



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

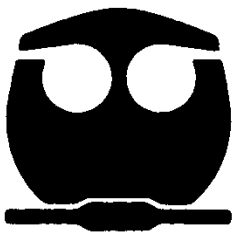
ACTIVIDAD DE CITOCROMO P4501A EN LA RATA (*Rattus norvegicus*) Y EL RATÓN (*Mus musculus*) DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL ALBENDAZOL.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA FLORES TORRES



MÉXICO D.F.

2008



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri
Vocal	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Secretario	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
1er suplente	Dra. Perla Carolina Castañeda López
2do suplente	Profa. María Elena Bravo Gómez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
UNAM

Asesor: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Sustentante: Mariana Flores Torres

DEDICATORIA.

Dedico de manera muy especial este trabajo a mi familia.

A mis papás, por ser siempre un gran apoyo y por estar con nosotras, pero sobre todo por impulsarnos a seguir nuestras ideas, sin importar que tan lejos se vean.

A mi hermana, por que a pesar de todo hemos aprendido a mantenernos juntas, por no dejarme.

A la Trita, Güera, Güerita y Lucas, por su cariño incondicional son una parte fundamental de la familia.

A mis miguis, Rebeca, Ana y Pamela por la amistad que nos une, por estar siempre en las buenas y las malas, por dejarme ser parte de sus vidas y por contagiarme de su alegría.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Javier Espinosa Aguirre por recibirme en su laboratorio, por su paciencia apoyo y preocupación cuando los resultados parecían no llegar, por la confianza que desde el principio me ha brindado.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza, por sus comentarios y las charlas culturales.

A los miembros del jurado que te manera tan amable revisaron y comentaron este trabajo.

A la Profa Ma. Elena Bravo por la minuciosa revisión de este trabajo, por adentrarme y contagiarme el gusto por la toxicología.

A la Biol. Sandra Luz Hernández, por ser tan amable y cálida, por tu confianza, paciencia y ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, a Sitlali, por ser una parte importante de este trabajo, por compartir conmigo tu amistad y también los festejos del año chino de la rata y a Ana, por la ayuda, la música, las platicas, los consejos.

A mis compañeros de la facultad, por los buenos y los malos momentos, por los juegos, las risas, las desmañanadas y desveladas, siempre los recordaré con mucho cariño.

Al programa PAPIIT por la beca otorgada dentro del proyecto “Implicaciones toxicológicas de la inducción de Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) en cerebro de rata” con clave IN214908.

ÍNDICE.

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Albendazol	6
2.1.1 Mecanismo de acción	6
2.1.2 Metabolismo	7
2.2 Citocromo P450	8
2.2.1 El ciclo catalítico del Citocromo P450	10
2.3 Citocromo P4501A	12
2.3.1 Inducción del CYP1A por xenobióticos	13
2.3.2 Inducción del CYP1A por benzimidazoles	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos particulares	
6. METODOLOGÍA	
6.1 Diagrama de flujo	18
6.2 Reactivos	19
6.3 Animales	19
6.4 Obtención de la fracción microsomal	20
6.5 Electroforesis e inmunodetección específica	21
6.6 Determinación de la actividad enzimática	22
6.7 Análisis estadístico	22

7. RESULTADOS	
7.1 Electroforesis e inmunodetección específica	23
7.2 Determinación de la actividad enzimática	27
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	31
9. ABREVIATURAS	35
10. REFERENCIAS	36

1. RESUMEN

El citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de enzimas que juegan un papel crítico en el metabolismo oxidativo de una gran variedad de compuestos lipofílicos tanto endógenos como exógenos. Algunos genes de diversas familias del CYP pueden ser inducidos por xenobióticos, lo que les permite a las células adaptarse a los cambios químicos en su ambiente.

Un número limitado de CYPs pertenecientes a las familias 1, 2 y 3, son los principales encargados del metabolismo de estos compuestos. Entre ellos, la subfamilia 1A tiene un papel importante en la transformación y bioactivación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y también de compuestos con importancia farmacológica como algunos benzimidazoles, dentro de los cuales se encuentra el albendazol que es ampliamente utilizado contra infecciones parasitarias como la neurocisticercosis.

De ésta subfamilia 1A, el CYP1A1 es de los más estudiados, ya que puede metabolizar una gran variedad de xenobióticos produciendo derivados citotóxicos y/o mutagénicos. Su inducción puede ser mediada a través del receptor citosólico a hidrocarburos aromáticos (AhR). Los inductores clásicos del CYP1A1 y agonistas de AhR son: 2,3,7,8-tetraclorobenzo-*p*-dioxina (TCDD), 3-metilcolantreno (3-MC), benzo(a)pireno (B(a)P) y α -naftoflavona (α -NF). Estos compuestos comparten diversas características, entre ellas: el ser hidrofóbicos, poseer una estructura policíclica y ser moléculas planas o coplanares.

Recientemente se han encontrado moléculas que no cumplen con las características clásicas para los inductores del CYP1A1 (compuestos que no son policíclicos ni planos) y sin embargo lo inducen. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas por lo que no se encuentran relacionados estructuralmente. Entre ellos se encuentran los benzimidazoles (omeprazol y

tiabendazol), los carotenoides (precursor de los retinoides), los carbamatos (carbaril) y las aminoquinolinas (primaquina).

Por otro lado, se ha observado que existen diferencias en la respuesta de la rata y el ratón cuando se les expone a inductores de CYP1A1 clásicos y no clásicos. Los primeros son capaces de inducir a la proteína en ambas especies mientras que los segundos inducen al CYP1A en rata pero no en ratón.

En nuestro laboratorio se han caracterizado previamente las propiedades de inducción de CYP por el albendazol (ABZ), llegando a la conclusión de que en la rata, este antihelmíntico es capaz de modular positivamente la concentración y actividad de CYP1A1 y CYP1A2. Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la respuesta en la inducción de CYP1A por la rata y el ratón después de ser expuestos al ABZ.

Para ello, se trataron vía intraperitoneal ratas Wistar (250 g) y ratones Balb/c (25 g) con dosis únicas de ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg) y aceite de maíz, como control.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la administración. Se obtuvo la proteína microsomal del hígado, con la cual se realizaron las siguientes determinaciones: inmunodetección para los CYP1A1/2, así como la determinación de la actividad de etoxiresorufin-*O*-deetilasa y de metoxiresorufin-*O*-demetilasa que sirven como indicadores de las actividades de CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente.

Se encontró que el ABZ induce a CYP1A en la rata pero no así en el ratón, mientras que el 3-MC es capaz de inducirlo en las dos especies. Adicionalmente, el aumento de actividad ocasionado en la rata por el 3-MC persiste hasta las 72 horas mientras que la ocasionada por el ABZ, llega a un máximo a las 24 h y disminuye a las 48 y 72 h.

Lo anterior constituye una evidencia de que el ABZ es un inductor no clásico del CYP1A1 y proporciona las bases para la exploración de una nueva cascada de señalización en el mecanismo de inducción de CYP1A.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Albendazol (ABZ)

El ABZ (Figura 1) es un antihelmíntico sintético de amplio espectro, derivado del benzimidazol que se utiliza para el tratamiento de la neurocisticercosis parenquimatosa secundaria y en lesiones provocadas por la forma larval de la tenia del cerdo (*Taenia solium*) [1, 2] y para el tratamiento de la enfermedad hidatídica quística del hígado, los pulmones y el peritoneo provocada por la forma larval de la tenia del perro (*Echinococcus granulosus*) [1]. EL ABZ es el tratamiento de elección para estas enfermedades [3].

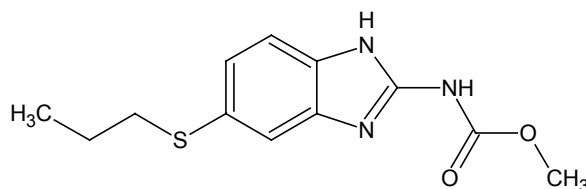


Figura 1. Estructura del albendazol [1].

2.1.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción no se conoce con certeza, pero se ha sugerido que el ABZ actúa sobre todo a través de la fijación de la β -tubulina libre de las células parasitarias, lo que conduciría a una inhibición selectiva de la captación de glucosa dependiente de los microtúbulos. La inhibición de la β -tubulina tiene lugar en presencia de una concentración menor de ABZ que la necesaria para inhibir la polimerización de los microtúbulos del ser humano [1].

2.1.2 Metabolismo

La bioconversión del ABZ (Figura 2) por los microsomas de hígado de rata incluye al inicio una S-oxidación por flavin monooxigenasas (FMO) y el CYP3A4, dando lugar al sulfóxido del albendazol (ABZSO) [4] y una segunda S-oxidación realizada principalmente por el CYP1A1 produciendo la sulfona del albendazol (ABZSO₂) [5].

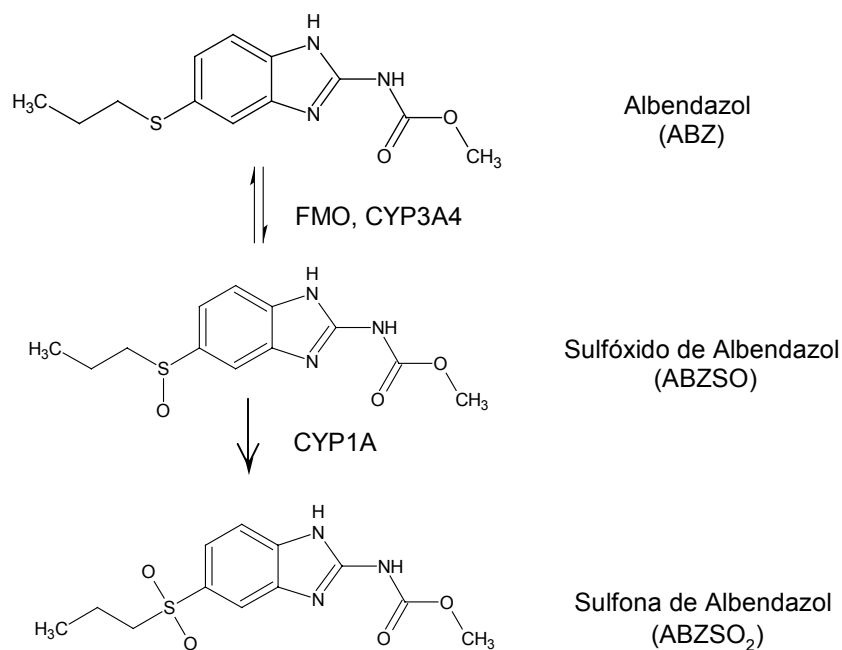


Figura 2. Metabolismo del albendazol [6].

La actividad antihelmíntica [2, 3] y la embriotoxicidad en ratas se debe principalmente al ABZSO y no al ABZSO₂ que no posee estas actividades [7].

2.2 Citocromo P450

El citocromo P450 (CYP) es una superfamilia de enzimas que contienen un grupo hemo unido no covalentemente a una cadena polipeptídica [3] a través de una cisteína. Estas enzimas fueron identificadas en 1964 por Omura y Sato [8] quienes determinaron la naturaleza hemoproteica de un pigmento presente en los microsomas hepáticos de diferentes especies, que era capaz de unirse al monóxido de carbono después de ser reducido con NADPH o ditionita de sodio y que presenta un pico máximo de absorción del grupo hemo (pico de Soret) a los 450 nm.

La importancia del CYP radica en la versatilidad con la que pueden participar en distintos mecanismos enzimáticos, desde el procesamiento de fuentes de carbono en algunas bacterias, mecanismos de defensa en algunas variedades de plantas (síntesis de metabolitos secundarios), metabolismo de eicosanoides, metabolismo del colesterol y ácidos biliares, síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas, aminas biogénicas, vitamina D₃, hidroxilación del ácido retinoico [9].

Además, juega un papel esencial en el metabolismo oxidativo [10], en la biotransformación de medicamentos y otros xenobioticos [11], al igual que en procesos de detoxificación. Metaboliza más del 90% de los compuestos químicos exógenos (xenobióticos) que ingresan al organismo, desde medicamentos, cosméticos, tintes, componentes de la dieta, compuestos carcinogénicos y contaminantes ambientales [9].

Sin embargo, también participa en procesos de activación contribuyendo a la aparición de efectos tóxicos o carcinogénesis [3]. Como parte de su actividad metabólica producen cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la célula, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻) que participan en la regulación del ciclo celular y en señales de traducción;

cuando se producen en exceso pueden actuar como mutágenos y carcinógenos [12].

En humanos, se sabe que hay 12 CYPs (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 y 3A5) importantes en el metabolismo de xenobióticos [3].

En eucariontes, los CYPs se encuentran intracelularmente acoplados a una membrana ya sea del retículo endoplásmico liso (Figura 3) o a la membrana interna de la mitocondria, junto con otras enzimas que transfieren electrones como: la citocromo P450 reductasa, el citocromo b5, y en caso de la mitocondria la ferredoxina reductasa.

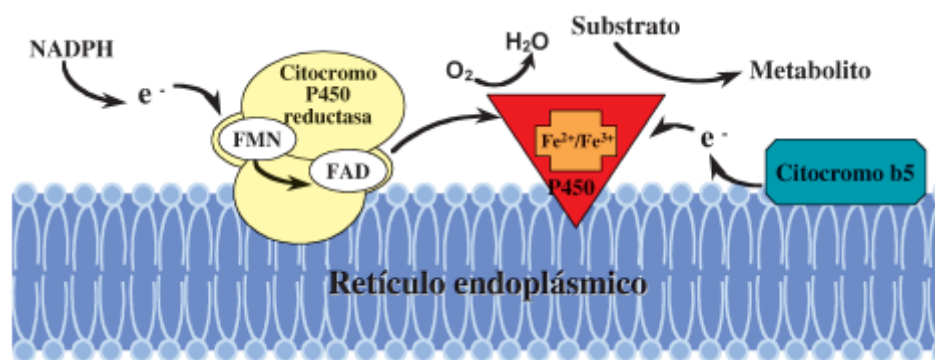


Figura 3. Localización del sistema del citocromo P450 en el retículo endoplásmico [13].

Para oxidar a un sustrato, el CYP requiere de oxígeno molecular y NADPH. Lleva a cabo reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado a la molécula del sustrato, mientras que el otro átomo es reducido hasta agua [13].

A las enzimas que catalizan este tipo de reacciones se les conoce como monooxigenasas u oxidasas de función mixta [13].

Entre las oxidaciones catalizadas por el CYP (Figura 4) se incluyen las hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y

S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, azoreducción, nitroreducción [14].

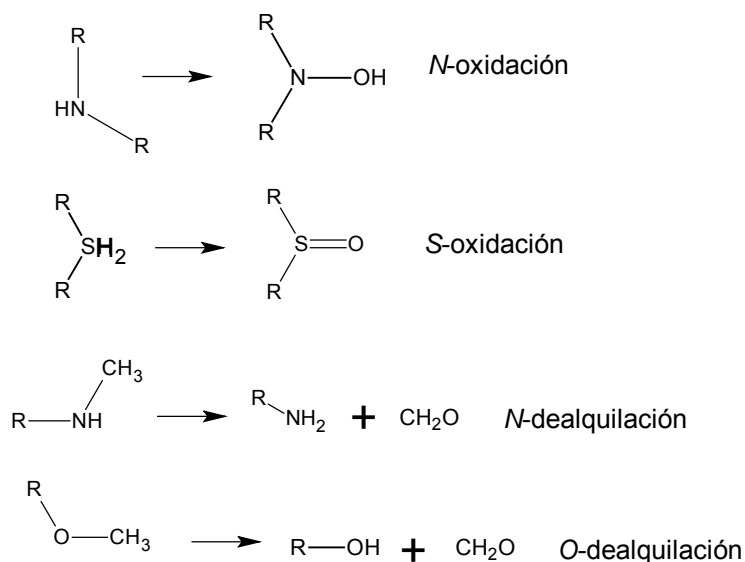


Figura 4. Reacciones catalizadas por el citocromo P450 [3].

2.2.1 El ciclo catalítico del citocromo P450

El centro catalítico del CYP (Figura 5) está integrado por: el átomo de hierro hexacoordinado (con los 4 anillos de la protoporfirina IX), el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y el agua [13].

El primer paso del proceso catalítico consiste en la unión del sustrato y el desplazamiento de un ligando, que regularmente es agua en la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. Como consecuencia de ello se originan cambios en el estado del spin del átomo de hierro, en el potencial redox y en el máximo de absorbencia de la hemoproteína.

En el segundo paso, se produce la reducción del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$) gracias al aporte de un electrón y al aumento en el potencial redox originado en el paso anterior. En eucariontes, el electrón proviene

de la oxidación de una molécula de NADPH, lo cual es realizado por la NADPH citocromo P450 reductasa.

El tercer paso es la unión del oxígeno molecular para formar un complejo superóxido y en el cuarto paso se produce el aporte de un segundo electrón con la formación de ERO.

A partir de este punto los mecanismos no se conocen con certeza. La naturaleza de las ERO es desconocida, se sugiere pudiera ser una mezcla de complejos hierro-peroxo o hierro-oxo con la hemoproteína. En cualquier caso, se trataría de un oxidante electrofílico de vida muy corta formado por la protonación del dioxígeno (O=O).

El resultado final es la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de agua y la incorporación del otro átomo en el sustrato (R-OH) [8, 13, 14].

El ciclo catalítico puede ser desacoplado cuando los electrones del NADPH son consumidos sin la formación de los metabolitos oxidados.

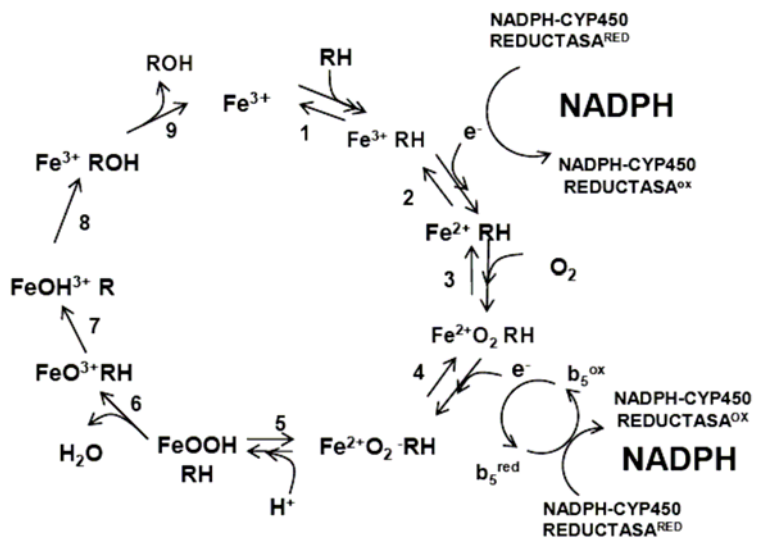


Figura 5. Ciclo catalítico del citocromo P450 [15].

2.3 Citocromo P450 1A

La subfamilia 1A del citocromo P450 está involucrada en el metabolismo de algunos procarcinógenos y de una gran cantidad de medicamentos de importancia clínica [16].

La inducción de isoformas de esta subfamilia puede tener implicaciones en la etiología de algunos tipos de cáncer y en la alteración en la eficacia terapéutica de algunos medicamentos [17].

El citocromo P450 1A1 (CYP1A1) juega un papel importante en la toxicidad, mutagenicidad y/o carcinogenicidad de algunos compuestos químicos en el ambiente como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). Su expresión constitutiva es muy baja pero altamente inducible en el hígado, piel, riñón y pulmones [18]. La inducción de esta isoforma está mediada a través del receptor citosólico a hidrocarburos aromáticos (AhR) [10].

Es altamente inducible por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y por hidrocarburos aromáticos planos como el 3-metilcolantreno (3-MC) o el benzo(a)pireno (B(a)P) [19].

La principal función del CYP1A1 es la de oxidar a los PAH, hidrófobos para así facilitar su eliminación [3].

El citocromo P450 1A2 (CYP1A2) participa fundamentalmente en la activación de nitrosaminas, aflatoxina B1 y aminas aromáticas [13]. Su expresión parece estar restringida al hígado, donde constituye aproximadamente el 10% del contenido total de CYP [9].

2.3.1 Inducción del CYP1A por xenobióticos

De manera clásica se sabe que la inducción del CYP1A (Figura 6) puede ser mediada a través del receptor AhR en una serie de eventos, los cuales se describen a continuación.

El AhR se encuentra en el citosol, donde está unido a diferentes proteínas chaperonas como la HSP90, XAP2 y p23. Cuando un compuesto xenobiótico se une a él formando un complejo, el AhR es liberado de las proteínas chaperonas y el complejo viaja al núcleo donde se unen al traslocador nuclear del receptor Ah (ARNT) formando un heterodímero, AhR/ARNT.

En el núcleo éste heterodímero se une a secuencias consenso del DNA conocidas como elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), lo cual ocasiona un cambio conformacional en la estructura de la cromatina del DNA permitiendo la transactivación de los genes controlados por el AhR [19-21].

Entre los genes controlados por el AhR se encuentran: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, NADPH-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), Aldehído deshidrogenasa (ALDH3A1), entre otros [9, 20].

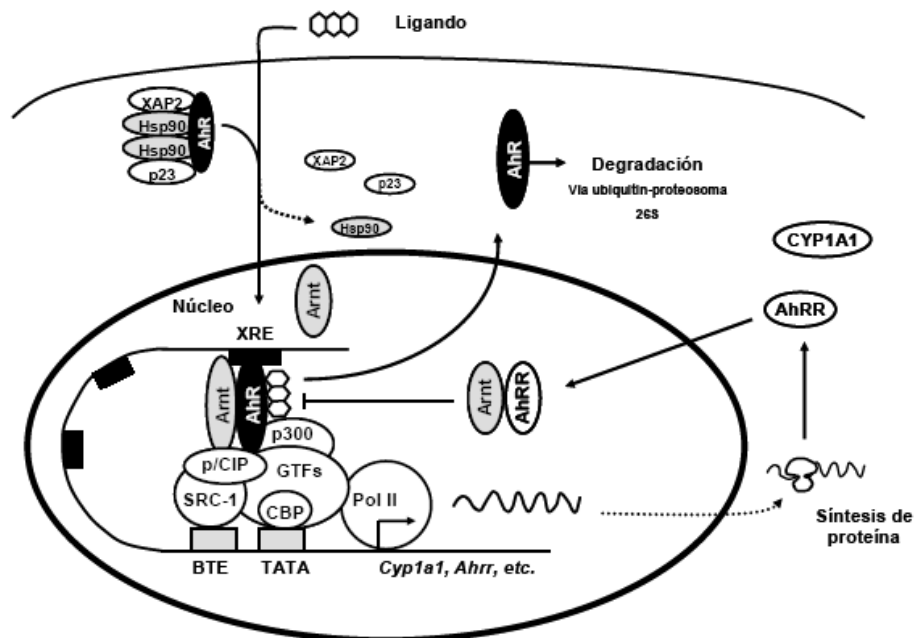


Figura 6. Modelo general de la inducción del CYP1A1 [22].

Entre los inductores clásicos del CYP1A1 y agonistas del AhR se encuentran: 2,3,7,8-tetraclorobenzo-*p*-dioxina (TCDD), 3-metilcolantreno (3-MC), benzo(a)pireno (B(a)P) y α -naftoflavona (α -NF) [9, 13, 21].

Todos estos compuestos comparten diversas características estructurales, entre ellas: son hidrofóbicos, son moléculas planas o coplanares con una estructura policíclica, cuyo tamaño les permite entrar en un rectángulo de 6.8 x 13.7 Å que corresponde al sitio de acción del AhR [21].

2.3.2 Inducción del CYP1A por benzimidazoles

Recientemente se han encontrado moléculas que no cumplen con las características clásicas para los inductores del CYP1A1 [21] (compuestos que no son policíclicos ni planos) que pueden llegar a inducirlo. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas por lo que no se encuentran relacionados estructuralmente.

Entre ellos están los benzimidazoles (omeprazol, tiabendazol), los carotenoides (precursor de los retinoides), carbamatos (como el carbaril) y las aminoquinolinas (primaquina), a estos inductores se les han denominado inductores no clásicos [21].

Existen estudios en los que se han realizado ensayos de competencia entre un inductor clásico de alta afinidad como el TCDD e inductores no clásicos como el omeprazol o el tiabendazol, con la finalidad de demostrar la independencia de estos últimos hacia el AhR. Se ha demostrado que los inductores no clásicos no tiene la capacidad de desplazar al TCDD cuando se encuentra unido al receptor [18].

Hay evidencia de que la tirosina cinasa, la Src, podría estar involucrada en la inducción del CYP1A1, pues al probar un inhibidor de la misma como la Herbamicina A y llevar a cabo un tratamiento probando nuevamente al omeprazol, al tiabendazol y al 3-MC, se observa una inhibición en la respuesta por el tratamiento con los benzimidazoles, pero no así por el tratamiento con el 3-MC donde si se observa una inducción del CYP1A1 [18].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ABZ es uno de los principales fármacos para el tratamiento contra la neurocisticercosis, la cual tiene prevalencia en nuestro país y en América Latina.

Como se mencionó anteriormente, este compuesto junto con otros benzimidazoles como el omeprazol, el mebendazol o el tiabendazol han sido reconocidos como inductores no clásicos del CYP, especialmente de la subfamilia 1A [9, 21].

En nuestro laboratorio se han caracterizado las propiedades de inducción de CYP por el ABZ [23], llegando a la conclusión de que en la rata, éste antihelmíntico es capaz de modular de manera positiva la concentración y actividad del CYP1A1 y CYP1A2.

Kikuchi y cols. [24] determinaron la inducción y actividad del CYP1A1 por omeprazol, tiabendazol y lansoprazol en células humanas pero no en células de ratón, concluyendo que estos benzimidazoles pueden llegar a activar algunos pasos en la vía de transducción de señales del AhR en células humanas pero no en las de ratón.

Por otro lado, Souma y cols. [25] han observado que existen diferencias en la respuesta de roedores como la rata y el ratón cuando se les expone a inductores del CYP1A clásicos y no clásicos. En este caso, los primeros son capaces de inducir a la proteína en ambas especies mientras que los segundos llegan a inducir al CYP1A en la rata pero no en el ratón.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar la respuesta en la inducción de CYP1A por la rata y el ratón después de ser expuestos al ABZ.

4. HIPÓTESIS

Habrán diferencias en la inducción a nivel de proteína y la actividad del CYP1A hepático entre la rata y el ratón como resultado del tratamiento con ABZ.

5. OBJETIVO

5.1 Objetivo General

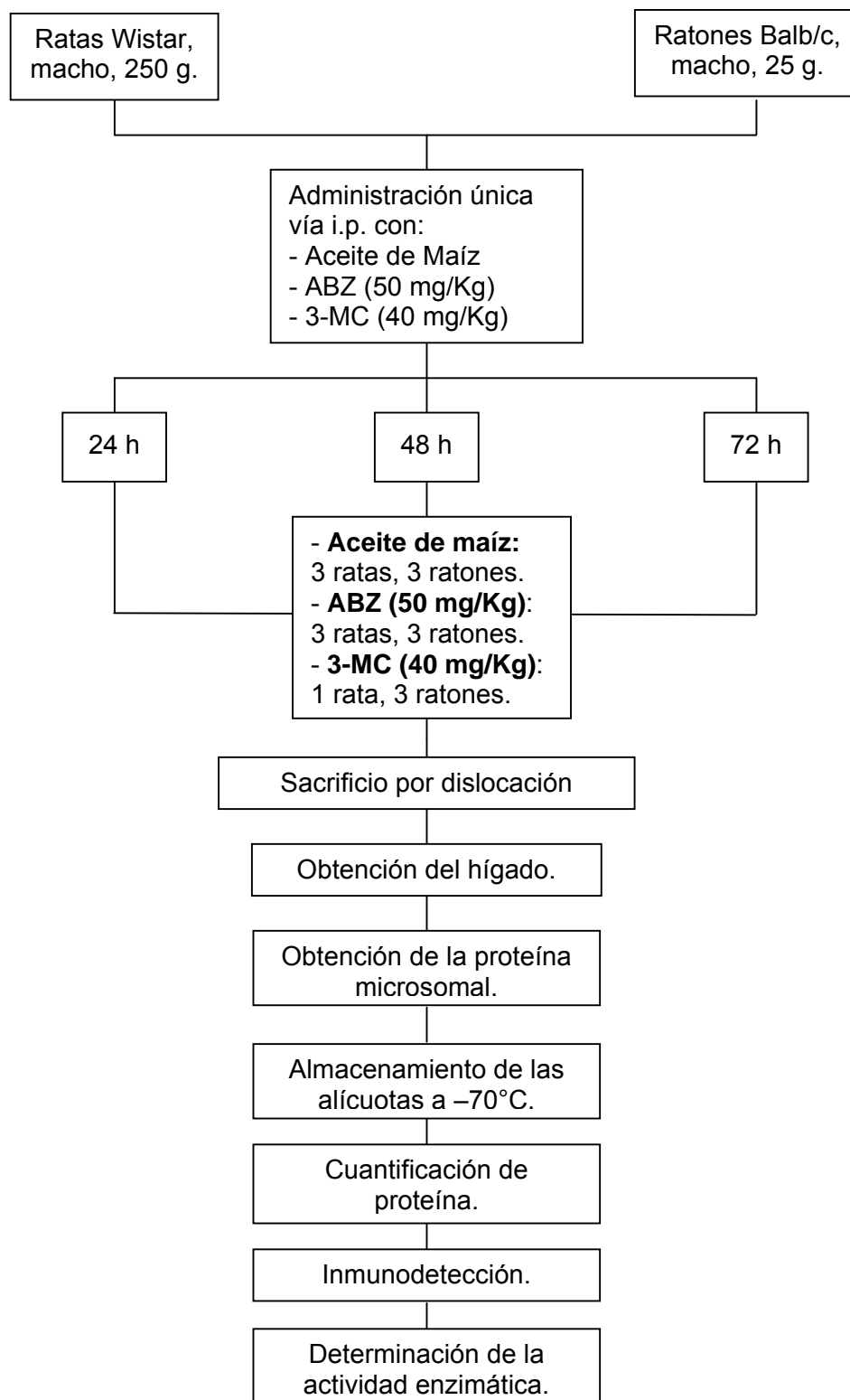
Analizar el efecto de la exposición al ABZ sobre la inducción a nivel de proteína y la actividad del CYP1A hepático entre rata y ratón.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener la fracción microsomal del hígado de las ratas y ratones control y tratados con ABZ y 3-MC.
- Detectar la proteína del CYP1A en los microsomas hepáticos, mediante la inmunodetección con anticuerpos específicos.
- Medir la actividad enzimática específica del CYP1A1 y del CYP1A2 en los microsomas obtenidos.
- Comparar la respuesta obtenida al utilizar un inductor como el ABZ en la rata y el ratón, con un inductor clásico como el 3-MC.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama de flujo



6.2 Reactivos

El albendazol, 3-metilcolantreno, aceite de maíz, NADPH, etoxiresorufina, resorufina, el ditioneitol DTT, la 3,3-diaminobenzidina fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO).

El anticuerpo policlonal de conejo anti-CYP1A1/2 de rata y el segundo anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa son de CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA, USA).

6.3 Animales

Se utilizaron 27 ratones de la cepa Balb/c, machos, de un peso corporal aproximado de 25 g \pm 3 g; los cuales se dividieron en grupos de acuerdo al tratamiento recibido y al tiempo de exposición según la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los ratones de acuerdo al tratamiento y tiempo de exposición.

Tratamiento	No. ratones por tiempo de exposición		
	24 h	48 h	72 h
Control (aceite de maíz)	3	3	3
ABZ (50 mg/Kg)	3	3	3
3-MC (40 mg/Kg)	3	3	3

Se utilizaron 21 ratas de la cepa Wistar, machos, de 250 g \pm 3 g de peso corporal, las cuales al igual que los ratones se dividieron en grupos para su administración y tratamiento, según la tabla 2.

Tabla 2. Distribución de las ratas de acuerdo al tratamiento y tiempo de exposición.

Tratamiento	No. ratas por tiempo de exposición		
	24 h	48 h	72 h
Control (aceite de maíz)	3	3	3
ABZ (50 mg/Kg)	3	3	3
3-MC (40 mg/Kg)	1	1	1

Para todos los animales la dosis fue única y se administró por vía intraperitoneal.

Para preparar las soluciones administradas a los animales, el ABZ y el 3-MC se sonicaron en frío hasta su completa suspensión en el aceite de maíz.

El sacrificio de los animales por dislocación cervical se llevó a cabo a las 24, 48 y 72 h después de la administración del compuesto o del aceite de maíz.

6.4 Obtención de la fracción microsomal.

Una vez sacrificados los animales se obtuvo el hígado, que se cortó en pequeñas porciones y se homogenizó en una solución de KCl 0.15 M a una proporción de 3 mL/g de peso de hígado. El homogeneizado se centrifugó a 9,000 g durante 10 minutos para obtener la fracción postmitocondrial (S9) [26], la cual se centrifugó a 100,000 g por 60 minutos a 4°C. Después, el botón obtenido se resuspendió en una solución de fosfatos 100 mM (pH 7.4) con sacarosa 0.32 M y nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones para la obtención de la fracción microsomal. El botón final 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.

La cantidad de proteína total se determinó por el método de Bradford [27] utilizando el protocolo descrito por el proveedor (BioRad).

6.5 Electroforesis e inmunodetección específica para el CYP1A

Se llevó a cabo una electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) [28]. Se manejaron concentraciones de 4% para el gel concentrador y 7.5% para el gel separador.

En los carriles se cargó lo equivalente a 5 μg de proteína microsomal hepática de rata o de ratón. La electroforesis se realizó a 60 volts durante 35 minutos y 100 volts durante una hora. La electrotransferencia [29] a la membrana de nitrocelulosa se dejó durante la noche y la transferencia de la proteína total se verificó tiñendo la membrana con rojo de Ponceau.

Después, las membranas se bloquearon por una hora con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% w/v en amortiguador de fosfatos (PBS), se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.3% y se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CYP1A1/2 a una dilución 1:1000 en PBS-BSA al 0.5% por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Luego de un segundo lavado con PBS-Tween 20 al 0.3%, se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (dilución 1:1000 en PBS-BSA 0.5%) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante.

Finalmente, se hizo un tercer lavado con PBS-Tween 20 al 0.3% y un último lavado con PBS; las membranas se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina y H_2O_2 al 30%.

Los análisis densitométricos de las membranas se realizaron con el programa ID Kodak versión 3.6.3.

6.6 Determinación de la actividad enzimática.

Para cuantificar la actividad del CYP1A1 y del CYP1A2 [30, 31], se llevó a cabo la reacción de *O*-dealquilación de alcoxirresorufinas. Utilizando la etoxiresorufina como sustrato para el CYP1A1 y metoxiresorufina para el CYP1A2.

Se preparó una curva de calibración con resorufina utilizando las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 pmol/mL.

La reacción se llevó a cabo en una celda para fluorómetro en la cual se mezcló: el amortiguador de Tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM (930-960 µL) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (10 µL de etoxirresorufina 50 µM o 20 µL de metoxirresorufina 0.5 mM) y NADPH 50 mM (10 µL) disuelto en el amortiguador. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 min. Una vez terminado este tiempo se agregó el volumen equivalente a 200 µg de proteína microsomal hepática.

La cinética de aparición de la resorufina se evaluó cada 15 segundos durante 3 minutos en un fluorómetro Versa Fluor™ de BioRad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530 nm y la de emisión de 590 nm.

6.7 Análisis estadístico

Para comparar los datos entre grupos y entre tratamientos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis post-hoc de comparación de Duncan y Tukey utilizándose el programa XLSTAT-Pro, versión 7.5.2, Addinsoft (USA, 2004).

7. RESULTADOS

Para la expresión de los resultados se utilizará la siguiente nomenclatura para la rata: CYP1A1 y CYP1A2 y para el ratón: *Cyp1a1* y *Cyp1a2*.

7.1 Electroforesis e inmunodetección específica para el CYP1A

Se realizaron los ensayos de inmunodetección para el CYP1A1 y el CYP1A2 utilizando los microsomas hepáticos de rata y ratón. A las membranas obtenidas se les realizó un análisis densitométrico, en las figuras 7, 8 y 9 se muestran los datos obtenidos. Cada columna en las gráficas, representa el promedio de los valores densitométricos obtenidos por tratamiento y tiempo de tratamiento.

En las Figuras 7 y 8 se presenta la inmunodetección del CYP1A1 y CYP1A2 para las ratas control (**a**) a las cuales se les administró aceite de maíz. Es posible observar la variabilidad interindividual en los niveles basales de las enzimas. En estas figuras también puede apreciarse que después del tratamiento con el ABZ (**b**) y el 3-MC (**c**) hay un aumento en la cantidad presente del CYP en la rata. Los valores obtenidos en la densitometría para ambas enzimas son muy parecidos, en el caso del ABZ hay un aumento a las 24h (que incluso sobrepasa al 3-MC) y disminuye al paso del tiempo, contrario a lo que pasa con el 3-MC, cuyo nivel se mantiene durante el tratamiento.

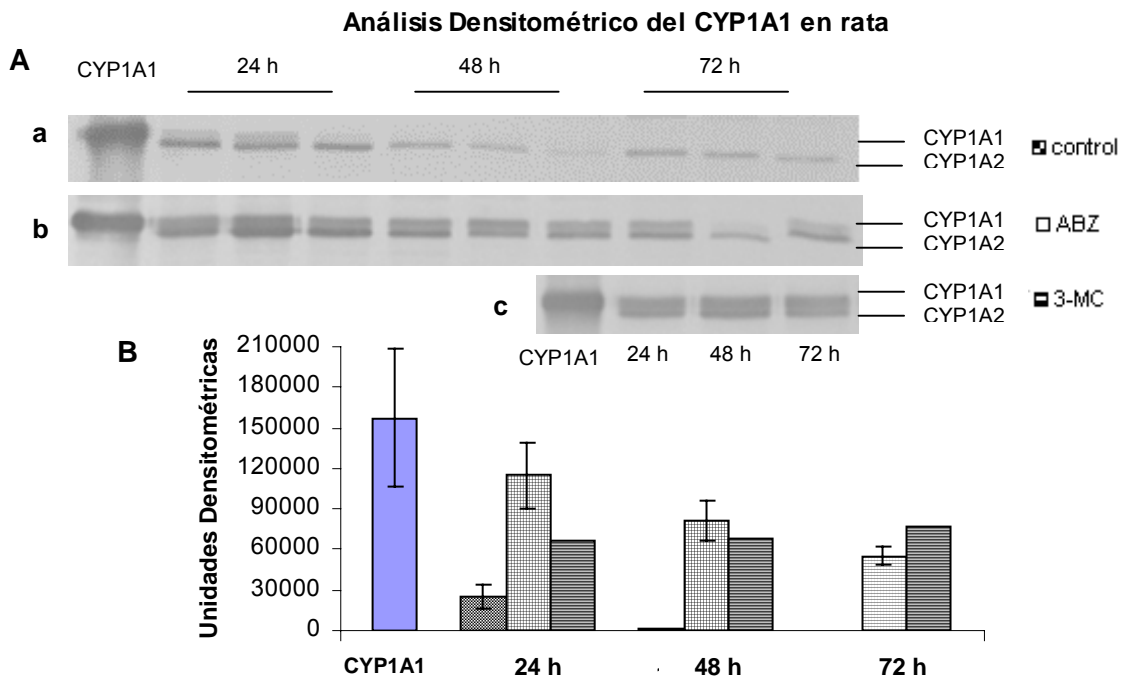


Figura 7. Inmunodetección (A) y análisis densitométrico de CYP1A1 (B) en microsomas hepáticos de rata. En la parte superior de la figura se observa la fotografía de la membrana de nitrocelulosa obtenida en la inmunodetección. La primera banda del extremo izquierdo corresponde al control positivo para el CYP1A1, la línea **a** de bandas corresponde al control tratado con aceite de maíz, la **b** al ABZ (50 mg/Kg) y la **c** al 3-MC (40 mg/Kg). Cada uno de los carriles fue llenado con el volumen equivalente a 5 µg de proteína a excepción del control positivo que se cargó con 1µg. La gráfica muestra el promedio de los valores obtenidos por tratamiento \pm DE, n =3.

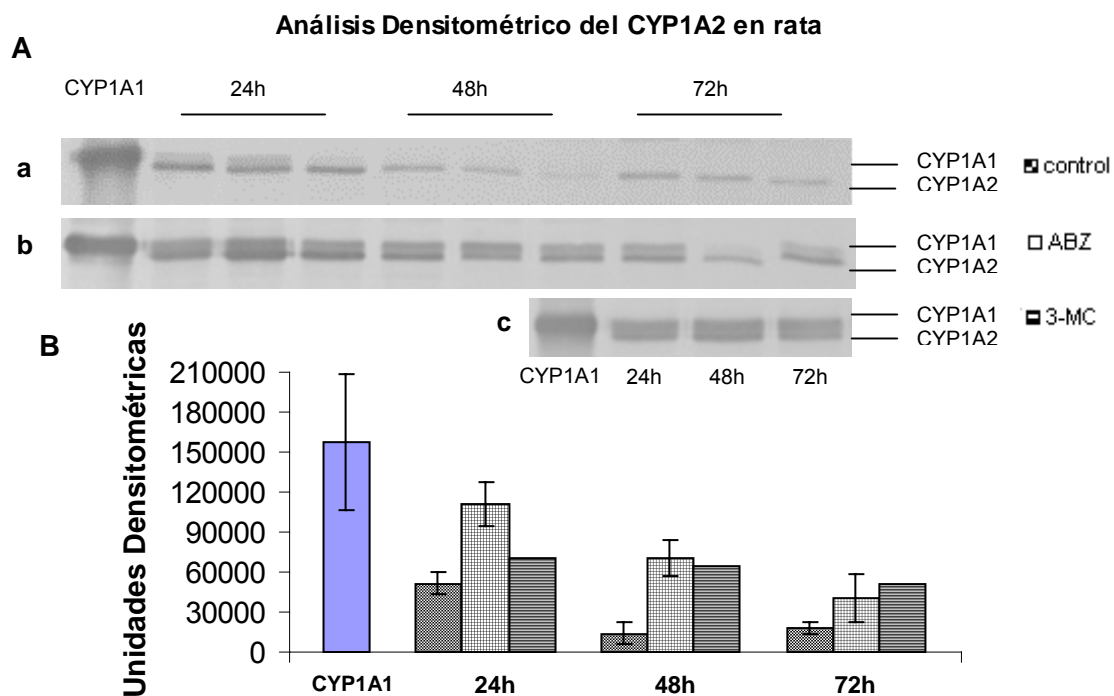


Figura 8. Inmunodetección (A) y análisis densitométrico de CYP1A2 (B) en microsomas hepáticos de rata. En la parte superior de la figura se observa la fotografía de la membrana de nitrocelulosa obtenida en la inmunodetección. La primera banda del extremo izquierdo corresponde al control positivo para el CYP1A1, la línea **a** de bandas corresponde al control tratado con aceite de maíz, la **b** al ABZ (50 mg/Kg) y la **c** al 3-MC (40 mg/Kg). Cada uno de los carriles fue llenado con el volumen equivalente a 5 µg de proteína a excepción del control positivo que se cargó con 1 µg. La gráfica muestra el promedio de los valores obtenidos por tratamiento ± DE, n =3.

La inmunodetección realizada con los microsomas hepáticos de ratón muestra al igual que en la de la rata, un aumento en la intensidad de las bandas durante el tratamiento con ABZ y 3-MC, observándose un aumento a las 48 h, mientras que a las 72 h se presentó una fuerte disminución.

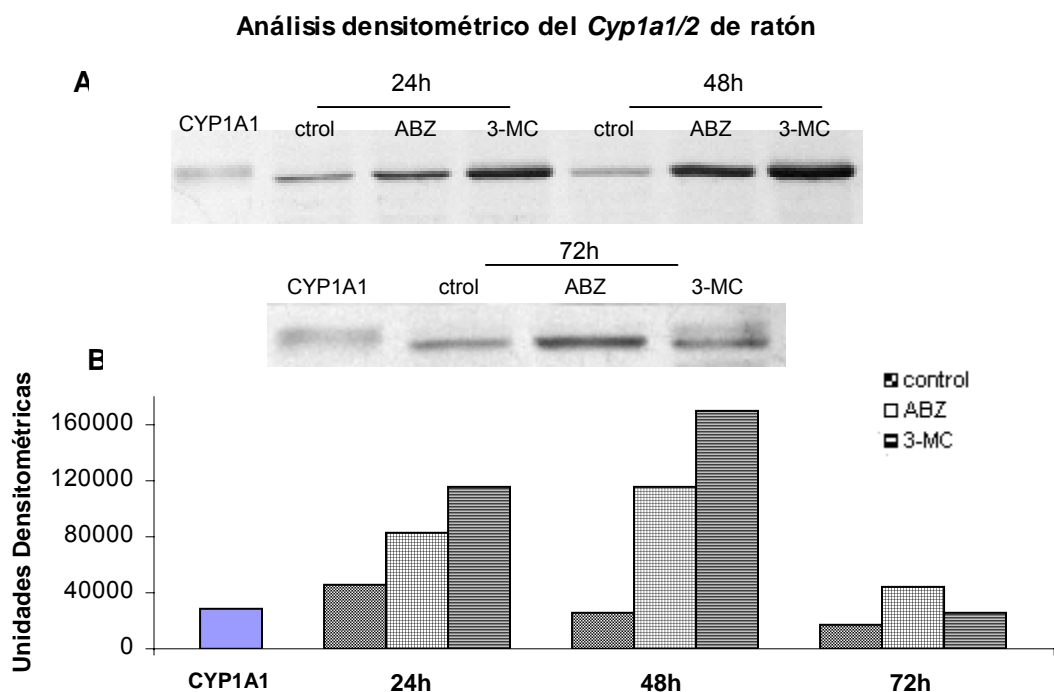


Figura 9. Inmunodetección (A) y análisis densitométrico (B) de la inmunodetección de *Cyp1a1/2* en microsomas hepáticos de ratón. En la parte superior de la figura se observa la fotografía de la membrana de nitrocelulosa. La primera banda del extremo izquierdo corresponde al control positivo para el CYP1A1. Cada uno de los carriles fue llenado con el volumen equivalente a 5 µg de proteína a excepción del control positivo que se cargó con 1 µg. La gráfica muestra los valores obtenidos en el análisis densitométrico.

7.2 Determinación de la actividad enzimática del CYP1A

Para determinar la actividad del CYP1A1 en los microsomas de rata y de ratón se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de etoxiresorufin-*O*-deetilasa (EROD). En las Figuras 10 y 11 se presentan los resultados.

La actividad del CYP1A1 aumenta en las ratas tratadas con ABZ a las 24 h y va disminuyendo con el tiempo, a diferencia de los expuestos a 3-MC, en el que el nivel de actividad de la enzima se mantuvo elevado hasta 72 h después del tratamiento (Figura 10). El análisis estadístico reveló que la actividad inducida por ABZ a 24 h y 3-MC a 24, 48 y 72 h es diferente a la encontrada en controles tratados con aceite de maíz. No hay diferencias significativas entre el nivel de actividad encontrada después del tratamiento con ABZ a las 24 h y 3-MC en los tres tiempos de tratamiento. Por otra parte, la actividad del CYP1A1 a las 48 y 72 horas después del tratamiento con ABZ, es igual a la encontrada en los controles.

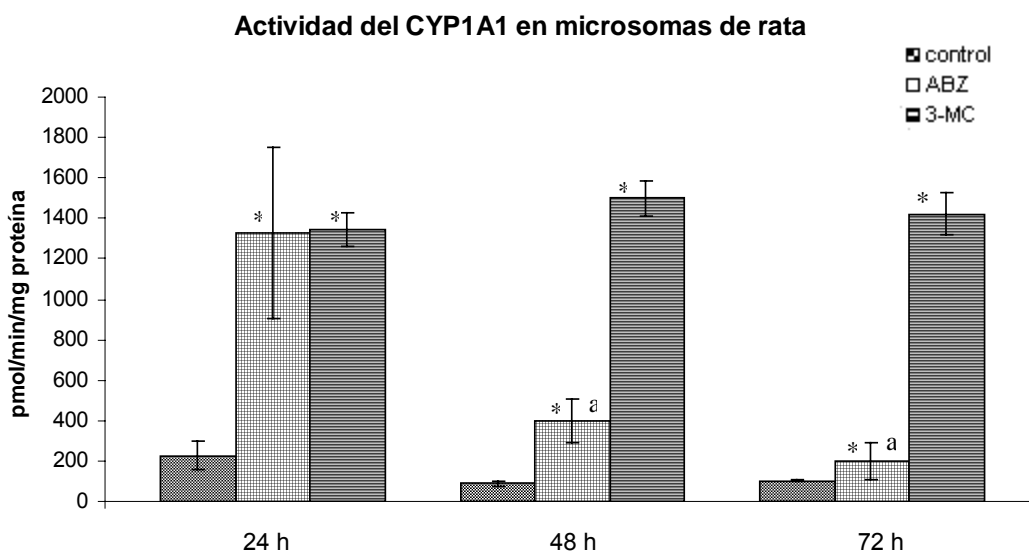


Figura 10. Efecto del tratamiento con ABZ (50 mg/Kg) y 3-MC (40 mg/Kg) en la inducción de la actividad EROD en microsomas hepáticos de rata a los diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h). Cada barra corresponde al promedio \pm DE. * $p \leq 0.025$ respecto al control con aceite de maíz, ^a $p \leq 0.025$ respecto al ABZ 24 h.

En el ratón (figura 11) no se observó actividad del *Cyp1a1* en respuesta al tratamiento con ABZ, el tratamiento con 3-MC ocasionó un aumento en la actividad a las 24 y 48 h, siendo mayor a las 24 h. A las 72 h se observó una drástica disminución en la actividad. La prueba estadística reveló que no existe diferencia significativa al comparar los controles con los resultados obtenidos con el ABZ, pero la actividad obtenida después del tratamiento con 3-MC es diferente a los controles. Al comparar entre ellos a los resultados del tratamiento con 3-MC se encontró que no hay diferencia entre la actividad a las 24 y 48 h, pero si la hay a las 72 h.

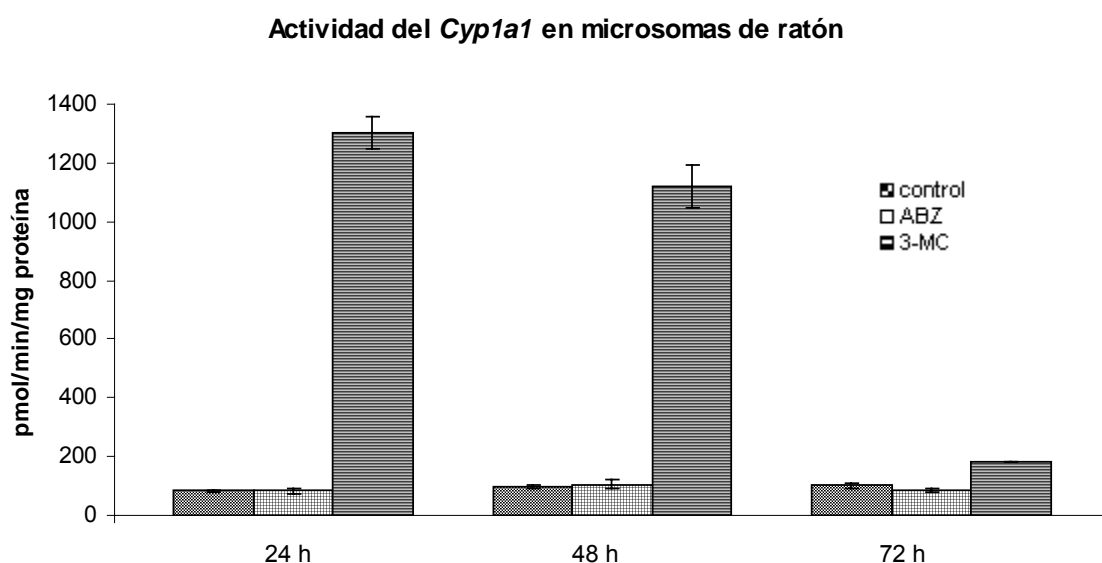


Figura 11. Efecto del tratamiento con ABZ (50 mg/Kg) y 3-MC (40 mg/Kg) en la inducción de la actividad EROD en microsomas hepáticos de ratón a los diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h). Cada barra corresponde al promedio de tres lecturas \pm DE. * $p \leq 0.025$, ** $p \leq 0.005$ respecto al control administrado con aceite de maíz.

Comparando los resultados obtenidos, la actividad del CYP1A1 inducido con 3-MC en la rata es mayor y más persistente que en el ratón, además de que el ABZ produjo una respuesta en la rata y no en el ratón.

La actividad del CYP1A2 se determinó fluorométricamente a partir de la O-desalquilación de la metoxirresorufina (MROD). En las figuras 12 y 13 se presentan los resultados para la rata y el ratón respectivamente.

En las ratas tratadas con 3-MC, la actividad del CYP1A2 (Figura 12) alcanzó los 200 pmol/min/mg de proteína durante los tres días de tratamiento. Para el tratamiento con ABZ, aunque la actividad se elevó respecto a los controles, ésta no alcanzó los niveles observados con el 3-MC. Existen diferencias significativas entre los valores de actividad obtenidos con ABZ y 3-MC al compararlos con los resultados de los controles tratados con aceite de maíz. Cuando se comparó la actividad del ABZ con la del 3-MC, se determinó que sí hay diferencias entre los valores obtenidos a las 48 y 72 h.

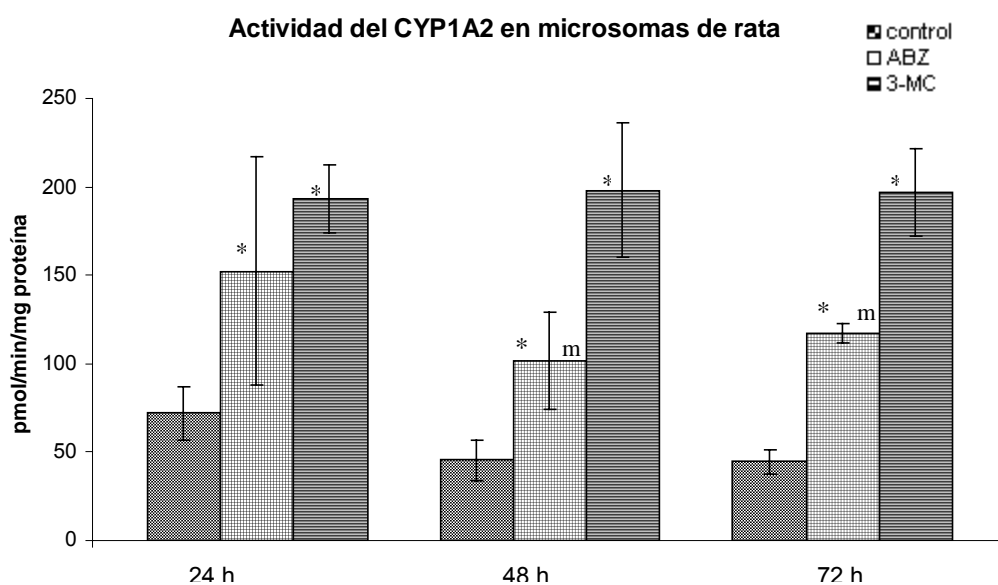


Figura 12. Efecto del tratamiento con ABZ (50 mg/Kg) y 3-MC (40 mg/Kg) en la inducción de la actividad MROD del CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata a los diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h). Cada barra corresponde al promedio \pm DE. * $p \leq 0.025$ respecto al control tratado con aceite de maíz, ^m $p \leq 0.025$ respecto al 3-MC.

En el caso del ratón (Figura 13), al igual que con el *Cyp1a1* no hubo inducción de la actividad del *Cyp1a2* por ABZ puesto que no hay diferencias significativas con el control tratado con aceite de maíz. Respecto al 3-MC, la actividad determinada para el *Cyp1a2* de ratón a las 48h fue 6 veces mayor a la obtenida en el CYP1A2 de rata y diferente al compararla con sus controles.

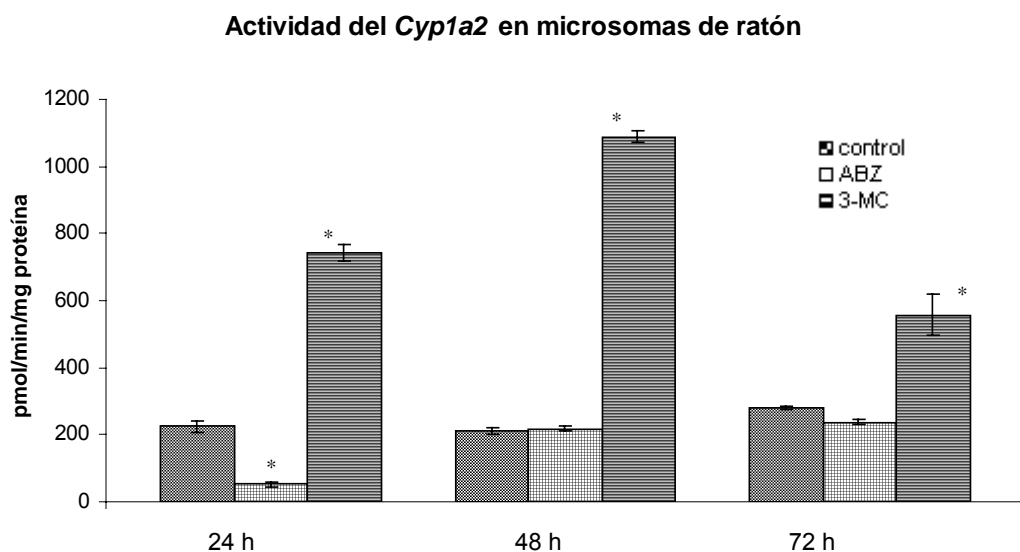


Figura 13. Efecto del tratamiento con ABZ (50 mg/Kg) y 3-MC (40 mg/Kg) en la inducción de la actividad MROD del *Cyp1a2* en microsomas hepáticos de ratón a los diferentes tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 h). Cada barra corresponde al promedio de tres lecturas \pm DE.* $p \leq 0.025$ respecto al control tratado con aceite de maíz.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Desde hace tiempo existe en la literatura reportes en los que se mencionan diferentes compuestos que no cumplen con las características de los inductores clásicos del CYP1A y que aún así tienen la capacidad de inducirlo. Entre estos inductores llamados no clásicos se encuentran los benzimidazoles [32], grupo químico al cual pertenece el ABZ.

De igual forma se han propuesto 3 diferentes hipótesis para la inducción del CYP1A por estos inductores no clásicos¹¹: i) el inductor es un ligando muy débil del AhR [33]; ii) el compuesto original es previamente metabolizado y alguno de los metabolitos originados es el ligando al receptor AhR [34]; iii) está involucrada una vía de señalización diferente en la inducción de la enzima [19, 35].

Previamente, Asteinza y cols. [23] caracterizaron la capacidad del ABZ para inducir diferentes isoformas del CYP en rata, entre las cuales se incluyen al CYP1A1 y CYP1A2.

En el presente trabajo se observó que en la rata, la administración de ABZ dio como resultado un aumento en la actividad del CYP1A1 24 h después de la administración, la cual fue disminuyendo al paso del tiempo. En el ratón el tratamiento con el ABZ no produjo un cambio en la actividad del CYP.

Por otra parte, el 3-MC en la rata ocasionó un aumento en el nivel de la actividad del CYP1A1 el cual se conservó a las 24, 48 y 72 h. Esto ya había sido reportado por Ortiz de Montellano [9], sin embargo en el presente trabajo se observa el mismo efecto del 3-MC sobre el CYP1A2 aunque con un nivel de actividad menor al CYP1A1. En el ratón, al igual que con el CYP1A1, el ABZ no ocasionó aumento de la actividad en comparación con los controles.

En el 2006, Souma y cols [25] observaron una respuesta parecida a lo reportado aquí. Encontraron que la 2-metoxi-4-nitroanilina (2-MeO-a-NA) induce al CYP1A hepático en rata pero no en ratón. Sin embargo, a diferencia de los resultados que se muestran en este trabajo, ellos observaron una mayor actividad del CYP1A2 a las 24 h de tratamiento que disminuía al pasar el tiempo; la respuesta del CYP1A1 fue menor que la del CYP1A2. Además determinaron que la 2-MeO-a-NA no es un ligando al AhR.

Ya se ha determinado que algunos benzimidazoles como el Omeprazol (OME) y el Tiabendazol (TBZ) no son ligandos al AhR [18] pues son incapaces de desplazar al TCDD en ensayos de competencia; dado que el ABZ pertenece al mismo grupo químico que el OME y el TBZ podríamos esperar que tampoco fuera un ligando del AhR.

Como ya se mencionó, el 3-MC es un inductor clásico del CYP1A1 principalmente, en años recientes Yoshinari y cols. [36] determinaron que el ABZ junto con el Lansoprazol (LPZ) tienen un patrón de inducción del CYP1A similar al 3-MC, es decir, que tienen preferencia en la inducción para el CYP1A1 sobre el CYP1A2 (como lo observado en este trabajo para la rata) a diferencia del OME, que de acuerdo a lo presentado por este grupo induce de manera similar a los dos citocromos. Adicionalmente, Bapiro y cols. [37] mencionan que el ABZ muestra un aumento en los niveles del mRNA para el CYP1A1 de manera más eficiente que para CYP1A2 en células HepG2.

Por otro lado, Kikuchi y cols. [24] reportan una diferencia en la inducción del mRNA del CYP1A1 en líneas celulares de humano (HepG2) y de ratón (Hepa-1) por benzimidazoles (OME, TBZ, LPZ), no obteniendo respuesta en las células Hepa-1 de ratón. Este grupo propone que la inducción por este tipo de compuestos podría deberse a que el AhR puede ser capaz de autoactivarse utilizando una vía de señalización endógena sin un ligando exógeno. También

plantean que podría existir un factor crítico en la transducción de señales que activa al AhR por el tratamiento con benzimidazoles en células humanas (HepG2).

El objetivo principal de este trabajo fue el determinar si existe alguna diferencia en la inducción del CYP1A por ABZ entre la rata y el ratón. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que sí existe una diferencia entre ambas especies. Observamos que en la rata, el ABZ provoca una inducción rápida (24 h) que no logra mantenerse al paso del tiempo a diferencia del 3-MC, un inductor clásico más potente, que logra una inducción sostenida durante el tiempo de estudio.

Por el contrario, en ratón, el tratamiento con ABZ no aumentó la actividad de los CYPs estudiados. Cabe señalar que la inducción provocada por el 3-MC fue distinta a la observada en la rata, ya que a las 72 h se vio una marcada disminución en el CYP1A1.

Un resultado inesperado lo constituye el aumento en la concentración de proteína del CYP detectada en los microsomas de ratón tratados con ABZ. Dicho aumento no corresponde con una elevación en la actividad respecto a los testigos no tratados. Una posibilidad es que la proteína detectada sea inactiva ya que en la transferencia de proteína total teñida con rojo de Ponceau, no se observan diferencias notorias en la concentración de proteína agregada en cada carril. Sin embargo, se requiere de mayor evidencia que nos permita explicar este fenómeno.

Podemos concluir que existen diferencias en la inducción del CYP1A entre la rata y el ratón por el tratamiento con ABZ; en la rata este benzimidazol incrementa preferentemente la actividad del CYP1A1 sobre el CYP1A2; sin embargo en el ratón, no se observó inducción de los CYPs estudiados por el ABZ.

Dentro de las perspectivas del proyecto en el que se encuentra este trabajo están el determinar si el ABZ es un ligando del AhR, si la inducción de estos CYPs es a nivel transcripcional, y continuar los trabajos dirigidos hacia la elucidación del posible el mecanismo de inducción por inductores no clásicos.

9. ABREVIATURAS

3-MC	3-Metilcolantreno
ABZ	Albendazol
ABZSO	Sulfóxido de Albendazol
ABZSO ₂	Sulfona de Albendazol
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
ARNT	Translocador nuclear del receptor Ah
B(a)P	Benzo(a)pireno
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P4501A1
CYP1A2	Citocromo P4501A2
CYP3A4	Citocromo P4503A4
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EROD	Etoxyresorufin-O-deetilasa
FMO	Flavin monooxigenasas
LPZ	Lansoprazol
MROD	Metoxiresorufin-O-demetilasa
NADPH	Nicotinamida adenina nucleótido fosfato reducido
OME	Omeprazol
S9	Fracción postmitocondrial
TBZ	Tiabendazol
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
XRE	Elemento de respuesta a xenobióticos

10.REFERENCIAS

1. Gennaro, A., Remington, *FARMACIA*. Vol. 1. (2000): Editorial Médica Panamericana.
2. Marques, M.P., Takayanagui, O. M., Lanchote, V. L., *ALBENDAZOLE METABOLISM IN PATIENTS WITH NEUROCYSTICERCOSIS: ANTIPYRINE AS A MULTIFUNCTIONAL MARKER DRUG OF CYTOCHROME P450*. Braz J Med Biol Res (2000). **35** p. 261-269.
3. Goodman, G., *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, ed. Edition. (2006), USA.
4. Moroni, P., Buronfosse, T., Longin-Sauvageon, C., Delatour, P., Benoit, E., *CHIRAL SULFOXIDACION OF ALBENDAZOLE BY FLAVINE ADENINE DINUCLEOTIDE-CONTAINING AND CYTOCHROME P450-DEPENDENT MONOOXYGENASES FROM RAT LIVER MICROSOMES*. Drug Metab Dispos, (1995). **23**: p. 160.
5. Souhaili-ElAmiri, H., Mothe, O., Totis, M., Masson, C., Batt, A.M., Delatour, P., Seist, G., *ALBENDAZOLE SULFONATION BY RAT LIVER CYTOCHROME P-450c*. J Pharmacol Exp Ther, (1988). **246**: p. 758.
6. Baliharová, V., Skálová, L., Maas, R.F.M., De Vrieze, G., Bull, S., Fink-Gremmels, J., *THE EFFECT OF BENZIMIDAZOLE ANTHELMINTICS ON P4501A IN RAT HEPATOCYTES AND HepG2 CELLS*. Research in Veterinary Science, (2003). **75**: p. 61-69.
7. Delatour, P., Garnier, F., Benoit, E., Longin, C., *A CORRELATION OF TOXICITY OF ALBENDAZOLE AND OF OXFENDAZOLE WITH THEIR FREE METABOLITES AND BOUND RESIDUES*. J Vet Pharmacol Ther, 1984. **7**: p. 139.
8. Omura, T., Sato, R., *THE CARBONE MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE*. J Biol Chem (1964). **239**: p. 2370-2378.
9. Ortiz de Montellano, P., *CYTOCHROME P450: STRUCTURE, MECHANISM AND BIOCHEMISTRY*. Chapter 1 - Models and Mechanism

- of Cytochrome P450 Action, Chapter 6 - Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes. (2005), New York: Plenum Publishers.
10. Tompkins, L., Wallace, A., *MECHANISMS OF CYTOCHROME P450 INDUCTION*. J Biochem Molecular Toxicology, (2007). **21**: p. 176-181.
 11. Boobis, A.R., Sesardic, D., Murray, B.P., Edwards, R.J., Singleton, A.M., Rinch, K.J., Murray, S., De la Torre, R., Segura, J., Pelkonen, O., Pasanen, M., Kobayshi, S., Zhi-Guang, T., Davies, D.S., *SPECIES VARIATION IN THE RESPONSE OF THE CYTOCHROME P450-DEPENDENT MONOOXYGENASE SYSTEM TO INDUCERS AND INHIBITORS*. Xenobiotica, (1990). **20**: p. 1139-1161.
 12. Zangar R.C., D.D.R., Verma S., *MECHANISMS THAT REGULATE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY CYTOCHROME P450*. Toxicol Appl Pharmacol (2004). **199**: p. 316-331.
 13. Donato, M.T., *¿QUÉ ES EL CITOCROMO P450 Y CÓMO FUNCIONA?*, in www.uv.es/jcastell/citocromo_P450.pdf, Universidad de Valencia, España.
 14. Hodgson, E., *A TEXTBOOK OF MODERN TOXICOLOGY*. Chapter 7 - Metabolism of Toxicants. (2006): John Wiley & sons Inc.
 15. Guengerich, F., *RAT-LIMITING STEPS IN CYTOCHROME P450 CATALYSIS*. Biol Chem, (2000). **383**: p. 1553-1564.
 16. González, F.J., Gelboin, H.V. , *ROLE OF HUMAN CYTOCHROMES P450 IN THE METABOLIC ACTIVATION OF CHEMICAL CARCINOGENS AND TOXINS*. Drug Metab Rev, (1994). **26**: p. 165-183.
 17. Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M., Hines, R., Gidrol, X., Rahmani, R., *INDUCTION OF CYTOCHROME P450 1A1 GENE EXPRESSION, OXIDATIVE STRESS, AND GENOTOXICITY BY CARBARYL AND THIABENDAZOLE IN TRANSFECTED HUMAN HepG2 AND LYMPHOBLASTOID CELLS*. Biochemical Pharmacology (2001) **61**: p. 399-407.
 18. Lemaire, G., Delescluse, C., Pralavorio, M., Ledric, N., Lesca, P., Rahmani, R., *THE ROLE OF PROTEIN TYROSINE KINASES IN CYP1A1*

- INDUCTION BY OMEPRAZOLE AND THIABENDAZOLE IN RAT HEPATOCYTES*. Life Science, (2004). **74**: p. 2265-2278.
19. Whitlock, J.P., *INDUCTION OF CYTOCHROME P4501A1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, (1999). **39**: p. 103-125.
 20. Brauze, D., Widerak, M., Cwykiel, J., Szyfter, K., Baer-Dubowska, W., *THE EFFECT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR OF AhR, AhRR, ARNT, Hif1a, CYP1A1 AND NQO1 GENES IN RAT LIVER*. Toxicology Letters, (2006). **167**: p. 212-220.
 21. Delescluse, C., Lemaire, G., De Sousa, G., Rahmani, R., *IS CYP1A1 INDUCTION ALWAYS RELATED TO AHR SIGNALING PATHWAY?* Toxicology Letters, (2000). **153**: p. 73-82.
 22. Fujii-Kuriyama Y, M.J., *MOLECULAR MECHANISMS OF AhR FUNCTIONS IN THE REGULATION OF CYTOCHROME P450 GENES*. Biochem Biophys Res Commun, (2005). **338**: p. 311-317.
 23. Asteinza, J., Camacho, R., Reyes, E., Dorado, V., Espinosa, J., *INDUCTION OF CYTOCHROME P450 ENZYMES BY ALBENDAZOLE TREATMENT IN THE RAT*. Environmental Toxicology and Pharmacology, (2000). **9**: p. 31-37.
 24. Kikuchi, H., Kato, H., Mizuno, M., Hossain, A., Ikawa, S., Miyazaki, J., Watanabe, M., *DIFFERENCES IN INDUCIBILITY OF CYP1A1-mRNA BY BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS BETWEEN HUMAN AND MOUSE CELLS: EVIDENCES OF HUMAN-SPECIFIC SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY FOR CYP1A1 INDUCTION* Archives of Biochemistry and Biophysics, (1996). **334**: p. 235-240.
 25. Souma, S., Sekimoto, M., Degawa M., *SPECIES DIFFERENCE IN THE INDUCTION OF HEPATIC CYP1A SUBFAMILY ENZYMES, ESPECIALLY CYP1A2, BY THE 2-METHOXY-4-NITRONILINE AMONG RATS, MICE, AND GUINEA PIGS*. Arch Toxicol, (2006). **80**: p. 739-747.
 26. Maron, D., Ames, B., *REVISED METHODS FOR THE Salmonella MUTAGENICITY TEST*. Mutat Res, (1983). **113** p. 174-215.

27. Bradford, M.M., *A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAMS OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING*. Anal Biochem, (1979). **72** p. 248-254.
28. Laemmli, U.K., *CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4*. Nature, (1970). **227**(5259): p. 680-5.
29. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., *ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM POLYACRYLAMIDE GELS TO NITROCELLULOSE SHEETS: PROCEDURES AND SOME APPLICATIONS*. Proc Natl Acad Sci, (1979). **76**: p. 4350-4354.
30. Burke, D., Thompson, S., Weaver, R., Wolf, R., Mayers, R., *CYTOCHROME P450 SPECIFICITIES OF ALKOXYRESORUFIN O-DEALKYLATION IN HUMAN AND RAT LIVER*. Biochemical Pharmacology, (1994). **48**: p. 923-936.
31. Rodrigues, A.D., Prough, R. A., *INDUCTION OF CYTOCHROMES P4501A1 AND P4501A2 AND MEASUREMENT OF CATALYTIC ACTIVITIES*. Methods in Enzymology, (1991). **26**: p. 423-431.
32. Backlund, M., Ingelman-Sunberg, M., *STRUCTURAL MECHANISTIC ASPECTS OF TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF CYTOCHROME P450 1A1 BY BENZIMIDAZOLE DERIVATES IN RAT HEPATOMA H411E CELLS*. Eur J Biochem, 1999. **261**: p. 66-71.
33. Denison, M.S., Phelan, D.G.M., Winter, G.M., Ziccardi, M.H., *CARBARYL, A CARBAMATE INSECTICIDE, IS A LIGAND FOR THE HEPATIC Ah (DIOXIN) RECEPTOR*. Tox Appl Pharmacol, 1998. **152**: p. 406-414.
34. Dzeltovic, N., McGuire, J., Daujat, M., Tholander, J., Ema, M., Fujii-Kuriyama, Y., Bergman, J., Maurel, P., Poellinger, L., *REGULATION OF DIOXINE RECEPTOR FUNCTION BY OMEPRAZOLE*. J Biol 1997. **272**: p. 12705-12713.
35. Vecchini, F., Mace, K., Magdalau, J., Mahe, Y., Bernard, B.B., Shroot, B., *CONSTITUTIVE AND INDUCIBLE EXPRESSION OF DROUG*

- METABOLIZING ENZYMES IN CULTURED HUMAN KERATINOCYTES*. Br J Dermatol, 1995. **132**: p. 121.
36. Yoshinari, K., Ueda, R., Kusano, K., Yoshimura, T., Nagata, K., Yamazoe, Y., *OMEPRAZOLE TRANSACTIVATES HUMAN CYP1A1 AND CYP1A2 EXPRESSION THROUGH THE COMMON REGULATORY REGION CONTAINING MULTIPLE XENOBIOTIC-RESPONSIVE ELEMENTS*. Biochem Pharmacol (2008). doi: **10.1016/j.bcp.2008.04.005**.
37. Bapiro, T., Andersson, T., Otter, C., Hasles, J., Masimirembwa, C., *CYTOCHROME P540 1A1/2 INDUCTION BY ANTIPARASITIC DRUGS: DOSE-DEPENDANT INCREASE IN ETHOXYRESOTUFIN O-DEETHYLASE ACTIVITY AND m-RNA CAUSED BY QUININE, PRIMAQUINE AND ALBENDAZOLE IN HepG2 CELLS*. Eur J Clin Pharmacol, (2002). **58**: p. 537-542.