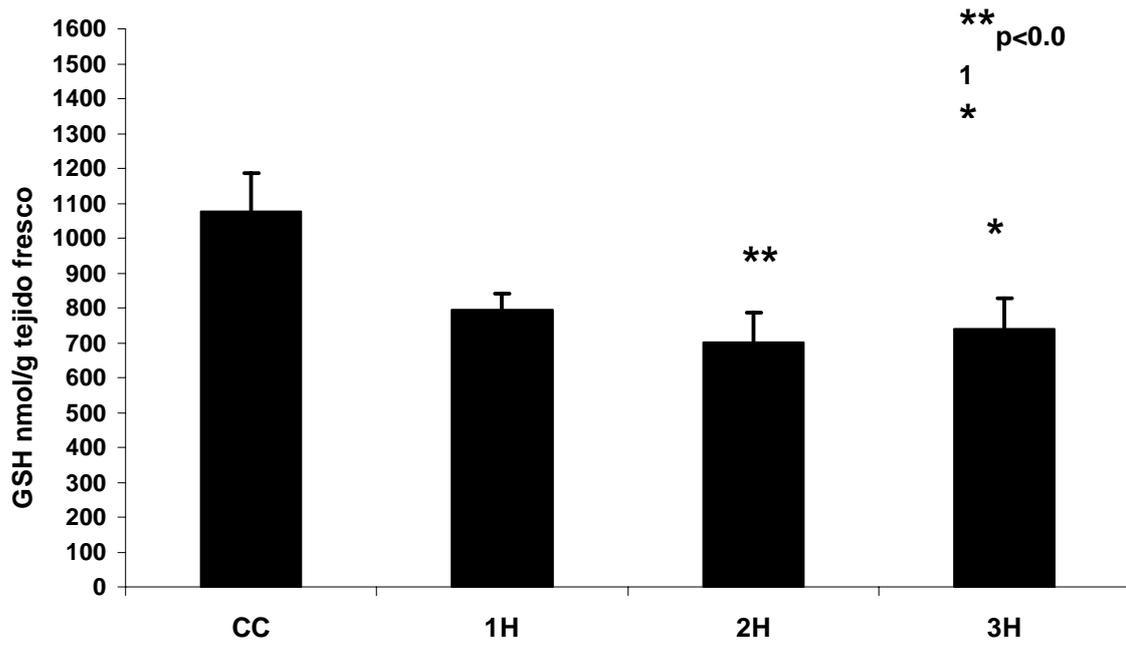


Figura 11. Niveles de GSH en riñón de ratón. Hay diferencias significativas del tratamiento a 2 h con  $**p < 0.01$  y 3h con  $p < 0.05$ . CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Se utilizó la prueba de Dunnet, para comparar las diferencias de los tratamientos contra el control,  $n=3$  por tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado, 2 veces,  $\pm$ EE.

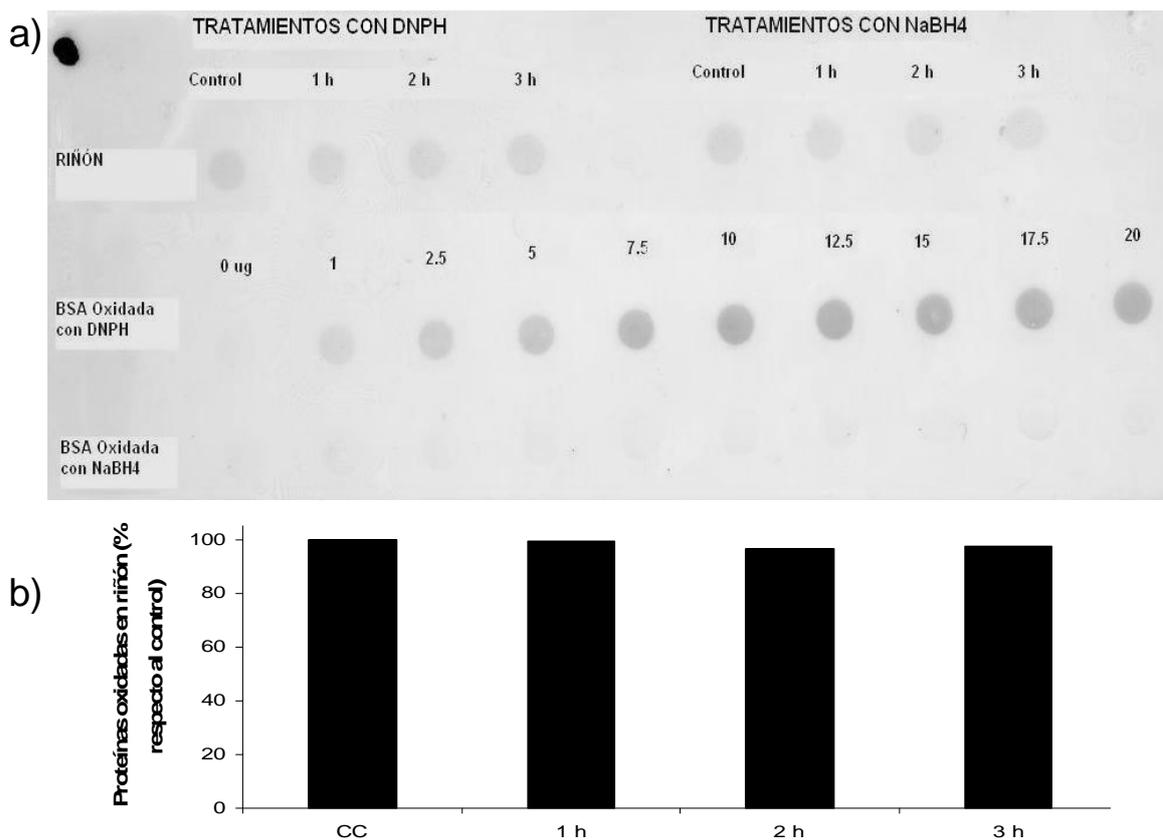


Figura 12. Proteínas oxidadas en riñón de ratón. a) Dot blot de proteínas oxidadas en riñón. Tratamientos: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento, Control positivo BSA oxidada. b) Representación gráfica del tratamiento analizado por densitometría. Las lecturas se hicieron por duplicado, n=3 por tratamiento..

### 3. Efecto del APAP en los niveles de GSH y proteínas oxidadas en cerebro de ratón

En cerebro de ratón no se observó un efecto del tratamiento en los niveles de GSH a los tiempos en los que se efectuaron las lecturas (Figura 13). Los niveles de proteínas oxidadas no aumentaron como se puede observar en la figura 14.

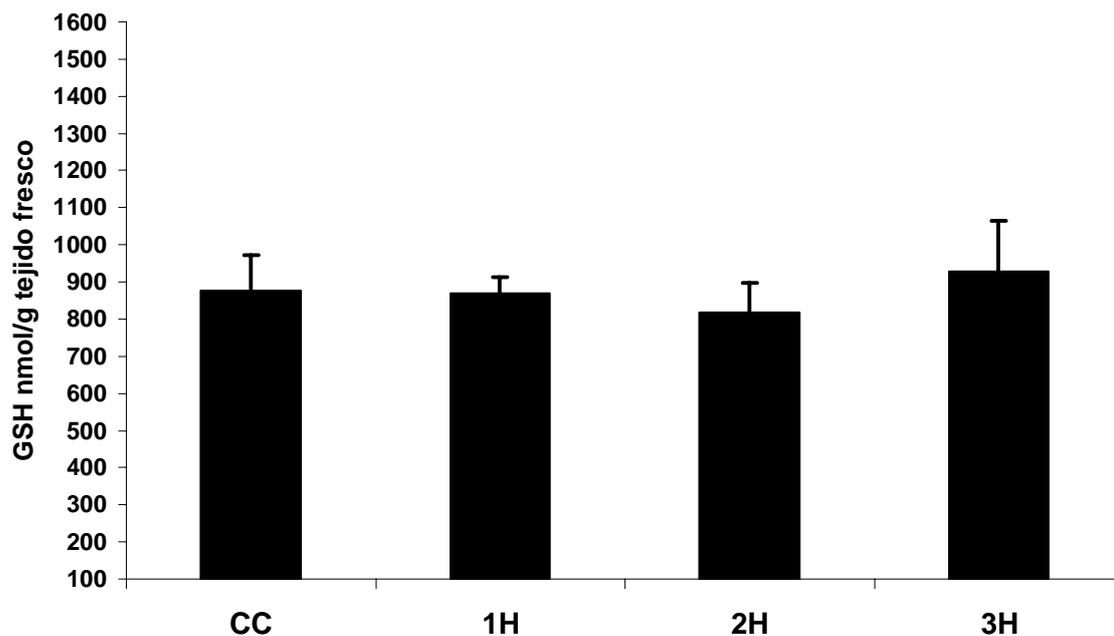


Figura 13. Niveles de GSH en cerebro de ratón. No hay diferencias significativas del tratamiento. CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Se utilizó la prueba de Dunnet, para comparar las diferencias de los tratamientos contra el control, n=3 por tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado, 2 veces,  $\pm$ E.E.

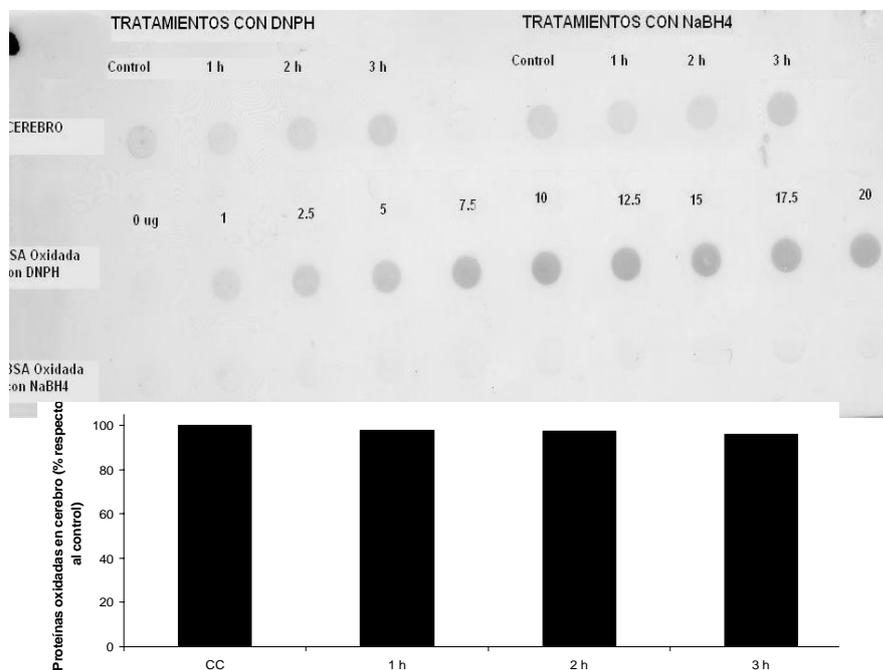


Figura 14. Proteínas oxidadas en cerebro de ratón. a) Dot blot de proteínas oxidadas en cerebro. Tratamientos: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento, Control positivo BSA oxidada. b) Representación gráfica del tratamiento analizado por densitometría. Las lecturas se hicieron por duplicado, n=3 por tratamiento.

#### 4. Efecto del APAP en los niveles de mRNA de tiorredoxina (*TRX1*) y glutarredoxina (*GRX1*) en tejidos de ratón

##### 4.1. Efecto del acetaminofén en hígado

Se presenta la imagen del RNA extraído de hígado de ratón, que muestran la integridad de las subunidades ribosomales 28s y 18s, lo cual nos ayuda a saber que nuestro mRNA está en óptimas condiciones para hacerse una copia de DNA (cDNA) y observar si hay expresión de mRNA en *GRX1* y *TRX1*.

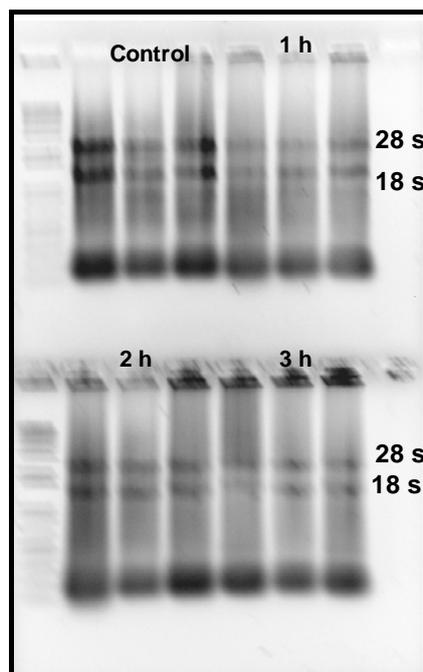


Figura 15. RNA en hígado de ratón. Integridad de RNA, 28s y 18s se encuentran en cada uno de los tratamientos. Control (n=3); 1h: 1 hora de tratamiento (n=3); 2h: 2 horas de tratamiento (n=3); 3h: 3 horas de tratamiento (n=3). Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

En la figura 16 se observa un incremento en los niveles de mRNA *GRX1* a 2h y 3h posteriores al tratamiento con respecto al control, a diferencia de *Tx TRX1* que presenta

un decremento a la 3h con respecto al control. Se observa una diferencia significativa de  $p < 0.0260$  en el análisis con respecto a *GRX1* y  $p < 0.0439$  con respecto a *TRX*.

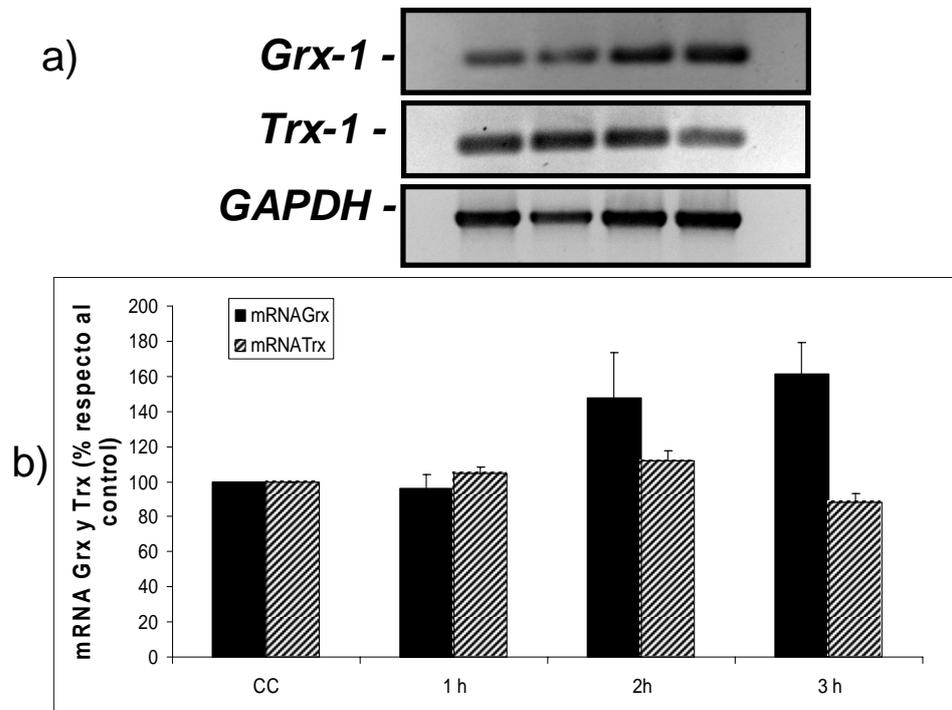


Figura 16. Expresión de mRNA *GRX1* y *TRX1* en hígado de ratón. a) expresión de mRNA *GRX1* y *TRX1*, *GAPDH*. b) representación gráfica de densidades ópticas de la expresión *GRX1* (barra negra) y *TRX1* (barra con rayas). CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado,  $n=3$  por tratamiento  $\pm$ E.E.

#### 4.2. Efecto del acetaminofén en Riñón

En la figura 17 se presenta la integridad de las subunidades ribosomales 28s y 18s en riñón de ratón.

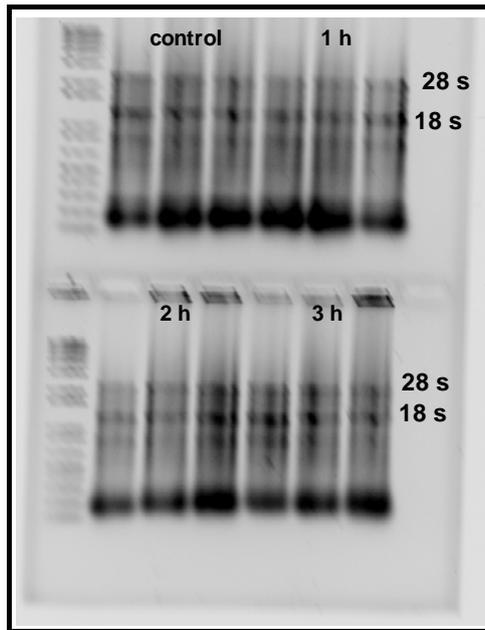


Figura 17. RNA en riñón de ratón. Integridad de RNA, 28s y 18s se encuentran en cada uno de los tratamientos. Control (n=3); 1h: 1 hora de tratamiento (n=3); 2h: 2 horas de tratamiento (n=3); 3h: 3 horas de tratamiento (n=3). Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

En este tejido se observó que los niveles de mRNA de *TRX1* y de *GRX1* tendieron a disminuir conforme aumentó el tiempo de exposición al APAP. Sin embargo, esto no fue significativo de acuerdo a la prueba estadística.

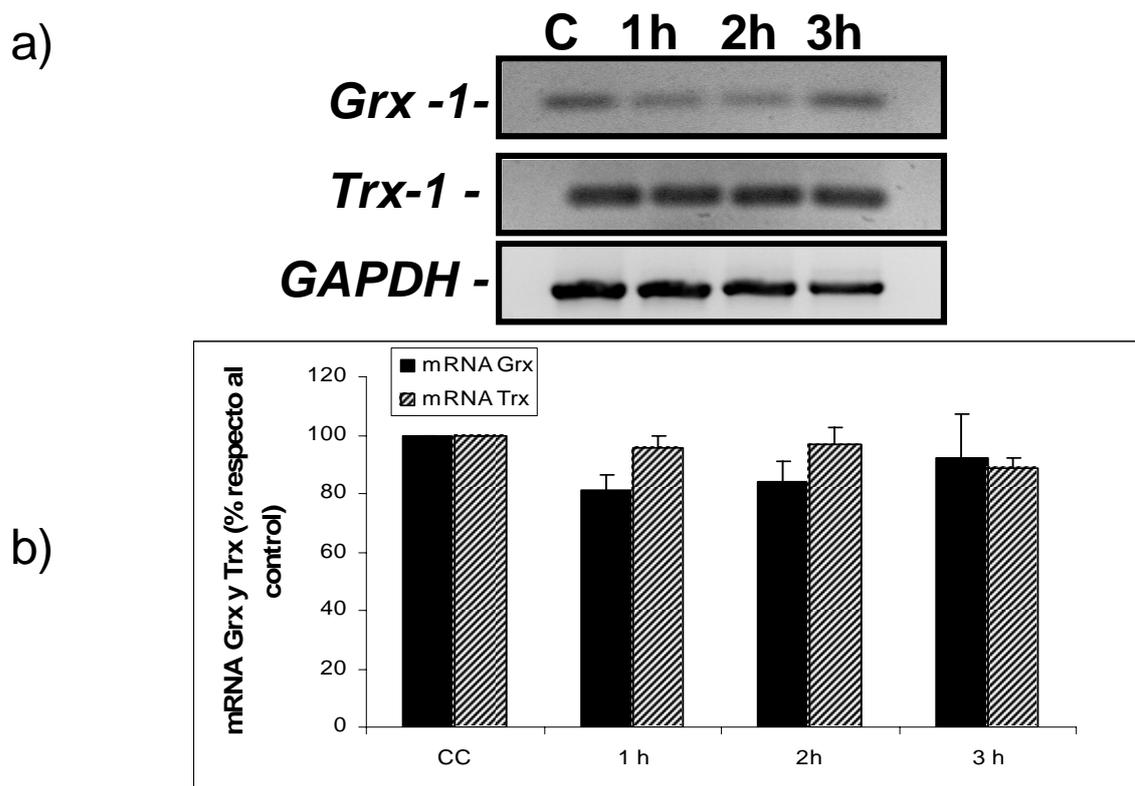
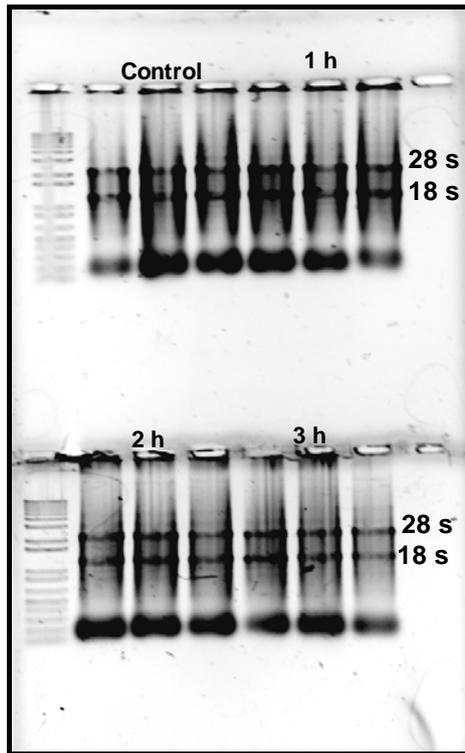


Figura 18. Expresión de mRNA *GRX1* y *TRX1* en riñón de ratón. a) expresión de *GRX1* y *TRX1*, *GAPDH*. b) representación gráfica de densidades ópticas de la expresión *GRX1* (barra negra) y *TRX1* (barra con rayas). CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado, n=3 por tratamiento  $\pm$  D.E.

#### 4.3 Efecto del acetaminofén en Cerebro

En la figura 19 se muestra la integridad del RNA de cerebro de ratón tratado con APAP.



**Figura 19. RNA en cerebro de ratón. Integridad de RNA, 28s y 18s se encuentran en cada uno de los tratamientos. Control (n=3); 1h: 1 hora de tratamiento (n=3); 2h: 2 horas de tratamiento (n=3); 3h: 3 horas de tratamiento (n=3). Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.**

La figura 20 presenta la expresión de mRNA de *GRX1* y *TRX1* en cerebro, donde se encontró un incremento, el cual es mayor en mRNA *GRX1*, con diferencias significativas a 2h y 3 h ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. Para *TRX1*, se observó también un incremento con diferencias significativas a 2h ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

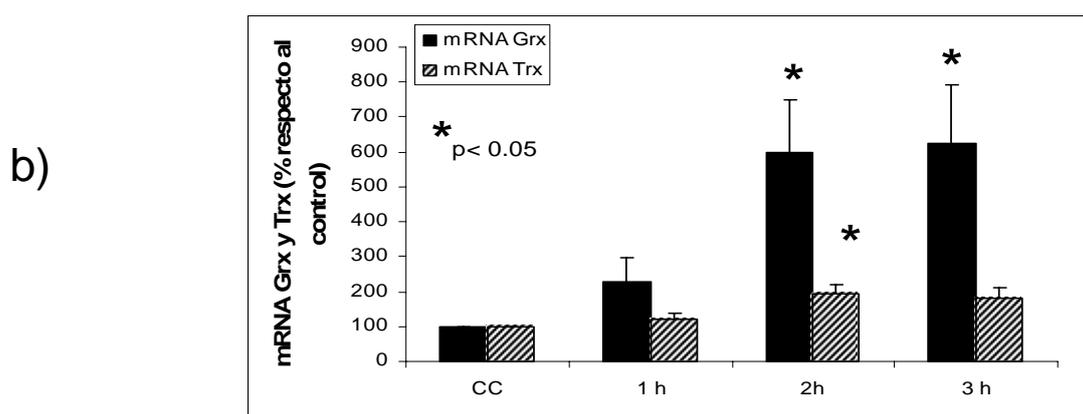
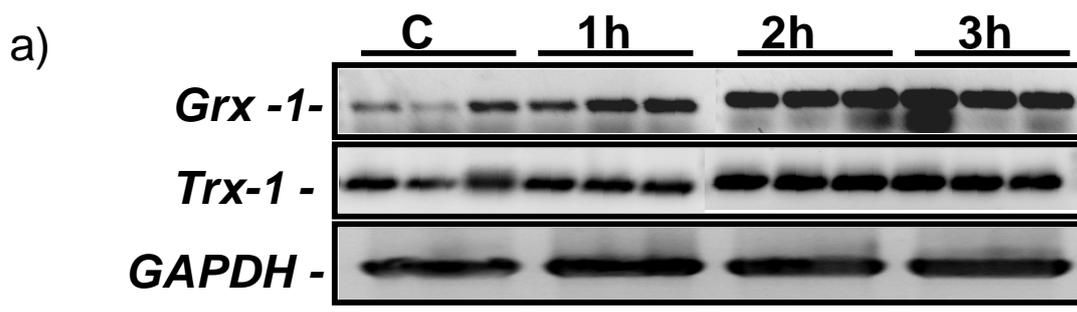


Figura 20. Expresión de mRNA *GRX1* y *TRX1* en cerebro de ratón. a) expresión de mRNA *GRX1* y *TRX1*, *GAPDH*. b) representación gráfica de densidades ópticas de la expresión *GRX1* (barra negra) y *TRX1* (barra cuadrículada). CC: control; 1h: 1 hora de tratamiento; 2h: 2 horas de tratamiento; 3h: 3 horas de tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado, 2 veces, n=3 por tratamiento. Las lecturas se hicieron por triplicado, n=3 por tratamiento  $\pm$  DE.

## DISCUSIÓN

Se sabe que las intoxicaciones generadas con APAP debidas a una sobredosis generan severas lesiones en hígado, por lo cual la mayoría de estudios realizados se enfocan en observar la respuesta que presenta este órgano a la exposición con el fármaco. Se pueden encontrar trabajos en los cuales se observa el efecto que produce en riñón. Por lo general el análisis de los efectos de fármacos como el acetaminofén en tejidos ha sido de manera individual, no considerando los efectos que pueden existir a nivel sistémico. El metabolismo de GSH se da de forma intra e inter órgano, en los cuales el hígado, riñón e intestino delgado tienen gran importancia, siendo el hígado el que mayor cantidad de GSH secreta a sangre, para distribuirse a otros órganos (Horota *et al.*, 1989). Sabiendo que la producción de NAPQI generada por APAP produce disminución en los niveles de GSH y que dichos niveles varían en diferentes órganos, en este trabajo caracterizó parte de la respuesta que se genera a nivel sistémico. Como se pudo observar, la respuesta es diferencial, ya que como se mencionó, el contenido de GSH varía y por consiguiente la capacidad de cada órgano para contener frente a una condición de estrés se puede considerar como órgano específica. Además, este trabajo proporciona evidencias de que los sistemas Grx y Trx pueden ser inducidos al menos a nivel transcripcional y posiblemente ello sea parte de una respuesta al estrés oxidante generado por el fármaco.

Se observó una respuesta que puede considerarse como órgano específica con el tratamiento. En hígado, hay una considerable disminución de los niveles de glutatión lo cual es consistente con los resultados de trabajos previos como el de Mitchell y cols. (1973). Esta disminución es mayor en la primera hora y posteriormente se observa una tendencia a recuperar los niveles. Una de las funciones del GSH en hígado y en otros órganos es el ataque nucleofílico contra los metabolitos generados por fármacos como el APAP (Mitchell *et al.*, 1973), esto explicaría su consumo por la especie reactiva NAPQI, que reaccionaría con el glutatión evitando así la toxicidad dentro del órgano.

En el riñón los niveles de GSH disminuyen en menor cantidad que en el hígado, manteniendo niveles semejantes durante las tres horas, mientras que en el cerebro no se

observan cambios en los niveles.

Se han encontrado casos en humanos en los cuales se presenta daño renal sin que se presente daño en el hepático (Cobden *et al.*, 1982). En estudios previos por Fisher y colaboradores. (1981), se observan altos niveles de metabolitos de ácidos glucurónicos, sulfatos y cisteínas al igual que conjugados de GSH y ácido mercaptúrico en menor cantidad los cuales pueden contribuir a la toxicidad real del APAP.

Hay que resaltar que en el cerebro los niveles de glutatión se mantienen constantes, lo cual es interesante al compararlo con hígado y riñón donde los niveles descienden de forma significativa. Existen reportes donde se ha demostrado la entrada de APAP marcado radiactivamente al cerebro, encontrándose en mayor cantidad en corteza e hipocampo a los 15 minutos (Fischer *et al.*, 1981; Courade *et al.*, 2001; Lambrech *et al.*, 2006). Fischer *et al.*, (1981) mostraron que el APAP no metabolizado en este tejido puede encontrarse en mayor concentración una hora después de la administración. Posteriormente la concentración decae, además sólo se observó la presencia de conjugados con ácido glucurónico. En el presente trabajo, no se observó una disminución en los niveles de GSH, lo cual sugiere que la biotransformación del APAP no ocurre en cerebro, ya que no generó metabolitos que se conjugaran con GSH. Otra posibilidad es que la actividad de la barrera hematoencefálica excluye rápidamente los metabolitos formados (Fischer *et al.*, 1981).

Un efecto causado por la toxicidad del APAP es la formación de uniones covalentes generadas por sus especies reactivas (NAPQI) produciendo oxidación de proteínas (Jollow *et al.*, 1973; Albano *et al.*, 1984). Los niveles de proteínas oxidadas no cambiaron durante el tratamiento con APAP en ninguno de los órganos estudiados, estos datos coinciden con los reportados por Gibson (1996), donde no se encuentran proteínas oxidadas en hígado de ratón por el tratamiento con APAP (400mg/kg) en las

primeras 6 horas después del tratamiento.. Kenneth *et al.*, 2002 midieron conjugados de APAP-cys, en tratamientos de 400mg con APAP, y encontraron uniones covalentes de este conjugado con proteínas en hígado a los 15 minutos posteriores, la mayor cantidad de estas uniones se observaba a las 2 horas.

Se ha visto que en tratamientos repetidos con APAP generan resistencia a daño hepatotóxico , lo cual es atribuido a la inducción de la actividad de enzima antioxidantes como GSSG-Rd y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo cual refleja una respuesta adaptativa y protectora al estrés oxidante y al consumo de GSH (O'brien *et al.*, 2000).

En nuestros tratamientos con APAP no observamos cambios en la oxidación de proteínas en hígado, riñón y cerebro. Aunque la gran mayoría de los experimentos relacionados con la toxicidad con APAP son realizados en hígado, nosotros vimos que en hígado, riñón y cerebro no se presentan cambios por efectos del fármaco. Esto podría indicar que uno de los primeros efectos generados por el NAPQI, no esta la oxidación de proteínas, sino que es una consecuencia generada por el descenso en los niveles de GSH y en la oxidación de tioles en proteínas . Otra posibilidad es que la metodología empleada no sea lo suficientemente sensible para detectar de manera significativa un aumento en la oxidación de proteínas, puesto que se ha demostrado que la administración de agentes antioxidantes, provee protección al hígado durante tratamientos con APAP (Nagasawa *et al.*, 2004).

Con respecto a los niveles de expresión de mRNA en Grx y Trx, estos no se pudieron evaluar utilizando a GADPH, dado que cuando se utiliza como control de expresión no se observa la inducción de los sistema enzimáticos, ya que se presenta una inducción aparente en esta enzima, lo cual indica que posiblemente no debe ser utilizada como control de expresión para este tipo de tratamientos.

por otro lado encontramos que la transcripción de *GRX1* y *TRX1* son inducidos en hígado y cerebro. Esto podría ser parte de una respuesta de protección para evitar la oxidación de tioles frente al estrés producido por el APAP, pues ya se ha descrito el papel de ambos sistemas en la reducción y mantenimiento de tioles en la célula. Albano (1984) reportó que hay disminución en tioles en proteínas causados por NAPQI, por lo que especulamos que la transcripción de *GRX1* y *TRX1* podría ser parte de un mecanismo que disminuya la oxidación de estos. Sin embargo, para esclarecer esto es necesario confirmar que la inducción a nivel de mensajero es correlaciona con la actividad y presencia de las correspondientes proteínas para aclarar el papel de estos sistemas en la protección celular. Contrario a lo anterior, en riñón se da un efecto de disminución tanto Grx y Trx con respecto al control que es paralelo a la disminución en los niveles de GSH. Esto sugiere que este órgano podría ser más susceptible a la toxicidad por acetaminofén, sin embargo esto deberá ser evaluado a través de marcadores de daño distintos al de proteínas oxidadas. Por otra parte, fue muy evidente la expresión de *TXRI* y *GRXI* en cerebro, lo cual fue hasta 4 veces más que el control para el caso de *GRXI* y un poco menor para *TXRI*. Ambos sistemas pueden ayudar a mantener un estado redox, sin embargo no es muy claro por qué estos sistemas se indujeron si no hubo cambios significativos los niveles de GSH. Una posible explicación sería que el cerebro active un “mecanismo de protección” para “prevenir” el daño oxidante y que además la señal para ello sean cambios a nivel sistémico en el contenido de tioles mantenidos principalmente por GSH.

Una pregunta que surgió a partir de este modelo es cómo se regula la inducción *TRX1* y *GRXI* observada. Se ha descrito recientemente que estos genes y otros de enzimas

antioxidantes poseen secuencias ARE (Antioxidant Responsive Elements, por sus siglas en inglés) (Lee *et al.*, 2004). Por ejemplo, el estrés oxidante generado por la sobredosis del APAP genera una respuesta de defensa inmediata por parte de los hepatocitos como es la activación y traslocación nuclear de factores de transcripción nuclear sensibles a estrés oxidante como lo es Nrf2 (Park *et al.*, 2005). Se ha observado *in vivo* la traslocación nuclear de Nrf2 con niveles máximos alcanzados a la primera hora (Goldring *et al.*, 2004). Además, se ha visto que en ratones a los cuales se les ha suprimido el gen a Nrf2, disminuye la sobre vivencia a tratamientos con APAP en dosis tóxicas (Enomoto *et al.*, 2001). Por lo anterior, al ser un factor de transcripción que responsable de la inducción de enzimas involucradas en la desintoxicación celular a través de la secuencia ARE, cabe la posibilidad de que en el presente modelo de estudio el factor esté influyendo en la expresión de de *GRX1* y *TRX1* observada.

Finalmente, la importancia de este trabajo es que se obtuvo evidencia de que en un organismo se presentan respuestas órgano específicas frente a un mismo estímulo.

## CONCLUSIONES

De este estudio se puede concluir que:

1. La intoxicación aguda con APAP a una dosis de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  disminuye los niveles de GSH en hígado y riñón, pero no en cerebro.
2. El APAP a la dosis mencionada no genera formación de carbonilos que indiquen oxidación de proteínas en los tejidos analizados.
3. La inducción de *GRX1* y *TRX1* por el tratamiento con APAP indica que los sistemas Trx y Grx participan como parte de una respuesta a la intoxicación.
4. Estos resultados apoyan la utilidad que tiene el modelo para explorar respuestas que pueden ser consideradas como órgano específicas.

## LITERATURA CITADA

Albano E, Rundgren M, Harvinson P, Nelson S, Moldeus P (1984). Mechanism of N-acetyl p-benzoquinone imine cytotoxicity. *Mol Pharmacol*. 28: 306-311.

Anderson M. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem-Biol Interac*. 111-112: 1-14.

Berlett B, Stadtman E. (1997). Protein oxidation in aging disease and oxidative stress. *J Biol Chem*. 272: 20313-20316.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Carmel-Harrel A, Storz G. (2000). Roles of the glutathione and thiol dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyce cerevisiae* responses to oxidative stress. *Ann Rev Microbiol*. 54: 439-461.

Clarsen L, Watkins J. (2001). Biotransformación de xenobióticos. En **Manual de toxicología**. 5° Ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. México. 981.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003) Protein carbonylation in human disease. *Trends Mol Med*.9:169-176.

Dauterman W, Metabolism of toxicans: phase II reaction. En: **Biochemical Toxicology**. P 113-131.

Dringen R. (2000). Metabolism and function of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 62: 649-671.

Enomoto A, Itho K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O`Conor T, Harada T, Yamamoto M. (2001). High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated decreased expresión of are-regulated drug metabolizing

enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci.* 59: 169-177.

Fischer L, Green D, Harman W. (1981). Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *J Pharmacol Ther.* 219: 281-286.

Flint B. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and diseases. *Free Radic Biol Med.* 32: 797-803.

Gibson J, Pumford N, Samokyszyn V, Hinson J. 1996. Mechanism of acetaminophen induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 9: 589-585.

Halliwell B, Gutteridge J. (1999). **Free Radicals In Biology And Medicine.** 3<sup>o</sup> Ed. Oxford Science Pub University Press. Nueve York. 936 p.

Halliwell B. (1994). Free radical, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet.* 344: 721-724.

Hansberg W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquím.* 26: 19-54.

Hayes J, McLellan L. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 31: 273-300.

Holmgren A, Aslund F. (1995). Glutaredoxin. *Methods Enzymol.* 252. 283-292.

Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn M, Hudemann C, Lillig C. (2005). Thioredoxin redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans.* 33:1375-1377.

Holmgren A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 264: 13963-13966.

Jollow D, Mitchel J, Potter D, Davids D, Gillete J, Brodie B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. role of covalent binding *in vivo*. J Pharmacol Exp Ther. 187:1. 195-202.

Jurado J, Prieto M, Madrid J, Pueyo C. (2003). Absolute gene expression patterns of thioredoxin and glutaredoxin redox systems in mouse. J Biol Chem. 278, 45546-45554.

Kehrer J, Lund L. (1991). Cellular reducing equivalents and oxidative stress. Free Radic Med. 17:. 65-75.

Kenchappa R, Ravindranath V. (2003). Glutaredoxin is essential for maintenance of brain mitochondrial complex I: studies with MPTP. Faseb J. Feb. 2003. Express Article

Lundberg M, Johansson C, Chandra J, Enoksson M, Jacobsson G, Ljung J, Johansson M, Holmgren A. (2001). Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. J Biochem Chem. 279:26269-26275.

Lee J-M, Johnson J. (2004). An important role of Nrf2 are pathway in the cellular defense mechanism. Biochem Mol Biol. 37: 139-143.

Leeuwenburg C, Ji L. (1995). Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. Arch Biochem Biophys. 316: 941-949.

Leslie E, Deeley R, Cole S. (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1 Mrp1 (Abcc1) and related transporters. Toxicology. 167.:3-23.

Levine R, Garland D, Oliver C, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shalter S, Stadman E. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186:464-478p.

Lovell M, Xie C, Gabbita S, Markesbery W. (2000). Decreased thioredoxin and increased thioredoxin levels in alzheimer's disease brain. Free Radic Biol Med. 28: 418-427.

Manahan S. (1992). **Toxicological Chemistry**. 2° Ed. Lewis Pub. Usa.. P93-109. 449p.

Manyike P, Kharasch E, Kalhorn T, Slattery J. (2000). Contribution Of cyp 2E1 and Cyp 3 A 4 to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther.* March.275-282.

Meister A, Anderson M. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 52. 711-760..

Meister A, On The Biochemistry of glutathione, En: Taniguchi N, Higashi T, Sakamoto Y, Meistr A (Eds.). (1989). **Glutathione Centennial: Molecular Perspectives And Clinical Implications**. Academic Press Inc, San Diego, California. Pp. 1–21. 441p.

Meister A. (1994). Glutathione, scorbate, and cellular protection. *Cancer Res. Suppl* 4:1969s-1975s.

Mitchell J, Jollow D, Potter W, Gillette J, Brodie B. (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 187:. 211-217.

Montoya M. (2006). Toxicología. Colegio De Pediatras Del Estado De Sonora A.C. *Www.Copeson.Org.Mx/Toxicologia/Toximedicamentos.Htm*

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N.(2004). *J Biol Chem.* 279, 5752-5726.

Oberley T, Verwiebe E, Zhong W, Won Kang S, Goo Rhee S. (2001). Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Radic Med.* 30:412-424.

Park B, Kitteringham N, Maggs J, Pirmohamed M, Williams D. (2005). The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:177–202.

Patenaude A, Murthy M, Mirault M. (2005). Emerging roles of thioredoxin cycle enzymes in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 62:1063-1080.

Potter W, Davis D, Mitchell J, Jollow D, Gillette J, Brodie B. (1973). Acetaminophen induced hepatic necrosis III. cytochrome P-450- mediated covalent binding *In Vitro.* *J Pharmacol Exp Ther.* 187:203-210.

Reed D. (1990). Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30:603-631.

Riestch A, Beckwith J. (1998). The genetics of disulfide bound metabolism. *Annu Rev Genet.*32:163-184.

Robinson, C E, Keshavarzian A, Pasco D S, Frommel T O, Winship D H, Holmes E W. (1999). Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem.* 266. 48-57.

Rodríguez F, Vicente J, Guerrero F. (2006). Intoxicación por analgésicos (capítulo 10.2) [www.tratado.uninet.edu/c100201.html](http://www.tratado.uninet.edu/c100201.html)

Rossen G , Rauckman E, Ellington S, Dahlin D, Christie J, Nelson S. (1984). Reduction and glutathione conjugation reaction of N-acetyl-p-benzoquinone imine and two dimethylated analogues. *Mol Pharmacol.* 25: 151-157.

Rybnikova E, Damdimopoulos A, Gustafsson J, Spyrou G, Peltouhikko M. (2000). Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *Eur J Neurosci,* 2:1669-1678.

Senft A, Dalton T, Sertzer G. (2000). Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem.* 280: 80-86.

Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82: 291-295.

Song J, Rhee J, Suntharalingam, Walsh S, Spitz D, Lee Y. (2002). Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. *J Biol Chem.* 277: 46566–46575.

Stadtman E, Berlett B. (1997). Free radical-mediated modification of proteins. En: Wallace K. **Free Radical Toxicology**. Taylor & Francis. p 71-89.

Stadtman E, Levine R. (2000). Protein oxidation. *Annals New York Academy Of Science*. 191-208 .

Vlami-Gardikas A, Holmgren A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods Enzimol*, 347: 286-296.

Winkler B, Orselli S, Rex T. (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Radic Biol Med*. 17:. 333-349 .