

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: ESTUDIO DE DIFERENCIA ESPECTRAL PARA LA DESCRIPCIÓN DE LA
INTERACCIÓN ENTRE LA HISTAMINA Y DOS ISOFORMAS DE CITOCROMO P450:
1A1 Y 2E1**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

BELMONT DÍAZ JAVIER ALEJANDRO

MÉXICO, D. F. 2006



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 Prof. Adolfo García Osuna

Vocal Prof. Luz del Carmen Castellanos Román

Secretario Prof. Regina Dorinda Montero Montoya

1er. Suplente Prof. Adriana Camacho Villanueva

2º. Suplente Prof. Minerva Carrasco Fuentes

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesor: Regina Dorinda Montero Montoya

Sustentante: Belmont Díaz Javier Alejandro

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Regina Dorinda Montero Montoya por todo su apoyo, orientación y enseñanzas sin las cuales hubiera sido imposible la realización de este trabajo.

Al Biol. Víctor Manuel Dávila Borja por su amistad, sus grandes aportaciones y sugerencias que fueron clave en la elaboración de esta Tesis.

Al técnico académico Luis Serrano García, por el apoyo técnico que prestó en el desarrollo del presente trabajo, así como por su valiosa amistad.

Al Dr. Arnulfo Albores por permitirme desarrollar parte de mi trabajo en su laboratorio, así como por sus aportaciones al mismo.

A los químicos Raúl Reyes y Patricia Vázquez por su apoyo técnico durante mi estancia en el CINVESTAV y por su gran calidez humana.

Al comité tutorial conformado por Adolfo García Osuna y Luz del Carmen Castellanos Román por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y por sus valiosas sugerencias.

DEDICATORIAS

Para mis padres Aurora Olivares Dávila y Luciano Díaz Pérez por darme algo más que la vida, por las noches de desvelo que compartimos, por su amor y su sabiduría, por todo GRACIAS.

A mi madre Alejandrina Rosalia Díaz Olivares por darme la vida e inspirarme para guiar mis intereses en la química.

Para mi tía, hermana, amiga y madre Coral Hazel Díaz Olivares por tus regaños, risas, cuidados y amor.

Para mis hermanas Axell Auraly Luyen Díaz y Lushyana Alexa Luyen Díaz por ser mi motor para ser mejor cada día.

A mi tío, hermano, amigo y padre Jorge Iván Díaz Olivares por enseñarme que sí se puede llegar más alto.

A mis tíos y hermanos Rubicelly Díaz Olivares, Perla Díaz Olivares, Luciano Díaz Olivares, Esmeralda Díaz Olivares por su apoyo y enseñanzas.

A mis primos, hermanos y amigos Edgar Pasco Díaz, Erick Pasco Díaz, Elliot Pasco Díaz, Jesús Rodríguez Díaz, Cynthia Rodríguez Díaz, Melissa Díaz Herrera, Massiel Díaz Herrera, Angie Díaz Herrera, Esmeralda Medina Díaz, Juan Miguel Medina Díaz, Hesione Díaz Gonzáles, Janaai Díaz Gonzáles, Viridiana Pasco y KEKE Pasco por todos los buenos recuerdos y las risas compartidas que hace que la vida valga la pena.

Para mi novia y amiga Alicia Barbosa Ruiz por su amor y apoyo que han cambiado mi vida.

Para mis amigos y hermanos: Gabriel Arturo Rosas, Claudio Martínez, Leticia Vázquez, Nadia Enríquez, Jordi Muria, Valerie Thibert, Ariel, Ángel Sánchez, Moisés (Mois), Felipe por su gran amistad, su calidez humana y todos esos buenos recuerdos que hacen menos pesada la vida.

Para mis colegas y amigos Víctor Manuel Dávila Borja, Luis Serrano García, Antonio Araujo, Gustavo Malagón, Paloma Carranza, Ana, Diego, Karen y Betza por ser los mejores compañeros de laboratorio y amigos que se pueda tener.

➤ **ÍNDICE:**

I. Introducción.

I.i.	Planteamiento del problema.	1
I.ii.	Hipótesis.	2
I.iii.	Objetivos generales.	2
I.iv.	Objetivos particulares.	2

II. Antecedentes.

II.i.	Histamina.	
II.i.a.	Historia	3
II.i.b.	Propiedades fisicoquímicas.	3
II.i.c.	Distribución natural de la histamina.	5
II.i.d.	Síntesis, almacenamiento y metabolismo.	5
II.i.e.	Funciones fisiológicas.	7
II.i.f.	Receptores clásicos (H1, H2, H3 y H4).	7
II.i.g.	Sitios de unión no clásicos de histamina (interacción con CYP450).	9
II.i.h.	Ensayos para la cuantificación de histamina.	11
II.ii.	Citocromo P450.	
II.ii.a.	El sistema de citocromo P450.	12
II.ii.b.	Abundancia y distribución.	13
II.ii.c.	La familia de genes y nomenclatura.	13
II.ii.d.	Ciclo catalítico.	15
II.ii.e.	Propiedades espectroscópicas.	19
II.ii.f.	Diferencia espectral.	20
II.ii.g.	Estados de espín.	23
II.ii.h.	Tipos de reacciones catalizadas por citocromo P450.	25
II.ii.i.	Inhibición.	28
II.ii.j.	Ensayos enzimáticos.	34

III. Material y Técnicas experimentales.

III.i.	Reactivos y sistema biológico.	35
III.ii.	Material y equipos	36
III.iii.	Tratamiento en ratas para la inducción de CYP1A1 y CYP2E1.	36
III.iv.	Obtención de microsomas hepáticos de rata.	36
III.v.	Cuantificación de proteínas	37
III.vi.	Cuantificación de CYP450 totales.	37
III.vii.	Estudios de diferencia espectral.	39
III.viii.	Metabolismo de histamina por CYP2E1.	40
III.ix.	Cuantificación de histamina en reacciones con CYP2E1.	40
III.x.	Sistema de HPLC.	41

IV. Resultados.

IV.i.	Cuantificación de CYP450 en microsomas inducidos con B(a)P, CH y sin inducción.	42
IV.ii.	Diferencia espectral con microsomas inducidos con benzo(a)pireno.	43
IV.iii.	Diferencia espectral con microsomas inducidos con ciclohexanol.	45
IV.iv.	Comparación de las constantes de disociación espectral (Kd) en microsomas inducidos con B(a)P y CH.	46
IV.v.	Cuantificación de HA en reacciones enzimáticas con CYP2E1	47

V. Discusión.

V.i.	Tipo de interacción de la histamina y CYP450.	49
V.ii.	Constantes de disociación.	50
V.iii.	Consumo de HA en reacciones enzimáticas con CYP2E1	51
V.iv.	Congruencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los resultados obtenidos en el laboratorio con anterioridad.	52
V.v.	Esquema de interacción propuesto para la interacción entre la histamina y CYP450.	56
V.vi.	Aportaciones del estudio.	57

VI. Conclusiones.

VII. Referencias.

➤ **Abreviaturas.**

B(a)P:	benzo(a)pireno
CH:	ciclohexanol
CYP450:	citocromo P450
CYP1A1:	citocromo P450 1A1
CYP2E1:	citocromo P450 2E1
DAG:	1,2-diacilglicerol
GPCR:	G-protein coupled receptors (receptores acoplados a proteína G)
HA:	histamina
HDC:	L-histamina descarboxilasa
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography.
IP₃:	inositol 1,4,5-trifosfato.
Kd:	constante de disociación espectral
NADPH:	fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina
OPT:	o-ftaldialdehído
PLC:	Fosfolipasa C

I. INTRODUCCIÓN.

I.i. Planteamiento del problema.

La histamina (HA) es una amina biogénica, la cuál participa en una amplia gama de procesos fisiológicos (neurotransmisión, liberación de jugos gástricos, etc.) y patológicos (inflamación, alergias, etc.) **(1)**. Su actividad se encuentra mediada por receptores que se encuentran en la membrana celular (H1, H2, H3, H4) y al interactuar con sus receptores desencadena una serie de señales químicas al interior de la célula **(1)**.

En la década de los 90 se propuso la existencia de un receptor intracelular de la histamina distinto a los receptores ya conocidos **(2)**, con estudios posteriores se determinó que la histamina es capaz de interactuar con enzimas de citocromo P450 (CYP450), lo que permitió proponer a estas enzimas como los receptores intracelulares de la amina **(3-7)**. Sin embargo el significado biológico de la interacción HA-CYP450 aún no es claro.

CYP450 es una superfamilia de enzimas (780 genes diferentes distribuidos en todo el reino biológico **(8)**) que se encuentran mayoritariamente inmersas en la membrana del retículo endoplásmico liso, y son capaces de llevar a cabo el metabolismo oxidativo de una gran variedad de agentes químicos de origen endógeno y exógeno **(9)**.

En nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar los efectos de la histamina en dos isoformas de CYP450 con gran relevancia toxicológica, CYP1A1 (activación de compuestos aromáticos policíclicos) y CYP2E1 (activación de compuestos orgánicos volátiles y formación de radicales libres).

Por medio de técnicas de inmunoblot se observó que la histamina es capaz de inducir los niveles de CYP1A1 y CYP2E1 en hígado de rata **(10, 11)**.

También se realizaron estudios de cinética enzimática **(10,11)** utilizando enzimas expresadas en células de insecto y altamente purificadas (supersomas) de CYP1A1 y se observó que la histamina actúa como un inhibidor de tipo mixto en la actividad de esta isoforma, además se determinó que la histamina no es metabolizada durante este proceso de inhibición, ya que no hay consumo de NADPH (cofactor indispensable para la actividad de CYP450) en presencia de histamina.

Por otro lado, estudios realizados con supersomas de CYP2E1 indican que la histamina podría ser metabolizada por esta isoforma debido a que existe oxidación importante de NADPH en presencia de la histamina **(11)**.

Toda la evidencia colectada previamente en nuestro laboratorio nos indica que la histamina presenta un efecto muy complejo sobre las isoformas CYP1A1 y CYP2E1, ya que por un lado la histamina es un inductor *in vivo* de estas isoformas, pero los estudios *in vitro* muestran que la histamina es inhibidor de la actividad de CYP1A1 y que podría ser sustrato de CYP2E1. Para proponer un mecanismo de acción de la histamina sobre estas isoformas de CYP450, es necesario estudiar el tipo de interacción que se presenta entre la histamina y estas enzimas y así proponer las condiciones en las que será posible la interacción y que repercusiones fisiológicas se pudieran presentar.

I.ii. Hipótesis

Si la histamina altera la actividad y los niveles de CYP1A1 y CYP2E1, entonces la histamina debe presentar algún tipo de interacción con estas isoformas.

Si existe un consumo importante de NADPH en una reacción enzimática con CYP2E1 en presencia de histamina, entonces la histamina debe ser metabolizada por esta isoforma.

I.iii. Objetivos generales.

- Determinar el tipo de interacción entre la histamina y microsomas inducidos para CYP1A1 y CYP2E1 utilizando la técnica de diferencia espectral.
- Obtener constantes de disociación de los complejos HA-CYP1A1 y HA-CYP2E1 utilizando titulaciones con la técnica de diferencia espectral.
- Cuantificar a la histamina en una reacción enzimática con CYP2E1

I.iv. Objetivos particulares.

- Obtener fracción microsomal de hígado de rata tratada con benzo(a)pireno (inductor de CYP1A1).
- Obtener la fracción microsomal de hígado de ratas tratadas con ciclohexanol (inductor de CYP2E1).
- Establecer los niveles de proteína total y citocromo P450 totales en fracciones microsomales enriquecidas con CYP1A1, CYP2E1, en comparación con microsomas de hígado de rata no inducidos.
- Implementar una técnica con HPLC para la cuantificación de histamina.

II. ANTECEDENTES

II.i. HISTAMINA

II.i.a. Historia.

La histamina o β -aminoetilimidazol fue descubierta en 1911 por Dale y Laidlaw **(12)**, quienes efectuaron estudios farmacológicos y descubrieron que estimulaba diversos tipos de músculo liso y que tenía acción vaso depresora. Estos estudios se llevaron a cabo muchos años antes de que se descubriera la presencia de la histamina en el cuerpo. En 1927, Best y colaboradores aislaron la histamina de muestras frescas de hígado y pulmón, y de esta forma intuyeron que dicha amina era un constitutivo natural del organismo **(12)**. Pronto surgieron evidencias de la presencia de histamina en otros tejidos y fue entonces que se acuñó el nombre de *histamina* con base en la raíz griega *histos* (tejido).

Por otro lado en 1927 Lewis **(12)** y colaboradores habían acumulado evidencia de que las células de la piel después de estímulos lesivos liberaban una sustancia con las propiedades de la histamina ("sustancia H"), incluida la reacción antígeno y anticuerpo. Ante las pruebas químicas de la presencia de la histamina en el organismo, casi no hubo duda para suponer que la "sustancia H" era la propia histamina. Se sabe ahora que dicha sustancia producida por el organismo (endógena) interviene en la respuesta alérgica inmediata y es una reguladora importante de la secreción ácida producida en el estómago; también se ha definido su participación como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Desde hace algún tiempo, surgieron sospechas de que la histamina actuaba a través de más de un receptor y se sabe ahora que tiene cuatro receptores membranales diferentes denominados H₁, H₂, H₃ y H₄.

II.i.b. Propiedades fisicoquímicas.

- Nombres alternativos **(13,14)**: 1H-imidazol-4-etanamina; 2-(4-imidazoil)etilamina; β -aminoetilimidazol.
- Fórmula condensada **(13,14)**: C₅H₉N₃
- Peso molecular **(13,14)**: 111.14.

La histamina es una molécula hidrofílica compuesta de un anillo de imidazol y un grupo amino unidos por dos grupos metilenos (Fig. II.i.b1.).

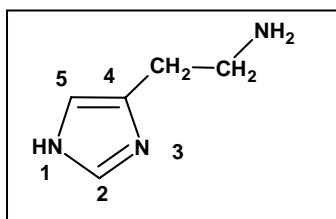


Figura II.i.b1. Representación gráfica de la histamina y la numeración del anillo de imidazol.

Tiene un punto de fusión de 83-84° C (**13, 14**) y un punto de ebullición de 209-210° C (**13, 14**), es soluble en agua, alcohol y cloroformo caliente (**13, 14**). Prácticamente insoluble en éter. Posee dos constantes de acidez (**15**) como se muestra en la figura II.i.b2

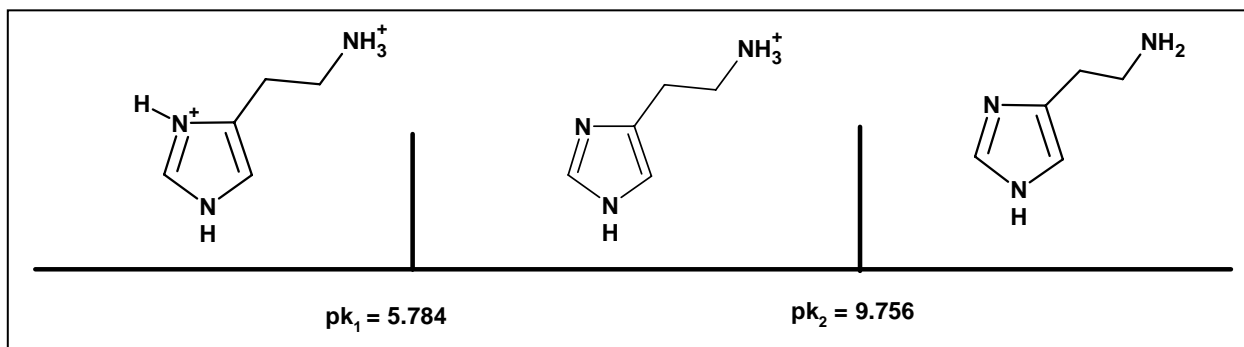


Figura II.i.b2. Constantes de acidez de la histamina y las especies existentes en los diferentes pH.

Los electrones en el anillo de imidazol se encuentran deslocalizados (**16**), por lo que la histamina presenta varias formas resonantes (Fig. II.i.b3).

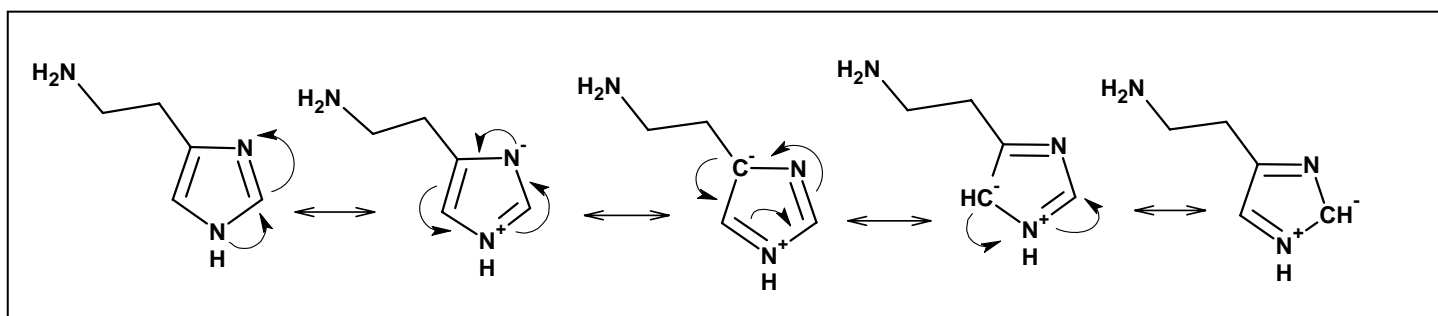


Figura II.i.b3. Muestra las formas resonantes del anillo de imidazol en la histamina.

La histamina también posee dos posibles tautómeros (**16, 17**) como se muestra en la figura II.i.b4.

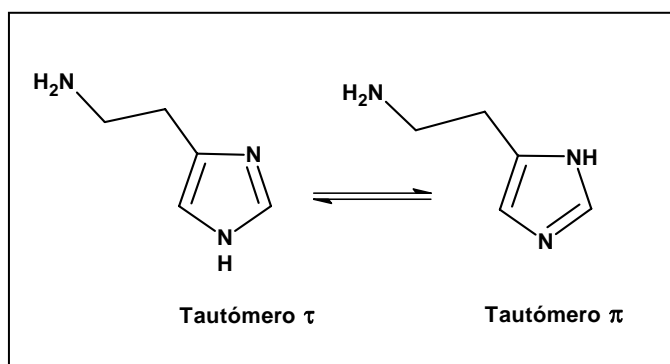


Figura II.i.b4. Representación gráfica de los dos posibles tautómeros de la histamina.

II.i.c. Distribución natural de la histamina

La histamina se encuentra distribuida ampliamente en todo el reino animal y forma parte de muchos venenos, bacterias y plantas **(12)**. Casi todos los tejidos de los mamíferos la contienen en cantidades que van de menos de 1 $\mu\text{g/g}$ a más de 100 $\mu\text{g/g}$ **(12)**. Las concentraciones en plasma y otros líquidos corporales por lo común son pequeñísimas, pero en líquido cefalorraquídeo humano se halla en cantidades importantes **(12)**. La célula cebada es el sitio predominante de almacenamiento de la histamina en casi todos los tejidos; la concentración de esta amina es particularmente mayor en tejidos que contienen un gran número de células cebadas, como la piel, la mucosa del árbol bronquial y de las vías intestinales **(12)**.

II.i.d. Síntesis, almacenamiento y metabolismo.

Todos los tejidos de mamíferos que contienen a la histamina son capaces de sintetizarla a partir de la histidina, gracias a su contenido de L-histidina descarboxilasa (Fig. II.i.d1) **(12, 18-20)**. El sitio principal de almacenamiento de histamina en casi todos los tejidos es la célula cebada, y en la sangre, el basófilo **(12, 18)**. Los dos tipos de célula sintetizan y almacenan a la histamina en sus gránulos secretores. Al valor de pH del gránulo secretor (~ 5.5), la histamina tiene carga positiva y puede unirse por enlaces iónicos a grupos ácidos de carga negativa en otros constituyentes del gránulo secretor, principalmente proteasas y heparina **(12)**.

La rapidez de recambio de la histamina en los gránulos secretores es pequeña y cuando los tejidos en que abundan las células cebadas agotan las reservas de la amina, se necesitan semanas para que normalicen sus concentraciones de histamina **(12)**. Los sitios de formación o almacenamiento de la histamina fuera de las células cebadas incluyen células de epidermis, mucosa gástrica, neuronas en el sistema nervioso central y células de tejidos en regeneración o con proliferación rápida **(12)**. El recambio es acelerado en dichos sitios por lo que se libera continuamente histamina en vez de almacenarla, contribuyendo así en la excreción diaria de histamina y de sus metabolitos por la orina **(12)**. Dado que la L-histidina descarboxilasa es una enzima inducible, la capacidad de producir histamina en los sitios fuera de las células cebadas está sometida a regulación por factores fisiológicos **(12)**.

Se conocen dos vías principales del metabolismo de la histamina **(12, 18, 21)** en seres humanos; la principal de ellas incluye la metilación del anillo imidazol, y es catalizada por la enzima histamina N-metiltransferasa. Gran parte del producto (N-metilhistamina), es transformado por la monoaminoxidasa a 1-metilimidazol-5-acetaldehído y posteriormente la enzima aldehído deshidrogenada transforma a este producto en ácido-1-metilimidazol-4-acético. En la otra vía, la histamina es sometida a la desaminación oxidativa que es catalizada por la monoaminoxidasa; los productos son el ácido imidazol-5-acético y, al final, su ribósido. Los metabolitos poseen poca o nula actividad y son excretados por la orina (Fig. II.i.d1).

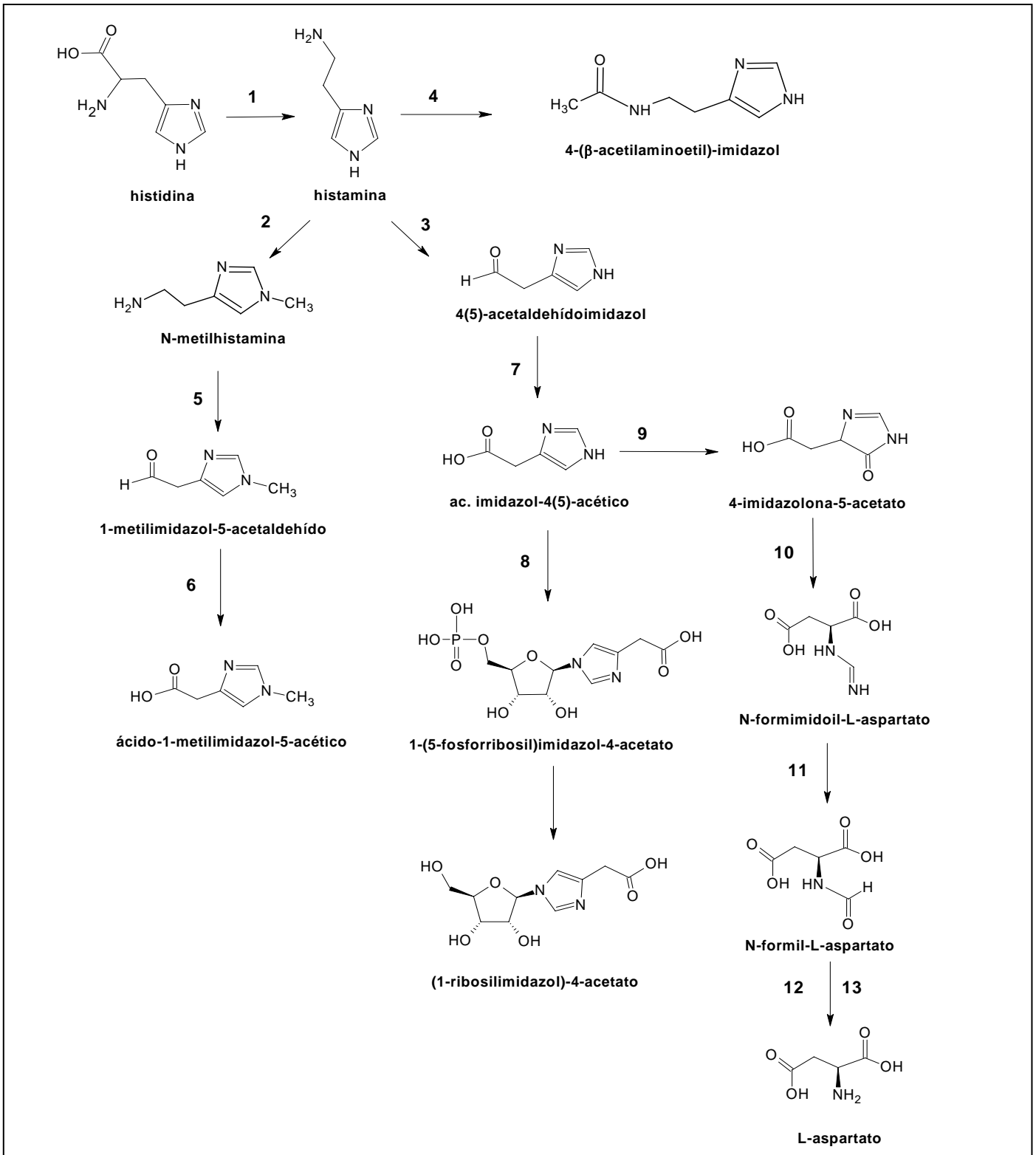


Figura II.i.d1. Síntesis y metabolismo de la histamina. **Enzimas:** 1. L-Histidina descarboxilasa. 2. histamina N-metiltransferasa. 3. Amino oxidasa (contiene cobre). 4. aciltransferasa. 5. monoaminooxidasa (contiene flavina). 6. aldehído deshidrogenasa [NAD(P)⁺]. 7. Aldehído deshidrogenasa (NAD⁺). 8. imidazolacetato-fosforribosildifosfato ligasa. 9. imidazolacetato 4-monooxigenasa. 10. hidrolasa. 11. Formimidoil aspartato desaminasa. 12. formilaspartato desformilasa. 13. aspartoacilasa.

II.i.e. Funciones fisiológicas.

La histamina tiene un amplio espectro de actividades fisiológicas y patológicas. Se ha demostrado que está involucrada en la neurotransmisión aminérgica y en numerosas funciones cerebrales (1, 12, 22), por ejemplo, aprendizaje, memoria, actividad motora, ingesta de alimentos y comportamiento agresivo. La histamina también está involucrada en la secreción de hormonas pituitarias (1), la regulación gastrointestinal (1,20, 23) y funciones circulatorias, así como en la reacción inflamatoria (1, 22, 23) y en la regulación de la respuesta inmune (1).

Dado que la histamina es uno de los mediadores preformados almacenados en la célula cebada, su liberación como consecuencia de la interacción de antígeno con los anticuerpos IgE en la superficie de dicha célula interviene decisivamente en las respuestas de hipersensibilidad inmediata y alérgicas (12, 20, 22, 23). Las acciones de la histamina en músculo liso de bronquios y de vasos sanguíneos explican en parte los síntomas de las reacciones alérgicas (12, 23). Además, algunos fármacos de utilidad clínica actúan directamente en las células cebadas para liberar histamina, y así se explican algunos de sus efectos adversos (12).

II.i.f. Receptores clásicos de histamina.

Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de receptores para Histamina en humanos (H_1 , H_2 , H_3 y H_4) (1, 23-25).

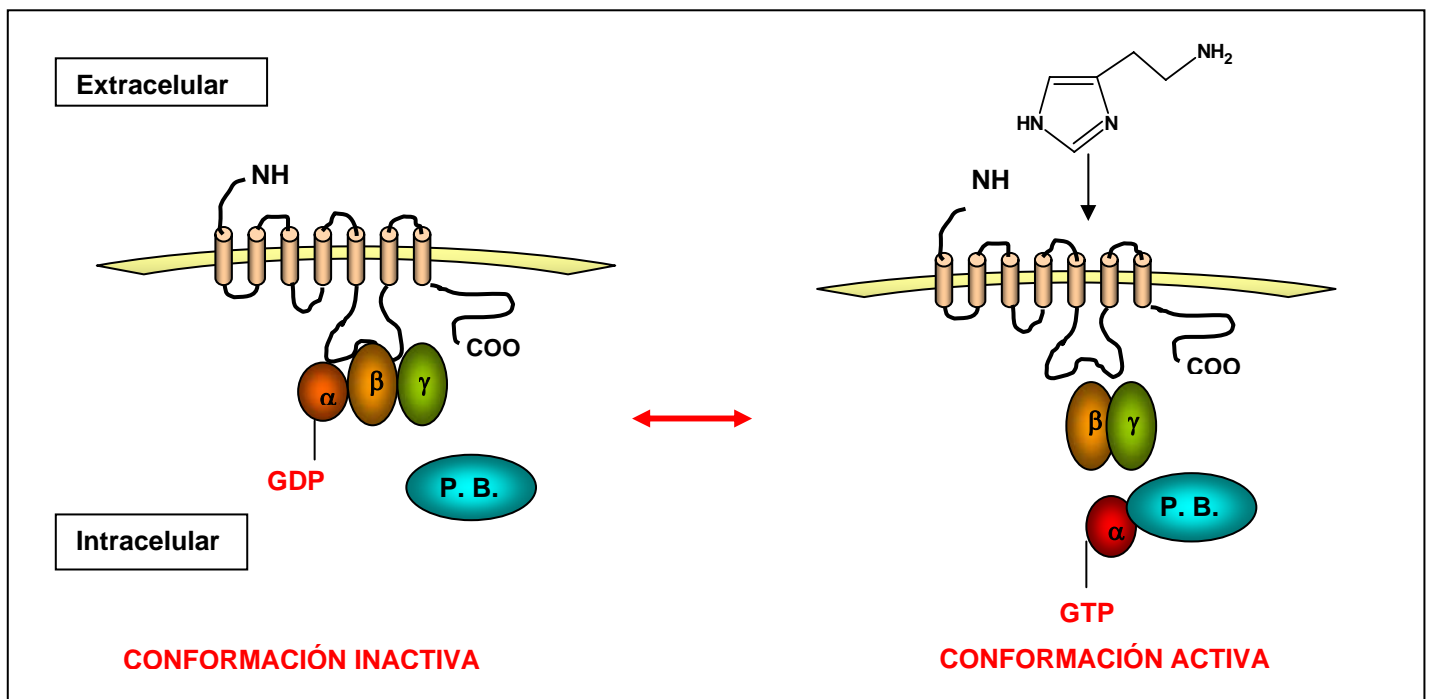


Figura II.i.f1. Forma básica de acción de los cuatro receptores membranales de histamina, puede observarse que cuando la histamina se une al receptor, la proteína G se fosforila en su subunidad α y se une a una proteína blanco (P.B.).

Los 4 tipos de receptores pertenecen a la familia de proteínas GPCR. Son proteínas integrales de la membrana y están formadas por una cadena en forma de serpiente que entra y sale 7

veces de la membrana. En su extremo extracelular se encuentra el sitio para acoplar a la histamina, y en el extremo intracelular se encuentra asociado a una proteína G, la cual a su vez está formada por 3 subunidades (α , β y γ) las cuales se pueden asociar ($\alpha\beta\gamma$) o disociar (α - $\beta\gamma$) dependiendo de la actividad del receptor. Acoplado a la subunidad alfa se encuentra una molécula de GDP de baja energía, que se puede fosforilar a GTP de alta energía cuando se disocia la subunidad alfa del heterodímero beta/gamma y actúa sobre una enzima "blanco" como se ilustra en la figura. II.i.f1.

- Receptores H₁.

El receptor H₁ contiene 486, 488 o 487 aminoácidos en rata, ratón y humano respectivamente, tiene siete dominios transmembranales de 20-25 aminoácidos en forma de hélices α **(1)**. La histamina se une al residuo de aspartato en el tercer dominio transmembranal y a los residuos de asparagina y lisina en el quinto dominio transmembranal **(1)**.

La unión de la histamina a los receptores H₁ estimula a la Fosfolipasa C (PLC) **(1, 12, 24)** la cual a su vez cataliza a los fosfolípidos de las membranas para obtener segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG) **(1, 12, 24)**. Estos mensajeros activan la cascada de la proteincinasa C y la movilización del calcio intracelular, permitiendo que se activen microtúbulos y microfilamentos del citoplasma para transportar gránulos con diferentes moléculas en su interior y eventualmente ser expulsados de la célula para ejercer algún efecto sobre las células vecinas **(1, 12, 24)**. También se ha encontrado que el receptor H₁ puede estar asociado a otras fosfolipasas como la PLD e inclusive la PLA-2. Recientemente también se ha encontrado que los receptores H₁ pueden activar a través de los segundos mensajeros al factor nuclear κ B (NF- κ B) **(1, 24)** el cual a su vez desregula genes en el DNA permitiendo la síntesis de varias citocinas y moléculas de adhesión para que se liberen o expresen sobre la membrana de la célula blanco. Los efectos de los receptores H₁ se han relacionado fácilmente con los síntomas y signos de diferentes enfermedades alérgicas, por ejemplo, rinorrea, prurito, estornudos, el edema que causa obstrucción nasal en la Rinitis alérgica, el lagrimeo, la hiperemia y la quemosis en la conjuntivitis alérgica. En el asma los receptores H₁ pueden ocasionar contracción del músculo liso bronquial y estimular la producción de moco en las glándulas. En la piel los receptores H₁ ocasionan contracción de las células endoteliales de las venas postcapilares causando la aparición de ronchas y estimulan a las fibras C para ocasionar prurito.

. Receptores H₂.

El receptor H₂ contiene 358 y 359 aminoácidos en rata o ratón y en humano respectivamente **(1)**. Cuenta con siete dominios transmembranales y la histamina se une al tercer dominio a través de un residuo de aspartato y se une al quinto dominio a través de residuos de treonina y aspartato **(1)**.

Los receptores H₂ guardan relación con la estimulación de la adenil-ciclase y por consecuencia, con la activación de la proteincinasa dependiente de cAMP en la célula blanco (12, 24). Las células del aparato gastrointestinal contienen grandes cantidades de estos receptores por lo que sus funciones se han relacionado con la secreción de ácido gástrico (18, 24), pero también existen sobre linfocitos y otras células inmunológicas pudiendo también tener participación en la regulación de la respuesta inmunológica (24).

. Receptores H₃.

A semejanza de los otros receptores de histamina, los H₃ son receptores acoplados a una proteína G. Originalmente se describió al receptor H₃ como un receptor presináptico que se hallaba en las terminaciones de neuronas histaminérgicas y en el sistema nervioso central, y que tenía por acción la regulación de la síntesis y liberación de histamina (1, 12). En la actualidad se sabe que los receptores H₃ actúan en muy diversos tejidos y que pueden regular a otros neurotransmisores como dopamina, serotonina, noradrenalina y acetilcolina (1, 12, 24).

. Receptores H₄.

En el año 2001 se descubrió un nuevo tipo de receptores para la histamina (24, 25), estructuralmente muy parecidos a los receptores H₃ pero codificados en un sitio diferente y con una distribución más amplia fuera del sistema nervioso central: médula ósea, timo, monocitos, linfocitos, granulocitos, bazo, hígado y colon. Aunque aún existen pocos estudios acerca de sus probables funciones se ha encontrado que estimulan la quimiotaxis directamente de eosinófilos y células cebadas, e indirectamente, de neutrófilos (por estimular producción de LTB₄) y de linfocitos T (estimulando producción de IL-16).

II. i. g. Sitios de unión no clásicos de histamina (interacción con citocromo P450).

El citocromo P450 (CYP450) es una superfamilia de enzimas que contiene un grupo hemo en su sitio activo. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo de una amplia gama de sustancias exógenas al organismo (xenobióticos), y además juegan un papel importante en diversos procesos fisiológicos al transformar o inactivar ligandos endógenos que participan en la regulación celular (1, ver sección II.ii.).

La unión de la histamina a CYP450 ha sido demostrada por L. Brandes, que propone un papel de segundo mensajero para la histamina intracelular a través de la unión con CYP450 (2-7, 26). Esta teoría comenzó a desarrollarse desde la década de los 60s, cuando Kahlson propuso a la histamina como un importante mediador del crecimiento celular (2). Este investigador encontró que la conversión de histidina a histamina (por acción de la histidina descarboxilasa), aumentaba significativamente en tejidos de rápida proliferación y la excreción urinaria de histamina se elevaba durante el embarazo y en la implantación de tumores. También determinó que dicha histamina no provenía de las células cebadas y formuló la hipótesis de un origen

intracelular para la amina. Aunque la teoría de Kahlson estaba sustentada por evidencia indirecta, no demostró la presencia de un receptor intracelular que explicara la acción promotora del crecimiento celular por histamina.

En 1981 Watanabe asoció la acción promotora de tumores del forbol-12-miristato-13acetato (PMA) a la producción de histamina al mostrar un incremento en la actividad de la proteincinasa C y en la actividad de la histidina descarboxilasa (HDC) **(2)**.

En 1984 Brandes sintetizó el N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]etamina · HCl (DPPE) (Fig.II.i.g1), con la intención de crear un ligante selectivo para los sitios de unión de antiestrógenos (AEBS) en fracciones microsomales **(2)**. El DPPE, en concentraciones micromolares, presentó actividad antiproliferativa y citotóxica para varias líneas de células malignas *in Vitro*, e inhibió el crecimiento uterino *in vivo*; estos experimentos sugirieron un papel importante para los AEBS en la proliferación celular **(2)**.

La estructura del DPPE es parecida a algunos antagonistas de los receptores H₁ de la histamina como la feniltoloxamina y la difenhidramina (Fig. II.i.g1). Basándose en la teoría original de Kahlson, L. Brandes planteó la hipótesis de que los sitios AEBS, podrían ser receptores intracelulares de histamina **(2)**, sin embargo con estudios posteriores utilizando [³H] DPPE y [³H] histamina, se estableció que la histamina se unía a otros sitios **(2, 26)** denominados en un principio como H_{1C} y que esta unión es capaz de promover el crecimiento celular. El DPPE, de acuerdo con lo anterior, podría inhibir la unión de la histamina con los sitios H_{1C} y de esta forma actuar como agente antiproliferante **(2)**. Estudios posteriores revelaron que los sitios H_{1C} correspondían a enzimas de CYP450.

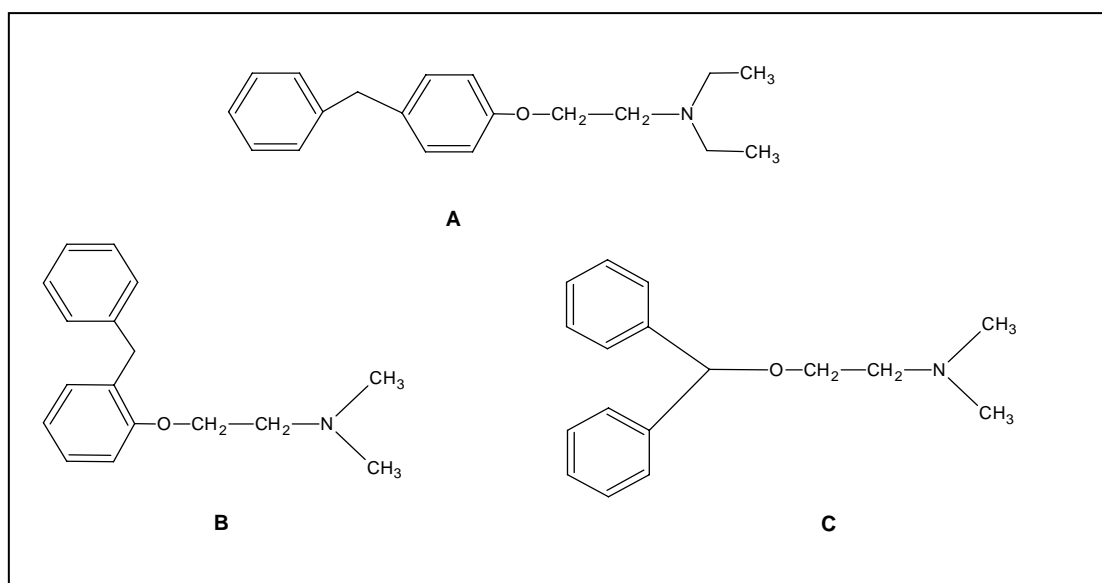


Figura II.i.g1. (2) A) Estructura del DPPE, ligante específico para los sitios AEBS y con actividad antiproliferante, **B)** feniltoloxamina, **C)** difenhidramina. Los compuestos **B** y **C** son antagonistas de los receptores H₁ de histamina.

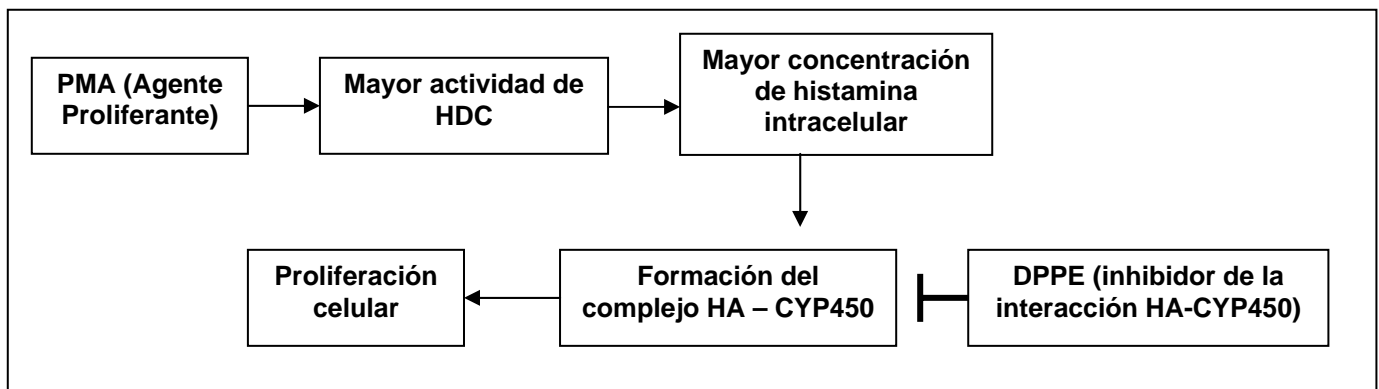


Figura II.i.g2. Hipótesis desarrollada por L. J. Brandes, se observa que el DPPE impide la formación del complejo HA-CYP450, lo que explicaría su acción antiproliferante.

II. i. h. Ensayos para la cuantificación de histamina.

- **Medición directa con el espectrofotómetro UV – Visible.**

La histamina puede ser detectada en la región del ultravioleta a 210 nm (27). Sin embargo, este método no es conveniente cuando se utiliza HPLC para separar a la histamina de alguna mezcla, ya que las fases móviles utilizadas en este instrumento absorben en la misma longitud de onda (27).

- **Ensayo fluorométrico (18, 28, 29).**

Este ensayo se basa en la capacidad del o-ftalaldehído para acoplarse con la histamina a pH alcalino y formar un producto de condensación fluorescente, este producto se detecta en un fluorómetro usando filtros a 340nm de excitación y 425nm de emisión.

- **Formación de derivados para la detección en la región del UV (30, 31).**

En este ensayo se hace reaccionar la histamina con cloruro de benzoilo en presencia de hidróxido de sodio y el complejo se detecta a 254nm (30). Una alternativa es hacer reaccionar a la histamina con cloruro de dansilo en presencia de bicarbonato de sodio y detectar el complejo a 254nm (31).

- **Ensayo inmunológico (18).**

Este ensayo está basado en la interacción de la histamina con un anticuerpo monoclonal después de crear un derivado de la histamina con succinil-glicinamida. Este ensayo es sumamente específico y existen pocas probabilidades de la unión del anticuerpo con otra amina.

II.ii. Citocromo P450

II.ii. a. El sistema de citocromo P450.

Las enzimas de citocromo P450 (CYP450) juegan un papel central en el metabolismo de muchos xenobióticos **(32, 33)**, catalizan reacciones tanto de desintoxicación como de bioactivación. CYP450 puede introducir grupos hidroxilo en estructuras que no son reactivas como cadenas hidrocarbonadas y anillos aromáticos, iniciando la biotransformación de compuestos que no poseen grupos funcionales, en compuestos aptos para la conjugación **(9, 33, 34)**.

La capacidad de los tejidos de mamíferos para oxidar xenobióticos, incluyendo la hidroxilación de sustratos aromáticos, ya estaba bien descrita a mediados de los años 1950's. La primera clave para elucidar la naturaleza de estas enzimas se obtuvo en 1955 por G. R. Williams y M. Klingenberg **(35- 37)** que se encontraban trabajando para la fundación Johnson, en la universidad de Pennsylvania al estudiar hemoproteínas microsomales por diferencia espectral. Como muchas hemoproteínas formaban complejos característicos con monóxido de carbono, ellos trataron los microsomas con un agente reductor, ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) en presencia de CO. El complejo resultante CO-ferroso fue observado por diferencia espectral, este experimento reveló una banda de absorción muy intensa en 450nm, la cual era diferente a todas las bandas de absorción obtenidas para otras hemoproteínas.

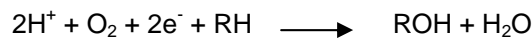
Omura y Sato que habían trabajado en la Fundación Johnson al mismo tiempo de las primeras observaciones, lograron purificar la proteína responsable de la banda peculiar en 450nm en 1964 y confirmaron que esta absorción era producida por una nueva clase de hemoproteína **(38, 39)**. Estos investigadores japoneses propusieron el nombre de citocromo P450, basados en el máximo de absorción de estas enzimas. Omura y Sato también descubrieron que el citocromo P450 era susceptible a la desnaturalización, convirtiendo a la enzima en una forma menos activa donde el máximo de absorción del complejo ferroso-CO se encuentra en 420nm **(39, 40)**. El sistema enzimático de CYP450 es responsable del metabolismo oxidativo de un vasto número de sustratos incluyendo xenobióticos o compuestos endógenos, este metabolismo oxidativo tiene tres funciones de gran importancia en el organismo **(32)**:

- 1) CYP450 es una ruta principal por la cual un organismo puede convertir un agente químico lipofílico externo en un producto más soluble en agua y de esta forma facilitar su eliminación. Sin este sistema de eliminación muchos xenobióticos podrían acumularse y provocar la muerte, y los efectos de algunos fármacos podrían persistir durante mucho tiempo **(32, 33, 41-43)**.
- 2) En contraste con la desintoxicación, CYP450 puede convertir ciertos xenobióticos en productos más tóxicos. Muchos químicos carcinógenos son activados metabólicamente vía

este sistema enzimático, hacia metabolitos carcinógenos que pueden unirse de forma covalente a macromoléculas como el ADN **(32, 33, 41-48)**.

- 3) Además de la importancia del CYP450 en el metabolismo de xenobióticos, estas enzimas también metabolizan numerosos compuestos endógenos incluyendo algunos esteroides, ácidos grasos, vitaminas, ácidos biliares, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas **(32, 48, 49)**.

La reacción general de esta familia de enzimas es la siguiente **(9, 33, 35)**:



Donde **RH** representa un sustrato y **ROH** el metabolito oxidado, durante la reacción dos equivalentes reductores (2e^-) del NADPH son consumidos y un átomo del oxígeno molecular es incorporado al sustrato, mientras que el otro átomo de oxígeno es reducido en agua.

II.ii.b. Abundancia y distribución.

CYP450 se encuentra ampliamente distribuido en prácticamente todas las formas de vida **(9)**, ha sido caracterizado en mamíferos, aves, peces, reptiles, insectos, moluscos, artrópodos, crustáceos, hongos, plantas y bacterias. En los mamíferos estas enzimas están presentes en la mayoría de los tejidos; una gran cantidad se encuentra en el hígado, donde se localizan en la membrana del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos. La membrana del retículo endoplásmico es una estructura de gran superficie, lo que hace que este organelo sea ideal como soporte para enzimas metabolizadoras de xenobióticos. También se sabe que entre el 12 y el 15% del retículo endoplásmico se encuentra compuesto por CYP450 y se estima que estas enzimas representan entre el 1 y el 2% del peso neto de un hepatocito **(9)**.

A pesar de que la mayor cantidad de CYP450 se encuentra en el hígado, existen también varias formas de CYP450 expresadas en otros órganos y tejidos, por ejemplo riñón, próstata, piel, epitelio nasal, gónadas, placenta, cerebro, pulmón, bazo, páncreas y tracto gastrointestinal **(9, 33)**. La distribución de CYP450 en los diferentes órganos depende de los requerimientos de cada órgano, por ejemplo, las enzimas de CYP450 involucradas en la biosíntesis de esteroides se encuentran en membranas de retículo endoplásmico liso de órganos esteroideogénicos, como testículos, ovarios y placenta **(35)**.

II.ii.c. La familia de genes y nomenclatura.

Los estudios de purificación de P450 revelaron la existencia de múltiples formas de esta enzima, con diferencias en su actividad catalítica. Con estos descubrimientos se pudieron

formular las siguientes preguntas: ¿cuántos tipos de enzimas de P450 existen en un tejido dado?, ¿cuál es la relación entre ellas? y ¿cuál es el papel que juega cada una de ellas en el metabolismo?.

La gran dificultad para purificar las enzimas de citocromo P450 (particularmente, por ser formas muy parecidas), hace estas preguntas difíciles de responder por los procedimientos clásicos de purificación enzimática. Las herramientas de biología molecular proporcionaron la clave. Los cDNA's para enzimas de citocromos P450 en roedores inducidos con agentes como fenobarbital o β -naftoflavona se obtuvieron en los años de 1980's y los cDNA's de nuevas formas de citocromo P450 ahora son aislados rutinariamente. Además, ya se han determinado las secuencias de genes de 780 isoformas de citocromo P450 distribuidas en todos los reinos biológicos y 36 isoformas en humano **(8)**.

El análisis de secuencias permitió el desarrollo de una nomenclatura universal para CYP450. Los sistemas previos de nomenclatura estaban basados en la movilidad electroforética relativa, en su λ_{max} , o en la especificidad por un sustrato, dependiendo del laboratorio, así que la misma enzima podía ser identificada con muchos nombres. Esta nomenclatura azarosa se reemplazó por un proceso sistemático molecular y de evolución. Este sistema se basa en que la semejanza de secuencias entre dos enzimas es menor cuando existe una mayor distancia con un antecesor común **(35, 50)**. De esta forma, dos enzimas que difieren muy poco en su secuencia, como P450 2B1 y 2B2, se espera que sean similares en estructura y en función, mientras que las enzimas que sean marcadamente diferentes en su secuencia se espera que muestren mayores diferencias en estructura y función. Las enzimas que tienen más de un 40% de similitud en su secuencia son asignados (arbitrariamente) en una misma familia, aquellas enzimas con más de 55% de semejanza son miembros de la misma subfamilia **(35, 50)**. A una sola enzima se le asigna un número de familia, una letra de subfamilia y finalmente otro número que indica específicamente el miembro de una subfamilia (tabla II. ii. c1). Por ejemplo, P450 3A4 es el cuarto miembro de la subfamilia A de la familia 3. Una forma más abreviada de nomenclatura se obtiene al reemplazar citocromo P450 por las letras CYP, por lo que el ejemplo anterior se escribiría CYP3A4 (ver tabla II.ii.c1).

La función enzimática usualmente correlaciona con la similitud en la secuencia. Por ejemplo, todas las enzimas de citocromo P450 4A catalizan la ω -hidroxilación de los ácidos grasos. Los números de familia por debajo de 100 están reservados para eucariontes, así que para las enzimas microbianas se utilizan números mayores de 100. Aunque este sistema está basado en valores arbitrarios para la similitud en las secuencias, se ha obtenido más orden que con la nomenclatura previa. En algunos casos el nombre trivial se sigue usando, por ejemplo, la aromatasa (CYP19A) remueve el metilo del carbón 19 y aromatiza el anillo-A de la androstenediona, en la biosíntesis del estradiol: citocromo P450cam (CYP101) cataliza la hidroxilación del alcanfor.

Familia P450	Enzima	Nombres anteriores			Sustrato típico o actividad	Típico agente inductor.
		Rata	Ratón	Conejo		
1	1A1	C	P ₁	LM ₆	EROD aril hidrocarbón hidroxilasa	PAH, TCDD, β-NF (receptor Ah)
	1A2	D	P ₃	LM ₄	2-AAF, IQ N-hidroxilación	isosafrol TCDD
2	2A1	A			Testosterona, 7α-hidroxilasa, (metabolismo de esteroides)	PB
	2B1	B		LM ₂	hexobarbital, PB	PB , constitutivo
	2D6	UT-H			debrisoquinona, esparteína	No inducible.
	2E 1	J		LM _{3a}	dimetilnitrosamina	etanol, isoniazida
3	3A4	P			nifedipina	esteroides, dexametasona
4	4A1	P-452			ω-hidroxilasa	peroxisoma, proliferadores

Abreviaciones: 2- AAF= 2-acetilaminofluoreno; EROD= 7-etoxirresorufina O-deetilasa; PB= fenobarbital;
PAH= hidrocarburos aromáticos policíclicos; TCDD= 2,3,7,8- tetraclorodibenzodioxina; β-NF= β-naftoflavona;
IQ= 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina.

Tabla II.ii.c1. En esta tabla se muestra la nomenclatura actual y los nombres anteriores de algunas isoformas de CYP450 hepáticos involucradas en el metabolismo de xenobióticos (35)

II.ii.d. Ciclo catalítico.

Como ya se ha mencionado, CYP450 tiene la capacidad de metabolizar una gran variedad de compuestos tanto xenobióticos como endógenos (sección II.ii.a). Para explicar la gran capacidad metabólica de estas enzimas es importante conocer su ciclo catalítico (Fig. II.ii.d1), así como los cambios conformacionales que sufre la enzima durante todo el ciclo. Mucho de lo que se sabe del ciclo catalítico, deriva de estudios cristalográficos en enzimas de CYP450 solubles de *Pseudomonas putida* denominadas CYP450cam (51), y se han podido proponer nueve pasos generales (34, 52) para dicho ciclo, sin embargo es importante notar que no todas las isoformas pasan necesariamente por todos los pasos del ciclo y que también existen reacciones laterales que pueden modificar el ciclo de manera importante (34, 53).

Esquema generalizado del ciclo de CYP450 (34, 52, 53)

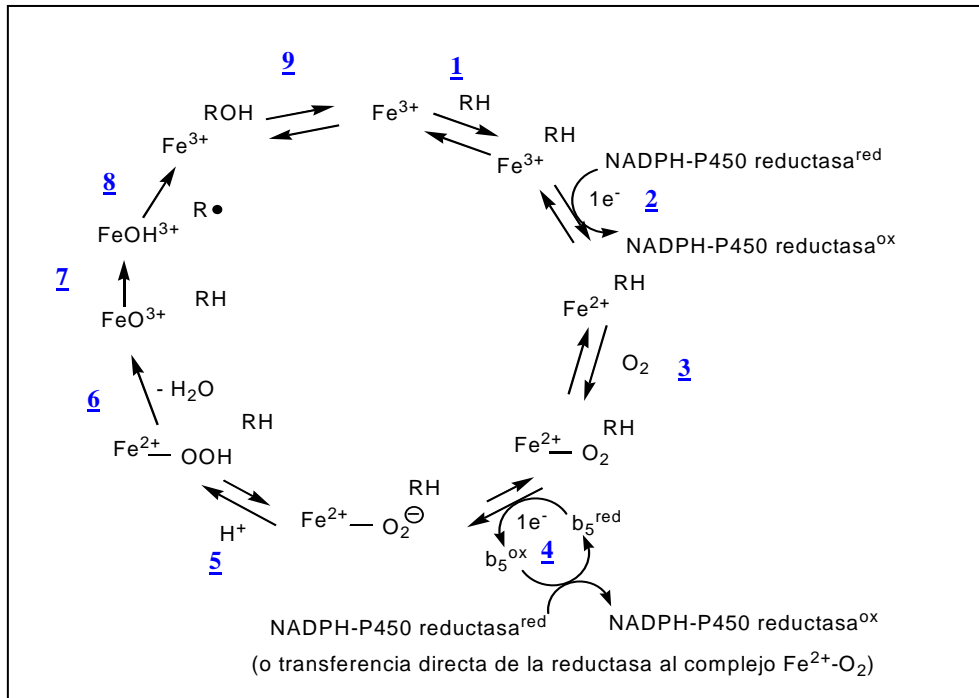


Figura II.ii.d1. En este esquema se representa el ciclo catalítico de CYP450, y se muestra el estado de oxidación del hierro, así como la entrada y salida de las moléculas necesarias para que el ciclo funcione (34, 53)

Paso 1. El ciclo catalítico (Fig. II.ii.d1) comienza con el átomo de hierro del CYP450 en estado férrico (Fe^{3+}). En este paso, el sustrato se une a la enzima, en alguna parte distal a la región del grupo hemo, desplazando una molécula de agua que actúa como sexto ligante (54, 55) (Fig. II.ii.d2). Este paso puede involucrar un cambio en el estado de espín del átomo de hierro (algunos CYP450 tienen bajo espín en el estado libre de sustrato, por ejemplo, y algunos se encuentran en alto espín), y también puede cambiar el potencial redox del sistema proteínico.

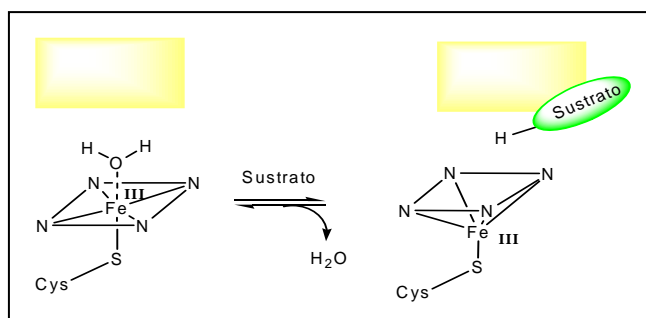


Figura II.ii.d2. En este esquema se representa la entrada de un sustrato en el sitio catalítico de CYP450, la mayoría de los sustratos se unen al dominio hidrofóbico de la bolsa catalítica (representada con un cuadro amarillo); esta unión provoca el desplazamiento de una molécula de agua que se encuentra unida al átomo de hierro y cambia el espín de este último.

Paso 2. El segundo paso es la reducción del complejo a un estado ferroso (Fe^{2+}). La forma en la que el electrón es transferido depende del tipo de célula y del tipo de CYP450; en

eucariontes la forma más común es que el donador de electrones sea el NADPH, y que los electrones sean transferidos a una enzima conocida como NADPH-P450reductasa (33, 54, 56) Fig. II.ii.d3 (A). Esta enzima es una flavoproteína con dos grupos prostéticos, el FAD y el FMN (Fig. II.ii.d3 (B)); el FAD es el aceptor inicial de los electrones provenientes del NADPH, mientras que el FMN sirve para reducir al átomo de hierro del CYP450 (56).

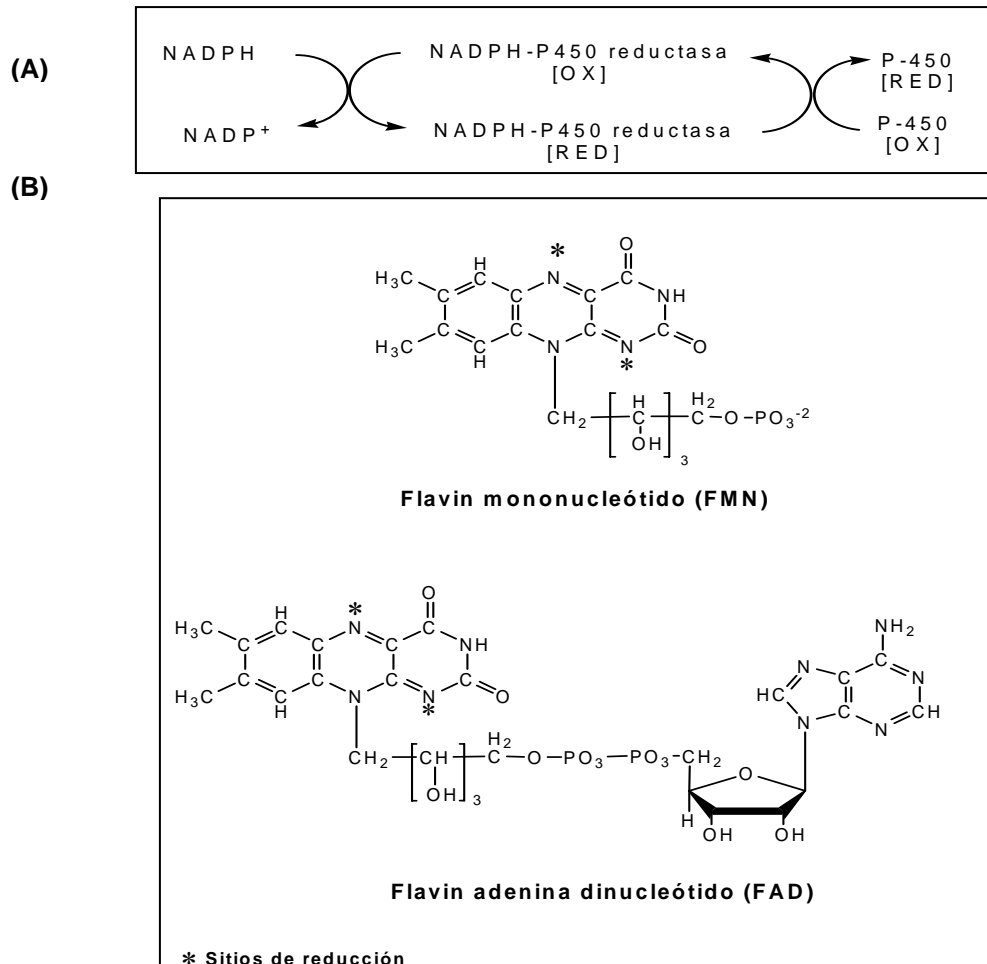


Figura II.ii.d3. (A) Cadena de transporte de electrones en CYP450 de retículo endoplásmico. (B) Estructuras de FAD y FMN, los grupos prostéticos de la NADPH-CYP450 reductasa (33).

El paso 1 puede o no facilitar el paso 2, dependiendo de la isoforma de CYP450; el paso 1 se muestra antes que el paso 2 porque es más rápido, aún cuando la cinética del paso 2 es independiente de la unión del sustrato (34).

Paso 3. El tercer paso es la unión del oxígeno molecular al CYP450 en estado ferroso. Este complejo es inestable y puede generar hierro férrico y un anión superóxido, $O_2^{\cdot -}$. El complejo $Fe^{2+} \cdot O_2$ ha sido observado en P450's microsomales, pero después de este paso, la caracterización de los intermediarios es incierta (Fig. II. ii. d4.).

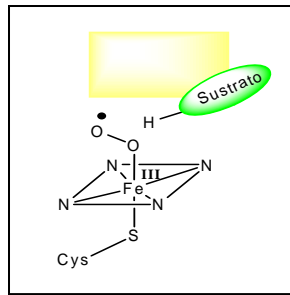


Figura II.ii.d4. Representación gráfica del complejo superóxido en el tercer paso del ciclo catalítico.

Paso 4. El cuarto paso es una segunda reducción, la cual origina especies activas de oxígeno. Este electrón puede provenir de la NADPH-P450 reductasa o en algunos casos, del citocromo b_5 (el citocromo b_5 es ineficiente para proveer el primer electrón probablemente porque la primera reducción es termodinámicamente más difícil que la segunda). La participación de citocromo b_5 para proveer de equivalentes reductores depende de la isoforma de CYP450 y del sustrato presente en la reacción de oxidación **(37)**.

Paso 5. En este paso se adiciona un protón a la molécula de oxígeno Fig. II.ii.d5.

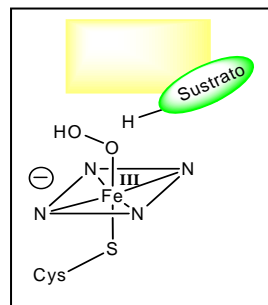


Figura II.ii.d5.

Paso 6. En este paso el enlace O-O es disociado, generando H_2O (con la adición de un protón) y la especie representada como FeO^{3+} . Este complejo de alta valencia también puede ser escrito como $Fe^V=O$ pero la configuración electrónica exacta se desconoce **(34)**.

Paso 7. Se proponen varios mecanismos para este paso, por ejemplo, se propone que el complejo deficiente de electrones, puede abstraer un protón del sustrato o que puede tomar un electrón o formar un complejo sigma con el sustrato.

Paso 8. Un subsecuente colapso de este intermediario causa la generación del producto en el paso 8. (En el caso de que el mecanismo del paso 7 sea la abstracción de un hidrógeno del sustrato, al paso 8 se le conoce como "oxígeno rebotado").

Paso 9. En el paso 9 el producto es disociado de la enzima, y ésta vuelve al estado Fe^{3+} inicial.

II. ii. e. Propiedades espectroscópicas.

El grupo hemo (Fig. II.ii.e1) es un cromóforo muy potente y sus propiedades espectroscópicas son sensibles a la naturaleza de los ligantes unidos al átomo de hierro del grupo hemo, al estado de oxidación del hierro y al ambiente proteínico en el que el grupo hemo se encuentra inmerso. La característica de las enzimas de CYP450 que permitió su descubrimiento y por el cual recibe su nombre, es que el hierro en su forma reducida (ferroso, Fe^{2+}) forma con el monóxido de carbono (CO) un complejo que presenta un máximo de absorción a 450nm (Fig. II.ii.e2). Las diferentes formas de CYP450 tienen un rango de absorción de 447nm a 452nm. Complejos análogos de Fe^{2+}CO de las hemoproteínas típicas tienen un máximo de absorción alrededor de a 420nm **(37)**; la mioglobina por ejemplo tiene una λ_{max} en 423nm.

El valor de λ_{max} para el complejo Fe^{2+}CO en una hemoproteína, está fuertemente influenciada por la identidad del ligante coordinado al átomo de hierro en el lado opuesto al que está ocupado por el CO. Este ligante axial en la mioglobina y en la mayoría de las hemoproteínas, es un átomo de nitrógeno proveniente del anillo de imidazol de una histidina. El inusual cromóforo P450 sugiere la presencia de un ligante poco común, la evidencia de modelos químicos fueron consistentes para un ligante tiolato (Fig. II. ii. e2), y la estructura cristalina de $\text{CYP450}_{\text{cam}}$ reveló directamente que el ligante axial era un sulfuro desprotonado de una cisteína **(57)**. Sólo las proteínas con un ligante tiolato forman complejos reducidos con CO que tienen una λ_{max} cercana a 450 nm.

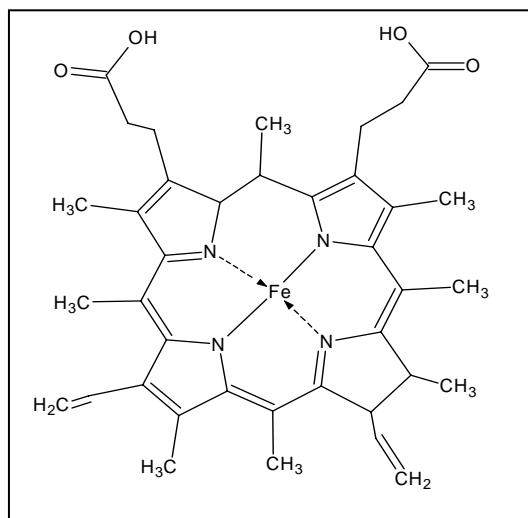


Figura II.ii.e1. Estructura de la protoporfirina IX, dos de los nitrógenos del anillo se encuentran coordinados al átomo de hierro (enlaces en flechas) **(61)**.

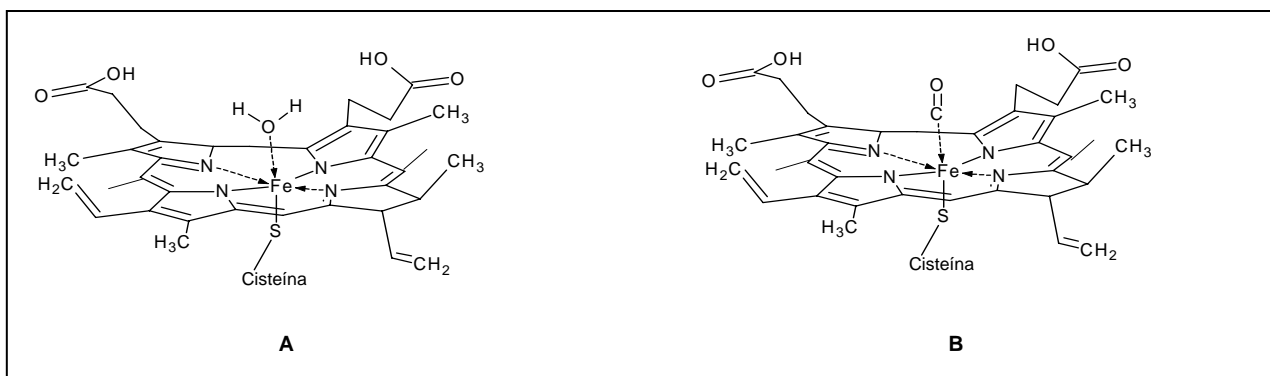


Figura II.ii e2. A) estructura de la protoporfirina IX en CYP450 donde el átomo de hierro se encuentra unido al átomo de azufre proveniente de una cisteína. **B)** Complejo responsable de la λ_{\max} de 450nm

I. ii. f. Diferencia espectral (58-60).

La espectroscopia en la región UV-visible ha sido ampliamente utilizada para la detección y caracterización de los diferentes tipos de CYP450, y se ha observado que la unión de un sustrato tiene un efecto muy marcado en el espectro de absorción (9, 58, 59). La primera demostración de cambios en la absorbencia como resultado de la interacción entre CYP450 y un sustrato fue reportado en 1965 cuando Narasimhulu (60) y colaboradores adicionaron 17-hidroxiprogesterona a una solución clarificada con Tritón N-101 de microsomas adrenocorticales de res. El espectro óptico consistía en un pico de absorción a 388nm, con un punto isobéptico a 407nm y un mínimo de absorción a 420nm.

Poco tiempo después Remmer y colaboradores (1966) (60) reportaron la formación de dos tipos de cambios espectrales, seguidos por la adición de sustratos en microsomas hepáticos de rata. Estos cambios espectrales fueron categorizados y descritos en detalle por Shenkman (58, 60) y colaboradores en 1967. En microsomas hepáticos de rata estos cambios espectrales fueron denominados como **tipo I**, teniendo un cambio en la diferencia espectral que está caracterizada por la aparición de un pico máximo de absorción de 385-390nm y un mínimo en 420nm (Fig. II.ii.f1) y **tipo II**, que son cambios espectrales caracterizados por un máximo de absorción en 425-435nm y un mínimo en 390-405nm (Fig. II.ii.f1).

Los cambios espectrales causados por compuestos como el butanol con un máximo de absorción a 420nm y un mínimo a 388-390nm, fueron originalmente designados como tipo II modificado (59) pero poco después fueron nombrados como **tipo I reverso** (60). Los cambios espectrales tipo I y tipo II han demostrado ser espectros de unión reversibles (58) y dependen de la cantidad de compuesto adicionado, al graficar Δ Abs. vs [sustrato] se observa un modelo de saturación del tipo Michaelis – Menten (Fig. II.ii.f2). Si se grafica el doble recíproco de $1/\Delta$ Abs. vs $1/$ [sustrato], simulando un modelo tipo Lineweaver-Burk, es posible calcular una constante de disociación espectral (K_s) (55) (Fig. II.ii.f3).

Como la constante K_m y la constante espectral K_s eran similares en magnitud, se sugirió que el espectro de tipo I era la manifestación de la formación del complejo enzima-sustrato. Sin embargo debe notarse que la correlación entre la constante K_m y la constante de disociación espectral K_s para sustratos de tipo I es fortuita ya que la K_s se obtiene a partir de cambios espectrales determinados con la proteína en estado férrico en ausencia de cualquier agente reductor, mientras que K_m se obtiene a partir de un sistema de metabolismo activo.

Los cambios espectrales de tipo II se han observado en compuestos que contienen una amina primaria como la anilina, la piridina, n-octilamina, etc. y aparentemente éstos compuestos son capaces de unirse a la forma férrica de la hemoproteína a través de un par electrónico disponible de la amina y ocupar la posición como sexto ligante del átomo de hierro. El criterio utilizado para determinar la interacción con el hierro se basa en la habilidad que poseen estos compuestos para desplazar al monóxido de carbono de la sexta posición de coordinación en la forma reducida de CYP450 (58, 60).

En el espectro tipo I reverso se piensa que puede ocurrir el desplazamiento de un ligante distal (como una molécula de agua o posiblemente un ión hidroxilo) combinado con la unión de un sustrato en la región hidrofóbica de la bolsa catalítica (9, 60).

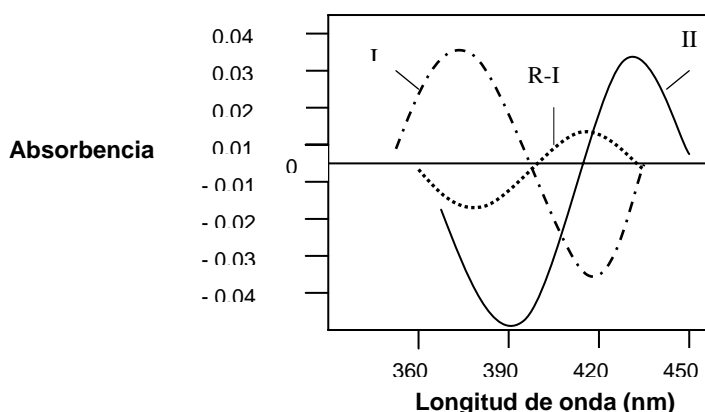


Figura II.ii.f1. Tipos de cambios espectrales. Tipo I (punto-línea), reverso tipo I (puntos), Tipo II (línea continua) (59).

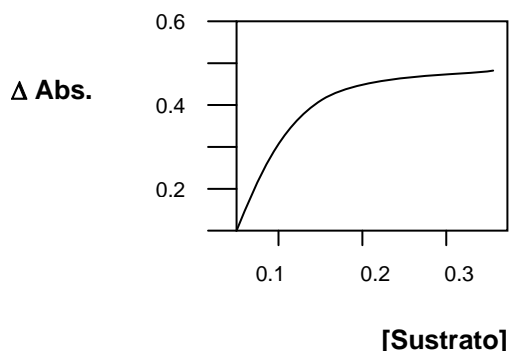


Figura II.ii.f2. Representación gráfica del comportamiento Michaelis-Menten que se observa al graficar $\Delta \text{Abs.}$ vs concentración de sustrato.

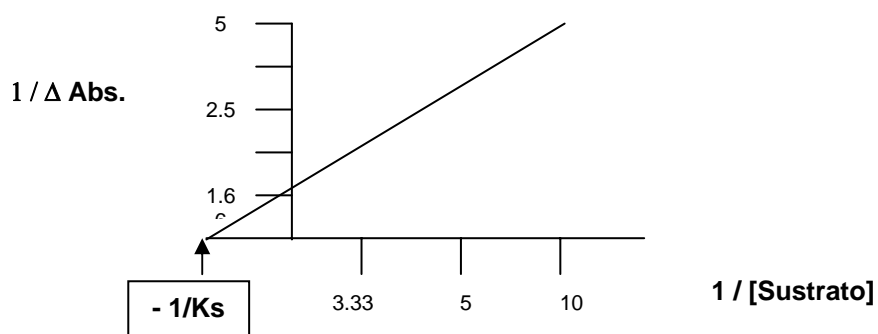


Figura II.ii.f3. Representación del gráfico tipo Lineweaver-Burk (doble recíproco) para el cálculo de la constante de disociación espectral (K_s).

En las tablas II.ii.f4, 5 y 6 se enlistan algunos ejemplos de compuestos que generan cambios espectrales de tipo I, tipo II y tipo I reverso.

Tabla II.ii.f4. Compuestos que producen espectros tipo I.

Ácido araquidónico	Tolueno
Benzo(a)pireno	R-warfarina
Benzfetamina	2-heptanona
Alcanfor	Metionina
DDT	α -naftoflavona
Hexano	β -naftoflavona
Hexobarbital	n-octano
Naftaleno	Ácido oleico
Pentobarbital	Paration
Fenobarbital	Triton X-100
Testosterona	Tween 80

Tabla II.ii.f5. Compuestos que producen espectros tipo II.

Anilina
Imidazol
Piridina
Óxido nítrico
n-octilaminaBenzilamina
Nicotina
Triptofano (altas concentraciones)

Tabla II.ii.f6. Compuestos que producen tipo I reverso

Cafeína
Teofilina
Butanol
Etanol
Metanol
2-propanol
Alcohol bencílico
Acetanilida

Referencias para las tablas I.ii.r4, 5 y 6 (9, 60)

I.ii.g. Estados de espín.

Para un entendimiento más profundo de la interacción de sustratos con CYP450 y su importancia en el mecanismo de acción de estas enzimas, es necesario examinar la química de coordinación del átomo de hierro en el grupo hemo. Este problema puede ser visualizado de una forma simple utilizando la teoría de campo cristalino (33, 35, 60, 61), esta teoría está basada en la interacción electrostática entre los ligantes y el ión metálico.

Se identifican los 26 electrones del átomo de hierro y sus niveles de energía principales $1s^2$, $2s^2$, $2p^6$, $3s^2$, $3p^6$, $3d^6$, $4s^2$, donde el superíndice indica el número de electrones, las letras designan los estados de energía y los coeficientes indican el número cuántico principal. El átomo de hierro en la protoporfirina se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}), y contiene cinco electrones distribuidos en los cinco orbitales 3d ($3d^5$), estos orbitales se denominan d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} , $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2} (Fig. I.ii.g1 **A**). Si el ion se encuentra en estado libre, todos los orbitales tendrán la misma energía, y los electrones se distribuirán uno en cada orbital. Los orbitales que tienen la misma energía se denominan degenerados (Fig. II.ii.g1 **B**). Cuando el átomo de hierro es colocado dentro de un anillo de protoporfirina y después es unido a una proteína, se pierde la simetría del ambiente de enlace provocando diferencias en los niveles de energía transformando a los orbitales en estados no degenerados (Fig. II.ii.g1 **C**).

Cuando un ligante se encuentra cercano a un metal de transición, la carga del ligante perturba a los orbitales **d** debido a la repulsión entre los electrones del metal y los del ligante. Mientras más cercano se encuentre el ligante, mayor será la energía del orbital. Para el caso del CYP450 en estado basal, el átomo de hierro se encuentra en un estado hexacoordinado con cuatro átomos de nitrógeno de la protoporfirina, un azufre de una cisteína que lo mantiene unido al resto de la enzima y un oxígeno de una molécula de agua, estos seis ligantes se acomodan en una simetría prácticamente octaédrica.

Este arreglo hace que el orbital que se encuentra en el plano **xy** (dx^2-y^2) y el orbital ubicado en el eje **z** (dz^2) suban en energía, y provoca que los electrones se apareen al máximo y quede un electrón desapareado; a este estado se le conoce como de bajo espín ($S = \frac{1}{2}$). Por estudios cristalográficos y de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en CYP450_{cam} se sabe que el átomo de hierro se encuentra en equilibrio con la forma pentacoordinada de alto espín ($S=5/2$) debido a la pérdida de la molécula de agua **(51, 62)** (Fig. II.ii.g1).

Estudios de resonancia paramagnética electrónica (EPR) revelaron que al interaccionar un sustrato con enzimas de CYP450, hay un incremento en las señales de alto espín **(62)**, esto significa que de alguna forma el hierro aumentaba en su forma pentacoordinada.

Por otro lado, al interaccionar una amina primaria con CYP450, las señales de alto espín desaparecen y sólo se observaban las de bajo espín **(62)**, esto significa que el átomo de hierro aumenta en su forma hexacoordinada.

Estudios cristalográficos **(7)** con CYP450_{cam} revelaron que la unión de un sustrato al dominio lipofílico de la enzima provoca el desplazamiento de una molécula de agua coordinada al átomo de hierro, lo que conduce al átomo de hierro a su forma pentacoordinada. Los estudios espectrofotométricos mostraron que las aminas primarias son capaces de modificar el espectro de CYP450 en su forma reducida con monóxido de carbono **(58)**, lo que sugiere que las aminas primarias compiten por el mismo espacio que el monóxido de carbono, es decir, las aminas primarias podían unirse al átomo de hierro y evitar la formación del complejo con CO, esta unión era posible gracias al par electrónico disponible del nitrógeno en las aminas. Estos mismos experimentos fueron realizados con un sustrato (hexobarbital) de CYP450, el cual no modificó los espectros con monóxido de carbono lo que sugiere que no se une al mismo sitio que el monóxido, es decir, este sustrato no se une al átomo de hierro, lo que estaba acorde con los estudios cristalográficos ya mencionados.

Con todas estas evidencias se ha podido plantear que las diferencias espectrales de tipo I y de tipo II son causadas por el cambio en el estado de espín del átomo de hierro en la protoporfirina, donde un espectro tipo I significa que el átomo de hierro se encuentra en estado pentacoordinado de alto espín y el espectro de tipo II se encuentra en estado hexacoordinado de bajo espín y es el compuesto químico el que está ocupando la sexta posición de coordinación.

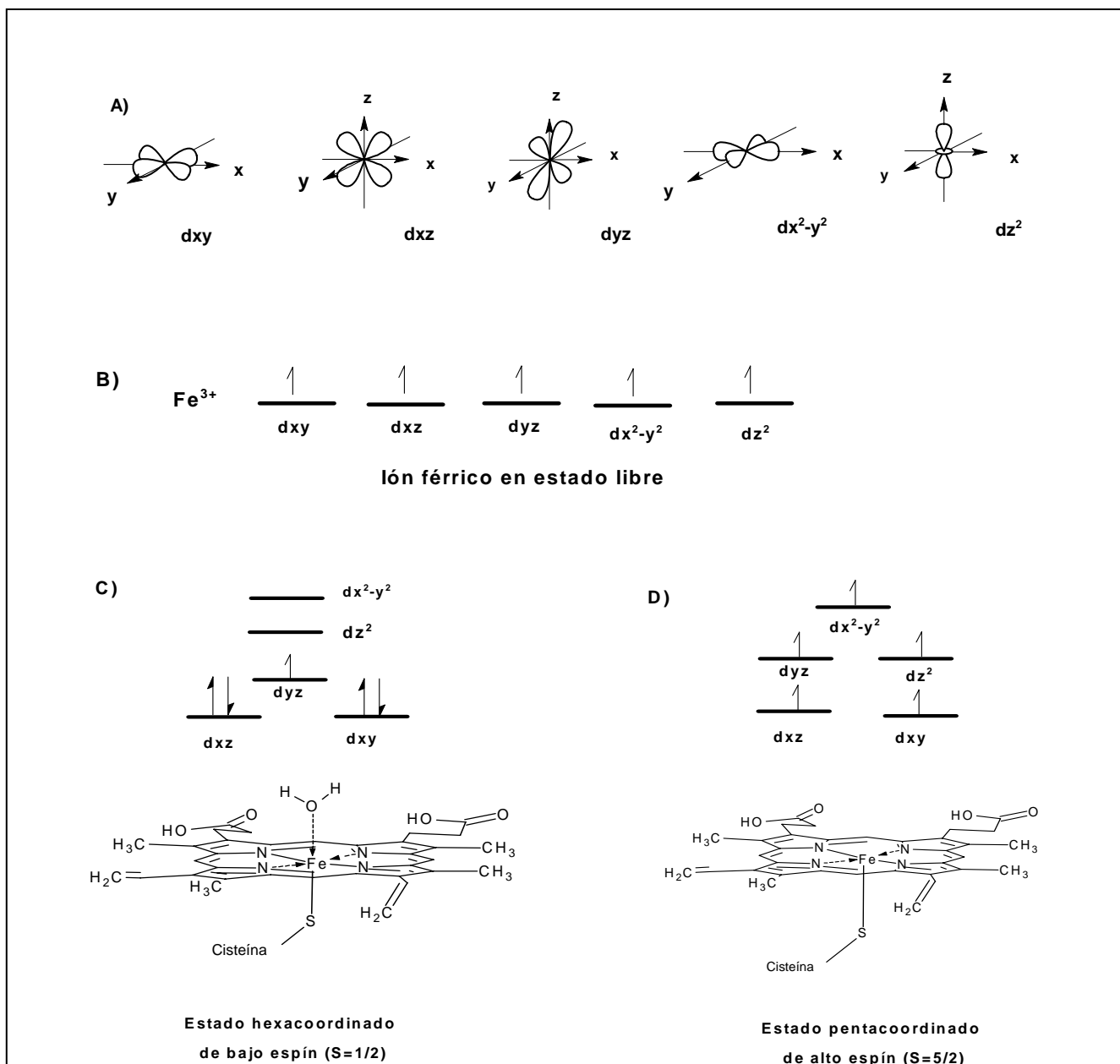


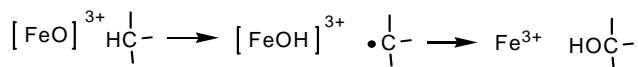
Figura II.ii.g1. **A)** Se muestran la forma de los orbitales **d** del Fe. **B)** Cuando el ion Fe^{3+} se encuentra en estado libre los orbitales atómicos tienen la misma energía y se denominan degenerados. **C)** Estado hexacoordinado del Fe^{3+} en CYP450, se tiene un estado de bajo espín ($S=1/2$). **D)** Estado pentacoordinado del Fe^{3+} en CYP450, muestra un estado de alto espín ($S=5/2$).

II.ii.h. Tipos de reacciones catalizadas por citocromo P450.

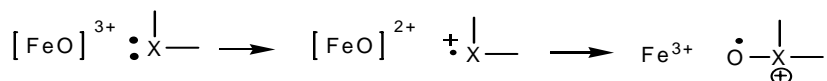
Las reacciones más comunes llevadas a cabo por CYP450 (**34, 52**) son (a) hidroxilación de carbono, (b) oxigenación de un heteroátomo, (c) liberación de un heteroátomo (desalquilación), (d) epoxidación y (e) migración oxidativa. Con un mecanismo catalítico general que involucra un "oxígeno rebotado" se pueden explicar las aparentemente diversas reacciones oxidativas de CYP450.

Esquema II.ii.h1. Mecanismos unificados para la mayoría de las reacciones de CYP450

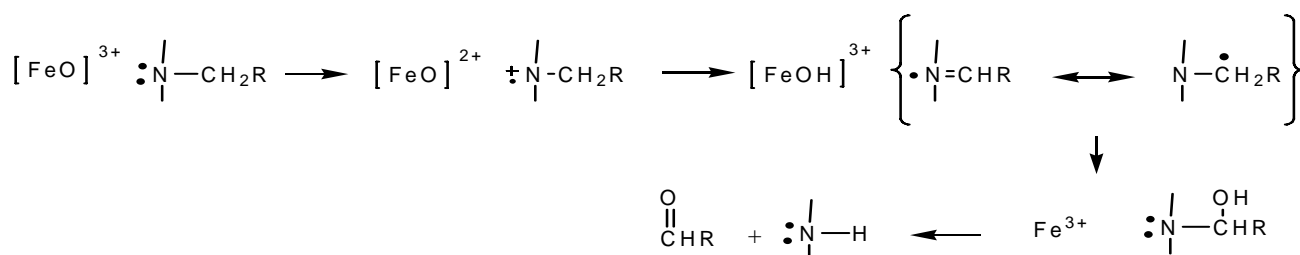
Hidroxilación de carbono



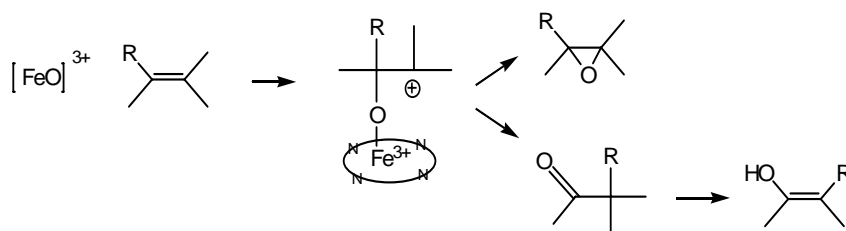
Oxigenación de un heteroátomo



Liberación de un heteroátomo (desalquilación)



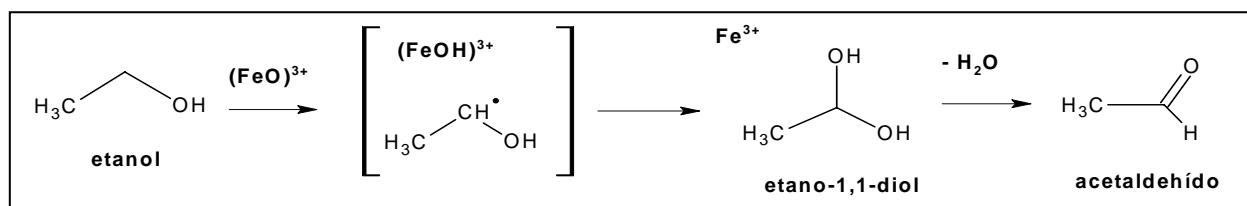
Epoxidación y migración oxidativa



A continuación se muestran ejemplos de cada tipo de reacción:

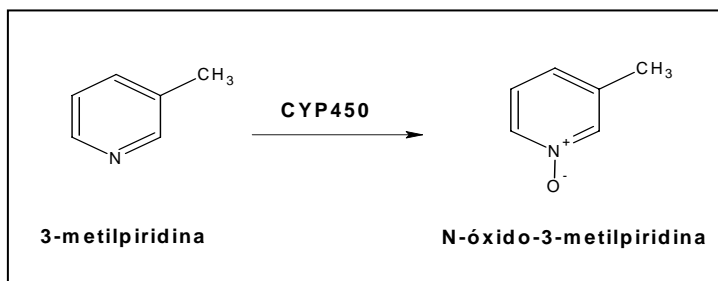
(a) Hidroxilación de carbono. La hidroxilación de carbono (o C-oxidación) es una reacción muy común. El caso más simple es la formación de un alcohol. El mecanismo es la abstracción de un hidrógeno y el rebote de un oxígeno.

Esquema II.ii.h2. Posibles mecanismos para la oxidación de etanol y acetaldehído por CYP2E1 (34, 42).



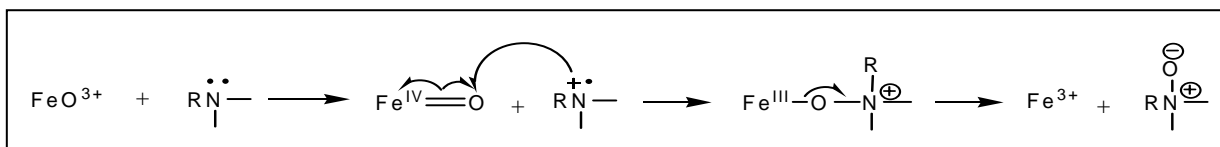
(b) Oxigenación de un heteroátomo (34). Los heteroátomos son aquellos átomos diferentes de carbono. Las enzimas de CYP450 son capaces de adicionar oxígeno a N, S, P y I.

Esquema II.II.h3. N-oxidación de 3-metilpiridina.

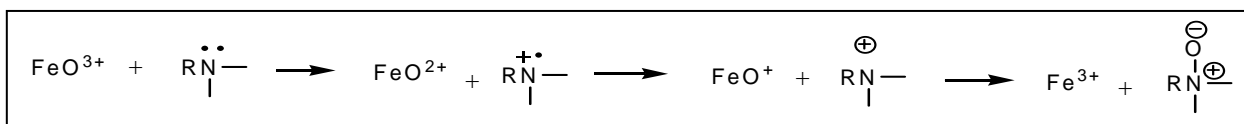


Existen dos mecanismos propuestos para este tipo de reacción

Mecanismo homolítico para la N-oxigenación.

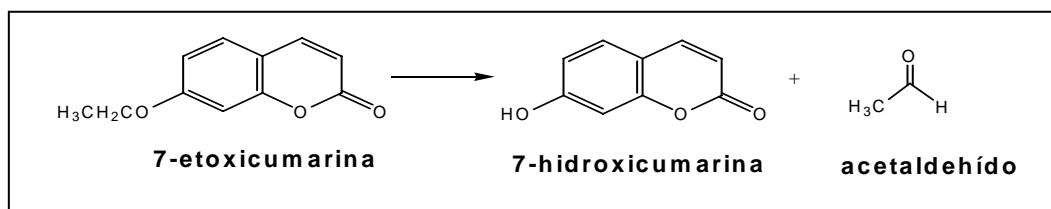


N-oxigenación (2 X 1-transferencia de electrón / rebote de oxígeno)



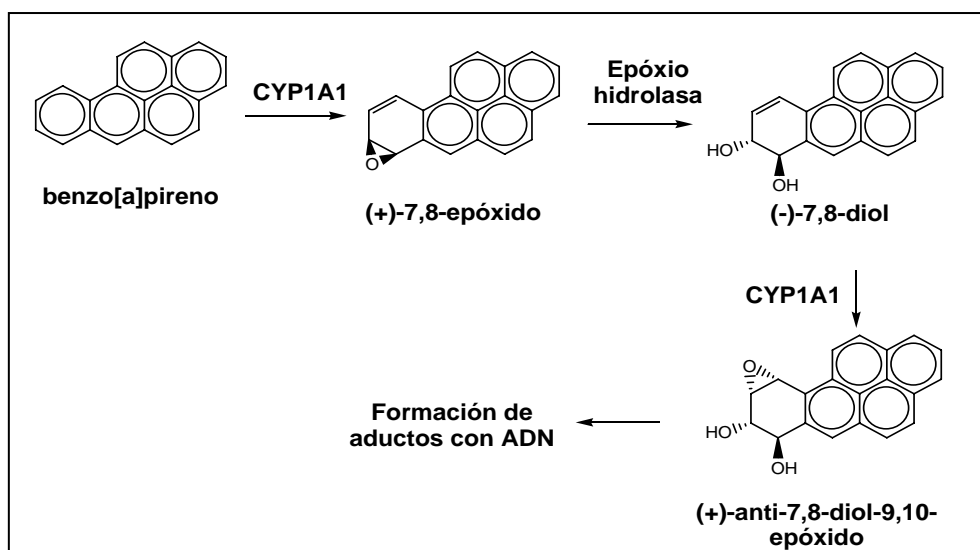
(c) Liberación de un heteroátomo (desalquilación). Este proceso resulta de la hidroxilación formal de un carbono adyacente a un heteroátomo para producir un compuesto inestable, lo que provoca la ruptura del carbono con el heteroátomo.

Esquema II.ii.h4. N-desalquilación de 7-etoxicumarina (31).



(d) Epoxidación. La epoxidación es de interés particular en toxicología, en este proceso los productos pueden ser inestables y reaccionar con grupos nucleofílicos en macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos) para iniciar el efecto biológico.

Esquema II. ii. h5. Epoxidación de benzo[a]pireno (28).



II.ii.i. Inhibición (63, 64).

En el ciclo catalítico de CYP450 se han identificado al menos tres pasos limitantes que pueden ser afectados por un inhibidor: (a) la unión del sustrato, (b) la unión del oxígeno molecular subsecuente a la primera transferencia de electrón y (c) el paso catalítico en el que el sustrato es oxidado. Los inhibidores de CYP450 se dividen en tres categorías mecánicas: (A) agentes que se unen reversiblemente, (B) agentes que forman complejos cuasi-irreversibles con el átomo de hierro, y (C) agentes que se unen irreversiblemente a la proteína o al grupo prostético hemo, o que aceleran la degradación del grupo prostético sin aparentemente unirse a él. La mayoría de los inhibidores que interfieren antes del evento oxidativo son generalmente reversibles y son inhibidores competitivos o no competitivos. Los agentes que actúan durante o después de la transferencia de oxígeno son generalmente irreversibles o cuasi-irreversibles, y en muchos casos caen en la categoría de inhibidores suicidas.

Inhibidores reversibles (63).

Los inhibidores que compiten con sustratos por la ocupación del sitio activo incluyen sustancias que se unen al dominio hidrofóbico, que se coordinan con el átomo de hierro del grupo hemo, o que participan en enlaces de hidrógeno específicos o interacciones iónicas con residuos específicos del sitio activo. El primer mecanismo, una simple competencia para unirse al dominio lipofílico del sitio activo, es evidenciado por la competencia que existe entre los sustratos de una isoforma de CYP450. Este tipo de inhibición es óptima cuando el inhibidor se une fuertemente pero no es un buen sustrato. La inhibición por este mecanismo no es particularmente efectiva pero en situaciones apropiadas pueden provocar cambios metabólicos importantes. Un ejemplo claro de este tipo de inhibidores es la inhibición metabólica causada por el benceno o el tolueno.

- Coordinación al hemo férrico.

La fuerte coordinación entre un ligante y el hierro pentacoordinado, o el desplazamiento de un ligante débil de un hemo hexacoordinado por un ligante fuerte, cambia a la enzima de un estado de alto espín a uno de bajo espín y da como resultado un espectro de "tipo II" con un máximo en aproximadamente 430nm **(59)**. Este cambio de espín es acompañado por un cambio en el potencial redox de la enzima lo que hace que su reducción por la citocromo P450 reductasa sea más difícil. Este cambio en el potencial de reducción, mucho más que la ocupación física del sexto sitio de coordinación, es responsable de la inhibición asociada con la unión de ligantes fuertes. Los ligante iónicos como el cianuro se unen preferencialmente a la forma férrica de P450. Las tres cargas positivas férricas se encuentran neutralizadas en la enzima por las cargas negativas de sus tres ligantes (dos nitrógenos de la porfirina y el tiolato), pero las cargas negativas exceden las dos cargas positivas del hierro ferroso. El cianuro se une mejor a la enzima neutral (estado férrico) que a la enzima negativa (estado ferroso). De hecho el cianuro se une más débilmente al P450 férrico que a la mioglobina férrica porque el ligante tiolato del P450 ubica una mayor densidad electrónica en el hierro que el ligante imidazol en la mioglobina. La quelación de ligantes iónicos es desfavorecida además, por la naturaleza lipofílica del sitio activo de CYP450.

- Coordinación al hemo ferroso.

El monóxido de carbono, el ligante no cargado más simple. Se une exclusivamente a la forma ferrosa (reducida) del CYP450. La unión del monóxido de carbono al hemo ferroso provoca una donación de electrones del carbón al hierro a través de un enlace σ , así como una retrodonación de electrones de los orbitales d ocupados del átomo de hierro a los orbitales π de antienlace vacíos del monóxido de carbono **(65)**. Las enzimas de CYP450 son nombradas de esta manera debido a que el complejo con monóxido de carbono presenta una absorción máxima en 450nm. El descubrimiento de que la absorción en 450 nm podía ser reproducida al modelar ferroporfirinas, sólo con un ligante tiolato trans al monóxido de carbono fue la evidencia clave para proponer un ligante tiolato como quinto ligante en el CYP450. La inhibición por monóxido de carbono es una característica particular en todos los procesos catalizados por CYP450.

- Coordinación al grupo hemo y unión lipofílica.

Los inhibidores que se unen a la región lipofílica de la proteína, y que simultáneamente se unen al hierro del grupo hemo, son más efectivos que los agentes que dependen sólo de una de estas interacciones. La actividad de estos agentes como inhibidores de CYP450 está gobernada por su carácter hidrofóbico y por la fuerza de unión entre un par electrónico disponible de su heterátomo y el hierro del grupo prostético hemo. Los inhibidores menos

efectivos incluyen alcoholes, éteres, cetonas, lactonas y otras estructuras en las que el átomo que se coordina con el átomo de hierro es un oxígeno, el cual se coordina muy débilmente. Los inhibidores reversibles más efectivos, en contraste, interactúan fuertemente con la proteína y con el grupo prostético. La unión de inhibidores que son fuertes ligantes del hierro, dan como resultado una diferencia espectral de tipo II con un máximo de Soret en 430nm. La mayoría de estos poderosos inhibidores son compuestos alifáticos y aromáticos que contienen nitrógeno. Derivados de piridina e imidazol son particularmente útiles como inhibidores de CYP450. La metirafona (Fig. II.ii.i1) es uno de los inhibidores de CYP450 más utilizados, y los factores que determinan su potencia inhibitoria así como para otros heterociclos que contienen nitrógeno, son válidos para la mayoría de los inhibidores reversibles: (1) la intrínseca afinidad de un par electrónico del ligante por el átomo de hierro en el grupo prostético hemo, (2) el grado en el que esta afinidad intrínseca es moderada por interacciones estéricas por sustituyentes en el inhibidor, (3) la lipofilicidad en la porción no ligante del inhibidor, (4) la congruencia entre la geometría del inhibidor y la del sitio activo. El sinergismo entre la unión del dominio lipofílico y la coordinación con el hierro, está ilustrada por el hecho de que el imidazol y el benceno individualmente son inhibidores débiles, pero unidos en el fenilimidazol constituyen un potente inhibidor. Las elipticinas (Fig. II.ii.i1), una clase de heterociclos inhibidores de CYP450, interactúan con las formas férrica y ferrosa de la enzima. Las constantes de inhibición se encuentran en el rango de 1-10 μ M pero la inhibición es competitiva en microsomas hepáticos de rata inducidos con fenobarbital y no-competitiva con microsomas hepáticos de rata inducidos con aroclor.

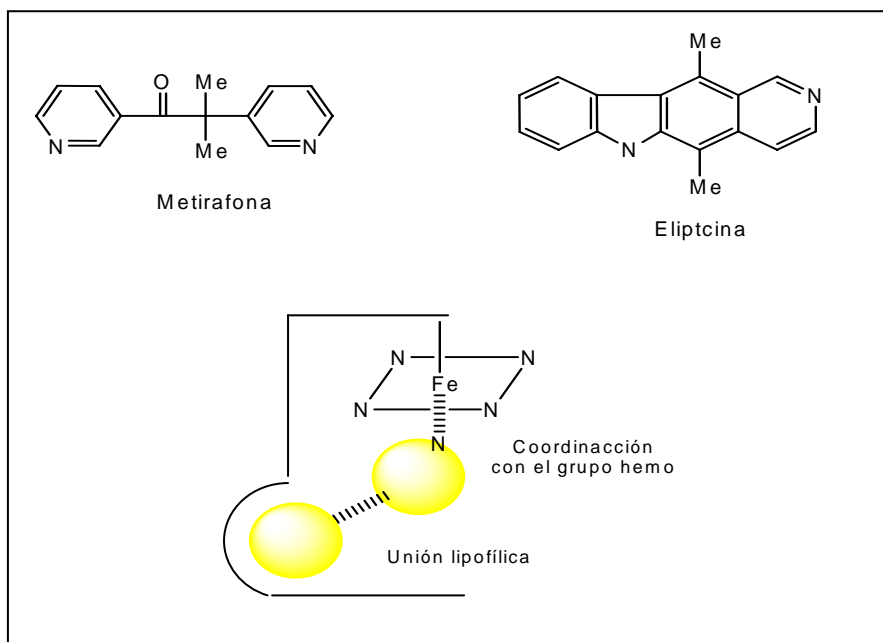


Figura II.ii.i1. Diagrama esquemático de dos puntos de unión de inhibidores con un dominio lipofílico y un nitrógeno coordinante. También se dan dos ejemplos de este tipo de agentes inhibidores.

Unión covalente a la proteína (63).

Los agentes que inactivan a CYP450 por la unión covalente a la proteína después de ser activados oxidativamente por la misma enzima, incluyen una gran variedad de compuestos sulfurados (por ejemplo paratión, dietilditiocarbamato, isotiocianatos, tio-ureas, etc.) y estructuras halogenadas como cloranfenicol. Los detalles del mecanismo por el cual estos compuestos inactivan al CYP450 no han sido totalmente definidos, sin embargo el mayor progreso se ha hecho en elucidar el mecanismo de acción del paratión (Fig. II.ii.i2) y el cloramfenicol (Fig. II.ii.i3). Se ha demostrado que la proteína queda marcada radiactivamente cuando se utiliza [³⁵S] en el paratión, pero no es así cuando la radioactividad se encuentra en el ¹⁴C de los grupos etilo. El 90% de proteínas microsomales que están enlazadas covalentemente con ³⁵S son precipitadas con anticuerpos contra CYP450. Aproximadamente el 75% del grupo prostético hemo se pierde al incubar la enzima de CYP450 con paratión. Entre el 50 y el 75% del sulfuro marcado radiactivamente es removido de la proteína con cianuro o ditioneitol, y esto es consistente con la sugerencia de que se encuentra en forma de hidrosulfitos (RSSH), pero la actividad de las enzimas no es recuperada. La unión covalente con el azufre, la bien establecida oxidación de compuestos con azufre para formar S-óxidos, y la formación de metabolitos en los cuales el azufre es reemplazado por un oxígeno, sugieren el siguiente mecanismo de activación oxidativa:

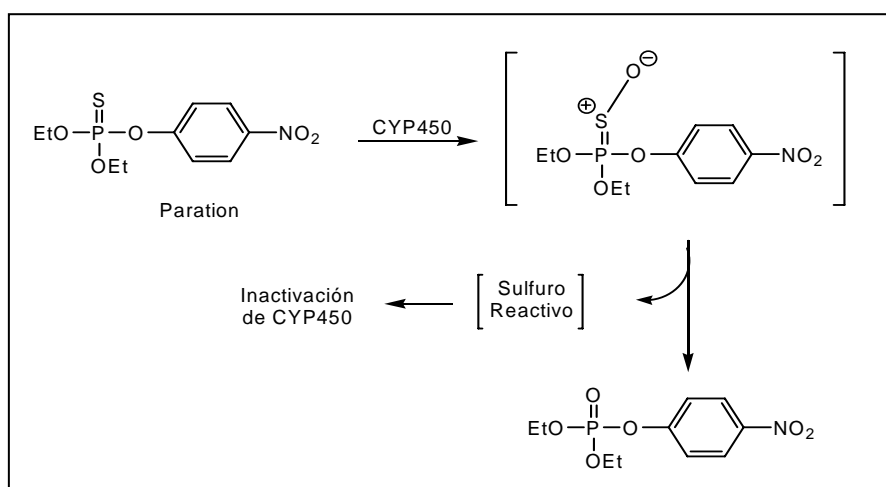


Figura II.ii.i2. La activación oxidativa del paratión. No se tiene evidencia experimental directa de los intermediarios encerrados en corchetes.

En el caso del cloranfenicol, no sólo la unión del cloranfenicol [¹⁴C] a la apoproteína está correlacionada con la pérdida de actividad, también con la digestión proteolítica. La hidrólisis del aminoácido modificado da como resultado un fragmento de lisina y cloramfenicol. El cloranfenicol es oxidado al intermediario oxamil cloruro, que es hidrolizado al metabolito ácido oxámico o acilan una lisina crítica en la proteína (Fig. II.ii.i3). La acilación de la lisina aparentemente interfiere con la transferencia de electrones al grupo hemo.

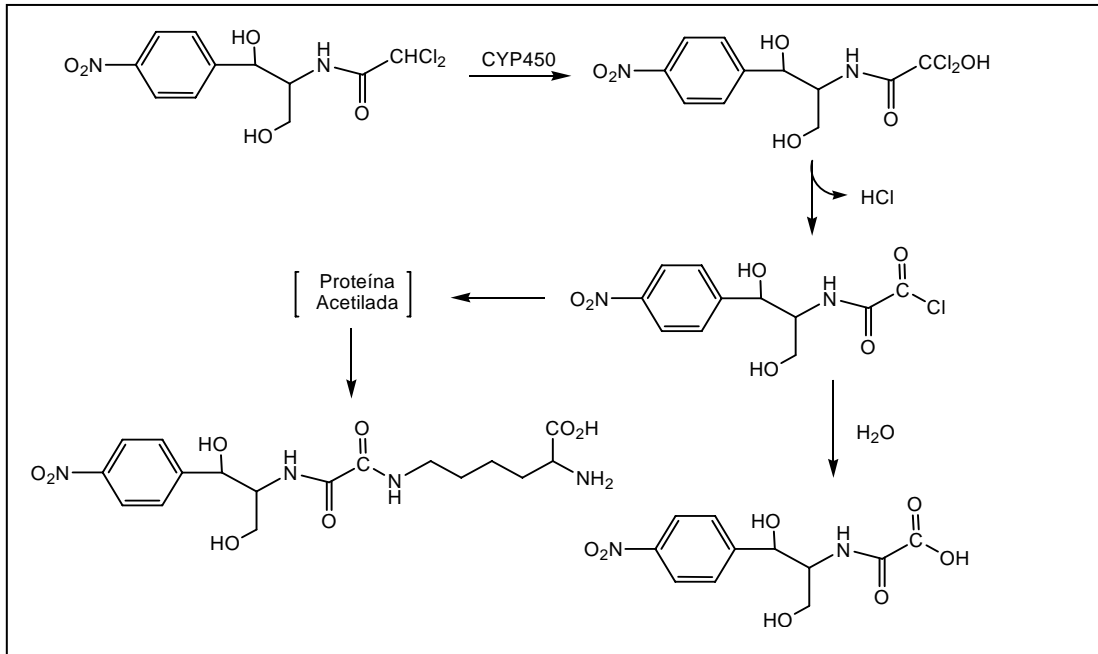


Figura II.ii.i3. Mecanismo propuesto para la inactivación de CYP450 por el cloramfenicol. El residuo acilado de la proteína ha sido aislado y caracterizado.

Coordinación cuasi-irreversible al grupo prostético hemo (63).

Un gran número de fármacos que incluyen metilendioxi-bencenos, alquilaminas, e hidrazinas, pueden formar metabolitos inhibitorios después de una activación metabólica por CYP450. Estos metabolitos pueden formar complejos estables con el grupo prostético hemo del CYP450, denominado complejo intermediario metabólico, de tal forma que el CYP450 es secuestrado en un estado funcionalmente inactivo. La complejación de este tipo de inhibidores puede revertirse, y la función catalítica del CYP450 puede restablecerse por una incubación *in vitro* con compuestos altamente lipofílicos, que desplazan al intermediario metabólico del sitio activo. Otros métodos *in vitro* incluyen la disociación del complejo por medio de una radiación en un rango de 400 a 500nm o la oxidación al estado férrico por la adición de ferricianuro de potasio. La disociación o el desplazamiento del complejo metabólico intermediario resultan en la reactivación de la actividad de CYP450. Sin embargo en situaciones *in vivo*, este complejo es tan estable que el CYP450 es incapaz de realizar su actividad metabólica, y la síntesis de nuevas enzimas de CYP450 es la única forma de restaurar la actividad. Por estas razones se considera a este tipo de complejación como quasi-irreversible.

El piperonil butóxido, un derivado de metilendioxi-benceno, ha sido utilizado por muchos años como un inhibidor del metabolismo oxidativo de fármacos. Este compuesto actúa formando un complejo intermediario metabólico, presumiblemente un complejo hierro-carbeno (Fig. II. ii. i4). La formación del intermediario metabólico por las aminas terciarias está mediada por CYP450 en muchos pasos. La secuencia de N-desmetilación, N-hidroxilación y N-oxidación produce un

metabolito nitroso que se une fuertemente al CYP450 ferroso, y da como resultado un espectro con un máximo de absorbanza en la región de 445 a 455nm (Fig. II.ii.i4).

Los derivados de hidrazina son otra clase de compuestos que pueden formar el complejo intermediario metabólico con CYP450. Las hidrazinas monosustituidas son oxidadas por CYP450 a intermediarios nitreno que se unen fuertemente al hierro del grupo prostético hemo para formar un complejo hierro-nitreno (Fig. II.ii.i4).

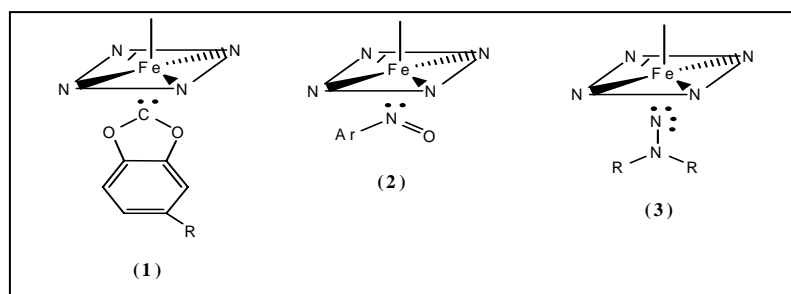


Figura II.ii.i4. Estructuras propuestas para complejos de intermediarios metabólicos (1) compuestos metilendioxiobenceno forman complejos hierro-carbeno (2) alquilaminas forman complejos hierro-nitroso (3) las 1,1-dialquilhidrazinas forman complejos hierro-nitreno.

Inactivación irreversible de CYP450

Algunos fármacos contienen ciertos grupos funcionales que pueden ser oxidados por el CYP450 para producir intermediarios reactivos que pueden provocar la inactivación irreversible de la enzima, principalmente si se ve afectado el sitio catalítico. Ya que se requiere de la activación metabólica para la inactivación de CYP450, éstos fármacos se denominan sustratos suicidas. Este tipo de inhibición puede resultar en la alteración irreversible del grupo hemo o de la proteína, o una combinación de ambos. En general, la modificación del grupo hemo inactiva al CYP450, mientras que la alteración de la proteína puede resultar en la pérdida de actividad catalítica si se afecta a aminoácidos esenciales para la unión del sustrato, la transferencia electrónica o la activación del oxígeno.

- Alquilación del grupo hemo

Los fármacos que contienen un doble enlace terminal (olefinas) (Fig. II.ii.i5) o un triple enlace (acetilenos) (Fig. II.ii.i6) pueden ser oxidados por CYP450 y formar radicales intermediarios que pueden alquilar al grupo prostético hemo e inactivan a las enzimas.

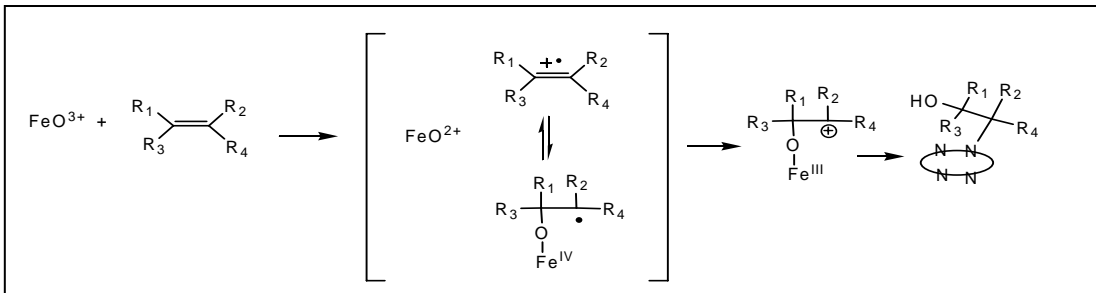


Figura II.ii.i5. Mecanismo propuesto para la alquilación del grupo hemo por olefinas.

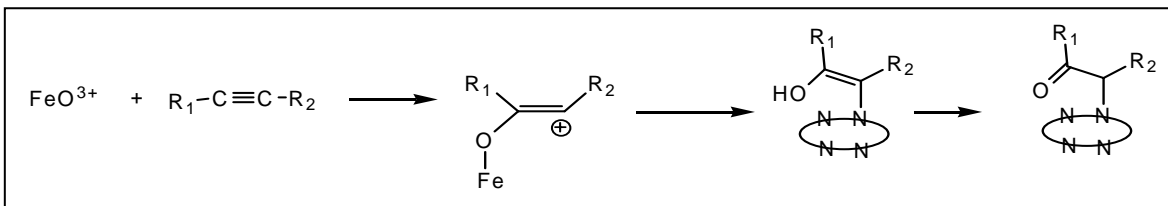


Figura II.ii.i6. Mecanismo propuesto para la alquilación del grupo hemo por acetilenos.

Al igual que las olefinas y los acetilenos, las dihidropiridinas pueden ser oxidadas por CYP450 y dar como producto un metabolito reactivo que alquila al grupo prostético hemo. Por ejemplo las 4-alkil-1,4-dihidropiridinas son oxidadas por las enzimas de CYP450, lo que provoca la formación de intermediarios radicales catiónicos que N-alkilan al grupo prostético hemo. No todas las dihidropiridinas provocan la alquilación del grupo hemo; la sustitución en la posición 4 del anillo de dihidropiridina es un aspecto muy importante. La alquilación del grupo hemo se lleva a cabo si la sustitución en la posición 4 es de un grupo no conjugado (metil, etil, propil). Pero no ocurre con grupos arilo (fenil) secundarios (isopropil) o conjugados (benzil).

II.II.j. Ensayos enzimáticos.

Con el objetivo de caracterizar la actividad de una isoforma de CYP450 en particular, se han desarrollado ensayos enzimáticos prácticamente específicos. En el presente trabajo sólo se examinan las isoformas CYP1A1 y CYP2E1, por lo que en esta sección se expondrán los ensayos enzimáticos correspondientes a dichas isoformas.

- CYP1A1 (66)

El ensayo para determinar la actividad enzimática de CYP1A1 se basa en la capacidad de ésta isoforma para realizar la O-desalquilación de la 7-etoxirresorufina y producir resorufina (Fig. II.ii.j1).

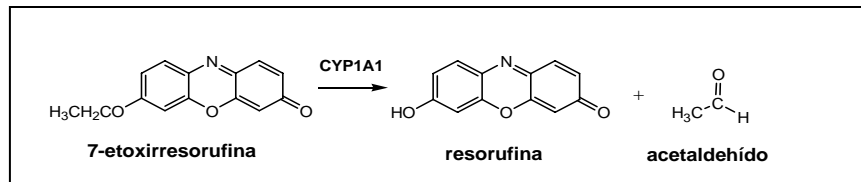


Figura II.ii.j1. o-desalquilación de la 7-etoxirresorufina, reacción para medir la actividad de CYP1A1

La resorufina puede ser detectada con un fluorómetro utilizando ajustado a una λ de excitación de 530nm y λ de emisión de 590nm.

- CYP2E1 (67, 68)

En ratas tratadas con etanol se observó que el p-nitrofenol (PNF) es rápidamente metabolizado a 4-nitrocatecol (4NC). A partir de estas observaciones se determinó que la enzima encargada de la transformación de PNF a 4NC era CYP2E1; desde entonces se considera a esta reacción como específica para esta isoforma.

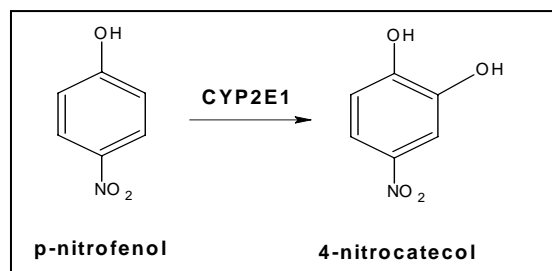


Figura II.ii.j2. La hidroxilación de p-nitrofenol para producir 4-nitrocatecol se utiliza para determinar la actividad de CYP2E1.

Al terminar la reacción se mide la cantidad de 4NC producido ajustando el espectrofotómetro de UV-visible a 510nm.

III. Material y técnicas experimentales.

III. i. Reactivos y sistema biológico.

- Marca Sigma: Reactivo de Bradford, benzo(a)pireno, histamina, TRITON X-100.
- Marca Baker: Cicohexanol, ácido sulfúrico, ácido fórmico, glicerol.
- Ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (Merck), o-ftaldialdehído (Fluka), Metanol (Burdick & Jackson).
- Ratas macho Wistar de 9 semanas de edad y peso promedio de 240g (adquiridas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas)

III. ii. Material y equipos.

- Cubetas desechables de metacrilato con un rango de utilidad de 285 a 750nm y un volumen máximo de 1.5mL Plastibrand®.
- Espectrofotómetro de doble haz UV-visible Camspec modelo M350.
- HPLC marca Perkin Elmer con un volumen de inyección fijo a 100 μL y un detector de fluorescencia.

III. iii. Tratamiento en ratas para la inducción de CYP1A1 y CYP2E1.

Las enzimas de CYP450 utilizadas para los estudios del presente trabajo fueron obtenidas de fracciones microsomales hepáticas de rata. Se realizaron dos tratamientos diferentes a ratas Wistar macho para obtener una mayor cantidad de las isoformas de interés.

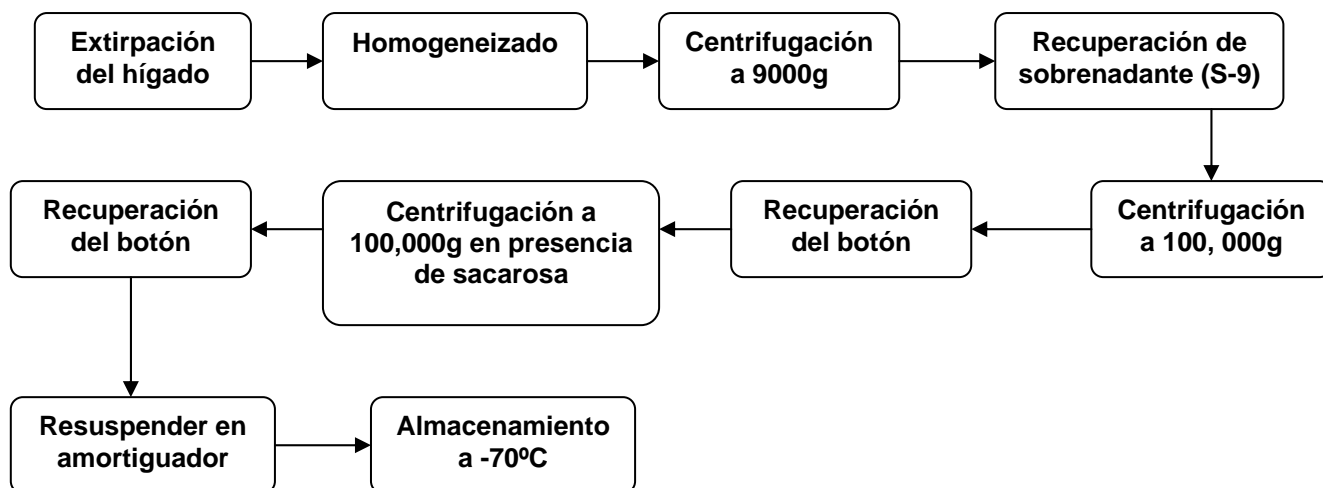
Para obtener fracciones enriquecidas con CYP1A1, se trataron ratas con benzo(a)pireno (inductor de CYP1A1) disuelto en DMSO, durante tres días en dosis de 20 mg/Kg, después de la última administración se retiró el alimento durante 24 hrs, posteriormente los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo su hígado.

Con el objeto de obtener fracciones microsomales enriquecidas con CYP2E1, se trataron ratas con ciclohexanol (inductor de CYP2E1) en el agua de beber de las ratas en una concentración de 2.5% (V/V) durante 3 días, al finalizar el tratamiento se retiró el alimento durante 24 hrs y posteriormente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se extrajo su hígado.

III. iv. Obtención de microsomas hepáticos de rata.

Una vez extraído el hígado de las ratas, se llevó a cabo una perfusión con KCl 150 mM frío, se pesó y luego se cortó en pedazos y se homogenizó en un volumen de 3mL de KCl por gramo del peso del hígado. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 9000g, a 4°C durante 10 min, y se trabajó con el sobrenadante (S-9), que luego es centrifugado a 100,000g durante

60 min a 4°C a 100 000g a 4°C durante 1hr; se desechó el sobrenadante y se recuperó el botón el cual se resuspendió en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4 y 0.25M de sacarosa en un volumen igual al obtenido en el S-9 y se centrifugó nuevamente a 100 000g durante 1hr a 4°C. Por último se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4 con 1mM DTT, 1mM EDTA y 20% de glicerol (v/v) en un volumen de 1/3 el volumen inicial. La fracción microsomal obtenida se almacenó a -70°C en alícuotas de 100µL (ver esquema III.iv.a) (69)



Esquema III.iv.a. Diagrama de flujo para la obtención de microsomas hepáticos de rata, para detalles ver texto.

III.v. Cuantificación de proteína.

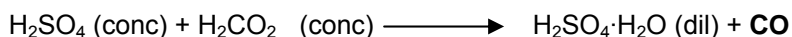
Una vez obtenida la fracción microsomal, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (70), para lo cual se realizó una curva patrón de albúmina en concentraciones conocidas (4, 8, 12, 16, 20µM) y se hizo reaccionar con 1mL de reactivo de Bradford, la reacción entre el reactivo de Bradford y las proteínas produce un color azul, y las muestras son leídas en el espectrofotómetro a una $\lambda = 595\text{nm}$.

III. vi. Cuantificación de CYP450 totales.

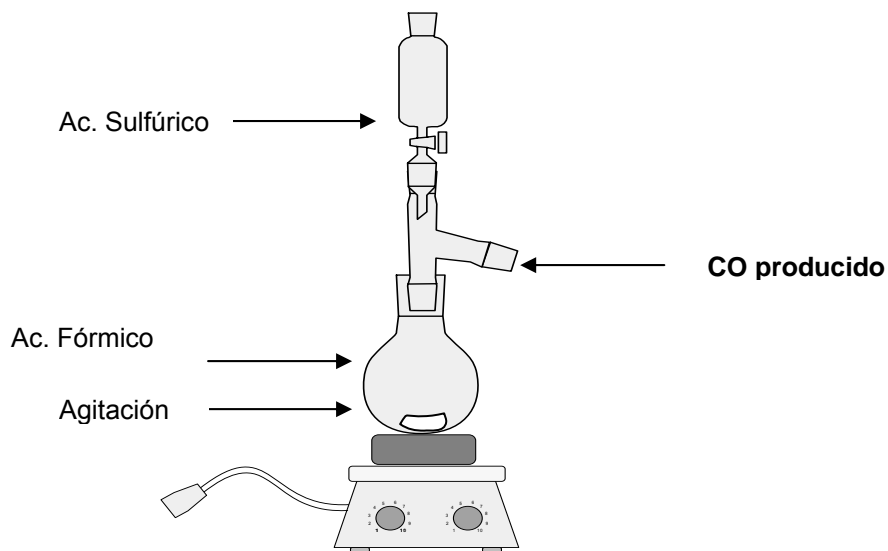
Para la cuantificación del CYP450 presente en las fracciones microsomales de hígado, se utilizó el método descrito por Omura y Sato (38, 39), en el cuál se usó 1mg/mL de proteína en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4, EDTA 1mM, 20%(v/v) glicerol y 0.4% (v/v) TRITON X-100, se prepararon 2mL de solución en un tubo de ensayo y se mezcla hasta que este homogénea, se divide el contenido del tubo de ensayo en dos celdas con un volumen de 1mL cada celda. Posteriormente se corre una línea base de 400 – 500nm, se sacan las dos celdas del espectro y se vierten en dos tubos de ensayo diferentes, a uno de los tubos se le burbujea CO a una velocidad de 1 burbuja /seg aproximadamente durante 3min, rápidamente

se le vierte una pizca de ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a los dos tubos y se corre un espectro de 400-500nm.

El monóxido de carbono fue producido al hacer reaccionar el ácido fórmico con ácido sulfúrico:



La reacción de producción de CO se llevó a cabo en el siguiente sistema:



Esquema III.vi.a. Esquema de generación de monóxido de carbono para la cuantificación de CYP450 totales. Este sistema se trabaja en una campana de extracción

Para este ensayo se utilizó el detergente TRITON X-100 con el objetivo de solubilizar las membranas microsomales y disminuir la turbidez de la solución en la celda, también se utiliza glicerol para evitar la desnaturalización de CYP450 debido al detergente (52).

Los estudios de cuantificación de CYP450 totales se llevaron a cabo en microsomas de ratas tratadas con benzo(a)pireno (B(a)P), ciclohexanol (CH) y sin tratamiento (CT) por triplicado.

CÁLCULOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CYP450 Y CYP420 (52).

$$[\text{CYP450}]_{\text{celda}} = (\text{Abs}_{450} - \text{Abs}_{490}) / 0.091$$

$$[\text{CYP450}]_{\text{sol. Stock}} = [\text{CYP450}]_{\text{celda}} * \text{Factor de dilución}$$

$$[\text{CYP420}]_{\text{Teórico}} = [\text{CYP450}] * (-0.041)$$

$$[\text{CYP420}]_{\text{celda}} = ([\text{CYP420}]_{\text{Teórico}} - (\text{Abs}_{420} - \text{Abs}_{490})) / 0.11$$

$$[\text{CYP420}]_{\text{sol. Stock}} = [\text{CYP420}]_{\text{celda}} * \text{Factor de dilución.}$$

Los cálculos para determinar la concentración de CYP450 totales utilizan la absorbencia a 490nm (punto isobéptico) como punto de referencia y se utiliza un coeficiente de extinción

molar de ($\Delta\epsilon$ 450-490) $91\text{mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, el cuál ha sido calculado utilizando preparaciones de CYP450 altamente purificadas (52).

Los cálculos para establecer la concentración de CYP420 también utilizan la absorbencia a 490nm como punto de referencia, en este caso se utiliza un coeficiente de extinción molar de $41\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y además se hace una corrección por la posible contaminación con methemoglobina en la obtención de microsomas hepáticos, para lo cual se considera en los cálculos un coeficiente de extinción de $110\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

III.vii. Estudios de diferencia espectral.

El tipo de unión de la histamina y CYP450 puede caracterizarse utilizando la técnica de diferencia espectral. Para este experimento se prepararon 2mL de una solución de microsomas con una concentración final de 1mg/mL en amortiguador de fosfatos de potasio 0.1M pH 7.4, con EDTA 1mM, 20%(v/v) glicerol y 0.4% (v/v) TRITON X-100 y se incubó a 37°C durante 3 min, posteriormente se dividió esta solución en dos celdas de metacrilato (1mL por celda) y se colocaron en un espectro de doble haz luminoso. Una vez colocadas las celdas en el espectro, se corrió una línea base de 350 a 500nm, luego se agregó a una de las celdas un volumen de 5 μ L de una solución 0.15 M de histamina para tener una concentración final de 0.781mM de histamina, en la celda de referencia se agregaron 5 μ L de amortiguador y se corrió el espectro. Posteriormente se siguió incrementando la concentración de histamina agregando siempre un volumen de 5 μ L, al final se obtuvieron cinco espectros de cinco diferentes concentraciones de histamina (0.781, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5mM).

Los estudios de diferencia espectral se llevaron a cabo con microsomas inducidos con B(a)P y con CH por duplicado.

Notas importantes:

- i. El amortiguador para diferencia espectral lleva el detergente TRITON X-100 para aclarar la solución de microsomas y facilitar su lectura en el espectrofotómetro, sin embargo el exceso de detergente puede desnaturalizar a la enzima, para evitar esta situación se agrega glicerol al mismo amortiguador, el cual es capaz de estabilizar las membranas de CYP450.
- ii. En la mayoría de los reportes de estudios de diferencia espectral en CYP450 no se lleva a cabo una pre-incubación a la enzima, sin embargo creemos que es importante hacerlo debido a que la conformación estructural de la enzima es diferente dependiendo de la temperatura de trabajo y este es un factor, que puede influir en los valores reales de las constantes de disociación espectral (Kd). Debido a que la temperatura fisiológica normal se encuentra alrededor de 37°C se decidió incubar a la enzima a esta temperatura, además

dentro del espectrofotómetro se ajustó un sistema regulador de la temperatura que nos permitió mantener una temperatura constante de 37°C dentro del espectrofotómetro.

- iii. Otro factor importante es el pH de trabajo, debido a dos factores fundamentales, el primero es que la carga de los aminoácidos contenidos en las proteínas varían con el pH, y por tanto la Kd puede variar dependiendo del pH de trabajo, el segundo es que la carga de la histamina también varía según el pH y por tanto la capacidad de interacción de la histamina con enzimas de CYP450 se ve afectada por las variaciones de pH. En el presente trabajo se utilizó un pH de 7.4.
- iv. Es importante que la adición de reactivo (en este caso histamina) no incremente el volumen final de reacción en más del 1%, ya que un mayor incremento puede causar variaciones en las lecturas del espectrofotómetro y provocar errores en los cálculos de Kd (71).

III.viii. Metabolismo de histamina por CYP2E1.

Para estudiar el posible metabolismo de la histamina por CYP2E1 se llevaron a cabo reacciones *in vitro* en presencia de NADPH, las concentraciones de los reactivos y las condiciones de reacción fueron las siguientes:

[CYP2E1] (Para supersomas y microsomas) = 1pmol / mL

[HA] = 2µmol / mL

[NADPH] = 0.5 µmol / mL

Amortiguador TRIS-HCl 50mM, MgCl₂ 25mM pH = 7.6

Temperatura = 37°C

Tiempo de reacción = 1hr

Volumen final de reacción = 1mL

La reacción fue protegida de la luz para evitar la degradación de alguno de los componentes de la reacción.

Al terminar la reacción se agregaron 250µL de HClO₄ 12% para precipitar la proteína, luego se centrifugó a 14 X 1000 min⁻¹ durante 5 minutos y el sobrenadante se recuperó por decantación. El sobrenadante recuperado fue guardado a 4°C para su posterior análisis. En este experimento se llevaron a cabo reacciones para supersomas de CYP2E1, microsomas inducidos con CH y como control negativo, reacción sin enzima. Todas las reacciones se hicieron por triplicado.

III.ix. Cuantificación de histamina en reacciones con CYP2E1.

Para saber si la histamina es metabolizada por CYP2E1, se decidió cuantificar la histamina presente en las reacciones con CYP2E1, para este objetivo se realizó una reacción entre la histamina y *o*-ftaldialdehído la cual da como resultado un producto fluorescente (Fig. III.ix.a) que puede ser detectado a 350 nm de excitación y 450nm de emisión **(28, 29, 72, 73)**.

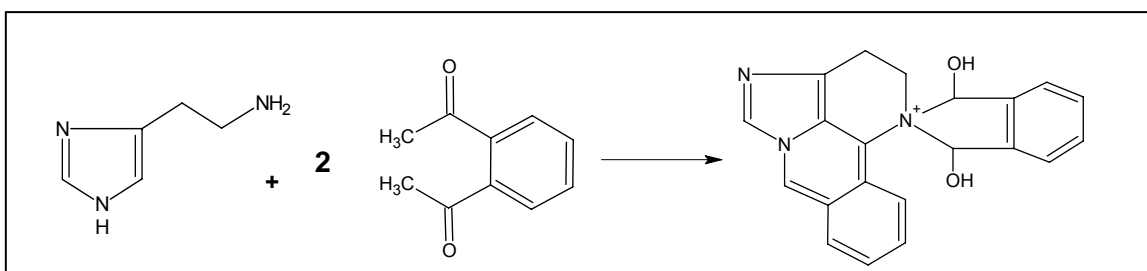


Figura III.ix. a. Reacción entre la histamina y *o*-ftaldialdehído, donde el producto formado es un fluoróforo que puede ser detectado a 350 nm de excitación y 450nm de emisión

La reacción con OPT se realizó de la siguiente manera:

Del sobrenadante recuperado en las reacciones con CYP2E1 se tomaron 10 μ L y se disolvieron en H₂O miliQ en un volumen final de 1.6mL, de esta nueva solución se tomaron 30 μ L y se disolvieron en NaOH (0.05M) en un volumen final de 1.7mL (pH \approx 12), esta solución se realizó en baño de hielo con frascos ámbar y fueron herméticamente cerrados con tapones de hule y anillo de metal, posteriormente se burbujeó nitrógeno durante 3 min cada frasco para desplazar el oxígeno contenido. Una vez burbujeado el nitrógeno, se agregaron 0.3mL de una solución de OPT 1%. Los frascos de reacción se dejaron toda la noche a -20°C y protegidos de la luz. Para detener la reacción entre HA y OPT y formar el fluoróforo se agregaron 0.5mL de H₂SO₄ (1.4mM) (pH \approx 2).

Notas importantes:

- La solución de OPT 1% se prepara a partir de OPT recristalizado en n-heptano caliente y se disuelve en metanol en un frasco color ámbar **(72-74)**.
- La dilución de la histamina de una concentración 2mM (inicial en las reacciones con CYP2E1) a una concentración aproximada de 120nM (final en la reacción con OPT), es importante por dos razones:

1) Las sales contenidas en el amortiguador afectan la formación del complejo HA-OPT inhibiendo por completo la fluorescencia. Entonces si se diluye la concentración de histamina

inicial, también se diluyen las sales del amortiguador, a una concentración tal que no afecte la formación del complejo HA-OPT.

2) Debido a que la fluorescencia del complejo HA-OPT es muy intensa, la señal en el HPLC puede saturarse a concentraciones altas de histamina y dificultar su cuantificación.

III.x. Sistema de HPLC.

Una vez formado el fluoróforo, éste fue analizado por HPLC, el instrumento utilizado fue marca Perkin Elmer con un volumen fijo de inyección de 100 μ L y un detector de fluorescencia ajustado a 350nm ex / 450nm em. Se utilizó una columna C18 marca Alltech Alltima, con una longitud de 250mm, un diámetro interno de 4.6mm y un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil que se utilizó fue una mezcla de Agua 75% y Metanol 25% con 1g / L de H₂SO₄ (pH \approx 2) **(74)**. Se utilizó un flujo de 1mL por minuto.

IV. Resultados.

IV.i. Cuantificación de CYP450 en microsomas inducidos con B(a)P, CH y sin inducción

Cuando se burbujea monóxido de carbono en microsomas hepáticos reducidos, se obtienen espectros como los de la figura IV.i.a. donde se presenta un máximo en 450 nm que se debe a la forma activa de CYP450 y otro máximo en 420 nm que es producto de la forma desnaturalizada de CYP450, a esta especie también se la conoce como CYP420. Esta metodología es la más ampliamente utilizada para cuantificar CYP450 totales. Los resultados de cuantificación derivados de estos espectros se resumen en la tabla IV.i.b.

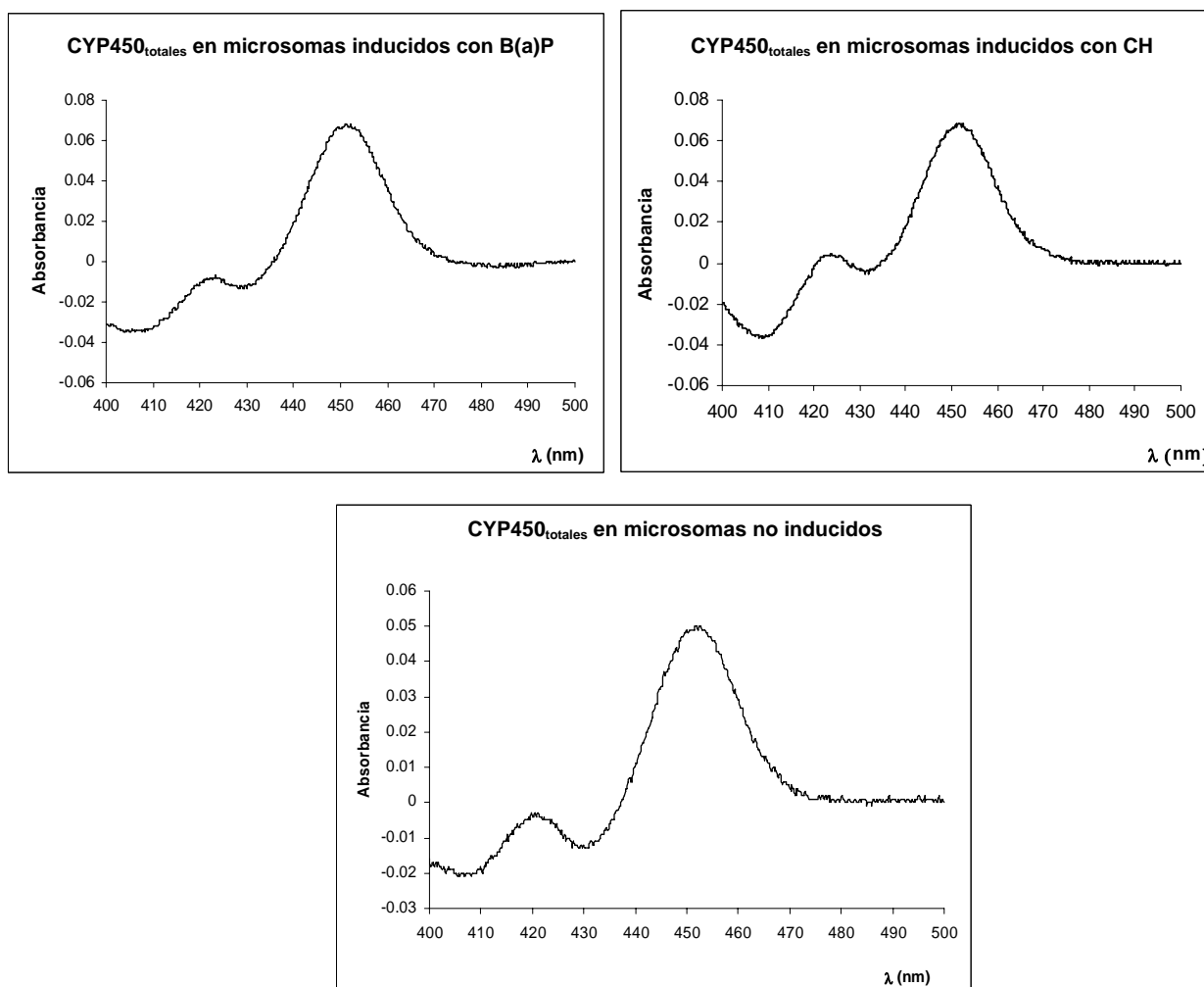


Figura IV.i.a. Espectros producidos de la unión entre el grupo hemo de CYP450 y monóxido de carbono en microsomas inducidos con B(a)P, CH y no inducidos.

Tipo de inducción	[CYP450] (nmol/mL)prom	Desv. Est.
Benzo(a)pireno	19.87179487	1.38275356
Ciclohexanol	20.53502054	1.386390942
Control	14.1025641	0.964803457

Tabla IV.i.b. Resultados de la cuantificación de CYP450 totales en los tres tratamientos de inducción. Se puede notar que las ratas no inducidas presentan menor cantidad de CYP450 que en las ratas inducidas.

IV.ii. Diferencia espectral con microsomas inducidos con benzo(a)pireno.

Como se mencionó en la sección I.ii.f., los espectros derivados de la técnica de diferencia espectral, son reflejo de los cambios en el estado de espín del átomo de hierro contenido en el grupo hemo de CYP450, y esta clase de estudios se utilizan para analizar el tipo de interacción entre CYP450 y alguna molécula de interés.

En la figura IV.ii.a. se muestran las diferencias espectrales obtenidas cuando microsomas hepáticos de rata tratadas con B(a)P interactúan con diferentes concentraciones de histamina.

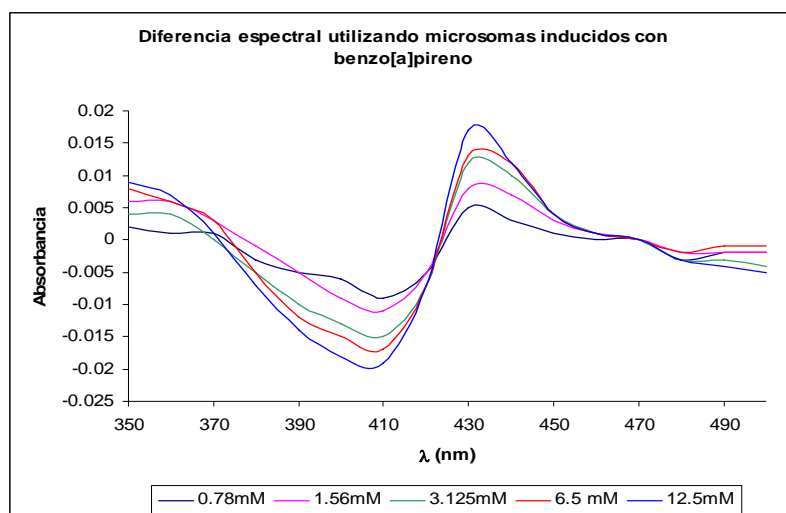


Figura IV.ii.a. Diferencia espectral incrementando las concentraciones de histamina, se muestra un mínimo en 409nm y un máximo en 430nm, estos espectros se clasifican como tipo II (ver sección I. II. f.), lo que significa una transición de un estado de alto espín a una de bajo espín.

Cuando se grafica el ΔAbs ($Abs_{max} - Abs_{min}$) contra la concentración de HA (mM), se obtiene un gráfico de saturación del tipo Michaelis – Menten y aunque los estudios de diferencia espectral no involucran ningún tipo de cinética, el modelo matemático de Michaelis – Menten se puede aplicar para estos estudios.

En la figura IV.ii.b. se observa claramente un comportamiento de saturación al graficar ΔAbs vs HA en microsomas inducidos con B(a)P.

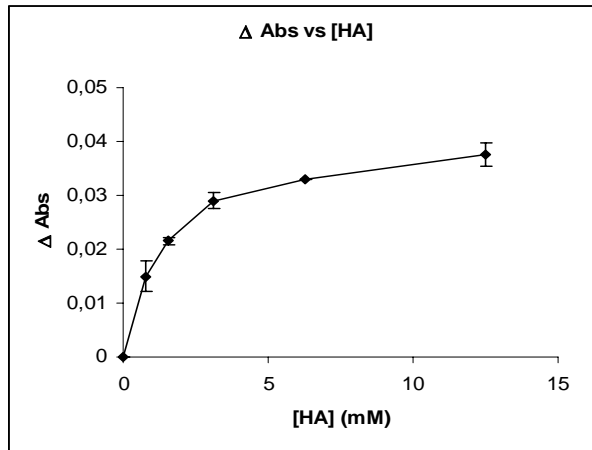
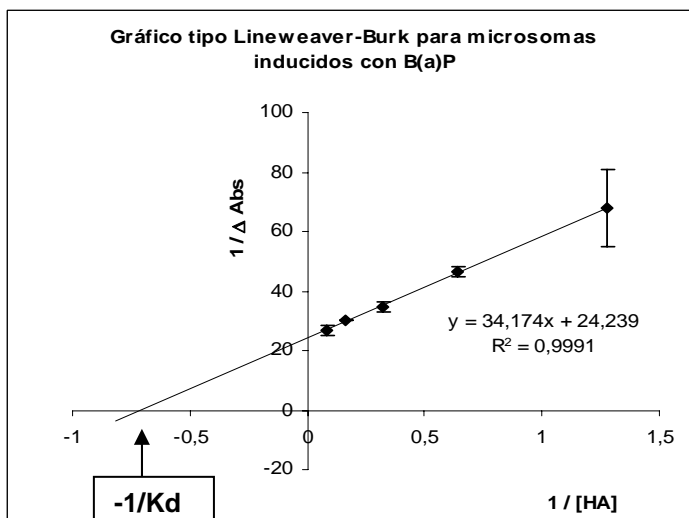


Figura IV.ii.b. Al graficar el Δ Abs (Abs max – Abs min) contra concentración de histamina se obtiene una curva de saturación similar a un modelo unireactante de cinética, como el modelo de Michaelis – Menten.

Con el objeto de cuantificar las constantes de disociación espectral del complejo HA-CYP450 con los diferentes tipos de microsomas, se hace un gráfico tipo Lineweaver-Burk o de doble recíproco, este gráfico nos permite hacer lineales a las gráficas de saturación.

En la figura IV. ii. c. se muestra la gráfica de doble recíproco ($1 / \Delta$ Abs vs $1 /$ HA) con microsomas inducidos con B(a)P.



Kd = 1.44 mM (± 0.009)

Figura IV. ii. c. Gráfico de doble recíproco tipo Lineweaver-Burk, permite linearizar la curva de la figura IV. I. b. y calcular la constante de disociación espectral (Kd).

IV.iii. Diferencia espectral con microsomas inducidos con ciclohexanol.

En la figura IV.iii.a. se muestran los espectros obtenidos de la diferencia espectral cuando microsomas hepáticos de rata tratadas con CH interactúan con diferentes concentraciones de histamina.

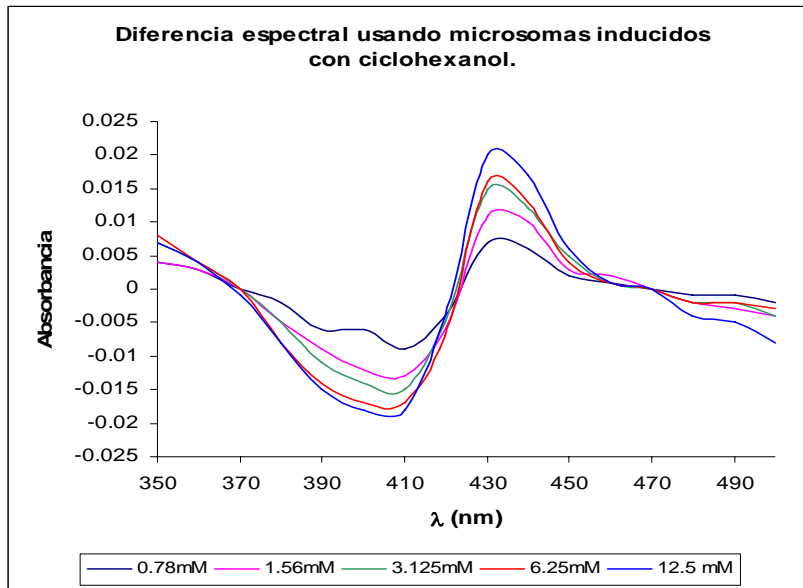


Figura IV.iii.a. Diferencia espectral en microsomas inducidos con ciclohexanol incrementando las concentraciones de histamina, se muestra un mínimo en 410nm y un máximo en 432nm..

En la figura IV.iii.b. se observa un comportamiento de saturación al graficar Δ Abs vs HA en microsomas inducidos con CH.

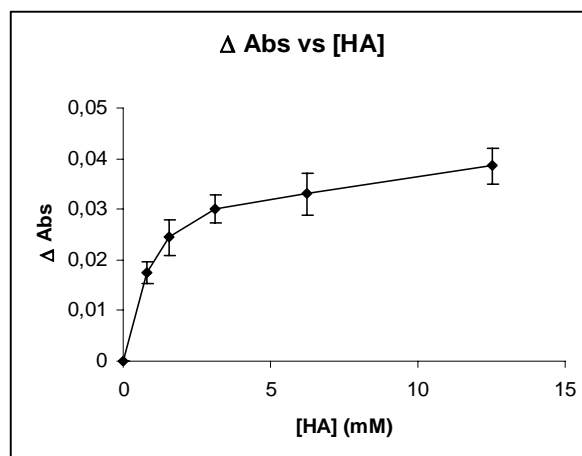
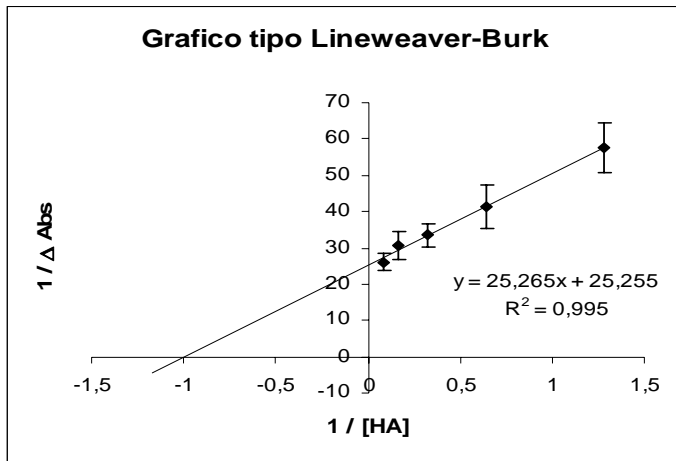


Figura IV.iii.b. Gráfico Δ Abs contra concentración de histamina se obtiene una curva de saturación similar a un modelo unireactante de cinética, como el modelo de Michaelis – Menten.

En la figura IV.iii.c. se muestra la gráfica de doble recíproco ($1 / \Delta$ Abs vs $1 / HA$) con microsomas inducidos con CH.



Kd = 0.99 mM (± 0.037)

Figura IV.iii.c. Gráfico de doble recíproco tipo Lineweaver-Burk, permite linearizar la curva de la figura IV. II. b. y calcular la constante de disociación espectral (Kd).

IV.iv. Comparación de constantes de disociación espectral (Kd) en microsomas inducidos con B(a)P y CH.

En la figura IV.iv.a. se presentan los valores de Kd obtenidos con el gráfico tipo Lineweaver – Burk, y se observa que los microsomas inducidos con B(a)P muestran un mayor valor de Kd que los microsomas inducidos con CH.

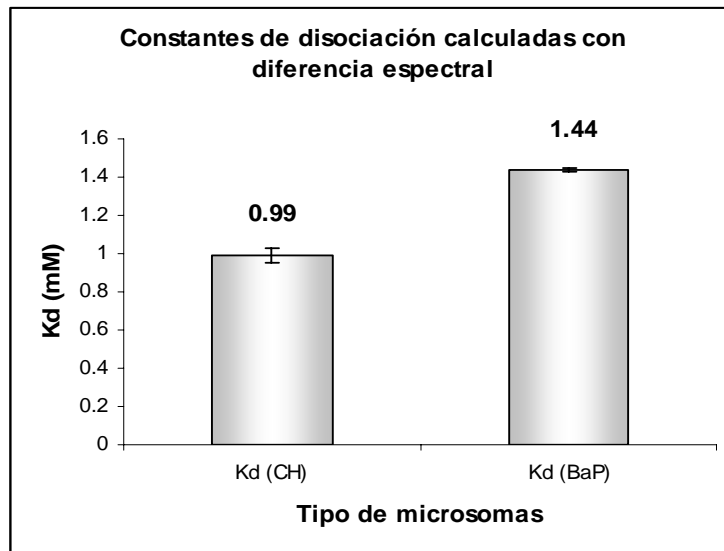


Grafico IV.IV.a. Constantes de disociación del complejo HA-CYP450 obtenidas a partir de los gráficos tipo Lineweaver-Burk.

IV.v. Cuantificación de HA en reacciones enzimáticas con CYP2E1.

Como ya se mencionó en los capítulos III.viii, III.ix y III.x, se llevaron a cabo reacciones para estudiar el metabolismo de HA por CYP2E1, para este objetivo se llevó a cabo una reacción entre HA y OPT para formar un fluoróforo el cual fue analizado por HPLC.

Los cromatogramas obtenidos en el HPLC del fluoróforo muestran tres picos, los cuales corresponden a tres isómeros del complejo HA-OPT (**74**) (Fig. IV.v.a)

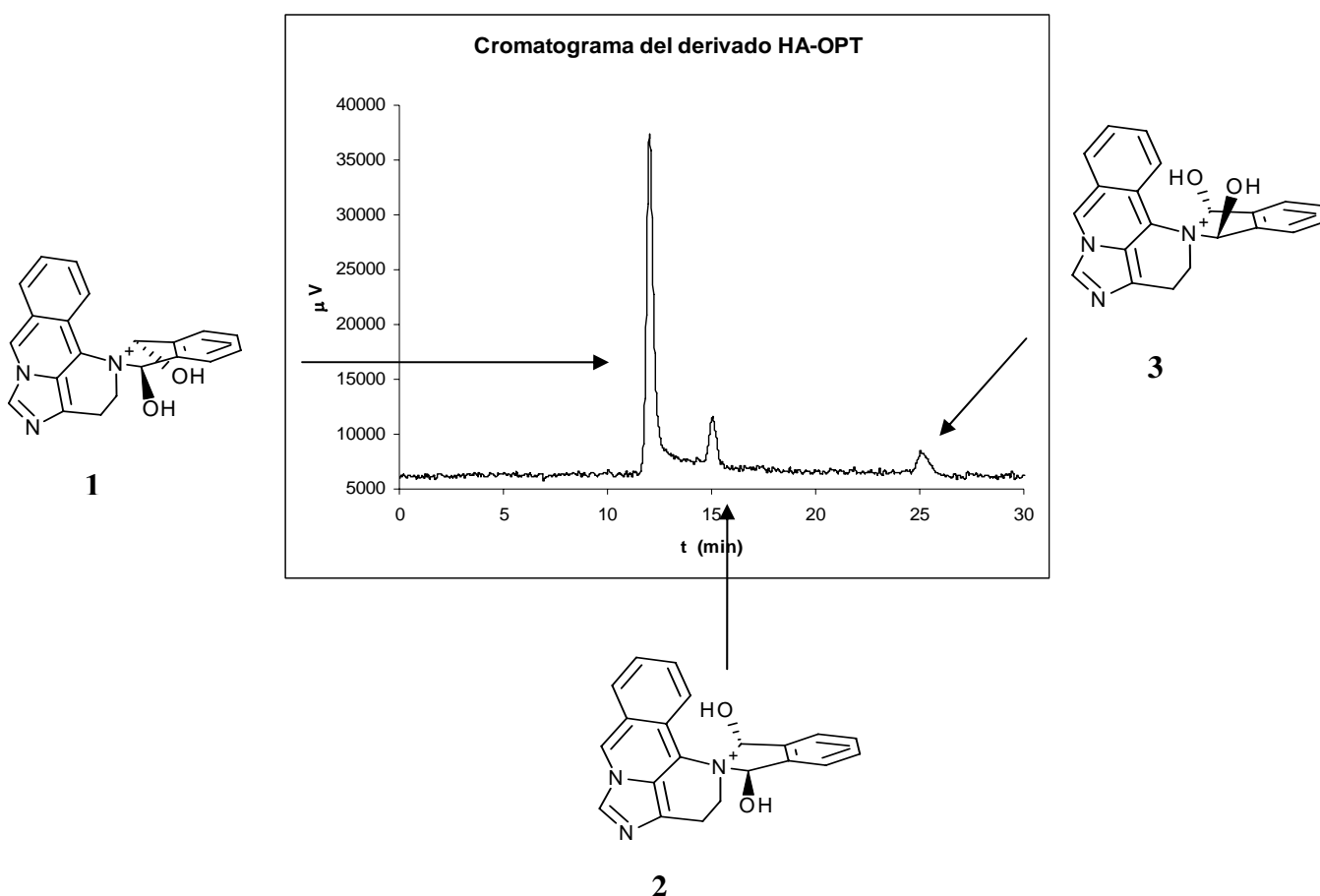


Figura IV.v.a. Cromatograma del derivado HA-OPT, donde se señala la identidad de los isómeros responsables de los picos en el cromatograma. **1** isómero cis mayoritario, **2** isómero trans, **3** isómero cis de minoritario.

Para la cuantificación de histamina se tomó el área del pico mayoritario (Tabla IV.v.b). El área del pico mayoritario en el control negativo de la reacción con CYP2E1 (HA en ausencia de CYP2E1); los valores obtenidos con supersomas y con microsomas inducidos con CH se corrigieron con respecto al control, cuyos valores se tomaron como 1 y a partir de este valor se calcularon concentraciones en unidades relativas (Tabla IV.v.c y Fig. IV.v.d). Cada experimento se hizo por triplicado y cada triplicado fue inyectado dos veces en el cromatograma, de tal manera que se obtuvieron seis valores de área de pico para cada experimento.

Sistema	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 4	Medición 5	Medición 6	Medición prom	Desv. Est.
HA + Am	845096.5	899400	813395	856645.13	834755.5	817175	844411.19	31530.79
HA + CYP2E1	800984	731359.64	778665.09	795615	778931	824777	785055.29	31319.67
HA + Mic. (CH)	707502	719045.9	745949	776525	799970	736103.33	747515.87	35035.17

Tabla IV.v.b. En esta tabla se muestran los seis valores del área para el pico mayoritario en el cromatograma del complejo HA-OPT. Todos los valores fueron obtenidos directamente del HPLC. HA+Am = histamina en amortiguador sin enzima, HA+CYP2E1 = histamina en presencia de supersomas de CYP2E1, HA+Mic. (CH) = histamina en presencia de microsomas inducidos con ciclohexanol.

Sistema	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 4	Medición 5	Medición 6	Medición prom.	Err. Est.
HA + Am	0.99	1.05	0.95	1.02	0.99	0.97	1	0.014
HA + CYP2E1	0.93	0.85	0.91	0.95	0.93	0.98	0.925	0.017
HA + Mic. (CH)	0.82	0.84	0.87	0.92	0.95	0.88	0.88	0.019

Tabla IV.v.c. Se muestran los valores de área de pico en unidades relativas, tomando como unidad el área promedio del sistema HA en amortiguador en ausencia de CYP2E1.

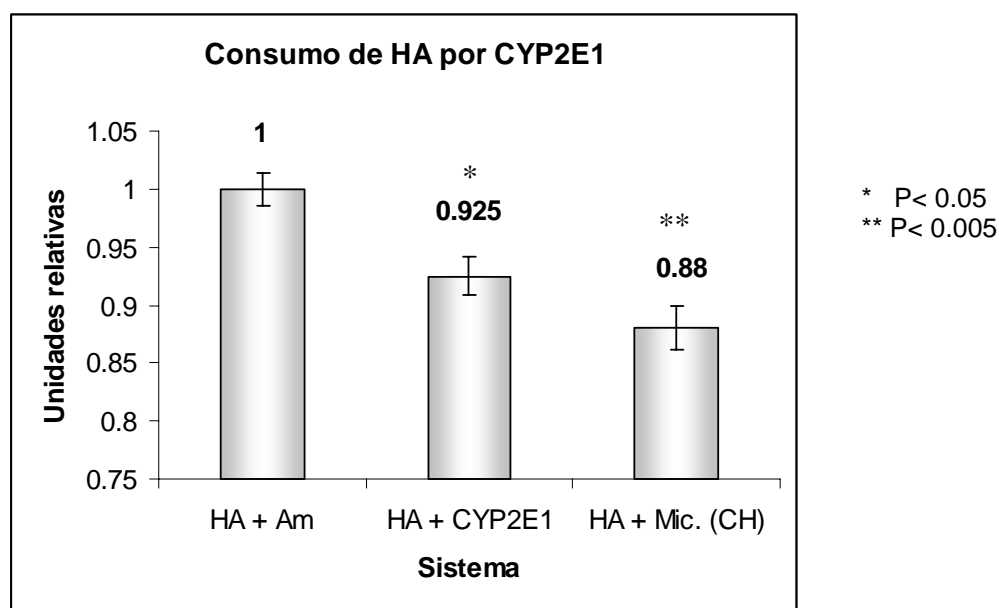


Figura IV.v.d. Gráfica de la tabla IV.v.c entre el tipo sistema de reacción y las unidades relativas. En HA + Amort., el tubo de reacción sólo tenía histamina resuspendida en el amortiguador. En HA + CYP2E1 se tenía una reacción completa en presencia de supersomas de CYP2E1 y NADPH. En HA+Mic. (CH) se tenía una reacción completa en presencia de microsomas inducidos con ciclohexanol y NADPH.

Los valores de P y de error estándar (Err. Est.), fueron obtenidos con una prueba de t de student de una cola y una significancia del 95% utilizando el programa estadístico de STATAtm 7.0 (Statistics /Data Analysis)

V. Discusión.

V.i. Tipo de interacción de la histamina y CYP450.

Los resultados de diferencia espectral muestran que la histamina produce espectros tipo II, esto significa que hay un incremento en el estado de bajo espín en el átomo de hierro de CYP450 (**35, 60**), este fenómeno se puede asociar con la coordinación de un par electrónico de la histamina con el átomo de hierro en el grupo hemo de CYP450 (**35, 60**), de tal forma que la histamina podría actuar como sexto ligante del átomo de hierro.

Los donadores de pares electrónicos en la molécula de histamina son los átomos de nitrógeno contenidos en esta molécula. Al pH de 7.4, en el que se llevaron a cabo los experimentos de diferencia espectral, existe la posibilidad de interacción de dos pares electrónicos con el átomo de hierro, pertenecientes a los nitrógenos en las posiciones 1 y 3 del anillo imidazol, ya que el grupo amino de la cadena lateral del anillo se encuentra protonado al pH de trabajo.

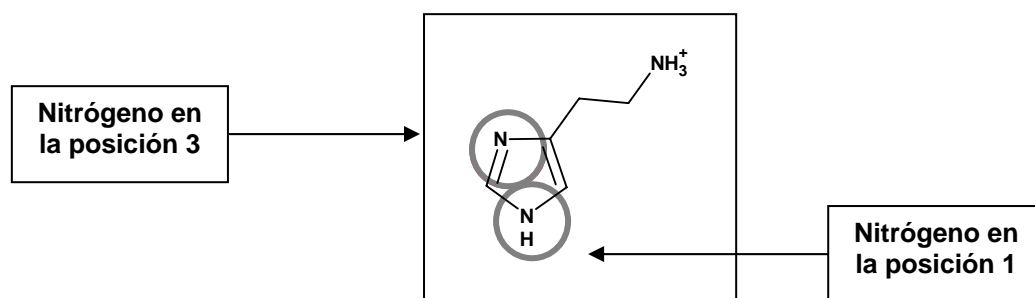


Figura V. i. a. Conformación de la molécula de histamina al pH de trabajo, se señala con un círculo los pares electrónicos libres del anillo imidazol que podrían interactuar con el átomo de hierro de CYP450.

Sin embargo, el par electrónico en el nitrógeno de la posición 1 se encuentra en resonancia en el anillo de imidazol como se observa en la figura V.i.b. Por otro lado el par electrónico del nitrógeno en la posición 3 se encuentra en el plano del anillo imidazol siempre disponible.

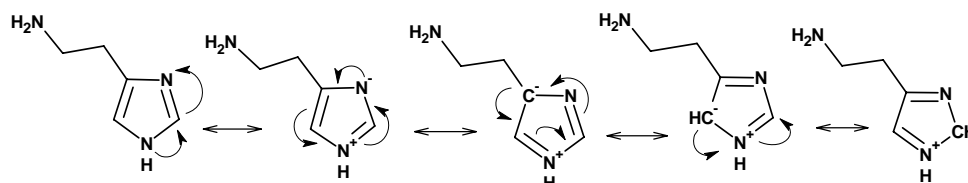


Figura V.i.b. Formas resonantes de la histamina, donde se observa que el nitrógeno en la posición 1 tiene su par electrónico en resonancia en el anillo de imidazol, lo que provoca que este par electrónico no esté disponible para la interacción con el átomo de hierro en CYP450

Estas observaciones son congruentes con estudios anteriores que han servido para sustentar la teoría de unión de los anillos imidazol, donde el par electrónico del nitrógeno 3 es el responsable de la interacción con CYP450 **(75-80)**.

V.ii. Constantes de disociación.

Con la técnica de diferencia espectral se pudieron realizar titulaciones y cálculos de constantes de disociación espectral (K_d), los valores de estas constantes reflejan dos cosas:

- 1) El valor de la constante de disociación en microsomas dependerá de las isoformas que se encuentren inducidas, en estos experimentos obtuvimos valores de 0.99 mM para microsomas inducidos para CYP2E1 y 1.44 mM para microsomas inducidos para CYP1A1, esto nos dice que aparentemente la histamina es más afín por CYP2E1 que por CYP1A1 (recordar que mientras más pequeña es la constante de disociación más afinidad existe entre la enzima y la molécula de estudio), lo cual es congruente con lo que se sabe de los sitios activos de estas isoformas, donde el sitio activo de CYP1A1 es grande ya que metaboliza compuestos aromáticos policíclicos de relativamente altos pesos moleculares **(89, 90)**, mientras que el sitio activo de CYP2E1 es pequeño ya que metaboliza compuestos de bajo peso molecular como compuestos orgánicos volátiles **(91)**. Al ser la histamina una molécula pequeña, entonces hay más probabilidades de que interactúe con isoformas afines a moléculas pequeñas como CYP2E1.
- 2) La magnitud de las constantes de disociación son del orden de 1×10^{-3} M, esto quiere decir que se necesitan estos órdenes de concentración para que la histamina pueda interactuar con CYP450. En condiciones normales la histamina se encuentra en concentraciones muy bajas **(12)**, sin embargo su concentración aumenta en condiciones patológicas como en la inflamación **(94)** o en una respuesta alérgica **(1)**, esto sugiere que los efectos de la interacción entre histamina y CYP450 podrán ser perceptibles en condiciones donde se liberen grandes concentraciones de la amina, como en las condiciones mencionadas.

Pensamos que la histamina presenta poca afinidad por CYP450 por dos razones principalmente:

- a) La histamina es una molécula muy polar y por tanto muy hidrofílica, mientras que el sitio activo de CYP450 es primordialmente hidrofóbico, esto dificulta la interacción del par electrónico de la histamina con el átomo de hierro de CYP450.
- b) La histamina presenta dos formas tautoméricas en equilibrio, como se expuso en la sección II. i., donde el tautómero τ posee un par electrónico libre en el nitrógeno impedido estéricamente, ya que la cadena hidrocarbonada se encuentra adyacente a ese nitrógeno,

este impedimento puede dificultar la interacción con CYP450 (76-78). Por otro lado el tautómero π no tiene tal impedimento estérico, por lo tanto proponemos que es esta forma tautomérica la que puede interactuar con CYP450.

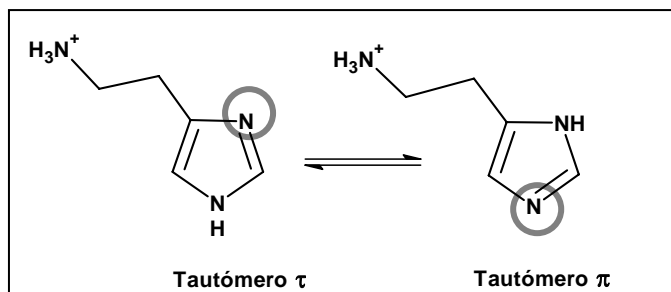


Figura V. ii. a Formas tautoméricas de la histamina señalando la posición del nitrógeno con el par electrónico libre

V.iii. Consumo de histamina en reacciones enzimáticas con CYP2E1.

La formación del fluoróforo entre HA y OPT y su posterior análisis en el HPLC nos permitió determinar el consumo de histamina en una reacción enzimática con supersomas de CYP2E1 y microsomas inducidos con CH.

Lo que se observó en estos experimentos es que existe consumo de histamina en supersomas de CYP2E1 y en microsomas inducidos con ciclohexanol, sin embargo el consumo de HA en microsomas inducidos con ciclohexanol es mayor y esto se puede deber a dos razones:

- 1) Probablemente en los microsomas inducidos con CH existan otras isoformas de CYP450 afines a la histamina y que sean capaces de metabolizar histamina y por esta razón vemos un mayor consumo.
- 2) Las enzimas de CYP2E1 se encuentren más activas en microsomas que en supersomas y esto es congruente con experimentos realizados en nuestro laboratorio, donde existe mayor consumo de NADPH basal (en ausencia de sustrato) en microsomas inducidos con CH que en supersomas de CYP2E1 (datos no presentados).

También es importante notar que en los cromatogramas de las muestras de las reacciones enzimáticas no se presenta ningún pico diferente a los correspondientes complejos de HA-OPT, esto puede deberse a que el metabolito producido no forma un complejo con OPT y por tanto no sea detectable en el fluorómetro.

V.iv. Congruencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los resultados obtenidos en el laboratorio con anterioridad.

La interacción del anillo imidazol de la histamina con el átomo de hierro en CYP450 puede explicar algunos de los resultados obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio (ver tabla V. iv. a):

	Inducción por HA in vivo	Oxidación de NADPH en presencia de HA	Actividad
CYP2E1	Hay inducción	Incremento en la oxidación de NADPH	inhibe la actividad
CYP1A1	Hay inducción	No hay oxidación de NADPH	inhibe la actividad

Tabla V. iv. a. Resultados del efecto de la histamina sobre CYP1A1 y CYP2E1 obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio.

- 1) Inducción de CYP2E1.** Esta isoforma tiene varios mecanismos de inducción, dentro de los que se encuentra la inducción por estabilización de la enzima **(81-83)**; en este tipo de inducción el inductor se une a la enzima y la estabiliza evitando su degradación, de tal forma que en este tipo de inducción no se incrementan los niveles de RNAm.

Se sabe que el imidazol puede inducir a CYP2E1 por el mecanismo de estabilización de la enzima **(81-83)** y también se sabe que produce un espectro tipo II con la técnica de diferencia espectral **(60)**, por lo que al unirse el imidazol al átomo de hierro en CYP450 estabiliza a la enzima y evita su degradación.

Con estos antecedentes y sabiendo que la histamina es estructuralmente muy semejante al imidazol y que se une a CYP450 de la misma forma, podemos proponer que el mecanismo de inducción es vía estabilización de la proteína, sin embargo es necesaria la cuantificación de RNAm para comprobar esta teoría.

- 2) Inducción de CYP1A1.** De esta isoforma se tiene bien caracterizado un solo tipo de inducción, donde un receptor citosólico puede interactuar con el inductor y a través de varios pasos producir mayor cantidad de la expresión de la enzima **(84-86)**, este tipo de inducción incrementa los niveles de RNAm.

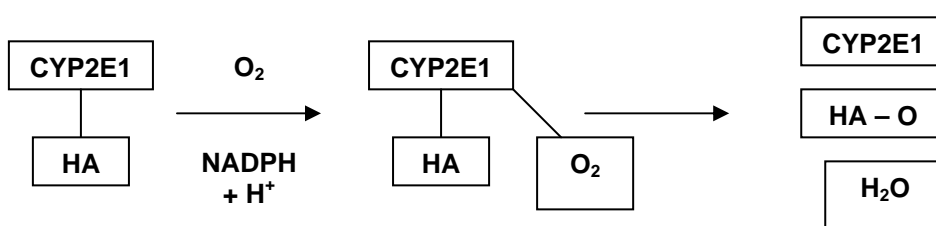
Con estos antecedentes se pueden plantear dos posibilidades, que la histamina sea capaz de interactuar con los receptores citosólicos y así incrementar la transcripción de la enzima, lo cual no ha sido descrito, y otra posibilidad es que el mecanismo de inducción sea por estabilización de proteína como lo proponemos para CYP2E1.

3) **Oxidación de NADPH por supersomas de CYP2E1.** El incremento en la oxidación de NADPH denota la existencia de alguna actividad catalítica y clásicamente, los sustratos de las isoformas de CYP450 incrementan la oxidación de NADPH al ser transformados. Sin embargo, los compuestos que producen cambios con espectro del tipo II, normalmente no se consideraban sustratos (63), ya que se coordinan con el átomo de hierro y no permiten la unión del oxígeno ni el paso de electrones. Entonces ¿por qué si la histamina es un compuesto que produce un espectro tipo II puede ser metabolizada por CYP2E1?. Para dar respuesta a esta pregunta hay que explorar más sobre la naturaleza de la bolsa catalítica de esta isoforma:

- Se piensa que CYP2E1 es una isoforma con la bolsa catalítica un poco reducida (91) ya que metaboliza agentes químicos de bajo peso molecular (91, 92).
- El átomo de hierro en CYP2E1 se encuentra en equilibrio entre el estado de alto espín y el de bajo espín, mostrando una gran cantidad en un estado de alto espín en ausencia de sustrato (91, 92), a diferencia de otras isoformas que se encuentran predominantemente en estado de bajo espín (92). Esta propiedad le permite oxidar NADPH sin necesidad de un sustrato, lo que puede generar especies reactivas de oxígeno (92, 93). Entonces la oxidación de NADPH puede ser reflejo de formación de especies reactivas de oxígeno y no de transformación directa de un sustrato. Cabe notar que sí existen sustratos clásicos para esta isoforma, como el p-nitrofenol, donde la oxidación de NADPH sí es atribuible a la transformación del sustrato.
- CYP2E1 puede metabolizar anilina (92), que es un compuesto que genera un espectro tipo II en microsomas hepáticos (60), lo que hace sospechar que en la bolsa catalítica de CYP2E1 existen aminoácidos que permiten la unión de aminas, lo que facilita el metabolismo de estos compuestos.

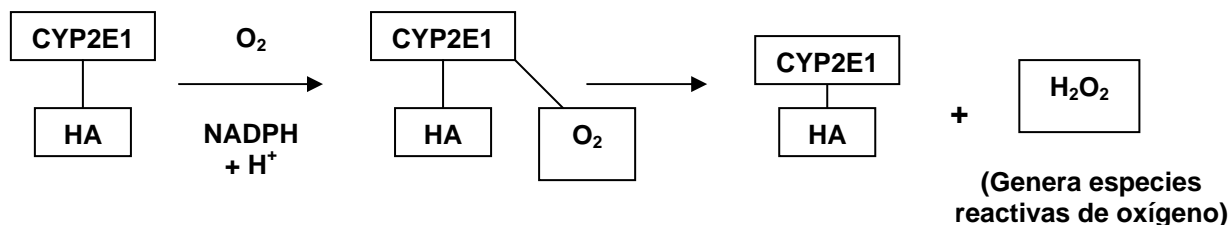
Con toda esta información podemos plantear las siguientes hipótesis que explicarían la oxidación de NADPH dependiente de la presencia de histamina:

- La histamina podría unirse a la bolsa catalítica de CYP2E1 de la misma forma en que lo hace la anilina y ser metabolizada de una forma clásica



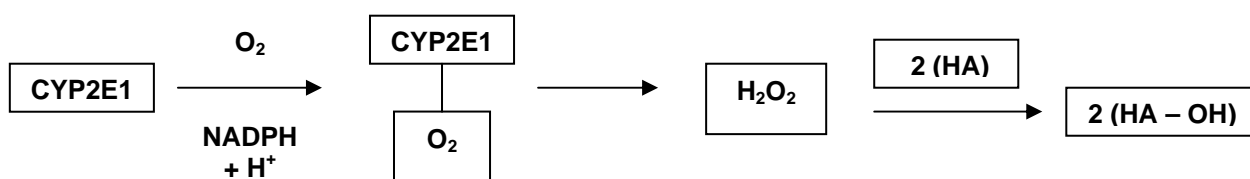
Esquema V. iv. b. Esquema de bloques donde se representa el metabolismo de la histamina (HA) como un sustrato clásico.

- La histamina produce un desacoplamiento en el ciclo catalítico de CYP2E1 y se forman especies reactivas de oxígeno, por lo que la oxidación de NADPH no se debe a la transformación de la histamina.



Esquema V. iv. c. Esquema de bloques donde se representa un desacoplamiento del ciclo catalítico de CYP2E1 y donde la histamina no es metabolizada pero se producen especies radicales de oxígeno.

- Se producen especies reactivas de oxígeno que pueden reaccionar con la histamina y formar un producto, de tal forma que existiera un metabolismo indirecto por CYP2E1.



Esquema V. iv. d. Esquema de bloques donde se representa un metabolismo indirecto de la histamina, donde son las especies reactivas de oxígeno las que transforman a la histamina.

Con los experimentos de HPLC se pudo evidenciar el consumo de histamina en reacciones enzimáticas con supersomas de CYP2E1 y microsomas inducidos con CH, lo cuál es un fuerte indicativo de una actividad metabólica sobre la amina. Sin embargo los detalles en el mecanismo de la reacción, la identidad de los metabolitos formados y el significado biológico de este metabolismo, son cuestiones que quedan por contestar.

- 4) Ausencia de oxidación de NADPH en supersomas de CYP1A1.** Como se observa en la tabla V.iv.a., no hay oxidación de NADPH en supersomas de CYP1A1 en presencia de histamina, y esto lo podemos explicar con el hecho de que la histamina se está uniendo al átomo de hierro de CYP450 y esto produce un incremento en su estado de bajo espín, y se sabe que la conformación de bajo espín afecta el potencial redox de CYP450 (51, 88), provocando que el paso de electrones sea desfavorable termodinámicamente, como el NADPH es el donador de electrones entonces no habrá no se oxidará este cofactor. Es importante hacer notar que estudios en enzimas purificadas han demostrado que esta isoforma se encuentra en equilibrio entre alto y bajo espín, y que la configuración de alto

espín es bastante considerable **(100)**. Entonces los efectos de la histamina sobre CYP1A1 y CYP2E1, serán determinados por la estructura catalítica de estas isoformas más que por el estado de espín del átomo de hierro.

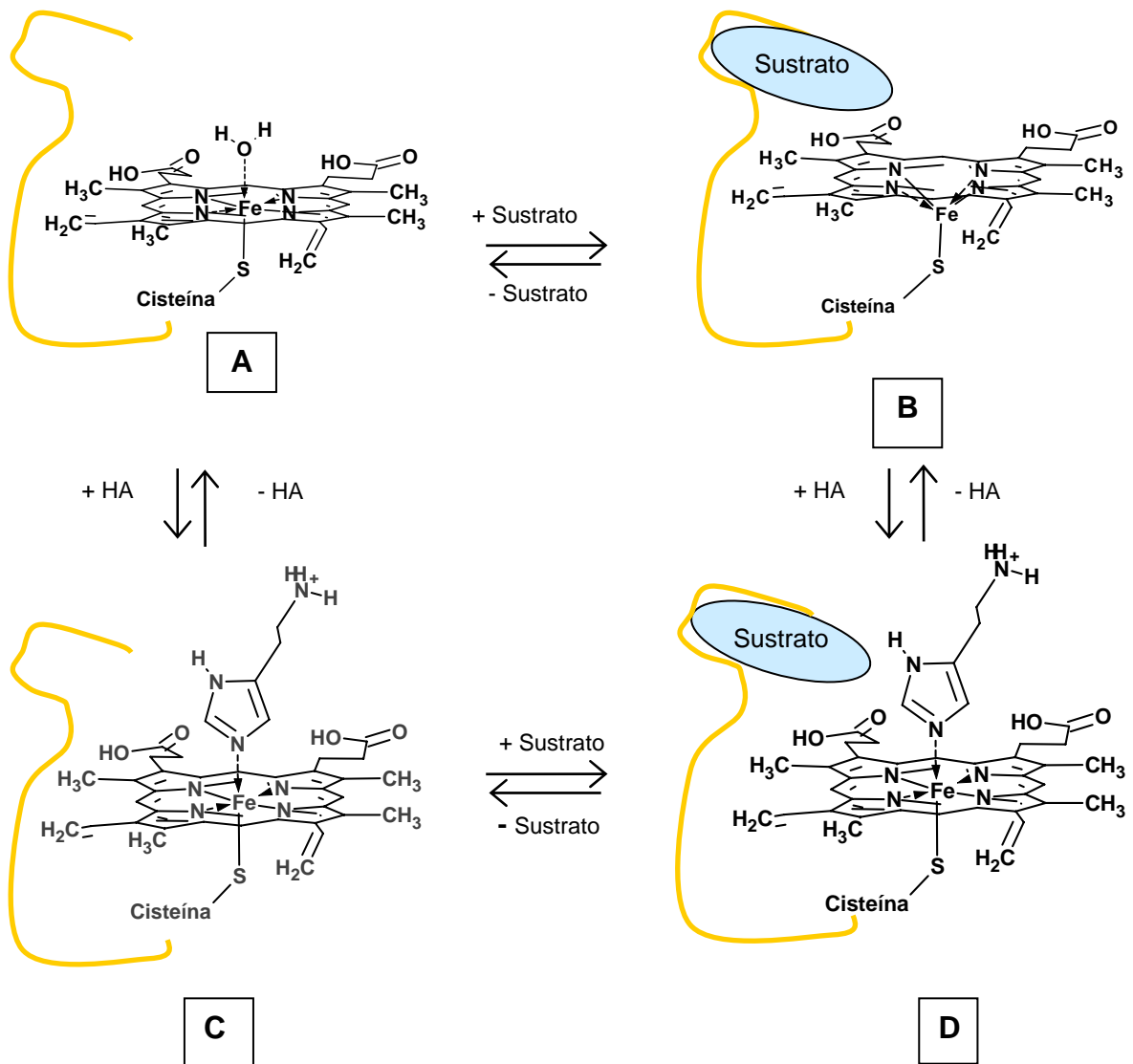
5) Inhibición de la actividad de CYP2E1. La histamina inhibe el metabolismo del p-nitrofenol en supersomas de CYP2E1, y esto puede deberse a dos razones primordialmente:

- Al unirse la histamina al átomo de hierro en CYP450 podría evitar la entrada del p-nitrofenol a la bolsa catalítica por impedimento estérico y así inhibir el metabolismo.
- Se puede dar el caso de que coexistan la histamina y el p-nitrofenol en la bolsa catalítica, pero la histamina al estar unida al átomo de hierro, puede evitar la entrada de oxígeno y el paso de electrones, lo que provocaría la inhibición del metabolismo.

6) Inhibición de la actividad de supersomas de CYP1A1. La histamina actúa como un inhibidor del tipo mixto en la actividad de CYP1A1. La inhibición tipo mixta denota la interacción del inhibidor en un sitio diferente al sitio de unión del sustrato, además se puede formar el complejo enzima-sustrato-inhibidor **(87)**. Los resultados de diferencia espectral muestran que la histamina se une al átomo de hierro en CYP450, además se sabe que los sustratos clásicos como la etóxirresorufina se unen en la región hidrofóbica de CYP450 **(54)**.

V.v. Esquema propuesto para la interacción entre la histamina y CYP450.

Con los resultados de interacción y las constantes calculadas a partir de la técnica de diferencia espectral y en conjunto con los estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio y toda la teoría de unión de ligantes en CYP450 sustentada por un gran número de investigaciones con diversas técnicas como cristalografía **(51, 57)**, EPR **(62, 95, 96)** y modelaje molecular **(89, 97, 98, 99)**, podemos proponer el siguiente esquema de interacción entre la histamina y enzimas de CYP450, el cual nos puede ayudar a visualizar de forma más clara y detallada el mecanismo de unión de la histamina y los posibles intermediarios que pueden existir dependiendo de la situación experimental:



Esquema V.v.a. Esquema general de interacción entre la histamina y el grupo hemo en CYP450. En todas las figuras se muestra una línea que proviene de la cisteína, la cual representa la región hidrofóbica en CYP450. En la figura **A** se observa que el átomo de hierro se encuentra hexacoordinado teniendo así cuatro átomos de nitrógeno del anillo de protoporfirina, un azufre de un residuo de cisteína y un oxígeno de una molécula de agua coordinada, esta conformación hexacoordinada del átomo de hierro presenta bajo espín. En la figura **B** la conformación es ahora pentacoordinada ya que se ha perdido la molécula de agua, y este estado es de alto espín. Se sabe que en estado basal **A** y **B** se encuentran en equilibrio, predominando la forma **A** en algunas isoformas y **B** en otras. Cuando un sustrato se une a la región hidrofóbica, es más favorable la conformación **B**, y es esta la conformación que comenzará con el ciclo catalítico de la enzima. Los estudios de diferencia espectral han demostrado que la histamina se une directamente al átomo de hierro de CYP450 y estudios previos proponen que la unión se da por el par electrónico del nitrógeno 3 en el anillo de imidazol (**72-77**), produciendo el complejo de la figura **C**. Los espectros de diferencia espectral podrían ser la transición de **A** hacia **C** o de **B** hacia **C**. Cabe notar que el intermediario de la figura **C** podría ser el responsable de la inducción por estabilización de CYP2E1. Los estudios de cinética enzimática muestran que la histamina se comporta como un inhibidor tipo mixto de la actividad de CYP1A1, lo que significa que en algún momento puede formarse el complejo CYP1A1-HA-sustrato que se encuentra representado en la figura **D**.

V.vi. Aportaciones del estudio.

El presente ha resultado tener las siguientes aportaciones:

- 1) Se describe detalladamente la técnica de diferencia espectral, la cual es muy sencilla y de bajo costo; sin embargo con el conocimiento del significado de los espectros obtenidos, es posible hacer conjeturas que nos conduzcan a un mejor entendimiento de la naturaleza de la interacción entre una sustancia de interés y las enzimas de CYP450.
- 2) Se describe la técnica de cuantificación de histamina con la formación de un fluoróforo con o-ftaldialdehído y su análisis en HPLC.
- 3) Los resultados derivados de este trabajo son complemento de los resultados obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, con lo que podemos esbozar una hipótesis general de los efectos de la histamina sobre CYP1A1 y CYP2E1.
- 4) Es importante que los investigadores que trabajan en las áreas de toxicología ambiental y epidemiología molecular, tomen en cuenta que los efectos de los contaminantes ambientales sobre la salud humana son producto de interacciones muy complejas que se llevan a cabo en el organismo y que la condición fisiológica en la que se encuentre el organismo puede modificar el comportamiento de esas interacciones.

En el presente trabajo se presentaron resultados que sugieren que la histamina, que es una molécula con una gran variedad de funciones en nuestro cuerpo, puede alterar los niveles y la actividad de enzimas de citocromo P450 de gran relevancia toxicológica como CYP1A1 y CYP2E1, pero cabe mencionar que la alteración en estas enzimas de fase I no es igual para todas las isoformas, por la diferente afinidad de la histamina hacia cada una, como se demostró. Lo anterior denota la complejidad de la interacción histamina – CYP450 en hígado de rata.

VI. Conclusiones.

- La histamina se une directamente al átomo de hierro en CYP450 produciendo un espectro tipo II en los dos tipos de microsomas utilizados.
- De los estudios de diferencia espectral se pudieron realizar gráficos de Δ Abs vs [HA], que dieron como resultado curvas de saturación tipo Michaelis-Menten, esto significa que sólo una molécula de histamina se encontraba interactuando con un átomo de hierro en CYP450, ya que el modelo tipo Michaelis-Menten se basa en la formación del complejo Enzima-Sustrato donde sólo existe una molécula de sustrato interactuando con una molécula de enzima.
- La histamina presenta constantes de disociación (K_d) del orden de 1×10^{-3} M, lo que sugiere que la unión HA y CYP450 sería posible sólo en ciertas condiciones fisiológicas, como la inflamación y las reacciones alérgicas.
- La histamina presenta valores de K_d menores en microsomas inducidos para CYP2E1, lo que sugiere que la amina de origen biogénico es más afín por CYP2E1 que por CYP1A1, además esto denota que la afinidad no será igual para todas las isoformas, por tanto los efectos de la histamina serán más perceptibles en unas isoformas que en otras.
- Existe consumo de histamina en reacciones enzimáticas con supersomas de CYP2E1 y con microsomas inducidos con ciclohexanol, lo que proporciona evidencias del metabolismo de histamina por enzimas de CYP450.

VII. Referencias.

- 1) Michel Dy y Elke Schneider (2004). Histamine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15, pp. 393-410.
- 2) Lorne J. Brandes, Frank S. LaBella, Gary B. Glavin, Frixos Paraskevas, Satya P. Saxena, Archibald McNicol y Jon M. Gerrard (1990). Histamine as an intracellular Messenger. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 40, No. 8, pp 1677-1681.
- 3) F. S. LaBella, G. Queen, G. Glavin, G. Durant, D. Stein y L. J. Brandes. H3 receptor antagonist, thioperamide, inhibits adrenal steroidogenesis and histamine binding to adrenocortical microsomes and binds to cytochrome P450.
- 4) Lorne J. Brandes, Gary M. Queen, y Frank S. LaBella (1998). Potent Interaction of Histamine and Polyamines at Microsomal Cytochrome P450, Nuclei, and Chromatin From Rat Hepatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 69, pp. 233–243.
- 5) Lorne J. Brandes, Gary M. Queen, y Frank S. LaBella (2000). N, N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy] ethanamine (DPPE), a chemopotentiating and cytoprotective agent in clinical trials: interaction with histamine at cytochrome P450 3A4 and other isozymes that metabolize antineoplastic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Vol. 45, pp. 298-304.
- 6) Frank S. LaBella y Lorne J. Brandes (2000). Interaction of histamine and other bioamines with cytochromes P450: implications for cell growth modulation and chemopotentialiation by drugs. *Cancer Biology*, Vol. 10, pp. 47-53.
- 7) Lorne J. Brandes, Gary M. Queen, y Frank S. LaBella (2002). Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochrome P450. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 85, pp. 820-824.
- 8) <http://www.icgeb.org/~p450srv/new/p450.html>
- 9) David F. V. Lewis (2001) en *Guide to Cytochromes P450. Structure and Function*. Taylor & Francis.
- 10) Dávila V.M., Belmont J.A, Albores A., Montero R. Environmental Mutagen Society 35th Annual Meeting (2004). Pittsburg Hilton Towers, Pittsburgh, PA, (presentación en cartel). Regulation of cytochrome P450 isoforms by histamine in rat liver.

- 11) Dávila V.M., Belmont J.A., Montero R. 13th NA ISSX / 20th JSSX Meeting (2005). Maui, Hawaii (presentación en cartel). "In vitro modification of rat cytochromes P450 enzymatic activity by histamine".
- 12) Kenneth S. Babe, Jr. y William E. Serafin. Histamina, bradicina y sus antagonistas, pp. 621-641. Publicado en: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Goodman y Gilman. 9ª edición en español (1996) Mc Graw – Hill iberoamericana.
- 13) Merck index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals 13ª edición. Published by Merck Research Laboratories. Merck & co., Inc. Whitehouse Station, NJ (2001). No. 4739, pp 842.
- 14) John A. Dean (1989). Lange manual de química tomo III, 1ª edición en español. McGraw – Hill pp 7-466, 7-467.
- 15) John A. Dean (1992). Lange's book of chemistry 14ª edición. McGraw-Hill Inc, pp. 8.52.
- 16) David T. Davies (1992). Aromatic heterocyclic chemistry. Oxford Science Publications, pp. 20, 21.
- 17) Graham A. Worth, Paul M. King and W. Graham Richards (1990). Histamine tautomerism and its mode of action. Biochimica et Biophysica Acta. 1036 pp. 158-161.
- 18) T. Prescott Atkinson, Martha V. White, y Michel A. Kaliner (1992). Histamine and Serotonin. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates 2nd edition. Editado por J. I. Gallin, I. M. Goldstein, y R. Snyderman. Publicado por Raven Press, Ltd., New York.
- 19) Aurelio A. Moya-Garcia, Miguel Ángel Medina y Francisca Sánchez Jiménez (2004). Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. BioEssays 27 pp. 57–63. Wiley Periodicals, Inc.
- 20) David L. Nelson y Michael M. Cox (2001). Lehninger Principios de Bioquímica tercera edición en español, pp. 844, 845.
- 21) <http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>
- 22) Rob Leurs y Henk Timmerman (1997). Histamine Receptors. Tocris Reviews No. 6, pp. 1-6. www.tocris.com.
- 23) Hua Xie y Shao – Heng He (2005). Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. World Journal of Gastroenterology; 11 (19), pp. 2851-2857.

- 24) <http://www.redalergia.com.ar/profesionales/contenidos/bibliodi/antiH.htm>
- 25) Tuan Nguyen, David A. Shapiro, Susan R. George, Vincent Setola, Dennis K. Lee, Regina Cheng, Laura Rauser, Samuel P. Lee, Kevin R. Lynch, Bryan L. Roth, y Brian F. O'dowd (2001). Discovery of a Novel Member of the Histamine Receptor Family. *Molecular Pharmacology* 59, pp. 427–433.
- 26) Lorne J. Brandes, R. P. Bogdanovic, M. D. Cawer y Frank S. LaBella (1987). Histamine and growth: Interaction of antiestrogen binding site ligands with a novel histamine site that may be associated with calcium channels. *Cancer research* Vol. 47, pp. 4025-4031.
- 27) V. Craig Trenerry, Philip A. Marshall and Kellie Windahl (2000). Determination of histamine in fish by capillary zone electrophoresis: method optimization. *Research and Development Report Series No. 2000-1*.
- 28) Helrich K (ed) (1990). *Official Methods of the AOAC, 15th ed*, Association of Official Analytical Chemist, Inc., Arlington, VA, USA, pp. 876-877.
- 29) Helrich K (ed) (2000). *Official Methods of the AOAC, Association of Official Analytical Chemist, Inc.*, Arlington, VA, USA, capítulo 35, pp. 17-19.
- 30) Deng-Fwu Hwang, Sheng-Hsiung Chang, Chyuan-Yuan Shiua, Tuu-ji Chai (1997). High-performance liquid chromatography determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatography B*, Vol. 693, pp. 23-30.
- 31) Julia Y. Hui y Steve L. Taylor (1983). High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 66 No. 4, pp. 853-857.
- 32) Dene E. Ryan y Wayne Levin (1990). Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmac. Ther.* Vol. 45, pp. 153-293.
- 33) G.Gordon Gibson y Paul Skett (1994) en *Introduction to drug metabolism 2nd edition*. Champman and Hall, pp. 35-75.
- 34) F. Peter Guengerich (2001). Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, Vol. 14, No. 6, 611-650.
- 35) P. David Josephy, Bengt Mannervik y Paul Ortiz de Montellano (1997). Capítulo 14, *Cytochrome P450*. *Molecular toxicology*, Oxford University Press, pp. 209-260.

- 36)** M. Klimberg (1958). Pigments of rat liver microsomes. Archives of biochemistry and biophysics, **75**, pp. 376-386.
- 37)** Omura T. (1993). Introduction: History of Cytochrome P-450. Cytochrome P-450 2nd edition. Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y. Tokio : Kodansha, pp. 1-15.
- 38)** Omura y Sato (1964).The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J.Biol.Chem. vol. 239, pp 2370-2378.
- 39)** Omura y Sato (1964).The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. J. Biol. Chem. vol. 239, pp 2379-2385.
- 40)** Toshio Yamano y Yoshiyuki Ichikawa (1978). Cytochrome P-450 – IV. Stability of cytochrome P-450 and conversion to cytochrome P-420: Isolation and properties of cytochrome P-420. Pharmac. Ther. A, Vol. 2, pp. 673-692.
- 41)** Larry G. Hansen y Barbara S. Shane (1994). Xenobiotic metabolism. Basic environmental toxicology. CRC Press, Inc. Cap. 3, pp. 49-105.
- 42)** Andrew Parkinson (2003). Capítulo 6. Biotransformation of xenobiotics. Essentials of toxicology, Curtis D. Klaassen y John B. Watkins III (editores), McGraw Hill, pp. 71-97.
- 43)** Tetsuya Kamataki (1993). Metabolism of Xenobiotics. Cytochrome P450 2nd edition. Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y. Tokio (Eds.): Kodansha, pp. 141-158.
- 44)** Yasushi Yamazoe y Ryuichi Kato (1993). Activation of Chemical Carcinogens. Cytochrome P450 2nd edition. Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y. Tokio (Eds.): Kodansha, pp. 159-170.
- 45)** Frank C. Lu. (1992). Biotransformación de sustancias tóxicas. Toxicología básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas. Editorial Harla. Cap. 3, pp. 21-33.
- 46)** Frank C. Lu. (1992). Carcinogenia. Toxicología básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas. Editorial Harla. Cap. 9, pp. 113-131.
- 47)** F. Peter Guengerich (1988). Roles of Cytochrome P-450 Enzymes in Chemical Carcinogenesis and Cancer Chemotherapy. Cancer Research Vol. 48, pp. 2946-2954.

- 48) Salah. A. Sheweita (2000). Drug-Metabolism Enzymes: Mechanisms and Functions. Current Drug Metabolism. Vol. 1, pp. 107-132.
- 49) Daniel W. Nebert y David W. Russell (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. The Lancet. Vol. 360, pp. 1155-1162.
- 50) Leslie Z. Benet, Deanna L. Kroetz y Lewis B. Sheiner (1996). Farmacocinética. Dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos. Las bases farmacológicas de la terapéutica 9ª edición en español, Goodman y Gilman editores, Mc Graw-Hill interamericana. Capítulo 1, pp. 3-29.
- 51) Thomas L. Poulos and Reetta Raag. (1992). Cytochrome P450_{cam}: crystallography, oxygen activation and electron transfer. The FASEB journal Vol. 6, pp. 674 – 678.
- 52) F.Peter Guengerich (2001). Analysis and characterization of enzymes and nucleic acids. Principles and methods of toxicology, 4th edition, edited by A. Wallace Hayes, pp. 1625-1687.
- 53) F. Peter Guengerich (2002). Rate –Limiting Steps in Cytochrome P450 Catalysis. Biol. Chem., Vol. 383, pp. 1553-1564.
- 54) Danièle Werck-Reichhart y Renè Feyereisen (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6): reviews 3003.1–3003.9.
- 55) <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/P450.html>.
- 56) Julian A. Peterson y Russell A. Prough (1986) Cytochrome P-450 reductase and cytochrome b₅ in cytochrome P-450 catalysis. En Cytochrome P-450 (Ortiz de Montellano, P.R., Ed.) pp 89-117. Plenum Press, New York.
- 57) Thomas L. Poulos (2003). The past and present of P450_{cam} structural biology. Biochemical and biophysical research communications 312, pp. 35-39.
- 58) John B. Schenkman, Herbert Remmer, y Ronald W. Estrabook (1967). Spectral Studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. Mol.Pharmacol.3, pp 113-123.
- 59) Jefcoate CR (1978): Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P450 by opticaldifference spectroscopy. Methods Enzymol 52:258–279.

- 60)** John B. Schenkman, Stephen G. Sligar y Dominick L. Cinti. (1981). Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacology and Therapeutics*. Vol.12. pp 43-71.
- 61)** James E. Huheey, Ellen A. Keiter y Richard L. Keiter. (1993) *Inorganic chemistry. Principles of Structure and Reactivity* 4th edition. Haper Collins College Publishers. pp 394-413.
- 62)** R. Tsai, C.A. Yu, I. C. Gunsalus, J. Peisach, W. Blumberg, W.H. Orme - Johnson y H. Beinert. (1970). Spin – State Changes in Cytochrome P-450_{cam} on Binding of Specific Substrates. *Proceedings of the National Academy of Science*. Vol. 66, No. 4, pp. 1157-1163.
- 63)** Paul R. Ortiz de Montellano y Norbert O. Reich (1986) *Inhibition of Cytochrome P-450 Enzymes*. En *Cytochrome P-450* (Ortiz de Montellano, P.R., Ed.) pp 273-314. Plenum Press, New York.
- 64)** Jiunn H. Lin y Anthony Y.H. Lu (1998) *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. *Clin. Pharmacokinet*. Nov ; 35 (5) pp 361- 390.
- 65)** Hanson, L. K., Eaton, W. A., Silgar, S. G., Gunsalus, I. C.m Gouterman, M., y Connell, C. R., (1976), *Origin of the anomalous Soret spectra of carboxycytochrome P-450*, *J. Am. Chem. Soc.* **98** pp. 2672-2674.
- 66)** Thomas K. H. Chang y David J. Waxman (1998). *Enzymatic Analysis of cDNA-Expressed Human CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 with 7-Ethoxyresorufin as Substrate*. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 107, *Cytochrome P450 Protocols*. Editado por: I. R. Phillips y E. A. Shephard © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 103-109.
- 67)** Koop DR (1986). *Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isoenzyme 3A*. *Molecular Pharmacology* **29** pp.399 – 404.
- 68)** Reinke, L.A and Moyer, MJ (1985). *p-nitrophenol hydroxylation*. *Drug Metabolism and Disposition* **13**(5), pp. 548 – 552.
- 69)** Montero, R., Serrano, L., Dávila, V. M., Ito, A. and Plancarte A. (2003). *Infection of rats with Taenia taeniformis metacestodes increases hepatic CYP450*. *Mutagenesis* **18** (2) pp. 211-216.
- 70)** Bradford M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Annals of Biochemistry* **72**, pp. 248-254.

- 71)** John B. Schenkman and Ingela Jansson (1998). Spectral Analyses of Cytochromes P450. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 107, Cytochrome P450 Protocols. Editado por: I. R. Phillips y E. A. Shephard © Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 103-109.
- 72)** R. Hakanson, A.-L. Rönnerberg and K. Sjölund (1972). Fluorometric Determination of Histamine with OPT: Optimum Reaction Conditions and Tests of Identity. *Analytical Biochemistry*, **7**, pp. 356-370.
- 73)** A.-L. Rönnerberg, C. Hansson, T. Drakenberg, and R. Hakanson (1984). Reaction of Histamine with o-Phthalaldehyde: Isolation and Analysis of the Fluorophore. *Analytical Biochemistry*, **139**, pp. 329-337.
- 74)** A.-L. Rönnerberg, C. Hansson and R. Hakanson (1984). High-Performance Liquid Chromatographic Determination of histamine in Biological Samples after Derivation with o-Phthalaldehyde. **139**, pp. 338-344.
- 75)** C. F. Wilkinson. (1972). Imidazole derivatives – A new class of microsomal enzyme inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 21, pp. 3187-3192.
- 76)** C. F. Wilkinson, Krystyna Hetnarski, G. Patricia Cantwell and Frederick J. Di Carlo. (1974). Structure – activity relationships in the effects of 1-alkylimidazoles on microsomal oxidation in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 23, pp. 2377-2386.
- 77)** C. F. Wilkinson, Krystyna Hetnarski and L. J. Hicks. (1974). Substituted Imidazoles as Inhibitors of Microsomal Oxidation and Insecticide Synergists. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 4, pp. 299-312.
- 78)** T. D. Rogerson, C. F. Wilkinson and Krystyna Hetnarski. (1977). Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 26, pp. 1039-1042.
- 79)** C. F. Wilkinson, Krystyna Hetnarski, Michael S. Denison and F. P. Guengerich. (1983). Selectivity of 1-phenylimidazole as a ligand for cytochrome P450 and as an inhibitor of microsomal oxidation. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 32, No. 6, pp. 997- 1003.
- 80)** D. J. Back and J. F. Tjia. (1985). Inhibition of tolbutamide metabolism by substituted imidazole drugs in vivo: evidence for a structure-activity relationships. *British Journal of Pharmacology*, **85**, pp. 121 – 126.

- 81)** Eliasson E., Johanson I. And Ingelman-Sundberg M. (1988). Ligand-dependent maintenance ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **150** (1), pp. 436-443.
- 82)** Eliasson E., Johanson I. And Ingelman-Sundberg M. (1990). Substrate - , hormone - , and cAMP – regulated cytochrome P450 degradation .*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***87**, pp. 3225-3229.
- 83)** Eliasson E., Souren Mkrtchian And Ingelman-Sundberg M. (1992). Homone – and substrate – regulated Intracellular Degradation of Cytochrome P450 (2E1) Involving MgATP – activated Rapid Proteolysis in the Endoplasmic Reticulum Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, No. 22, pp. 15765-15769.
- 84)** P. David Josephy, Bengt Mannervik and Paul Ortiz de Montellano (1997). Capítulo 15, The AH receptor and the toxicity of chlorinated aromatic compounds. *Molecular toxicology*, Oxford University Press, pp. 253 - 259.
- 85)** C. Delescluse, G. Lemaire, G. de Sousa and R. Rahmani. (2000). Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?. *Toxicology* **153**, pp. 73-82.
- 86)** Qiang Ma and Anthony Y. H. Lu. (2003). Origins of Individual Variability in P4501A Induction. *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 16, pp. 249-260.
- 87)** David L. Nelson y Michael M. Cox (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica* tercera edición en español, Capítulo 8, pp.266-268.
- 88)** S. G. Sligar, D. L. Cinti, G. G. Gibson and J. B. Schenkman. (1979). Spin state control of the cytochrome P450 redox potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 90, No. 3, pp. 925-932.
- 89)** D. F. V. Lewis (1996). *Molecular Modeling of Mammalian Cytochromes P450*. *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects* edited by Costas Ioannides. CRC Press, pp. 355-398.
- 90)** K. Kawajiri and S. Hayashi (1996). The CYP1 Family. *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects* edited by Costas Ioannides. CRC Press, pp. 77 - 97.
- 91)** M. J. J. Ronis, K. O. Lindros and Ingelman - Sundberg (1996). The CYP2E Family. *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects* edited by Costas Ioannides. CRC Press, pp. 211 - 239.

- 92)** D. F. V. Lewis, M. G. Bird, m. Dickins, B. G. Lake, P. J. Eddershaw, M. H. Tarbit and P. S. Goldfarb. (2000) Molecular modelling of human CYP2E1 by homology with the CYP102 haemoprotein domain: investigation of the interactions of substrates and inhibitors within the putative active site of the human CYP2E1 isoform. *xenobiotica*. vol. 30, no. 1, pp. 1-25
- 93)** Magnus Ingelman, Sundbeg and Inger Johansson. (1984). Mechanisms of Hydroxyl Radical Formation and Ethanol Oxidation by Ethanol-inducible and Other Forms of Rabbit Liver Microsomal Cytochromes P450. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 259, No. 10, pp. 6447-6458.
- 94)** D Huw Davies (2001). Immune System. *Encyclopedis of Life Sciences*. Nature Publishing Group. www.els.net.
- 95)** Su Chiau Cheng and Boyd W. Harding. (1973). Substrate-induced Difference Spectral. Electron Paramagnetic Resonance, and Enzymatic Properties of Cholesterol-depleted Mitochondrial Cytochrome P450 of Bovine Adrenal Cortex. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 248, No. 29, pp. 7263-7271.
- 96)** Kenji Kumaki, Mitsuo Sato, Hideo Kon and Daniel W. Nebert. (1978). Correlation of Type I, Tlpe II, and Reverse TypeI Difference Spectra with Absolute Changes in Spin State of Hepatic Microsomal Cytochrome P450 Iron from Five Mammalian Species. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 253, No. 4, pp. 1048-1058.
- 97)** Ilia G. Denisov, Thomas M. Makris, Stephen G. Sligar and Ilme Schlichting. (2005). Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews*, **105**, 2253–2277.
- 98)** Sason Shaik, Devesh Kumar, Samue"l P. de Visser, Ahmet Altun, and Walter Thiel. (2005). Theoretical Perspective on the Structure and Mechanism of Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*, **105**, 2279-2328.
- 99)** M. D. Segall, M. C. Payne, S. W. Ellisoe, G. T. Tuckeroe and R. N. Boyes. (1998). An *ab initio* approach to the understanding of_cytochrome P450 – ligand interactions. *Xenobiotica* , 1998, Vol. 28, No. 1, pp. 15 – 20.
- 100)** Alexey Chernogolov, Joachim Behlke, Wolf-Hagen Schunck, Ivar Roots, and Dieter Schwarz. (2003). Human CYP1A1 allelic variants: baculovirus expression and purification, hydrodynamic, spectral, and catalytical properties and their potency in the formation of all-trans-retinoic acid. *Protein Expression and Purification* **28**, pp. 259–269.