



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

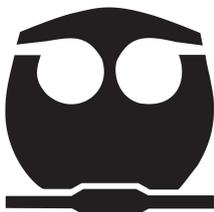
**Efecto de restricción proteica sobre el CYP3A2 y
citocinas proinflamatorias**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

PRESENTA

GEORGINA GARCÍA GINEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE:	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL:	Dr. Enrique Ortega Soto
SECRETARIO:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
1er. SUPLENTE:	Dra. María Elena Bravo Gómez
2º SUPLENTE:	Dr. Mario Adán Moreno Eutimio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 206, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda

SUSTENTANTE:

Georgina García Ginez

Índice general

1. Resumen	8
2. Introducción	10
2.1. Malnutrición proteico-energética	10
2.2. Generalidades de los citocromos P450 (CYP)	12
2.2.1. Subfamilia 1A	14
2.2.2. Subfamilia 3A	15
2.3. Generalidades de las citocinas	16
2.3.1. Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)	17
2.3.2. Interleucina-1 (IL-1)	18
2.3.3. Interleucina-6 (IL-6)	18
3. Planteamiento del problema	20
4. Hipótesis y Objetivos	23
4.1. Hipótesis	23



4.2. Objetivo General	23
4.2.1. Objetivo Particular	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1. Reactivos	25
5.2. Tratamientos	26
5.3. Obtención de la fracción microsomal y citosólica	27
5.4. Determinación de la actividad enzimática	27
5.5. Inmunodetección de los citocromos	29
5.6. Determinación de las citocinas proinflamatorias	30
5.7. Análisis Estadístico	30
6. Resultados	31
6.1. Parámetros generales	31
6.2. Determinación de la Actividad Enzimática	33
6.3. Inmunodetección de los citocromos	35
6.4. Determinación de las citocinas proinflamatorias	37
7. Discusión y Conclusiones	38
Abreviaturas	42
Bibliografía	44



ApéndiceA. Actividad enzimática de los citocromos	50
ApéndiceB. Concentración de citocinas proinflamatorias	53

1

Resumen

La desnutrición es el resultado de una ingesta inadecuada de los nutrientes, caracterizada por la deficiencia de macronutrientes tales como carbohidratos, lípidos y proteínas, además de un déficit específico de vitaminas y elementos trazas [1]. Cabe mencionar que es un problema latente en países en vías de desarrollo, por lo cual se han realizado estudios evaluando el impacto de la desnutrición sobre enzimas encargadas del metabolismo de compuestos endógenos y exógenos, como es el caso de los citocromos P450.

Estudios previos en ratas machos Wistar en un modelo de restricción proteica, han evidenciado que la actividad enzimática del CYP1A1/1A2, 2B1/2B2 y 2E1 se encuentran disminuidas [2]; sin embargo, el efecto que pudiese tener esta restricción sobre el CYP3A2 no está ampliamente estudiada. Por otro lado, se ha demostrado que el TNF- α , IL-6 e IL-1 β tienen la capacidad



de disminuir la expresión del CYP1A1 y CYP3A2 [3]. Por lo anterior, en este estudio se evaluó el efecto de la restricción proteica sobre los niveles de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), así como la actividad enzimática y concentración del CYP3A2 en un modelo *in vivo*.

Como estrategia experimental se utilizaron 16 ratas macho Wistar recién destetadas, las cuales se dividieron en 2 grupos de 8 animales cada uno; el primer grupo consumió una dieta control (18 % proteína) y el segundo una dieta hipoproteica (6 % de proteína), al finalizar los 20 días de tratamiento se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se realizó la disección del hígado el cual fue procesado hasta la obtención de la fracción microsomal y citosólica. Para la determinación de la actividad enzimática y presencia del CYP1A1/1A2, CYP3A2 se utilizó la fracción microsomal y para la determinación de los niveles de las citocinas proinflamatorias la fracción citosólica.

Los resultados revelaron un decremento en la actividad enzimática y concentración del CYP1A1/1A2, en contraste, el CYP3A2 no presentó cambios en la actividad enzimática pero sí una disminución en la presencia de esta proteína. Por otro lado los niveles de IL-6 e IL-1 β no se vieron afectados por la dieta hipoproteica; sin embargo, los niveles del TNF- α presentaron una disminución significativa con respecto al control.

En resumen, el restringir el consumo de proteína en la alimentación trae como consecuencia una disminución en la actividad enzimática y presencia del CYP1A1 y 1A2; no así en el caso del CYP3A2, el cual no presentó cambios en la actividad enzimática pero si una disminución en la cantidad de proteína. Finalmente, en este modelo no se encontró un aumento en los niveles de las citocinas que indiquen su participación en la regulación de la actividad y concentración de los citocromos estudiados.

2

Introducción

2.1. Malnutrición proteico-energética

La malnutrición proteico-energética (MPE), también llamada desnutrición proteico-energética, se debe tanto a la falta de macronutrientes como de energía, pero no a la escasez de micronutrientes. De acuerdo a la FAO los factores causales de la MPE en infantes son: necesidades elevadas de energía y proteína por kilogramo de peso, prácticas incorrectas de destete, consumo inadecuado de las formulas lácteas infantiles, dietas bajas en contenido energético (grasas o proteínas), infecciones que puedan ocasionar anorexia, disminución en el consumo de alimentos o bien una reducción en la absorción de los nutrientes [4].

En países en vías de desarrollo las causas de la MPE están asociadas a la pobreza o aislamiento social [5]; en cambio, en países industrializados



se presenta en grupos marginados de pobreza extrema. Representa formas de maltrato infantil o de vejez abandonada, además de prácticas religioso-culturales. Adicionalmente, en la actualidad el ideal de delgadez ha favorecido el consumo de dietas poco balanceadas logrando con ello formas graves de la malnutrición, entre los cuales se encuentra el Marasmus y Kwashiorkor [6].

En el Marasmus, la principal carencia es el alimento en general, por lo tanto, también de energía. Puede presentarse a cualquier edad y es la forma más común de desnutrición presente en desordenes alimenticios. Los síntomas clínicos pueden ser parecidos a los del Kwashiorkor; sin embargo existen algunas diferencias; por ejemplo, no hay presencia de edemas como en el Kwashiorkor pero sí pueden presentarse ulceraciones por presión; además existe pérdida severa del músculo; la grasa subcutánea es mínima; existen cambios en la textura del cabello y los niveles de albúmina sérica son casi normales [7], [4].

El nombre de Kwashiorkor proviene de la región de Ghana de la tribu de Ga, que significa *síndrome del primer hijo desplazado*, debido a que esta forma de desnutrición se presenta en los niños que han dejado de consumir la leche materna e inician el consumo de alimentos bajos en proteínas y altos en carbohidratos. Entre las características que presentan son: niveles bajos de albúmina sérica, incremento de la susceptibilidad a infecciones, escasa ganancia del peso y estatura, cambios en la coloración del cabello, presencia de escamas en la piel, la absorción de los nutrientes es escasa debido a la muerte de las células que recubren el tracto digestivo y que no son posibles de reemplazar, presencia de edemas, vientre hinchado como consecuencia de la acumulación de grasa en el hígado y la acumulación de líquidos en el abdomen [7].



Estudios realizados en niños con desnutrición tipo Kwashiorkor se ha reportado modificaciones en algunos parámetros farmacocinéticos de la cafeína, en concreto, el aclaramiento de la paraxantina y el tiempo de vida media de la cafeína fueron significativamente menores en los niños con Kwashiorkor; además, la actividad enzimática del CYP1A2 también se encontró disminuida [8]. Lo cual indica que el estado nutricional puede afectar el metabolismo de compuestos xenobióticos.

2.2. Generalidades de los citocromos P450 (CYP)

Los citocromos P450 son una superfamilia de hemoproteínas encargados de la biosíntesis de compuestos endógenos tales como esteroides, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos, aminas biogénicas y feromonas. Además metabolizan un gran número de compuestos xenobióticos; por ejemplo, fármacos, metabolitos de plantas, contaminantes ambientales y aditivos alimenticios, dando como resultado la detoxificación del organismo o bien la bioactivación de compuestos a través de reacciones oxido-reducción [9].

Inicialmente fueron reconocidos como un pigmento en microsomas de hígados de mamíferos. Sin embargo, al tratarse con un agente reductor (ditiocita de sodio) y gasificar el sistema con monóxido de carbono se detectó una banda con absorción máxima en $450nm$ guiando al reconocimiento de estas hemoproteínas [10].

En eucariontes, los citocromos se encuentran anclados en la membrana del retículo endoplasmático o en la membrana interna de las mitocondrias y en procariontes se localizan como proteínas solubles. Estas enzimas fueron localizados en hígado de mamíferos, donde se encuentran en mayor proporción y juegan un papel importante en reacciones de Fase I, aunque también

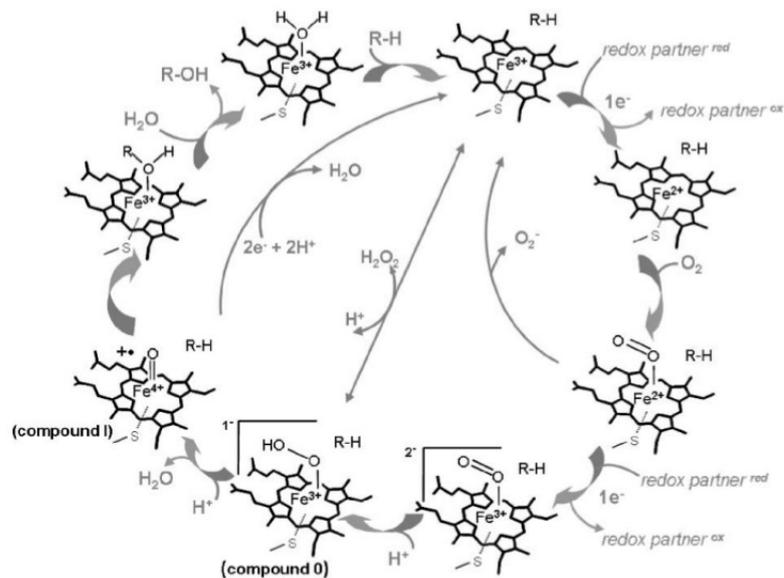


Figura 2.1: Ciclo catalítico del CYP.

se pueden encontrar en órganos extrahepáticos como es el intestino, pulmón, cerebro, piel, testículo, placenta, ovario, etc.

El proceso general de las reacciones catalizadas por los CYPs es a través de una serie de reacciones cíclicas (figura 2.1). El primer paso es la unión del sustrato con la forma ferrica de las hemoproteínas liberando una molécula de agua, seguido de la reducción del hierro por un electrón pasando a un estado ferroso. Posteriormente el complejo reacciona con una molécula de oxígeno para dar lugar a la forma ternaria del complejo, el cual es reducido por un segundo electrón guiando a la formación del complejo hierro-peroxo, el cual es rápidamente protonado generando el complejo Fe-hidroperoxo (compuesto 0), una segunda protonación guía a la escisión del dióxigeno ($O=O$) generando una molécula de agua y la formación del compuesto I. Este complejo oxigena al sustrato y disocia el producto a través de la entrada de una molécula de agua completando así el ciclo.



Los citocromos pueden ser divididos en 4 clases dependiendo de cómo los electrones del NADPH son entregados al ciclo catalítico. Las proteínas de Clase I utilizan una reductasa que contiene FAD y una ferrosulfoproteína (ferridoxina). Las clase II sólo necesitan una reductasa del CYP que contiene FAD/FMN para la transferencia de electrones. Las de clase III son autosuficientes y no requieren un donador de electrones, mientras que las de clase IV reciben los electrones directamente del NADPH [11].

La clasificación actualmente utilizada se basa en la secuencia de similitud entre los aminoácidos, las enzimas que comparten el 40 % de similitud se clasifican en la misma familia, pero si entre estas enzimas comparten el 60 % de similitud se les clasifica en la misma subfamilia. Entre los CYPs hepáticos que intervienen en el metabolismo de compuestos xenobióticos se encuentran principalmente las familias 1,2 y 3.

2.2.1. Subfamilia 1A

La subfamilia del CYP1A ha sido ampliamente estudiada por su papel en la carcinogénesis y el metabolismo de xenobióticos; se constituye de dos miembros, CYP1A1 y CYP1A2. El porcentaje de similitud entre CYP1A1 y CYP1A2 en humano y rata es del 83 y 80 % respectivamente. La isoforma del CYP1A1 es inducible en hígado y en tejidos extrahepáticos en rata, en cambio en el humano es considerada principalmente una enzima extrahepática que está presente predominantemente en el intestino delgado, pulmón, placenta y riñón.

El CYP1A2 se expresa principalmente en el hígado y débilmente en los tejidos extrahepáticos. La cantidad de esta isoforma es del 13 % del contenido total en el hígado y está involucrada en el metabolismo de aproximadamen-



te el 2% de los fármacos, además del metabolismo de varios compuestos procarcinógenos principalmente aminas aromáticas.

La expresión de estas enzimas es a través de la vía del receptor arilhidrocarburo (AhR), la cual puede ser activada por algunos componentes de humo del cigarro, alimentos y fármacos. En particular, se ha demostrado que el TNF- α suprime la expresión del CYP1A1 de una manera dosis dependiente, a través de la interacción entre la vía del AhR y NF- κ B [12].

2.2.2. Subfamilia 3A

La subfamilia 3A es la más importante para los humanos debido a que está involucrada en la biotransformación de más del 50% de los fármacos utilizados en la clínica. En el humano se han identificado cuatro isoformas, el CYP3A4, 3A5, 3A7 Y 3A43, siendo el CYP3A4 el más abundantes en el hígado y con mayor actividad catalítica. Esta isoforma no sólo se expresa en hígado sino también en otros tejidos incluyendo pulmón, colon y estómago.

El CYP3A4 humano presenta un 72 y 71 % de similitud con el CYP3A1 y CYP3A2 respectivamente en rata. Esta subfamilia aparentemente se expresa de manera sexo específico en roedores, por ejemplo , el CYP3A2 y 3A18 son isoformas específicas de los machos, mientras que el CYP3A9 es dominante en las hembras [13].

La transcripción de los genes de estas enzimas es regulada por la vía del Receptor de Pregnano X (PXR) y del Receptor de Androstano Constitutivo (CAR). Entre los factores que pueden afectar la expresión de este citocromo se encuentran las citocinas proinflamatorias, ya que se ha demostrado en hepatocitos humanos que la IL-6 disminuye la expresión del CYP3A2 a nivel transcripcional [14].



2.3. Generalidades de las citocinas

Las citocinas son polipéptidos solubles de bajo peso molecular (<30KDa), extracelulares y secretadas por células del sistema inmunológico. Participan en un enorme conjunto de actividades biológicas, entre ellas en la inmunidad innata, inmunidad adaptativa, inflamación y hematopoyesis. Estas proteínas son moléculas estructuralmente diversas, pero presentan características en común. En general son no constitutivas, por lo cual, su producción es debida a un estímulo y su ciclo de producción dura pocas horas o pocos días en un estado normal pero si el estímulo persiste, como en la enfermedad, es posible que su producción se prolongue.

Las citocinas tienen la capacidad de estimular la producción de otras mediante una cascada de señalizaciones en el cual una segunda citocina puede mediar el efecto de la primera. Estas proteínas se unen a receptores específicos de la membrana celular de las células blanco, provocando una cascada de señalización que en última instancia altera la expresión de genes. Cuando la citocina se une al receptor de la célula que la secretó ejerce una acción autocrina, si se adhiere a receptores de una célula blanco cercana a la célula productora ejerce una acción paracrina, en pocos casos, se pueden unir a receptores de células de partes distantes del cuerpo, ejerciendo así una acción endocrina [15].

Los receptores para las distintas citocinas son muy diversos, pero se han categorizado en cinco familias de receptores basándose en la homología estructural de los dominios extracelulares de unión a citocinas y en los mecanismos de señalización intracelular compartidos Tabla 1.[16]

Otra forma de poder categorizarlas es a través de su papel en la infección y en la inflamación. Aquellas que promueven el proceso inflamatorio se



Familia de receptores	Ligandos
Receptores de inmunoglobulinas	IL-1, MC-CSF, IL-18 y C-Kit
Receptores de citocinas clase I	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9 IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23
Receptores de citocinas clase II	IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29
Receptor del TNF	TNF α , TNF- β , CD27L, CD30L, CD40L, FAS
Receptor de quimiocinas	IL-8, RANTES, PF-4, MCAF, NAP-2

Tabla 2.1: Familia de receptores con sus ligandos

les denominan citocinas proinflamatorias, las tres citocinas principales son el TNF- α , IL-1 e IL-6; sin embargo, otro grupo de ellas pueden disminuir la inflamación y son llamadas citocinas anti-inflamatorias, por ejemplo, la IL-4, IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF)- β . [17].

2.3.1. Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

El TNF- α es sintetizado como una prohormona que subsecuentemente es procesado a una proteína madura de 17 KDa. La principal fuente de producción de esta citocina son las células mononucleares, aunque también puede ser producido por células presentadoras de antígenos y mastocitos [18].

El TNF- α se encarga de estimular el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el sitio de infección activando estas células para erradicar al microorganismo. A bajas concentraciones actúa sobre células endoteliales vasculares ocasionando la expresión de moléculas de adhesión para neutrófilos, monocitos y leucocitos; además, estimula a células mononucleares para la secreción de IL-1 y quimiocinas. En concentraciones moderadas el TNF- α



entra a torrente sanguíneo y actúa sobre el hipotálamo para inducir fiebre, además puede incrementar la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos. Si la producción del TNF- α es prolongada puede causar trombosis intravascular, además de una disminución en la concentración de glucosa en sangre [15].

2.3.2. Interleucina-1(IL-1)

La IL-1 es un polipéptido que se encuentra en dos formas, IL-1 α y β , ambas son sintetizadas como moléculas precursoras de 31kDa y secretadas como proteínas maduras de 17 kDa a través de un mecanismo de proteólisis. La producción de esta citocina es a través de la activación de la vía NF- κ B mediante la unión de algunos productos bacterianos o bien de algunas citocinas (ej. TNF- α) con los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores NLR (Nacht-Lrrs). Entre los tipos celulares que pueden secretar a esta citocina se encuentran los macrófagos, neutrófilos, células epiteliales, microglia, células de Kupffer, astrocitos etc.

La IL-1 β a bajas concentraciones funciona como mediador de la inflamación local, además actúan sobre células endoteliales para incrementar la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión de leucocitos. A concentraciones altas puede pasar a torrente sanguíneo causando fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado y la estimulación de la transcripción de IL-6 [15].

2.3.3. Interleucina-6(IL-6)

La IL-6 es una glicoproteína sintetizada como un precursor de 212 aminoácidos, el cual es procesado a una proteína de 194 a 186 aminoácidos;



su peso molecular varía de célula a célula en un intervalo de 21-28 kDa. La secuencia cDNA del humano y rata muestra una similitud del 68 % y un 58 % a nivel de proteína. La IL-6 consiste de cuatro helices antiparalelas interconectadas por dos loops largos y uno corto, similar a las de otras citocinas (ej. IL-4, IL-2, G-CSF).

La producción de la IL-6 es regulada por una variedad de estímulos. Algunos componentes bacterianos como el LPS, aumenta la producción de IL-6 en monocitos y fibroblastos. Varios virus inducen la producción de IL-6 de fibroblastos en el sistema nervioso central. Una variedad de factores peptídicos tales como IL-1, TNF, IL-2, $\text{INF}\beta$ y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) causan un incremento intracelular en los niveles de AMP cíclico causando la producción de la IL-6.

La IL-6 es una proteína pleiotrópica con un amplio rango de actividad biológica. La participación de la IL-6 en la respuesta inmune fue identificada como un factor que actúa sobre células B para estimular la producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA; además, participa en la diferenciación y activación de las células T y macrófagos. En la hematopoyesis el efecto sinérgico de la IL-6 con la IL-3 inducen la proliferación de progenitores hematopoyéticos y la maduración de megacariocitos. En la respuesta de fase aguda la IL-6 estimula a los hepatocitos para incrementar la producción de proteínas de fase aguda como α 1-Glicoproteína-ácida, proteína C reactiva, haptoglobina, amiloide A sérica, α -1 antitripsina.[19]

3

Planteamiento del problema

La desnutrición es un problema presente en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a la población infantil. Reportes de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT,2012) señala que el 13.6% de los infantes menores de 5 años presentan desnutrición crónica y el 1.6% manifiestan desnutrición aguda [20]. Entre los efectos negativos de la desnutrición crónica se presenta la disminución en la talla debido a la adaptación del organismo, ya que sacrifican estructuras anatómicas no indispensables; con respecto a la desnutrición aguda, el riesgo de adquirir infecciones aumenta especialmente en niños no alimentados del seno materno, además, el hecho de no poder adaptarse a la falta de nutrientes le ocasiona el rápido desfallecimiento por descompensación [21].

Informes en la literatura han revelado que la desnutrición puede afectar la disposición y el metabolismo de los fármacos. Lares et al. en su estudio



realizado en niños mexicanos con desnutrición severa demostró que los parámetros farmacocinéticos, como la constante de eliminación y el aclaramiento del metronidazol, se encuentran disminuidos en comparación de aquellos niños que han sido rehabilitados de la desnutrición[22]. Así mismo en niños con desnutrición tipo Kwashiorkor se ha reportado modificaciones en algunos parámetros farmacocinéticos de la cafeína, en concreto, el aclaramiento de la paraxantina y el tiempo de vida media de la cafeína, los cuales fueron significativamente menores en los niños con Kwashiorkor, en este mismo estudio se evidenció que el metabolismo de la cafeína mediada por el CYP1A2 también se encontró disminuida[8]. En la misma línea, en un modelo con ratas bajo el consumo de una dieta al 23 % proteína (normal) o bien al 5 % de proteína(restricción proteica) se ha reportado que el aclaramiento y la constante de eliminación del acetaminofen se encuentran disminuidos en el grupo restringido de proteína[23]. Además estudios en ratas Sprague-Dawley con una dieta control(22.5 % proteína) o con una dieta deficiente de proteína(5.5%) tratadas con Ketamina, los resultados mostrarán que el aclaramiento de este fármaco disminuye en el grupo con MPE[24]. Todo lo anterior muestra la influencia del estado nutricional sobre el metabolismo de los fármacos.

Estudios realizados en ratas Wistar recién destetadas bajo el consumo de una dieta normal (24 % caseína) o una dieta hipoproteica (6 % caseína) durante 45 días, evidenciaron un decremento en la actividad enzimática del CYP1A1/2, 2B1/2 Y 2E1 en el grupo restringido de proteína [2]. Del mismo modo, en ratas mantenidas bajo una dieta al 5% de proteína o 21 % proteína(control), la actividad de la enzima (V_{max}) del CYP1A2, CYP2E1 Y CYP3A4 presenta una disminución significativa con respecto al control [25].

Debido a que estos citocromos metabolizan gran parte de los compuestos xenobióticos, es importante saber qué factores podrían estar participando en



su modulación. En hepatocitos humanos se ha reportado que las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) pueden disminuir la expresión en el mRNA del *CYP1A1/1A2*, *2E1* Y *3A2* [3]. En otro estudio realizado en hepatocitos humanos evaluaron el impacto de las citocinas, TNF- α e IL-6, sobre la expresión del CYP1A y 3A, los resultados mostraron la capacidad de las citocinas en disminuir los nivel del mRNA de los citocromos [26]. Por otra parte, estudios en niños con desnutrición tipo kwashiorkor se ha observado un aumento en la concentración plasmática del TNF- α e IL-6 [27], lo cual da un indicio de la posible participación de las citocinas proinflamatoria sobre la expresión de los citocromos en la restricción proteica.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es correlacionar la disminución de la actividad enzimática y concentración de los citocromos con un aumento en la concentración de la IL-1 β , IL-6 y TNF- α en la restricción proteica.

4

Hipótesis y Objetivos

4.1. Hipótesis

La disminución en la concentración y actividad enzimática del CYP1A1/1A2 y 3A2 en la restricción proteica *in vivo* correlaciona con un aumento en los niveles de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β).

4.2. Objetivo General

Analizar el efecto de la restricción proteica sobre la concentración y actividad enzimática del CYP1A1/1A2 y CYP3A2 así como en la concentración de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) en un modelo *in vivo*.



4.2.1. Objetivo Particular

- Evaluar la actividad enzimática del CYP1A1/1A2 y CYP3A en microsomas hepáticas de animales sometidos a una dieta control o hipoproteica.
- Identificar por medio de inmunodetección la cantidad de proteína del CYP1A1/1A2 y 3A2 en los animales bajo el consumo de la dieta control o hipoproteica
- Cuantificar la concentración de citocinas proinflamatorias hepáticas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) en los animales bajo el consumo de la dieta control o hipoproteica.

5

Materiales y Métodos

5.1. Reactivos

Las dietas isocalóricas conteniendo 18% de proteína(control) y 6% de proteína(hipoproteica) se obtuvieron de Harlan Teklad (Tabla5.1). Los reactivos etoxiresorufina, metoxiresorufina, eritomicina y dexametasona se adquirieron de Sigma Chemical Co.(*St. Louis MO, US.*) Los anticuerpos primarios policlonales de cabra anti-CYP1A1/1A2 y de oveja anti-CYP3A2 así mismo los anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-oveja conjugados con peroxidasa fueron proporcionados por Abcam plc. Finalmente el Kit de ELISA para la determinación de TNF- α , IL-6 e IL-1 β fueron adquiridos de Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, Massachusetts).



Ingredientes	Dieta estándar de roedores	Dieta hipoproteica
Proteína cruda	18 %	6.1 %
Carbohidratos	44.2 %	75.6 %
Grasas	6.2 %	5.5 %
Contenido calórico	3.1 %	3.8 %

Tabla 5.1: Tabla de macronutrientes expresados en porcentaje de peso

5.2. Tratamientos

En el modelo de restricción proteica se utilizaron 16 ratas machos Wistar recién destetados, los cuales se dividieron en dos grupos conformados de 8 ratas cada uno. El primer grupo se mantuvo bajo el consumo de una dieta estándar para roedores (18 % de proteína cruda) y el segundo grupo se alimentó con la dieta al 6 % de proteína (dieta hipoproteica). Durante los 20 días del tratamiento, los animales fueron pesados de manera cotidiana, y sometidos a ciclos de 12 horas luz-oscuridad consumiendo agua y alimento *ad libitum*.

Para el protocolo de inducción del CYP3A2 se utilizaron 6 ratas machos adultos de la cepa Wistar (180-200g), los cuales se dividieron en dos grupos de 3 ratas cada uno. Al primer grupo se administró por vía intraperitoneal dexametasona (100mg/kg) usando como vehículo aceite de maíz durante 3 días consecutivos. Al segundo grupo se administró sólo el vehículo durante el mismo periodo[28]. Los animales se sometieron a ciclos de 12 horas luz-oscuridad consumiendo agua y alimento *ad libitum*.



5.3. Obtención de la fracción microsomal y citosólica

El sacrificio se realizó 24h posterior al término del periodo de alimentación o bien del protocolo de inducción del CYP3A2. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se realizó la disección del hígado.

Cada hígado se corto en pequeños trozos los cuales fueron homogeneizados en 3mL/g peso de solución amortiguadora TRIS-Base 20mM, KCl 150mM y EDTA 1mM; en el caso del protocolo de inducción del CYP3A2 se utilizó KCl 150mM; posteriormente fueron centrifugados a 9,000g durante 15 min. El sobrenadante se centrifugó a 105,000g, 4° C durante 60 min, el sobrenadante resultante (Fracción citosólica) de los animales con el régimen alimenticio, se almacenó a -70°C para la determinación de las citocinas proinflamatorias [29]. El botón se homogenizó en una solución de fosfatos 0.1M pH7.4 y Sacarosa 0.25mM, posteriormente se centrifugó a 100,000g a las mismas condiciones, finalmente el botón fue homogeneizado con EDTA 1mM, DTT 0.1mM y Glicerol 20 %v/v (Fracción microsomal) y se dividió en pequeñas alícuotas para su almacenamiento a -70°C.

5.4. Determinación de la actividad enzimática

El ensayo de la actividad enzimática se evaluó mediante la reacción de O-dealquilación de las alkoxiresorufinas utilizado como sustratos etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) para el ensayo del CYP1A1 y CYP1A2 respectivamente. Se preparó una curva de calibración de resorufina utilizando las concentraciones 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmol/mL. La reacción enzimática se llevó a cabo en una celda para fluorómetro, en la cual



se mezcló el amortiguador Tris-base 50mM, $MgCl_2$ 25mM a pH7.6, el sustrato específico para la isoforma a determinar y $200\mu g$ de proteína microsomal hepática. Todo lo anterior se incubó a $37^\circ C$ durante 3min. Una vez finalizado el tiempo de incubación se inició la reacción enzimática adicionando NADPH 50mM. La cinética de formación de resorufina se evaluó cada 15 seg durante 3 min. La longitud de onda de excitación y emisión utilizada fue de 530nm y 590nm.

La actividad enzimática del CYP3A se evaluó por medio de la reacción de N-demetilación de la eritomicina (END) en microsomas hepáticos. La mezcla de reacción se realizó adicionando Eritromicina 100mM, $MgCl_2$ 150 mM, amortiguador de K_2HPO_4 . 50mM pH 7.25 y $500\mu g$ de proteína. Lo anterior se incubó a $37^\circ C$ durante 3min, posteriormente se inició la reacción adicionando NADPH 50mM, y se volvió a incubar a $37^\circ C$ durante 10 min. Al término de la incubación se detuvo la reacción adicionando TCA. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 5600 rpm y se tomó 1ml del sobrenadante el cual se mezcló con 1ml del reactivo de NASH, la mezcla anterior se incubó durante 30 min a $50^\circ C$. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 412nm. Para determinar la cantidad de formaldehído generado en las muestras se realizó una curva de calibración de formaldehído con 2,4,6,8,10 y 12 nmoles.



5.5. Inmunodetección de los citocromos

Los niveles de proteína hepática del CYP1A1/2 Y 3A2 fueron estimados a través del ensayo de Western Blot. La separación de la proteína microsomal se realizó mediante una electroforesis a 60 Volts en un gel de SDS-acrilamida, el porcentaje de acrilamida utilizado para el gel concentrador y separador fue de 4 % y 7.5 % respectivamente. Al finalizar la electroforesis se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts durante 60 min. Para corroborar la transferencia se tiñó la membrana con rojo Ponceau S. Posteriormente, la membrana se bloqueó con una solución de leche Svelty[®] al 3 % m/v en TTBS durante 2 hrs. Al finalizar el bloqueo, se realizaron 3 lavados con TTBS durante 10 min cada uno.

La incubación con el primer anticuerpo policlonal anti-CYP1A1/2 obtenido en cabra o anti-CYP3A2 obtenido en oveja, se realizó en TTBS-leche Svelty[®] 0.3 % m/v a temperatura ambiente con agitación constante durante 1 hr. Al finalizar la incubación con el primer anticuerpo se realizaron tres lavados de 10 min con TTBS. La incubación del segundo anticuerpo anti-oveja o anti-cabra conjugado con peroxidasa se realizó en TBS 1X durante 1 hr a temperatura ambiente con agitación constante. Al finalizar se realizaron 2 lavados con TTBS y un lavado con TBS durante 10 min cada uno. Posteriormente, las membranas se revelaron con luminol (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit) y las bandas fueron visualizadas mediante un sistema de quimioluminiscencia. Finalmente el análisis densitométrico se realizó con el programa ID Kodak versión 3.6.3.



5.6. Determinación de las citocinas proinflamatorias

Para evidenciar la presencia de la IL-6, IL-1 β y TNF- α en la fracción citosólica, se utilizó el Kit de ELISA específico para cada una de las citocinas. Para su cuantificación las muestras de los animales con una dieta control o hipoproteica fueron diluidas en una proporción 1 : 10 y se siguió el protocolo descrito por el fabricante.

Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras, se interpolaron en una curva estándar de las citocinas correspondientes, las cuales se trabajaron bajo las mismas condiciones que las muestras de la dieta normal o hipoproteica.

5.7. Análisis Estadístico

Para comparar los datos entre los dos grupos se realizó un análisis de t-student $p < 0.05$ en el programa SPSS statistic, versión 20.0.

6

Resultados

6.1. Parámetros generales

Las características que presentaron los animales con restricción proteica fue un aumento en su actividad física, pelo erizado, alopecia y una disminución en el crecimiento (Fig 6.1). En contraste, los animales bajo el consumo de la dieta control presentaron menor actividad física y sin alopecia. Como resultado de la disminución de proteína durante 20 días causó un decremento en la ganancia del peso corporal del 40 % con respecto a la dieta control; con respecto al consumo de alimento, se observó un ligero decremento en el grupo restringido de proteína; sin embargo no es estadísticamente significativa (Tabla 6.1).

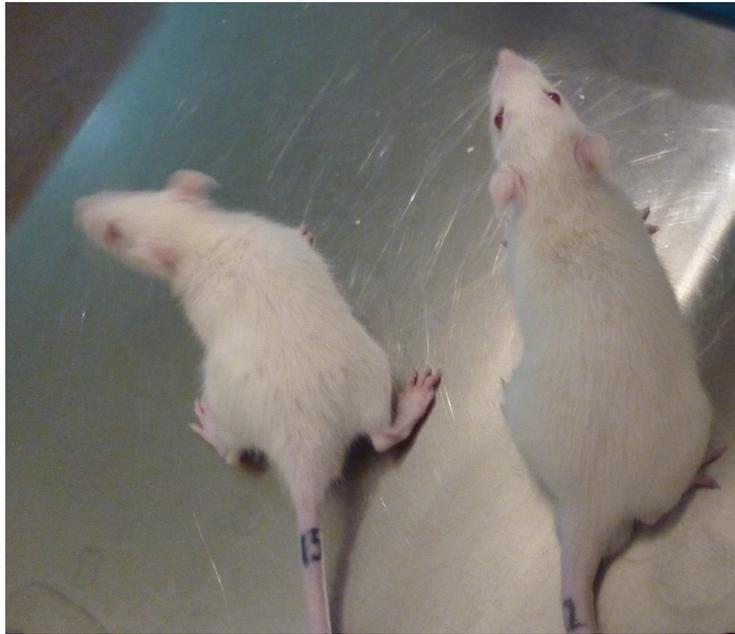


Figura 6.1: Imagen de ratas alimentadas bajo un consumo de la dieta control(dcha.) o hipoproteica(izq.) a los 18 días de tratamiento.

Parámetros	Nivel de proteína en la dieta	
	18 %	6 %
Peso inicial(g)	43.3±1.52	44.6±1.32
Peso final(g)	143.2±10.96	85.3±5.81*
Consumo de alimento(g/día)	48.9±16.97	40.0±8.1

Tabla 6.1: Efecto de la dieta sobre el peso corporal y consumo de alimento en ratas macho



6.2. Determinación de la Actividad Enzimática

Con la finalidad de evaluar el efecto de la restricción proteica sobre los citocromos se realizó el ensayo de actividad enzimática en cada uno de los sujetos bajo el consumo de las diferentes dietas (Apéndice A). Las figuras 6.2 y 6.3 representan el promedio de la actividad enzimática.

La actividad enzimática del CYP1A1 y 1A2 se vio disminuida en el grupo con restricción proteica; sin embargo, la tendencia observada en el CYP1A2 no fue estadísticamente significativa (Figura 6.2).

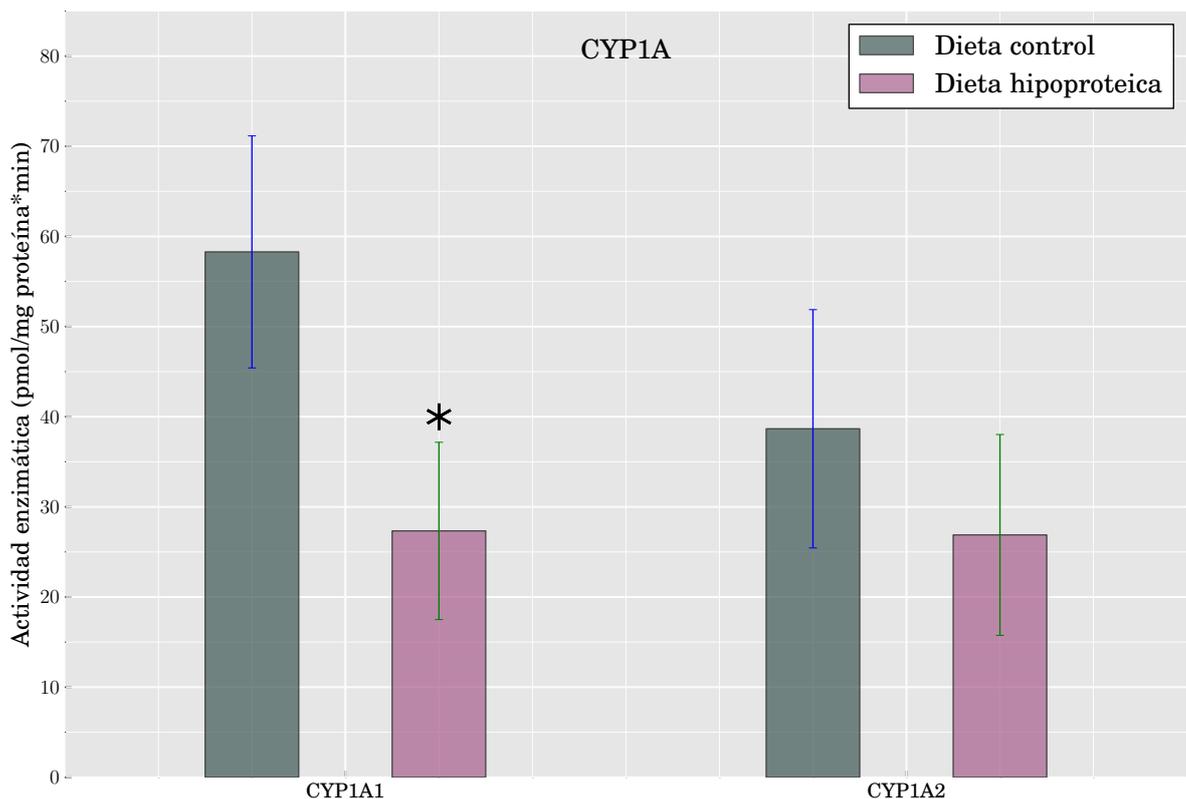


Figura 6.2: Actividad enzimática del CYP 1A1/1A2 en ratas bajo un consumo de una dieta control o hipoproteica. La desviación estándar corresponde al promedio de cada una de las actividades enzimáticas de las ratas de cada grupo. Análisis estadístico t-student * $p < 0.05$.



En la Figura 6.3 se puede observar un ligero incremento en la actividad enzimática del CYP3A2 en los animales con la dieta hipoproteica; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Como un control positivo de la técnica se realizó la medición de la actividad enzimática en ratas tratadas con dexametasona y aceite de maíz, los resultados muestran un aumento de la actividad enzimática del CYP3A2 en el grupo tratado con dexametasona (Apéndice A).

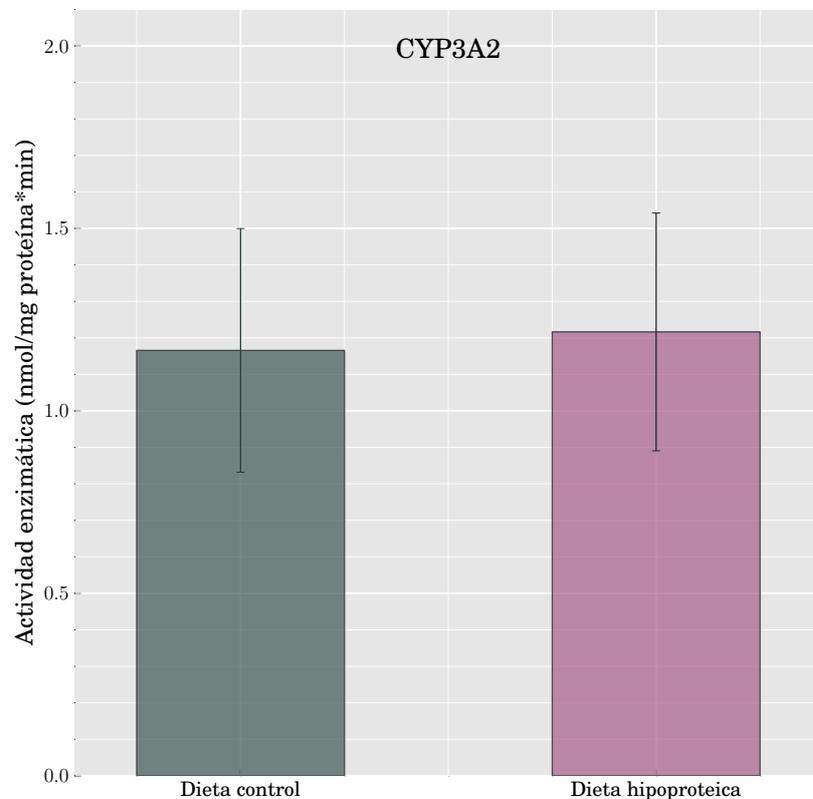


Figura 6.3: Actividad enzimática del CYP3A en ratas bajo un consumo de una dieta control o hipoproteica. La desviación estándar corresponde al promedio de cada una de las actividades enzimáticas de las ratas de cada grupo. Análisis estadístico t-student * $p < 0.05$.



6.3. Inmunodetección de los citocromos

La inmunodetección se hizo a partir de un pool de microsomas hepáticos de animales sometidos a las diferentes dietas, además se utilizó como marcadores de peso molecular el supersoma[®] para CYP1A1 y CYP1A2, y los microsomas de ratas tratadas con Dexametasona para el CYP3A2. Como proteínas de control de carga se utilizó GAPDH y β -actina.

Como se aprecia en el análisis densitométrico para el CYP1A2 (figura 6.4), existe una disminución en la presencia de este citocromos en la dieta hipoproteica, además la normalización de los datos no fue posible debido a que las proteínas comúnmente utilizadas (GAPDH y β -actina) se vieron afectados por la dieta hipoproteica.

En la figura 6.5 se muestra el análisis densitométrico del CYP3A2, utilizando como marcadores de peso molecular microsomas tratados con dexametasona y su control (aceite de maíz). En los microsomas obtenidos en la dieta hipoproteica se observa un ligero decremento de la proteína del CYP3A2.

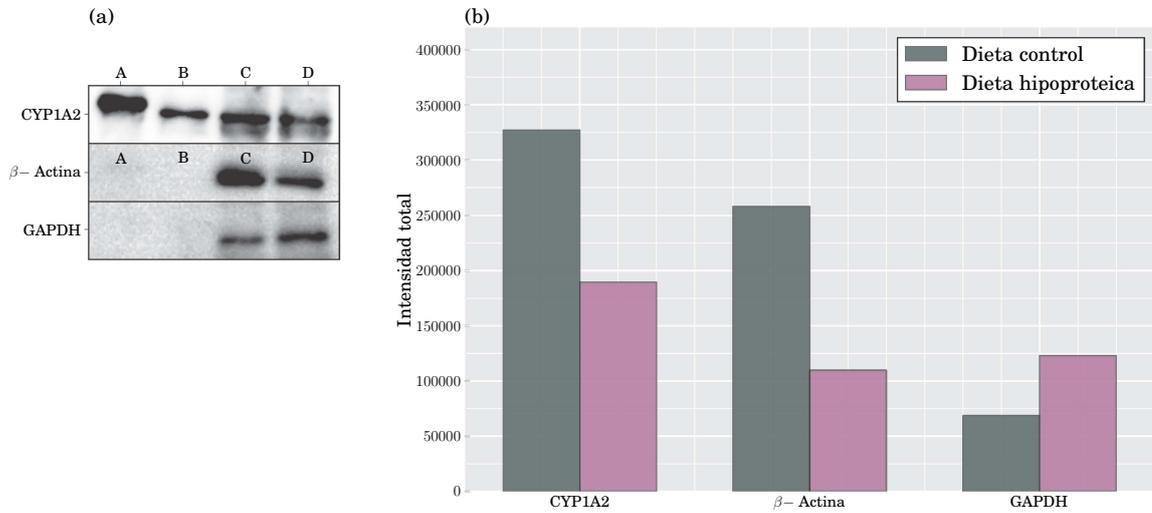


Figura 6.4: Análisis densitométrico e inmunodetección del CYP1A1/1A2. 10 μ g de proteína microsomal fue sometida a un análisis de WesternBlot. Para la detección de la proteína se utilizó el anticuerpo policlonal anti-CYP1A1/1A2. Como marcadores de peso molecular se empleo el supersoma[®] del CYP1A1 Y CYP1A2 y como controles de carga β -Actina y GAPDH.

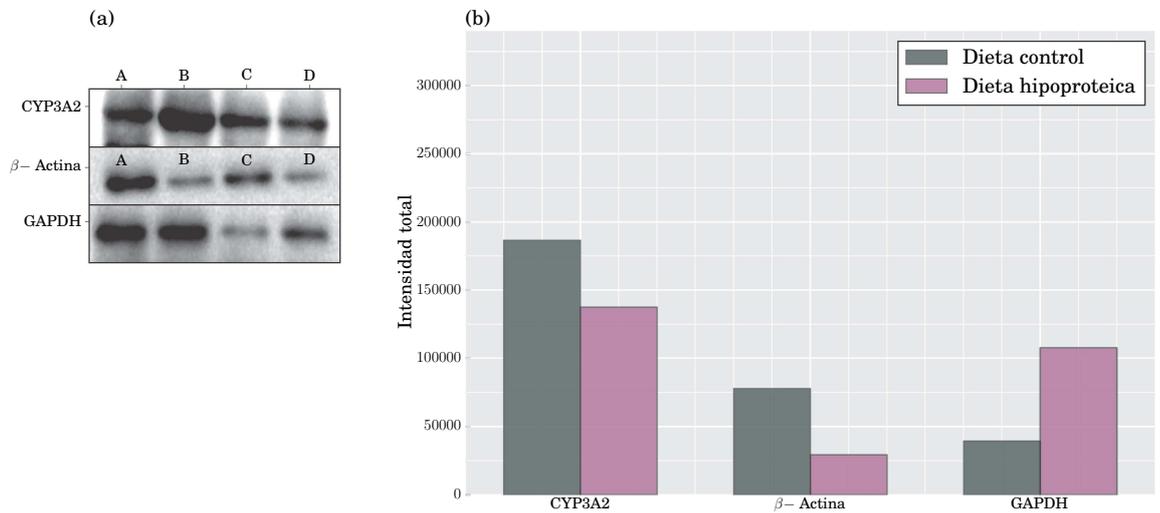


Figura 6.5: Análisis densitométrico e inmunodetección del CYP3A2. Se realizó el análisis de Western Blot con 15 μ g de proteína microsomal. Como marcadores de peso se utilizó Dexametasona y su control(aceite de maíz) y como controles de carga β -Actina y GAPDH.



6.4. Determinación de las citocinas proinflamatorias

Para evidenciar el aumento de las citocinas proinflamatorias en la fracción citosólica, se cuantificó los niveles del TNF- α , IL-6 e IL-1 β en cada uno de los individuos a través del ensayo de ELISA (Apéndice B).

El promedio de la concentración de las interleucinas en los animales bajo el consumo de la dieta hipoproteica no mostraron cambios significativos, sin embargo la concentración del TNF- α se vio abatida de manera significativa en los animales con restricción proteica (Tabla 6.2).

Tratamiento	TNF- α	IL-6	IL-1 β
Dieta Control (18 % proteína)	269.24 \pm 79.63	353.04 \pm 6.37	90.45 \pm 8.77
Dieta Hipoproteica (6 % proteína)	129.9 \pm 19.32*	365.44 \pm 82.93	90.09 \pm 7.46

Tabla 6.2: Concentración de las citocinas proinflamatorias en animales expuestos a las distintas dietas evaluadas. Los valores están expresados en pg/mg de proteína. Valores medios \pm D.E *p<0.05.

7

Discusión y Conclusiones

Los signos que presentan las ratas con una deficiencia en los nutrientes se caracteriza por la reducción del crecimiento, pelo áspero y delgado, necrosis en la cola y piel escamada. En el presente trabajo, la reducción de proteína en la dieta del 18% al 6% durante 20 días, condujo a una disminución en la ganancia del peso corporal, talla y un aumento de la actividad física (figura 6.1 y tabla 6.1) lo cual concuerda con lo reportado en animales con desnutrición [30]. De acuerdo a la NRC(National Research Council, 1995) el crecimiento y la reproducción son dos indicadores claves de una dieta adecuada, asegurando que la cantidad de los nutrientes necesarios para sostener el crecimiento máximo y mantener las medidas fundamentales, tales como, la actividad enzimática[31]. Por lo cual la disminución en la ganancia del peso y talla presente en los animales de este estudio, indica que el modelo es adecuado para poder observar las posibles variaciones en la actividad enzimática de los citocromos.



Estudios sobre el efecto de la restricción proteica en algunas isoformas de los citocromos, han demostrado que la actividad enzimática y concentración del CYP1A1/1A2 se encuentran disminuidas [32],[2], los datos obtenidos en el presente trabajo mostraron una disminución en la actividad y concentración del CYP1A1/1A2 (figura 6.3); sin embargo la disminución en la actividad enzimática del CYP1A2 no es estadísticamente significativa.

Debido a la importancia del CYP3A4 en el metabolismo de los fármacos, se ha evaluado el efecto de la malnutrición sobre este citocromos. Lee et.al en su estudio con ratas Sprague-Dawley recién destetadas mantenidas con una dieta baja en proteína, reportaron una disminución en la expresión y actividad del CYP3A2 [33]; de la misma forma Zhang et al en su modelo de restricción proteica (5 % de proteína) evidenció que el consumo de una dieta baja en proteína disminuye la actividad enzimática del CYP3A2 [25]; además Cho et al. en su modelo de restricción proteica constató que en una dieta baja en proteína existe una disminución en la expresión y presencia de este citocromo [32]. Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el ensayo de actividad enzimática del CYP3A2 no reveló diferencias significativas entre los grupos de prueba (*Figura 6.4*), lo cual puede deberse a la alta variabilidad interindividual; sin embargo el análisis de Western blot evidenció una disminución en la cantidad de proteína en el grupo con la dieta hipoproteica, lo cual concuerda con lo registrado en la literatura.

Como se observa en la *Figura 6.5 y 6.6*, las proteínas comúnmente utilizadas como controles de carga (GAPDH Y β -Actina) se modularon con la dieta hipoproteica, por lo cual la normalización de los datos no fue posible con estas proteínas. Estos genes *housekeeping*, pueden ser modulados bajo ciertas condiciones; estudios realizados en ratas bajo condiciones de ayuno(2 días), revelaron una disminución en la expresión del mRNA de β -actina y GAPDH



en el páncreas, mucosa duodenal, antral y oxíntica[34]; además, se ha observado en células de hepatomas de rata H4-II-E con limitación de fenilalanina o metionina una disminución en la expresión del mRNA de α -tubulina; sin embargo, los niveles de mRNA de β -actina aumenta cuando la deficiencia de metionina es presente[35]. Por otra parte, también estos genes pueden ser modulados por algunos fármacos, como es el caso de la eritromicina, la cual disminuye la expresión del mRNA de β -actina, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo(fig 6.5a)[36].

Con el fin de investigar si la disminución en la presencia y actividad enzimática de los citocromos, está relacionada con un aumento en las citocinas proinflamatorias, se determinó los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-1 β hepáticas. Los resultados revelaron que la concentración de las interleucinas no se vieron afectadas con la restricción proteica, no así en el caso del TNF- α , el cual presentó una disminución significativa con respecto al control. Esto mismo se ha observado en ratones bajo una dieta normal o hipoproteica, en donde la producción de las interleucinas 6 y 1 β no se vieron afectados en cultivos de médula osea, bazo y macrófagos peritoneales con un pretratamiento de LPS; sin embargo, la concentración del TNF- α se vio disminuida de manera significativa [37]. Estudios previos al anterior han demostrado que la dieta baja en proteína reduce la disponibilidad de las células inflamatorias (macrófagos, eosinófilos y leucocitos) frente a un agente infeccioso, lo cual explicaría la reducción en la concentración del TNF- α [38]. Se sabe que en pacientes con daño renal crónico sin diálisis y con una dieta baja en proteína y fósforo, se ha registrado que la concentración en suero del TNF- α se encuentra disminuida [39]. Por otra parte se ha asociado al daño renal crónico con una disminución en la expresión de los CYP, principalmente CYP2C11, CYP3A1/3A2 [40].

En conclusión, en este estudio se demostró que en el modelo de restric-



ción proteica utilizado, no se observó una disminución en la actividad enzimática del CYP3A2 pero sí en su concentración, así mismo los resultados sugieren que al no existir un aumento en la concentración de las citocinas proinflamatorias no podrían estar participando en la modulación de los citocromos. Cabe mencionar que estudios realizados en animales mantenidos con una dieta restringida suplementada con cisteína, los niveles de mRNA y la concentración del CYP1A2 y CYP3A1/3A2 se recuperaron de manera total; sin embargo, al suplementar la dieta con metionina la recuperación de los citocromos fue parcial[32]. Por lo anterior se puede decir que la cisteína juega un papel clave en la transcripción y traducción de los citocromos estudiados; sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva acabo aún no ha sido descrito.

Abreviaturas

BROD	Benziloxiresorufina
CYP	Citocromo P450
DEX	Dexametasona
DTT	Ditiotreitol
END	N-desmetilación de la eritromicina
EROD	Etoxiresorufina
FAO	Food and Agriculture Organization
IL	Interleucina
MPE	Malnutrición Proteico-Energética
MROD	Metoxiresorufina
NLR	Nacht-Lrrs
TCA	Ácido Tricloroacético
TLR	Receptores tipo Toll
TTBS	Tween-Tris-Buffer salino



TBS Tris-Buffer salino

TNF- α Factor de necrosis tumoral- α

Bibliografía

- [1] Prakash Shetty. Malnutrition and undernutrition. *Medicine*, 31(4):18–22, 2003.
- [2] L Cancino-Badias, RE Reyes, R Nosti, I Perez, V Dorado, S Caballero, A Soria, R Camacho-Carranza, D Escobar, and JJ Espinosa-Aguirre. Modulation of rat liver cytochrome p450 by protein restriction assessed by biochemical and bacterial mutagenicity methods. *Mutagenesis*, 18(1):95–100, 2003.
- [3] Zaid Abdel-Razzak, P Loyer, Alain Fautrel, Jean-Charles Gautier, Larent Corcos, Bruno Turlin, Philippe Beaune, and Andre Guillouzo. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome p-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Molecular pharmacology*, 44(4):707–715, 1993.
- [4] Michael C Latham. *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. FAO Roma, 2002.
- [5] John Saunders, Trevor Smith, and Mike Stroud. Malnutrition and undernutrition. *Medicine*, 39(1):45–50, 2011.
- [6] Manuel Hernández. *Tratado de Nutrición*. Ediciones Días Santos, 1999.



- [7] Lori A Smolin and Mary B. *Nutrition: science and applications*. Saunders college publishing, 2000.
- [8] Olusegun O Akinyinka, A Sowunmi, R Honeywell, and AG Renwick. The pharmacokinetics of caffeine in nigerian children suffering from malaria and kwashiorkor. *European journal of clinical pharmacology*, 56(2):153–158, 2000.
- [9] Costas Ioannides. *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects*. CRC Press, 1996.
- [10] Julia A Hasler, Ronald Estabrook, Michael Murray, Irina Pikuleva, Michael Waterman, Jorge Capdevila, Vijakumar Holla, Christian Helvig, John R Falck, Geoffrey Farrell, et al. Human cytochromes p450. *Molecular Aspects of Medicine*, 20(1):1–137, 1999.
- [11] Danièle Werck-Reichhart and René Feyereisen. Cytochromes p450: a success story. *Genome Biol*, 1(6):3003–1, 2000.
- [12] Sui Ke, Arnold B Rabson, Joseph F Germino, Michael A Gallo, and Yanan Tian. Mechanism of suppression of cytochrome p-450 1a1 expression by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43):39638–39644, 2001.
- [13] Marcella Martignoni, Geny MM Groothuis, and Ruben de Kanter. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cyp-mediated drug metabolism, inhibition and induction. 2006.
- [14] Jian Yang, Chunshu Hao, Dongfang Yang, Deshi Shi, Xiulong Song, Xiaofei Luan, Gang Hu, and Bingfang Yan. Pregnane x receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome p450 3a4 in human hepatocytes. *Toxicology letters*, 197(3):219–226, 2010.



- [15] Abul K Abbas, Andrew H Lichtman, and Shiv Pillai. *Cellular and molecular immunology*, volume 20005. Saunders Philadelphia, 2005.
- [16] Thomas J Kindt and Janis Kuby. *Kuby immunology*. Macmillan, 2007.
- [17] Charles A Dinarello. Proinflammatory cytokines. *CHEST Journal*, 118(2):503–508, 2000.
- [18] Lawrence B Schook. *Xenobiotics and inflammation*. Academic Press, 1994.
- [19] Angus W Thomson and Michael T Lotze. *The Cytokine Handbook, Two-Volume Set*. Gulf Professional Publishing, 2003.
- [20] Juan P Gutiérrez. Resultados nacionales ensanut. *Salud Publica Mex*, 2012.
- [21] E Roggiero and M Di Sanzo. *Desnutrición Infantil Fisiopatología, Clínica y Tratamiento*. Editorial Corpus, 2007.
- [22] Ismael Lares-Asseff, Joaquín Cravioto, Pilar Santiago, and Bartolomé Pérez-Ortíz. Pharmacokinetics of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 51(1):42–50, 1992.
- [23] Donald Jung. Disposition of acetaminophen in protein-calorie malnutrition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 232.
- [24] Marion L Williams, Donald E Mager, Heli Parenteau, Girish Gudi, Timothy S Tracy, Mike Mulheran, and Irving W Wainer. Effects of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. *Drug metabolism and disposition*, 32(8):786–793, 2004.



- [25] W Zhang, H Parentau, RL Greenly, CA Metz, S Aggarwal, IW Wainer, and TS Tracy. Effect of protein-calorie malnutrition on cytochromes p450 and glutathione s-transferase. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 24(2):141–147, 1999.
- [26] Jordi Muntané-Relat, Jean-Claude Ourlin, Jacques Domergue, and Patrick Maurel. Differential effects of cytokines on the inducible expression of cyp1a1, cyp1a2, and cyp3a4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, 22(4):1143–1153, 1995.
- [27] Robert W Sauerwein, Janet A Mulder, Lambertus Mulder, Brett Lowe, Norbert Peshu, PN Demacker, JW van der Meer, and Kevin Marsh. Inflammatory mediators in children with protein-energy malnutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 65(5):1534–1539, 1997.
- [28] Robert Martini and Michael Murray. Participation of p450 3a enzymes in rat hepatic microsomal retinoic acid 4-hydroxylation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(1):57–66, 1993.
- [29] Hisakazu Sanada, Masashi Sekimoto, Ayaka Kamoshita, and Masakuni Degawa. Changes in expression of hepatic cytochrome p450 subfamily enzymes during development of adjuvant-induced arthritis in rats. *The Journal of toxicological sciences*, 36(2):181–190, 2011.
- [30] Linda D Youngman. Protein restriction (pr) and caloric restriction (cr) compared: effects on dna damage, carcinogenesis, and oxidative damage. *Mutation Research/DNAging*, 295(4):165–179, 1993.
- [31] S.L.A. Nutrition, C.A. Nutrition, B. Agriculture, I.L.A. Research, and N.R. Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, : Fourth Revised Edition, 1995*. Nutrient Requirements of Domestic Animals: A Series. National Academies Press, 1995.



- [32] Min Kyung Cho, Yoon Gyoon Kim, Myung Gull Lee, and Sang Geon Kim. Suppression of rat hepatic cytochrome p450s by protein-calorie malnutrition: complete or partial restoration by cysteine or methionine supplementation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 372(1):150–158, 1999.
- [33] Ping-Cheung Lee, Mark F Struve, Jorge A Bezerra, and Burris Duncan. Effects of protein malnutrition on liver cytochrome p450s. *Nutrition Research*, 17(10):1577–1587, 1997.
- [34] Hironori Yamada, Duan Chen, Hans-Jürg Monstein, and Rolf Håkanson. Effects of fasting on the expression of gastrin, cholecystokinin, and somatostatin genes and of various housekeeping genes in the pancreas and upper digestive tract of rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 231(3):835–838, 1997.
- [35] NW Marten, EJ Burke, JM Hayden, and DS Straus. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *The FASEB journal*, 8(8):538–544, 1994.
- [36] Masuhiro Nishimura, Takeshi Nikawa, Yuichi Kawano, Mitsuo Nakayama, and Muneharu Ikeda. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mrna expression of housekeeping genes in cultures of c2c12 myotubes. *Biochemical and biophysical research communications*, 367(3):603–608, 2008.
- [37] Ricardo Ambrósio Fock, Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Vanessa de Moura Sá Rocha, Luiz Carlos de Sá Rocha, and Primavera Borelli. Protein-energy malnutrition decreases the expression of tlr-4/md-2 and cd14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthe-



- sis of $\text{tnf-}\alpha$ in response to lipopolysaccharide (lps) in mice. *Cytokine*, 40(2):105–114, 2007.
- [38] Primavera Borelli, Mario Mariano, and Radovan Borojevic. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition research*, 15(10):1477–1485, 1995.
- [39] Lucyna Kozłowska, Danuta Rosołowska-Huszcz, and Andrzej Rydzewski. Low protein diet causes a decrease in serum concentrations of leptin and tumour necrosis factor-alpha in patients with conservatively treated chronic renal failure. *Nephrology*, 9(5):319–324, 2004.
- [40] Francois Leblond, Carl Guévin, Christian Demers, Isabelle S Pellerin, Marielle Gascon-Barré, and Vincent Pichette. Downregulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(2):326–332, 2001.



Actividad enzimática de los citocromos

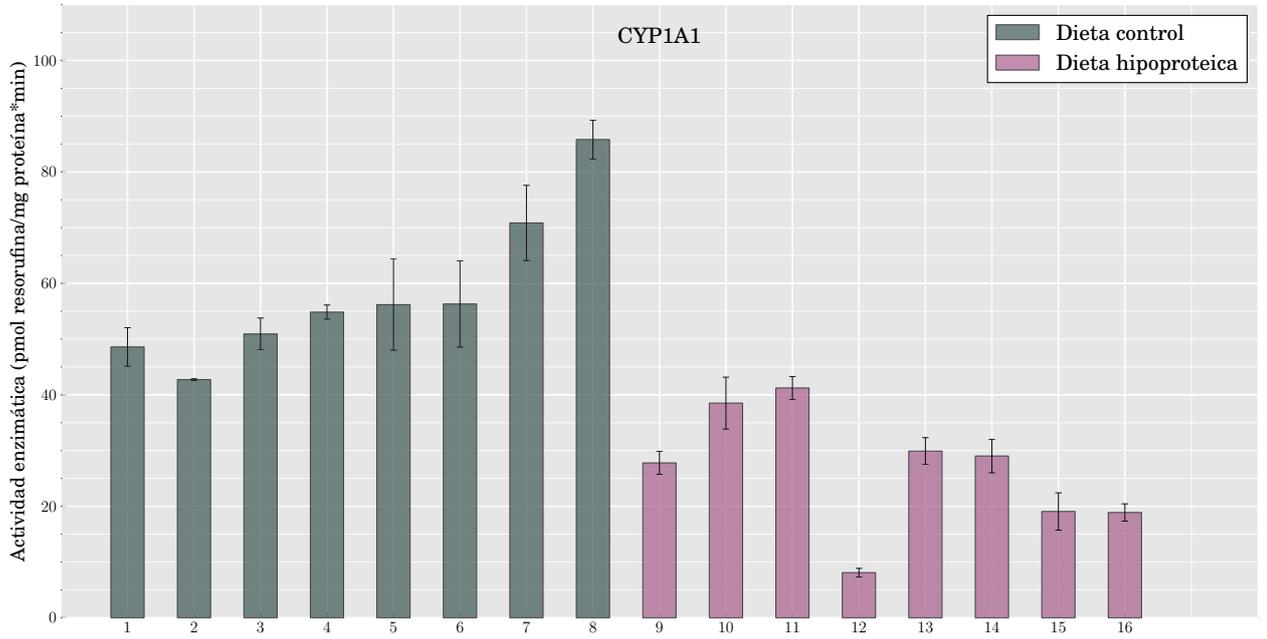


Figura A.1: Actividad enzimática del CYP1A1 en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E de tres repeticiones.

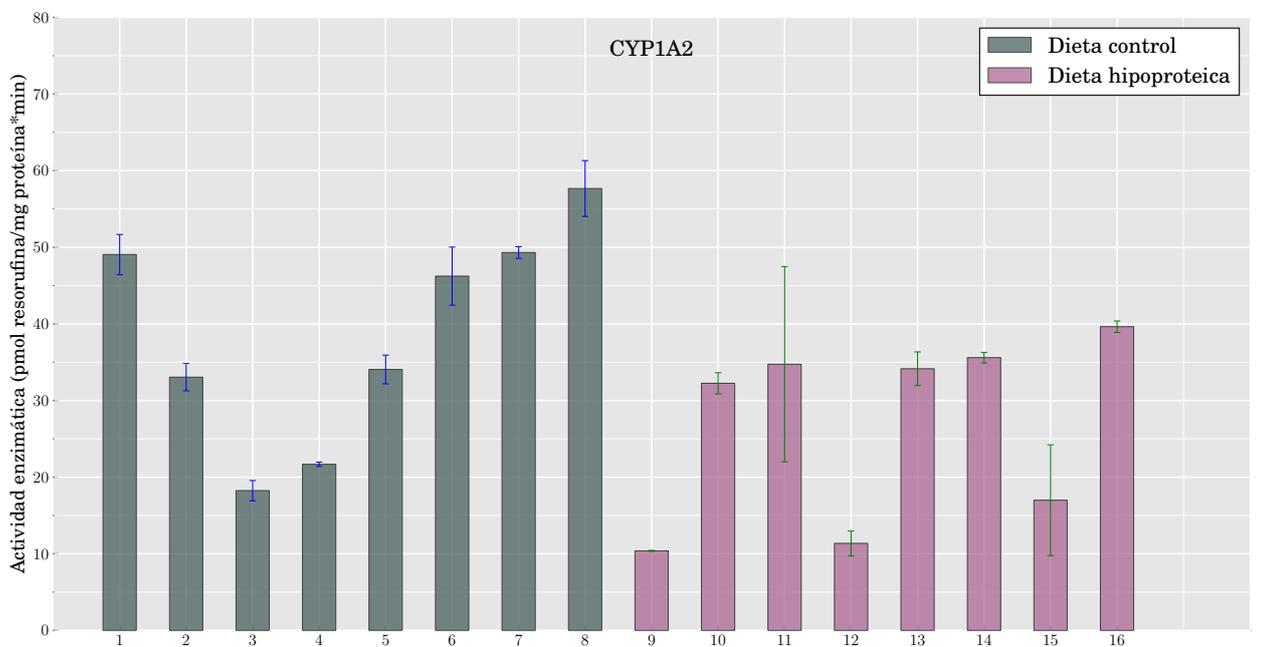


Figura A.2: Actividad enzimática del CYP1A2 en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E de tres repeticiones.

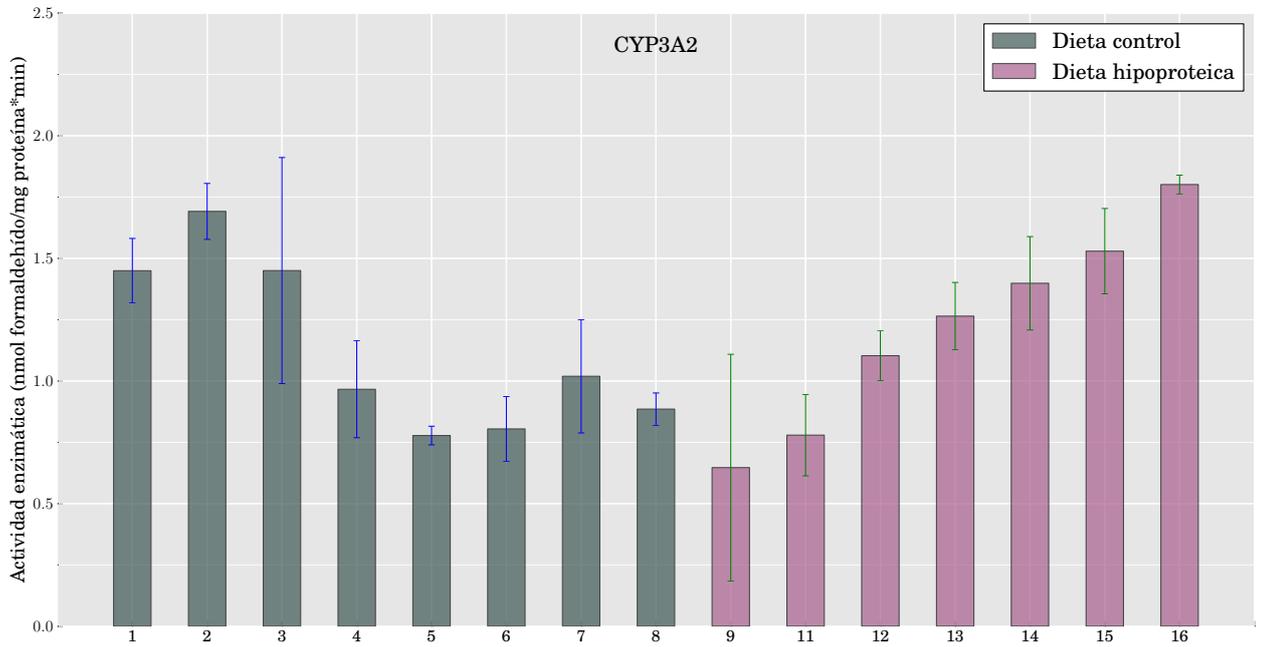


Figura A.3: Actividad enzimática del CYP3A2 en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E de tres repeticiones.

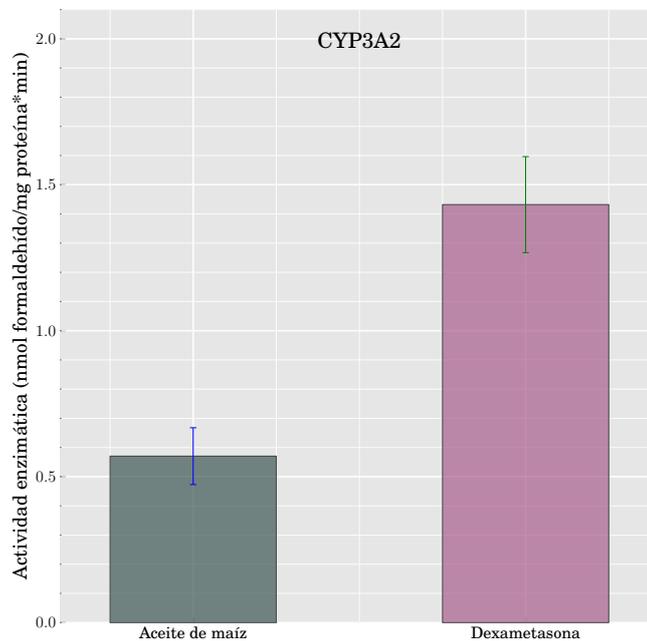


Figura A.4: Como control positivo de la técnica de N-demetilación de eritromicina se determinó la actividad enzimática de un inductor del CYP3A2 y su control. Los datos mostrados son provenientes de un pool de microsomas hepáticos de animales tratados con DEX y Aceite de maíz (n=3). Representan la media \pm D.E de tres repeticiones.

B

Concentración de citocinas
proinflamatorias

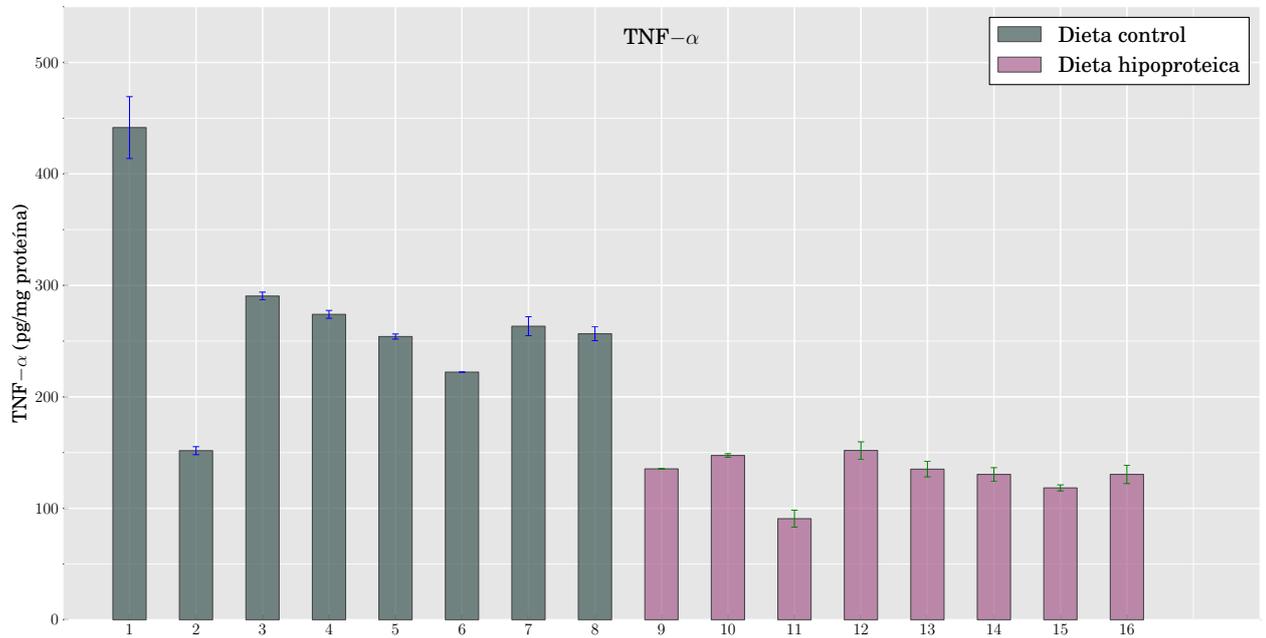


Figura B.1: Concentración de TNF- α en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E.

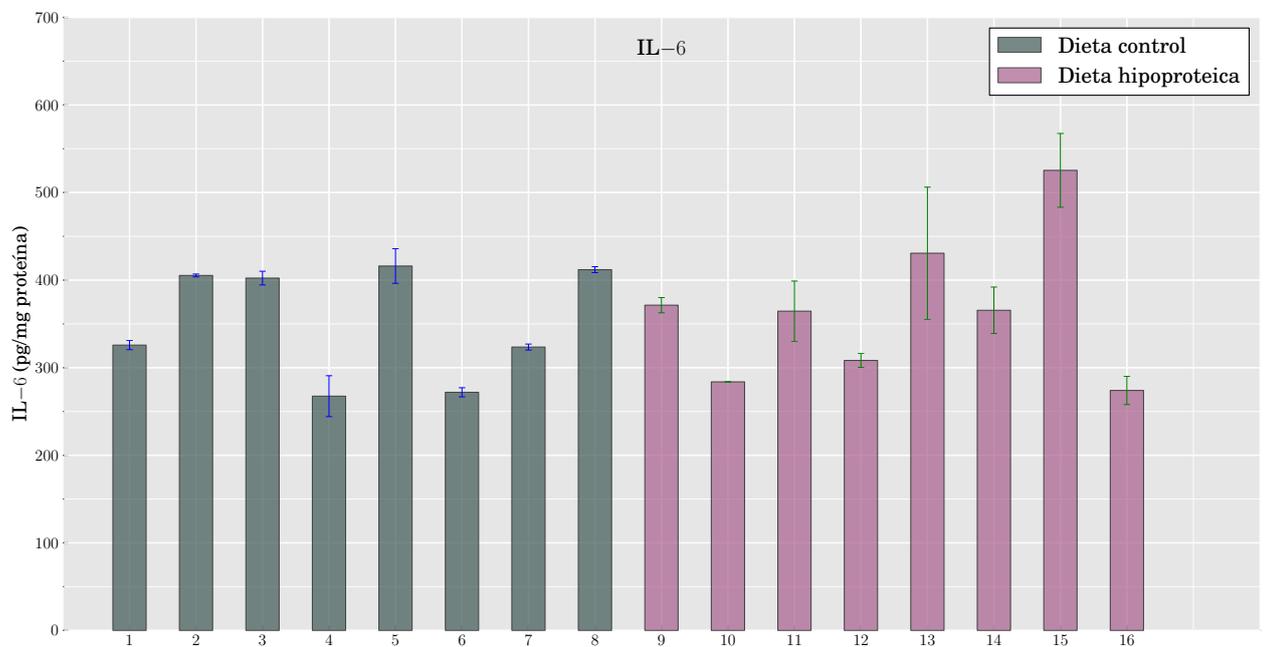


Figura B.2: Concentración de IL-6 en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E.

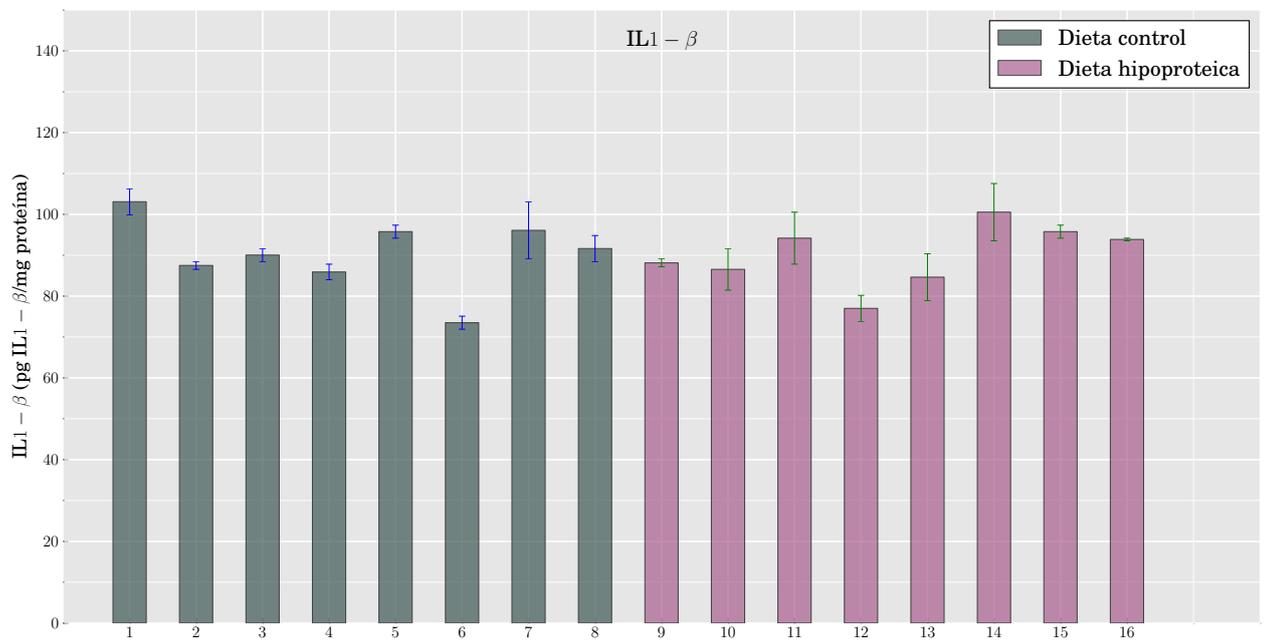


Figura B.3: Concentración de IL-1 β en los animales de la dieta control e hipoproteica. Los datos mostrados representan la media \pm D.E.