



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

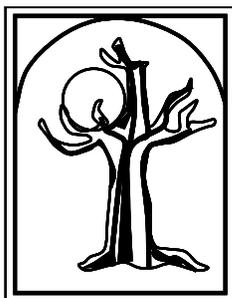
**PARTICIPACIÓN DE LA HISTAMINA EN LA
REGULACIÓN DE ISOFORMAS DE CYP450
EN HÍGADO DE RATA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

VÍCTOR MANUEL DÁVILA BORJA



BIOMÉDICAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. REGINA D. MONTERO MONTOYA

México D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Con gran cariño, admiración y respeto, a la Dra. Regina Montero Montoya. Por creer en mí desde el principio y brindarme su apoyo incondicional en momentos difíciles, por permitirme crecer en lo profesional y en lo académico, por su confianza y sus críticas. Gracias por introducirme en el maravilloso mundo de la Toxicología.

Al Dr. Javier Espinosa. Por compartir conmigo su conocimiento sobre los citocromos P450, por su confianza y amistad, pero sobre todo por escucharme y brindarme su consejo. Por supuesto, también por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Dr. Rafael Moreno Sánchez. Por distinguirme con su confianza, por sus comentarios y sugerencias, que fueron clave en el desarrollo de esta investigación, por compartir conmigo su experiencia y conocimiento de la bioquímica, con un sentido responsable y crítico.

Al Dr. Arnulfo Albores. Por su amistad y por compartir conmigo su conocimiento y sus observaciones. Por su apoyo en el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Rafael Saavedra. Con profundo agradecimiento por sus comentarios y asesoría.

A los Doctores J. Edgardo Escamilla Marván, Rafael Camacho Carranza, Rolando Hernández Muñoz y Guillermo Elizondo Azuela. Por sus comentarios y sugerencias, que sin duda han mejorado la presentación de este trabajo.

Con cariño a la Dra. María Eugenia Gonsebatt. Por brindarme su confianza y su apoyo.

Con cariño y admiración a la Dra. María Elena Flores. Por escucharme, brindarme su consejo y distinguirme con su amistad.

Con profundo agradecimiento al M.V.Z. Luís Serrano García. Por ser un gran amigo en las cosas buenas de la vida, y por escucharme en los momentos difíciles, por su ayuda y asesoría en el desarrollo de la presente investigación.

Con gran cariño y admiración a mi amigo y hermano, al Químico Javier A. Belmont Díaz. Gracias por crecer conmigo en esto de los citocromos P450, por tu apoyo y dedicación, que han hecho de este trabajo algo concluído.

Con gran aprecio a la M. en C. Diana María Escobar. Por distinguirme con su confianza y amistad, por compartir su experiencia profesional.

A la Dra. Sara Rodríguez. Por su ayuda en la determinación enzimática de fracciones celulares.

A mis compañeros y amigos Diego A. Alonzo y Fernanda Cisneros. Por creer en los citocromos P450 y la histamina. Gracias por su colaboración, que seguro estoy brindará más frutos.

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio, Luís Serrano, Antonio Araujo, Javier Belmont, Paloma Carranza, Diego Alonzo, Karen Suárez, Betzabé Nieto, Fernanda Cisneros, Omar Ochoa y Dulce. Con mucho cariño y agradecimiento, porque con Ustedes es como sentirse en casa y en familia, gracias por su amistad, su confianza, sus críticas y su apoyo. Siempre los tendré en mi pensamiento, en donde quiere que esté.

A Angélica, Zenaida y Lorena, de la Coordinación del Posgrado en Ciencias Biomédicas. Por su amabilidad y tener siempre una sonrisa para los estudiantes.

Con singular agradecimiento a Blanca Huerta (Blanquita) y Azucena Ayala (Azu). Por tener siempre una sonrisa y un trato agradable en la Coordinación de Enseñanza.

A este gran país que es México. Por su historia y su gradeza, porque creo en él, en su gente y en sus instituciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En especial al Instituto de Investigaciones Biomédicas. Ha sido para mí, y seguirá siendo un orgullo el formar parte de esta honorable institución. Gracias.

Finalmente, mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (registro 176503) para la realización de mis estudios de doctorado.

DEDICATORIAS

A los dos seres maravillosos que un día unieron sus almas para concederme el preciado regalo de la vida. A Ustedes debo comprensión, infinito amor, entrega, apoyo y confianza. Gracias por estar conmigo siempre.

A mis padres:

Pascuala Borja y Lorenzo Dávila

Con todo mi cariño y admiración para mis incansables compañeros de batalla, Francisco Javier y Luís Antonio. Gracias por creer en mí. Gracias por enseñarme a luchar, gracias por no dejarme caer.

Para mis hermanos Enrique, Claudia y Enerit. Siempre los llevó en el corazón.

En memoria de mis abuelos María del Refugio y Francisco.

Con cariño para mis tíos Jesús y Alma, y mis primos Sergio, su esposa Sandra y sus hijas Salma y Lizbeth. Para Maricruz, por ser tan valiente. A Nancy, por todo su cariño. A Armando, Magdalena, Yuri e Ivonne.

Con gran cariño para mis tíos Domingo y Juana, por estar siempre conmigo en todo momento. Gracias por su cariño y su apoyo. A mis primos y compadres, Marco y Angeles y mi ahijado, el pequeño David. A mis primas Aracelí y Verónica.

A mis tíos Guadalupe y Felipe. Por todo su cariño y apoyo.

A mis tíos Humbertina, Natividad, Josefina, Sidronio, Inocente, Celerina, María de los Angeles, Jorge y Costa. Gracias por todo su apoyo, cariño y consejo; pero sobre todo por darme el calor de una gran familia.

En memoria de mi tía Eva Borja. A mi tío Salvador. A mi tía Francisca y mi primo José.

A mis tíos Benny e Isaías, por toda su confianza y cariño.

A mis abuelos Teófilo Dávila y Tomasa Reyes. Por tenerme en sus oraciones.

Con todo mi cariño, admiración y respeto, a mis amigos y hermanos Rolando Carrisoza (Boulita) y Sergio López (Gordo). Por reír conmigo en los momentos más felices y acompañarme en los difíciles.

A Delfina Carranza. Gracias por reservar para mí un espacio en tu corazón, por escucharme y apoyarme.

A mi amigo del alma José Calderón, a su esposa Norma y los pequeños Normand y Arí.

Con cariño a mis amigos Sergio Badillo, César Muñoz y Eduardo Mejía.

Con profundo agradecimiento al Sr. Esquerro y Ariel. Por toda su confianza, sus regaños, cariño, amistad y consejos. Por tener siempre una sonrisa para mí.

Con profundo agradecimiento a mi amigo René Reyes, por todo su apoyo.

Con admiración a mi primo Bertín y su esposa Fabiola, sus pequeños Christopher y Linnette. Gracias por todo su cariño.

A la Dra. Blanca Martinelli, con admiración y respeto; por su ayuda profesional en los momentos más difíciles.

Con mucho respeto a la Sra. Irma López, por su cariño y grandes charlas de café.

A todos mis amigos, con los que he crecido profesional y personalmente. Aquellos, con los que he compartido el apasionante mundo de la biología, con los que en muchas ocasiones de parranda, bohemias, navidades y campamentos, hemos soñado con poder mejorar el mundo. Con mucho cariño para Luís (Compa), Juan Carlos (Ratman), Lian (China), Artemisa (Arte), Pablo y Myrna (Ñoña).

A mis amigos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Jorge, Wendy, Gerardo, Roxana, Manuel, Mariana, Patricia Guzmán, Blanca, Juan Carlos (JC), Conny, Ricardo, Perla, Karina, Octavio y Brenda. Gracias por su amistad y por hacer de mi estancia en el instituto, una etapa maravillosa. A la M. en C. Flor Martínez, por su cariño y apoyo.

A mis amigos Francisco Ledesma (Paco) y Omar Farfán.

De manera especial a Giovanna Salamanca, Ana Valencia, Danny y Perla. Por todo su cariño y apoyo, por compartir conmigo momentos agradables, y por aprender con Ustedes.

A la M. en C. Sandra Luz Hernández. Por todo su apoyo y confianza.

A la Sra. Delfina Aquino. Por su cariño, ayuda y comprensión.

A la Sra. Margarita Salazar. Por todo su cariño y su apoyo.

PENSAMIENTOS

ES TAN GRANDE EL PLACER QUE EXPERIMENTA UN HOMBRE AGRADECIDO,
QUE VALE LA PENA NO SER UN HOMBRE INGRATO.

Séneca

NO TE QUEJES, SI SUFRES. SE PULE LA PIEDRA QUE SE ESTIMA, LA QUE VALE
¿TE DUELE? DEJATE TALLAR, CON AGRADECIMIENTO, POR QUE DIOS TE HÁ
TOMADO EN SUS MANOS COMO UM DIAMANTE...NO SE TRABAJA ASÍ UN
GUIJARRO VULGAR.

San José María Escrivá de Balaguer

EN LAS GRANDES ADVERSIDADES, TODA ALMA NOBLE APRENDE A CONVERSE
MEJOR.

Friedrich von Schiller

ATESORAR LOS SUEÑOS, NO GUARDA EL MISMO VALOR, QUE SI LOS
HACEMOS REALIDAD.

Víctor M. Dávila

Contenido

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 HISTAMINA	3
3.1.1 <i>Importancia biológica</i>	3
3.1.2 <i>Metabolismo de la histamina</i>	5
3.1.3 <i>Receptores clásicos de la histamina</i>	8
3.1.3.1 Receptor H1	8
3.1.3.2 Receptor H2	9
3.1.3.3 Receptor H3	10
3.1.3.4 Receptor H4	10
3.1.4 <i>Inflamación y toxicidad</i>	11
3.2 CITOCROMO P450	15
3.2.1 <i>Generalidades</i>	15
3.2.2 <i>Ciclo catalítico de CYP450</i>	19
3.2.3 <i>Mecanismos que regulan la inducción de CYP450</i>	23
3.2.3.1 Receptores nucleares	24
3.2.3.2 Receptor de aril hidrocarburo (AhR)	25
3.2.3.3 Estabilización de RNAm y proteína de CYP450	27
3.2.4 <i>Cinética enzimática</i>	28
3.2.5 <i>CYP450 e inflamación</i>	30
3.2.6 <i>CYP450 e histamina</i>	31
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
5. HIPÓTESIS	34

6. OBJETIVOS	34
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
8. MATERIAL Y MÉTODOS	36
8.1 REACTIVOS	36
8.2 TRATAMIENTOS	36
8.3 INDUCCIÓN DE CYP450 POR HISTAMINA	37
8.3.1 Preparación de microsomas	37
8.3.2 Determinación de CYP450 totales	37
8.3.3 Obtención de RNA total	38
8.3.4 Transcripción reversa-PCR	38
8.3.5 Amplificación de CYP1A1 y CYP2E1 por PCR	39
8.3.6 Actividad catalítica de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1	40
8.3.8 Actividad de CYP2E1	40
8.3.9 Electroforesis y análisis densitométrico de proteínas	41
8.4 ESTUDIOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	42
8.4.1 inhibición de la actividad de CYP1A1 y CYP2E1 por histamina	42
8.4.2 Oxidación de NADPH	43
8.4.3 Oxidación de NADPH dependiente de la concentración de histamina	43
8.4.4 Cinética de inhibición de CYP1A1 por histamina	44
8.4.5 Análisis estadístico	44
9. RESULTADOS	45
9.1 INDUCCIÓN DE CYP450 TOTALES POR HISTAMINA	45
9.2 CYP1A1	46
9.3 CYP2E1	50

9.2 ESTUDIOS DE UNIÓN Y CINÉTICA ENZIMÁTICA	55
9.2.1 CYP1A1	55
9.2.2 CYP2E1	67
10. DISCUSIÓN	70
11. CONCLUSIONES	83
12. PERSPECTIVAS	84
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
14. ARTÍCULO PUBLICADO	109

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AhR	Receptor de aril hidrocarburo
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
Arnt	Translocador nuclear de AhR
B(a)P	Benzo(a)pireno
cDNA	ADN complementario
CH	Ciclohexanol
CO	Monóxido de carbono
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
CYP450	Citocromo P450
CYP450 _{cam}	CYP450 de <i>Pseudomonas putida</i>
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Commission number
Fe	Hierro
GPCR	Receptores de acoplamiento a proteínas G
GTP	Guanosina trifosfato
HA	Histamina
H1	Receptor 1 de histamina
H2	Receptor 2 de histamina
H3	Receptor 3 de histamina
H4	Receptor 4 de histamina
HDC	L-histidina descarboxilasa
H _{1C}	Receptor intracelular de histamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato

K_i	Constante de inhibición
K_m	Constante Michaelis-Menten
LPS	Lipopolisacáridos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NCR	NADPH-CYP450 reductasa
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO•	Óxido nítrico
NR	Receptores nucleares
OCT	Transportador de cationes orgánicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	ARN mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Transcripción reversa-PCR
SNC	Sistema nervioso central
VMAT	Transportadores vesiculares de monoaminas
V_{max}	Velocidad máxima
VOC's	Compuestos orgánicos volátiles
XRE	Elemento de respuesta a xenobióticos

1. Resumen

La histamina es una amina biogénica que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos, tales como la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria, secreción de jugos gástricos, cognición, neurotransmisión, nocicepción, hematopoyesis, regeneración de tejidos, procesos de cicatrización, entre otras más. Se ha propuesto que la histamina podría participar en la regulación de la proliferación celular, a través de su interacción con citocromo P450 (CYP450) y modular su actividad. La presente investigación tuvo como objetivos principales, el determinar el efecto de distintas dosis de histamina (50, 100, 1000 mg/Kg) en la expresión de 4 isoformas hepáticas de CYP450 en rata (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2E1), las cuales se han visto inducidas en distintos modelos de inflamación; y hacer estudios de cinética enzimática. In vivo, la histamina incrementó los niveles de CYP450 totales, e indujo la expresión de CYP1A1 y CYP2E1. La inducción de ambas enzimas sucedió de manera diferente; en el caso de CYP1A1, se registraron incrementos en los niveles de RNAm, niveles de proteína y actividad enzimática, mientras que en el caso de CYP2E1, se sólo se registraron incrementos en los niveles de proteína y actividad enzimática, pero no se observó un efecto en los niveles de RNAm. Los CYP1A2 y CYP2B1 no presentaron alteraciones en su actividad y niveles de proteína, lo que demuestra que la histamina puede actuar de manera diferente en la inducción de isoformas de CYP450. Mediante estudios de oxidación de NADPH y cinética enzimática, realizados con microsomas hepáticos de rata y supersomas[®], se demostró que la histamina no es sustrato de CYP1A1 y que actúa como un inhibidor de tipo mixto. En contraste, la oxidación de NADPH dependiente de la actividad de CYP2E1 (observada en microsomas hepáticos de rata y supersomas[®]), en presencia de histamina, sugiere fuertemente que la histamina es un sustrato de CYP2E1.

2. Abstract

It's well-characterized that histamine mediates a broad spectrum of physiological activities, such as regulation of the immune and inflammatory responses, aminergic neurotransmission and brain functions, secretion of pituitary hormones and regulation of gastrointestinal and circulatory functions. Cytochrome P450 (CYP450) has been considered as a non-classical histamine-binding site and their interaction would modulate cell proliferation. However, little is known about histamine role in the regulation of expression and activity of CYP450 isoforms. Here we show that acute i.p. treatments with histamine (50, 100 and 1000 mg/Kg) induce total hepatic CYP450 in rats and increase messenger RNA, protein levels and activity of CYP1A1, as well as protein levels and activity of CYP2E1, but not its messenger RNA levels, whereas CYP1A2 and CYP2B1 were found unaffected. This suggests that histamine can differentially induce CYP450 isoforms. Furthermore, enzyme kinetics and NADPH oxidation assays carried with rat liver microsomes and Baculovirus overexpression systems (supersomes[®]), showed that histamine is not a substrate for CYP1A1, instead, activity measurements using the *o*-dealkylation of ethoxyresorufin, indicated that histamine is a mixed-type inhibitor of CYP1A1 in both microsomal systems. On the other hand, NADPH oxidation by CYP2E1 in the presence of histamine strongly suggested that it is a substrate for CYP2E1. These results demonstrated that histamine can differentially interact with CYP450 isoforms and suggests that these interactions are more complex than initially expected. Therefore, further studies should be done to understand the importance of histamine-CYP450 interactions and its possible implications on the cell physiology.

La fuente principal de histamina en mamíferos son las células cebadas, las cuales después de sintetizarla la almacenan en vesículas especializadas; al igual que las neuronas histaminérgicas en el sistema nervioso central (ubicadas principalmente en el hipotálamo e hipocampo), células del epitelio gástrico, particularmente las células parecidas a las enterocromafines, también conocidas como parietales (enterochromaffin-like cells, ECL), células del epitelio bronquial, basófilos y eosinófilos. En contraste, los hepatocitos, linfocitos, células hematopoyéticas, monocitos/macrófagos, células de Merkel (piel), células C de la tiroides, células de Kupffer (hígado), algunas células del epitelio nasal, riñón, intestino, adenohipófisis, paratiroides e isletas pancreáticas, son ejemplos de células que producen histamina y la mantienen libre en el citoplasma, sin almacenarla (Kondo et al., 1995; Tanimoto et al., 2004).

Fisiológicamente la histamina es una molécula central en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria, proliferación y diferenciación celular, hematopoyesis, desarrollo embriológico, regeneración y cicatrización. En una inflamación aguda la histamina es liberada principalmente por basófilos y células cebadas, y su efecto es sumamente rápido a nivel de endotelio vascular, bronquial y músculo liso. En procesos patológicos como una respuesta alérgica, la liberación excesiva de histamina provoca síntomas como rinitis agudas, broncoespasmos, diarrea, pápulas dérmicas e incrementos en la temperatura corporal (Akdis y Blaser, 2003). Por otro lado, en una respuesta inflamatoria crónica, regula la función de macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, proliferación de células epiteliales y endoteliales, producción de citocinas, expresión de moléculas de adhesión y antígenos de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Dy y Schneider, 2004).

En el sistema nervioso central (SNC), la histamina participa en procesos de cognición y memoria, regulación del ciclo circadiano, hibernación, energía y homeostasis endocrina. En mamíferos adultos, la mayoría de las neuronas histaminérgicas se ubican en la parte posterior del hipotálamo, particularmente en

el núcleo tuberomamilar (Anichtchik et al., 2000, Skaper et al., 2001). Se ha determinado que durante el desarrollo embrionario, los niveles de histamina se modifican significativamente en las etapas prenatales y postnatales, por lo que se ha propuesto que la histamina podría tener un papel relevante durante el desarrollo y maduración del cerebro (Panula et al 2000); por ejemplo, se ha determinado que en embriones de rata de entre 15 y 17 días, los niveles de histamina son muy altos.

Por sus propiedades de mitógeno, desde hace mucho tiempo se propuso que la histamina podría participar en la regulación del ciclo celular, al igual que lo hacen algunas otras aminas biogénicas, como la espermina y espermidina (Kahlson and Rosengren, 1968). Al respecto, se ha observado que tumores, tejidos en regeneración, desarrollo embrionario del timo, del corazón, del riñón y del hígado presentan altos niveles de histamina (Heron et al, 2001).

3.1.2 Metabolismo de la histamina

La histamina es producida a partir de la descarboxilación del aminoácido L-histidina, principalmente por la enzima histidina descarboxilasa (HDC) (E.C. 4.1.1.22) (Fleming et al., 2004), aunque también se ha observado que en algunos casos puede ser producida por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (EC 4.1.1.28) (Lovenberg et al., 1962). La concentración intracelular y extracelular de la histamina puede variar por la influencia de factores que actúan a nivel de síntesis o degradación, como moléculas de regulación (señales de transducción que regulan la actividad de HDC, o bien la liberación de la histamina de fuentes celulares de almacenamiento), transportadores iónicos y catiónicos (de membrana plasmática e intracelulares), sistemas de compartimentalización (formación de vesículas secretoras), flujo iónico (p.e. liberación de Ca^{2+} de retículo endoplásmico) y niveles de histidina (Medina et al., 2005). La histamina extracelular (proveniente de la secreción de células especializadas, de la dieta o por uso terapéutico) es inactivada por acción de la enzima diamino oxidasa (EC 1.4.3.6), la cual cataliza una desaminación oxidante en la histamina y produce

imidazol acetaldehído, el cual puede ser conjugado con ribosa (Schwelberger, 2007). Por su parte la histamina intracelular, puede ser inactivada por la histamina N-metiltransferasa (EC 2.1.1.8), al conjugar un grupo metilo con el anillo imidazol de la histamina y producir la N-metilhistamina (Horton et al., 2005), que más adelante puede ser transformada en metilimidazol acetaldehído y metilimidazol-ácido acético, por acción de una amino oxidasa (EC 1.4.3.4) y la aldehído deshidrogenasa NADP⁺, respectivamente (Anichtchik et al., 2000). Una segunda vía puede conducir a la acetilación de la histamina por la acción de aciltransferasas (EC 2.3.1) (Svensson y Tomilo, 1992) (Figura 2). La mayoría de los metabolitos producidos por la degradación de la histamina, poseen poca o nula actividad y son excretados en orina; sólo en algunos casos se ha observado que la N-metilhistamina puede actuar como antagonista de la histamina al unirse al receptor H3.

Estudios realizados tanto en humanos como en modelos animales, coinciden en que los principales sitios de degradación de la histamina se encuentran en el sistema nervioso central, pulmón, riñón e hígado (Horton et al., 2005; Ogasawara et al., 2006). En lo que se refiere a la histamina extracelular, su metabolismo depende en gran parte de su incorporación al interior de la célula (por mecanismos de transporte especializado) (Ogasawara et al., 2006), en donde su inactivación vía histamina N-metiltransferasa (enzima que se ubica en el citoplasma) produce aproximadamente el 50% del total de metabolitos derivados de la histamina (Ogasawara et al., 2006). En contraste, menos de un 25% de la histamina extracelular puede ser metabolizada por la enzima diamino oxidasa, que en mamíferos, incluyendo al humano, se encuentra soluble en el plasma y que puede activar a la histamina para su posterior conjugación con ribosa (Schwelberger, 2007). En las células secretoras, por su parte, la histamina que es sintetizada en el citoplasma, es incorporada a vesículas de almacenamiento por medio de transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT).

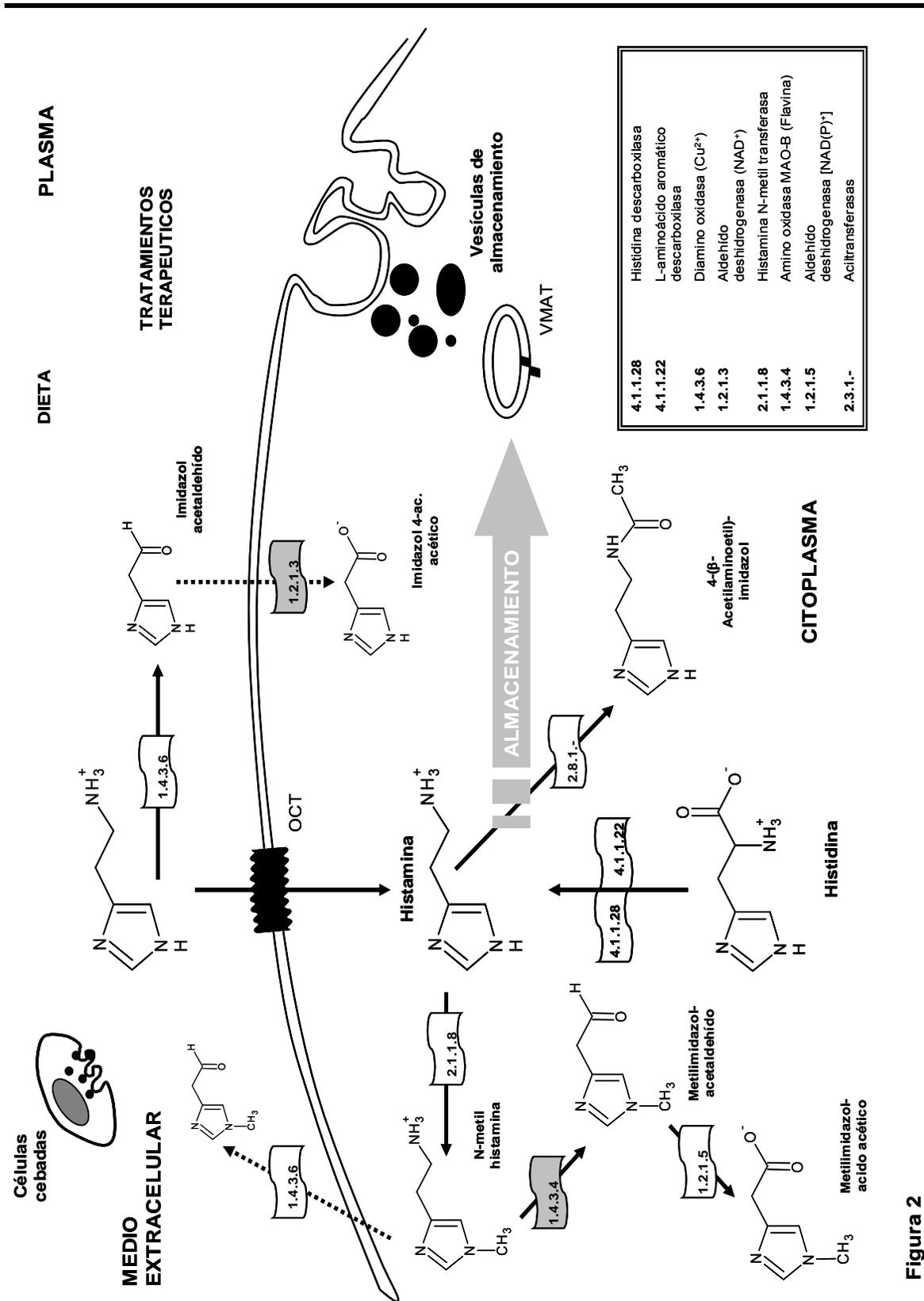


Figura 2

Figura 2. La histamina presente en el organismo puede provenir de dos fuentes distintas: exógena, por el aporte de histamina presente en componentes de la dieta y por tratamiento terapéutico, y endógena, la que se encuentra en el torrente sanguíneo y plasma proveniente de células secretoras (extracelular), e intracelular, presente en el citoplasma, núcleo de linfocitos, hepatocitos y vesículas de almacenamiento en células cebadas, neuronas histaminérgicas, basófilos, etc. En el esquema se muestran las principales vías de síntesis y degradación de la histamina en el interior de la célula, así como la degradación vía desaminación oxidante por la acción de diamino oxidasas presentes en el plasma. Las banderillas en color gris, indican a las enzimas que se ubican tanto en el citoplasma, como en la membrana externa de la mitocondria. La histamina extracelular, ya sea de origen exógeno o endógeno, puede ingresar al interior de la célula por medio de transporte activo (transportadores de cationes orgánicos OCT); en el caso específico de células secretoras, la histamina es incorporada a vesículas de almacenamiento por transportadores vesiculares de monoaminas VMAT.

3.1.3 Receptores clásicos de la histamina

El efecto pleiotrópico producido por la histamina en una gran variedad de procesos biológicos, sucede a través de su interacción con receptores que se ubican en la membrana plasmática; hasta el momento se han descrito 4 tipos diferentes conocidos como H1, H2, H3 y H4, los cuales además de presentar isoformas, también se expresan de manera diferencial en distintos tipos celulares. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y son proteínas transmembranales, heptahélicas, con 7 porciones hidrofóbicas de entre 20 a 25 aminoácidos embebidos en la membrana plasmática (Smit et al., 1999).

3.1.3.1 Receptor H1

Los primeros receptores en ser clonados y de los que se obtuvo su estructura fueron H1 y H2 (Ash y Schild, 1996). El receptor H1 regula la mayor parte de los efectos producidos por la histamina, se expresa en neuronas, células de músculo liso, hepatocitos, condrocitos, endotelio, células dendríticas, monocitos, neutrófilos y linfocitos B y T. El gen que codifica para este receptor se localiza en el brazo corto del cromosoma 3, en la región 3p25 y consta de un solo exón. La proteína está compuesta por 486, 488 y 487 aminoácidos en rata, ratón y humano, respectivamente; en su dominio amino terminal se ubica un sitio de glicosilación y la región de unión para histamina se localiza en el dominio transmembranal 3 (aspartato) y 5 (asparagina y lisina). La unión de la histamina con H1, activa a la

fosfolipasa C (PLC), para la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG), los que a su vez activan cascadas de señalización dependientes de proteína cinasa C (PKC), que finalmente conduce a la movilización de calcio intracelular (Ca₂⁺) y la producción de óxido nítrico (NO•), ácido araquidónico (AA) y adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Smit et al., 1999). H1 también activa a las fosfolipasas D y A2 y a factores de transcripción como NF-κB; el receptor H1 es uno de los más activos durante una respuesta alérgica y presenta polimorfismos en las poblaciones humanas (Figura 3). En modelos animales, particularmente en ratones knockout para el receptor H1, se han descubierto otras funciones importantes, pues estos ratones presentan anomalías en los procesos de memoria, locomoción, nocicepción, aprendizaje, y además presentan un comportamiento agresivo. En cuanto a las respuestas inmune e inflamatoria se han observado fallas en las respuestas dependientes de linfocitos T y B. En cerebro, H1 participa en la regulación de los niveles de glucógeno en neuronas, células de la glía y en astrocitos (Smit et al., 1999, Dy y Schneider, 2004).

3.1.3.2 Receptor H2

A diferencia del receptor H1, H2 puede suprimir muchos de los efectos fisiológicos producidos por la histamina. El gen de H2 se localiza en el cromosoma 5, y la proteína contiene 358 y 359 aminoácidos en rata o ratón y humano, respectivamente. Los sitios de unión para histamina se localizan en los dominios 3 (aspartato) y 5 (treonina y aspartato); en ratas, por ejemplo, posee un sitio de glicosilación en la región amino terminal (Del Valle y Gantz, 1997). H2 también se expresa en diversos tipos celulares y participa en la regulación de la contracción muscular cardíaca y en la secreción de ácido gástrico. Al activarse, H2 puede acoplarse con la adenilato ciclasa o fosfoinositido de manera dependiente de GTP, y activar a PKA, o bien activar a c-Fos, c-Jun y la cinasa p70S6 vía PKC (Wang et al., 2000), que finalmente conducen a la liberación de AMPc (Figura 3). En hepatocitos, los receptores H1 y H2 pueden modular vías metabólicas como la

gluconeogénesis, ureagénesis y glucogenólisis (Imoto et al., 1985; García-Sáinz et al., 1985); ambos receptores también se encuentran relacionados con procesos de hepatotoxicidad por lipopolisacáridos (LPS) (Masaki et al., 2005).

3.1.3.3 Receptor H3

El gen que codifica para el receptor H3 de humanos, se localiza en la región q13.33 del cromosoma 20, consta de 4 exones y 3 intrones (Bongers et al., 2007). Este receptor se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico, y actúa como receptor presináptico de liberación de histamina y de otros neurotransmisores como la dopamina, serotonina, noradrenalina, ácido aminobutírico y acetilcolina (Arrang et al., 2007). Las señales de transducción producidas a través de H3 involucran a proteínas $G_{i/o}$ que conducen a la inhibición de AMPc, acumulación de Ca^{2+} y activación de la vía de cinasas de proteína activadas por mitógeno (Figura 3).

3.1.3.4 Receptor H4

El gen que codifica para el receptor humano H4 consta de tres exones, separados por dos largos intrones localizados en el cromosoma 18 en la región q11.2. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas $G_{i/o}$ (Figura 3) y presenta un 37 a 43% de homología con H3 (un 58% en la región transmembranal). H4 se expresa en considerablemente en células hematopoyéticas, neutrófilos, eosinófilos y células T, y presenta una expresión moderada en bazo, timo, pulmón, intestino delgado, colon y corazón. A la fecha lo que se sabe del papel fisiológico de H4 en la respuesta inmune, es que participa en la regulación de quimiotaxis y secreción de citocinas (de Esch et al., 2005; Dy y Schneider, 2004).

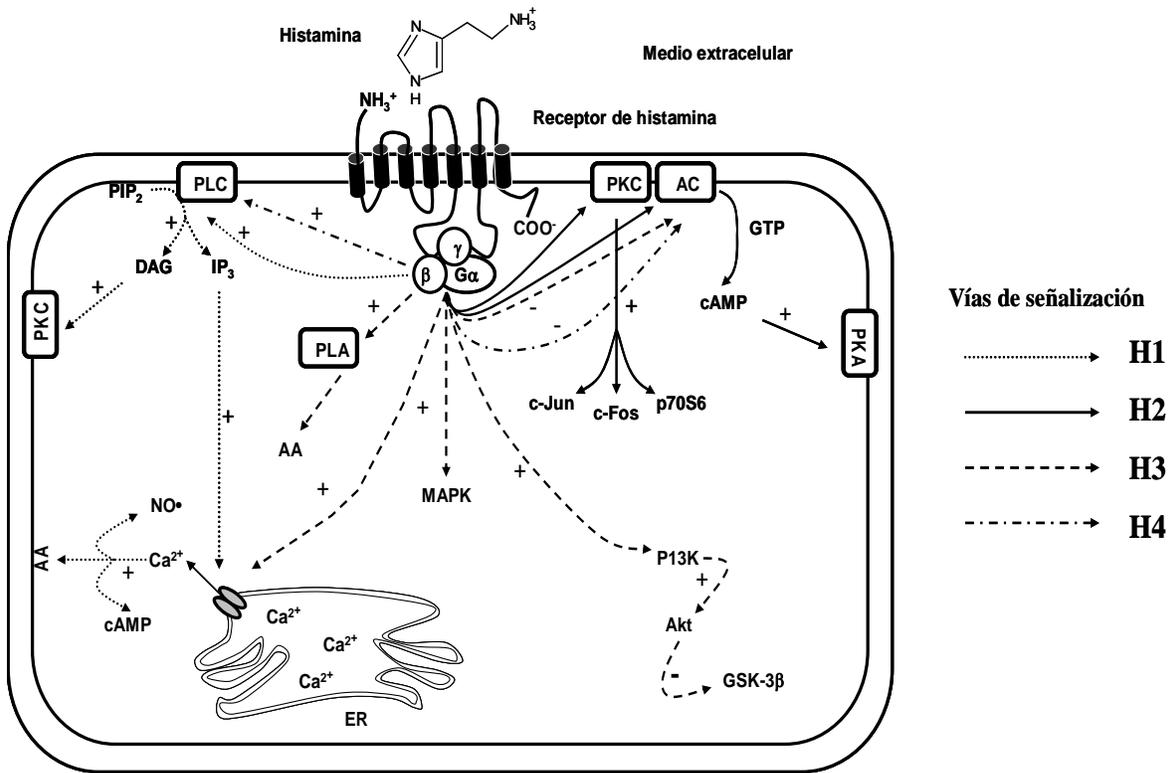


Figura 3. Los cuatro receptores de membrana plasmática reconocidos para histamina (**H1**, **H2**, **H3**, **H4**), pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales presentan 7 dominios transmembranales. En la figura se presenta el esquema general de un receptor para histamina en su forma activa y las vías de señalización principales, que se originan a partir de la activación de los receptores correspondientes. Acido araquidónico (**AA**), adenilato ciclasa (**AC**), adenosina monofosfato cíclico (**cAMP**), 1,2-diacilglicerol (**DAG**), retículo endoplásmico (**ER**), fosfolipasa A (**PLA**), fosfolipasa C (**PLC**), guanosina trifosfato (**GTP**), inositol-1,4,5-trifosfato (**IP₃**), óxido nítrico (**NO•**), proteína cinasa activada por mitógeno (**MAPK**), proteína cinasa A (**PKA**), proteína cinasa C (**PKC**). (+) Indica que la vía es activada, (-) simboliza que la vía es inactivada.

3.1.4 Inflamación y toxicidad

Desde sus orígenes el hombre ha mantenido una estrecha relación con el ambiente que le rodea; en la modernidad, el crecimiento de las poblaciones humanas y el uso inadecuado de los recursos mantiene un grave impacto en su entorno, por la generación de contaminación. Una gran variedad de compuestos químicos, entre contaminantes ambientales (dispersos en el aire, agua o suelo), sustancias a las que nos encontramos expuestos en el trabajo, en nuestro hogar, las que consumimos (alimentos ahumados, procesados o contaminados con toxinas) o las que usamos en la terapéutica (fármacos y drogas), pueden actuar

como tóxicos y tener un efecto nocivo en la salud humana, ya sea por provocar la muerte en algunos casos, o bien por participar en la etiología de distintas enfermedades, como malformaciones congénitas, anemia, desregulación hormonal, nefropatías, neuropatías, cardiopatías, alergias, leucemia y cáncer (Hodgson y Smart, 2001). Agentes químicos como insecticidas y pesticidas (DDT y organofosforados), compuestos orgánicos volátiles (cloroformo, benceno, tolueno, halotano, cloruro de vinilo) hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno), micotoxinas (aflatoxina b₁), nitrosaminas (N-nitrosodimetilamina), dioxinas (TCDD) o el etanol, son sólo algunos ejemplos de sustancias consideradas altamente tóxicas.

Al ingresar al organismo, la mayoría de los compuestos químicos deben ser metabolizados para su excreción y evitar procesos de toxicidad y/o su acumulación en órganos y tejidos. El proceso de desintoxicación comprende tres fases principales: la fase I que consiste en reacciones de oxidación y reducción, que introducen una función química al compuesto, haciéndolo más polar. En la fase II (o de conjugación), los metabolitos de la fase I son conjugados con moléculas como carbohidratos, sulfatos y tioles, que los hacen todavía más solubles para su excreción de la célula y del organismo, a través de mecanismos especializados de transporte activo, agrupados en la fase III (o de excreción) (Margaret et al., 2002). La toxicidad de un xenobiótico no sólo depende de su naturaleza (características fisicoquímicas, hidrofobicidad, polaridad y estados de ionización), sino también de los procesos de biotransformación que siga, particularmente si en su metabolismo se forman compuestos intermediarios tóxicos (mucho más reactivos que el compuesto original) altamente electrofílicos, capaces de reaccionar y formar aductos (enlaces covalentes) con proteínas, DNA y otras biomoléculas (Liebler y Guengerich, 2005). Adicionalmente, la toxicidad de un compuesto o de una mezcla también se encuentra influenciada por factores inherentes al organismo como grupo étnico al que se pertenece, polimorfismos genéticos, etapas del desarrollo o crecimiento, género, estado de

salud/enfermedad, cáncer, dieta, estilos de vida, tratamientos terapéuticos, radiación, infecciones e inflamación (Figura 12) (Rushmore y Kong, 2004).

En infecciones producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos, se han detectado alteraciones en el metabolismo de xenobióticos, sobre todo a nivel de la expresión y actividad de las enzimas encargadas de desintoxicar (Renton, 2004; Aitken et al., 2006). En algunos estudios realizados con distintos modelos de inflamación, se ha observado que enzimas del metabolismo de xenobióticos como citocromo P450 (CYP450), se encuentran inducidas, y que esta inducción se encuentra relacionada con incrementos en la activación de compuestos mutagénicos y pro-carcinogénicos, al mismo tiempo que con mayor daño genético (Montero et al., 2003; Morgan, 2004; Aitken et al., 2006). Sin embargo, aún no queda del todo claro cómo es que una inflamación podría afectar a un proceso de desintoxicación, sobre todo cuando se tienen respuestas tan variadas, pues en otros casos también se ha observado inhibición de CYP450. Al respecto, nuevas propuestas han comenzado a surgir y se plantea que la relación inflamación-metabolismo no se reduce a una correspondencia de causa-efecto, sino a una relación mucho más compleja, en la que ambos fenómenos se encuentran estrechamente vinculados.

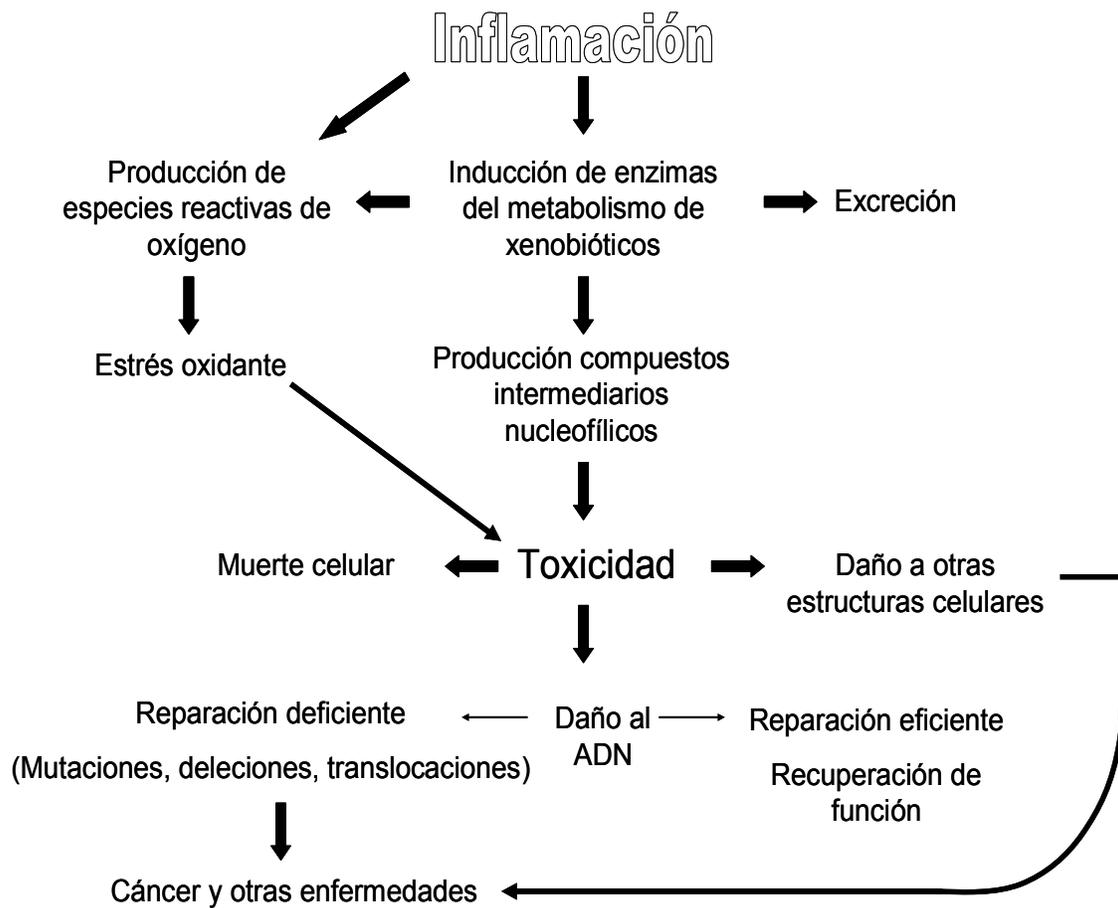


Figura 4. En condiciones normales, se espera que cualquier compuesto químico que ingrese al organismo sea metabolizado para su excreción. Sin embargo, factores como un proceso inflamatorio pueden alterar estas funciones e incrementar o disminuir la toxicidad del compuesto. Dentro de estas consideraciones se incluyen la inducción de enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos, que puede conducir a la formación excesiva de compuestos intermediarios, altamente reactivos, que pueden producir daño al DNA y en tejidos, y que se relacionan con diversos tipos de patologías.

3.2 Citocromo P450

3.2.1 Generalidades

El sistema enzimático de Citocromo P450 (CYP450), también conocido como sistema de monooxigenasas microsomal o proteínas hemo tioladas (EC 1.14.14.1), es una superfamilia de genes de hemoproteínas ampliamente distribuida en organismos de todos los niveles de la clasificación biológica (Nelson et al., 1993). Su importancia radica en la versatilidad con la que pueden participar en distintos mecanismos enzimáticos, desde el procesamiento de fuentes de carbono en algunas bacterias (Janssen et al., 2005), mecanismos de defensa en algunas variedades de plantas (síntesis de metabolitos secundarios), metabolismo de eicosanoides (y otros derivados del ácido araquidónico, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, prostaciclina), metabolismo del colesterol y ácidos biliares, síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas, aminas biogénicas, vitamina D3, hidroxilación del ácido retinoico y otros morfógenos. CYP450, además metaboliza más del 90% de los compuestos químicos exógenos que ingresan al organismo (xenobióticos), desde fármacos, drogas, cosméticos, tintes, componentes de la dieta, compuestos carcinogénicos y contaminantes ambientales, de ahí su importancia para la industria farmacéutica y en toxicología (Ortiz de Montellano, 2005). Otro aspecto importante, es que como parte de su actividad metabólica, se producen cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula, particularmente H_2O_2 y anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, compuestos reactivos que participan en la regulación del ciclo celular y en señales de transducción y que cuando se producen en exceso, actúan como mutágenos y carcinógenos (Caro y Cederbaum, 2004; Zangar et al., 2004).

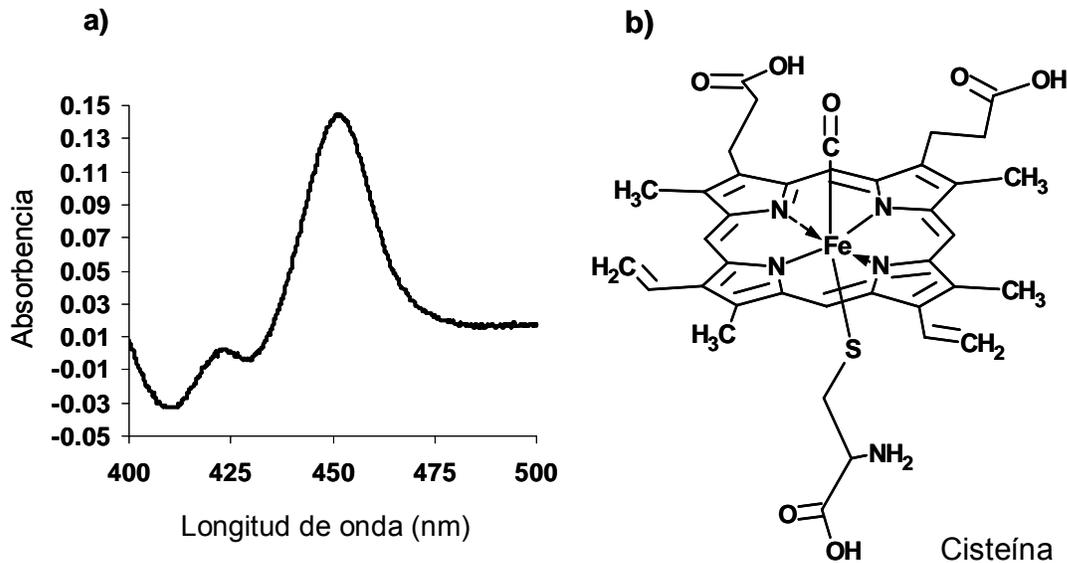


Figura 5. a) Diferencia de espectro de CYP450. Se observa un pico máximo de absorción a 450 nm, en microsomas hepáticos de rata, reducido con ditionita de sodio y burbujeado con CO. Espectro similar obtuvieron en 1964 los japoneses T. Omura y R. Sato, el pico observado a 420 nm, corresponde a formas de CYP450 parcialmente desnaturalizadas, conocidas como CYP420. **b)** Una característica diacrítica de todas las isoformas de CYP450, es que su grupo prostético es una Protoporfirina IX, la cual se encuentra unida a la proteína por una unión no covalente entre el átomo de hierro y una cisteína. En esta figura se esquematiza la unión de CO al hierro del grupo hemo de CYP450, que confiere el pico característico observado a 450 nm.

Los primeros estudios acerca de la estructura de CYP450, fueron realizados por Garfinkel y Klingenberg (1958), quienes por separado reportaron la existencia de un pigmento inusual en microsomas hepáticos (fracciones de membrana de retículo endoplásmico) reducidos con el agente reductor ditionita de sodio, el cual presentaba un pico máximo de absorción a 450 nm en la región UV del espectro, cuando se unía con monóxido de carbono (CO) (Lewis, 2001); 6 años más tarde los japoneses Tsuneo Omura y Ryo Sato (1964) purifican estas proteínas y confirman que la absorción a 450 nm era producida por una nueva clase de hemoproteínas, a las que denominaron citocromo P450. Una serie de estudios posteriores dejan en claro que las características espectrales de CYP450 se deben a la naturaleza hemoproteica de su grupo prostético, la protoporfirina IX, la cual se encuentra unida a la proteína de manera no covalente por una cisteína (C) y un átomo de hierro (Fe), la cisteína cede un electrón de su azufre y forma un enlace S-Fe (Figura 5); el grupo hemo es similar al observado en citocromo b,

hemoglobina y mioglobina y la unión del hierro al azufre de la cisteína es una característica de todas las isoformas.

Los CYP450 son proteínas globulares (Figura 6a), cuyo peso molecular oscila alrededor de los 57 kD (~ 500 a.a.) (Black, 1992); existen formas solubles presentes en distintas especies de bacterias (distribuidas en citosol) (Poulos et al., 1987; Ortiz de Montellano, 2005; Janssen et al., 2005; McLean et al., 2006, Otyepka et al., 2006), mientras que en eucariontes se encuentran unidas principalmente a membranas celulares, en particular al retículo endoplásmico liso (Bar-nun, 1980), aunque también suelen ser localizadas en otros compartimentos celulares, como en envoltura nuclear, en aparato de Golgi, mitocondrias y membrana plasmática, adonde son transportadas desde el retículo endoplásmico; de hecho, su ubicación en la parte exterior de la membrana plasmática puede traer como consecuencia la generación de autoinmunidad (Yamamoto et al., 1985; Neve et al., 1996). Gran parte del conocimiento que se tiene sobre la estructura y arreglo tridimensional de CYP450, se ha obtenido a partir de estudios realizados con formas solubles de estas enzimas. La primer estructura cristalina de alta resolución en obtenerse, fue la de CYP450_{cam}, isoforma que participa en el metabolismo del alcanfor en la bacteria *Pseudomonas putida* (Poulos et al., 1987). Sin embargo, con la aplicación de nuevas herramientas, como el modelado en computadoras y mutagénesis dirigida, actualmente se cuenta con aproximadamente 20 modelos de estructuras distintas de CYP450 de eucariontes, incluyendo algunas isoformas humanas, como CYP2C9 (Williams et al., 2003; Ortiz de Montellano, 2005). En general, la forma plegada se mantiene similar para todas las formas, de acuerdo con la clasificación CATH (CATH Protein Structure Classification, <http://cathwww.biochem.ucl.ac.uk>). A nivel molecular, CYP450 está constituido principalmente por hélices α (~ 12 hélices, identificadas con las letras A a la L), y contiene regiones altamente conservadas en la cercanía al grupo hemo, particularmente en las hélices I y L, el segmento F/G (formado por las hélices F y

G) y en el asa B/C que controlan el acceso al sitio activo de la enzima (Figura 6a, b) (CATH, 2007; Favia et al., 2006).

Topológicamente los CYP450 presentan un dominio α , que contiene principalmente a hélices α , y al grupo hemo; y el dominio β , integrado en su mayoría por láminas β plegadas (Werck y Feyereisen, 2000; Favia et al., 2006) (Figura 6). Las regiones de mayor variabilidad que presentan las isoformas de CYP450, son las que se encargan de la interacción y reconocimiento de sustratos, y el acoplamiento con la enzima NADPH-CYP450 reductasa (la cual transfiere electrones a partir de la oxidación de NADPH, EC 1.6.2.4). Otras regiones conservadas son un grupo de prolina (P) que se ubican en la región amino terminal y una asa conformada por las espirales A, C e I que definen un surco que delimita la transferencia de protones. Evolutivamente, CYP450 conserva a la cisteína que ancla al átomo de hierro de la protoporfirina IX (bolsa Cys) y la mantiene posicionada entre las hélices I y L; también son altamente conservadas en esta región, una fenilalanina (F) y una glicina (G) (Ortiz de Montellano, 2005; Werck- Reichhart & Feyereisen, 2000; Otyepka et al., 2006).

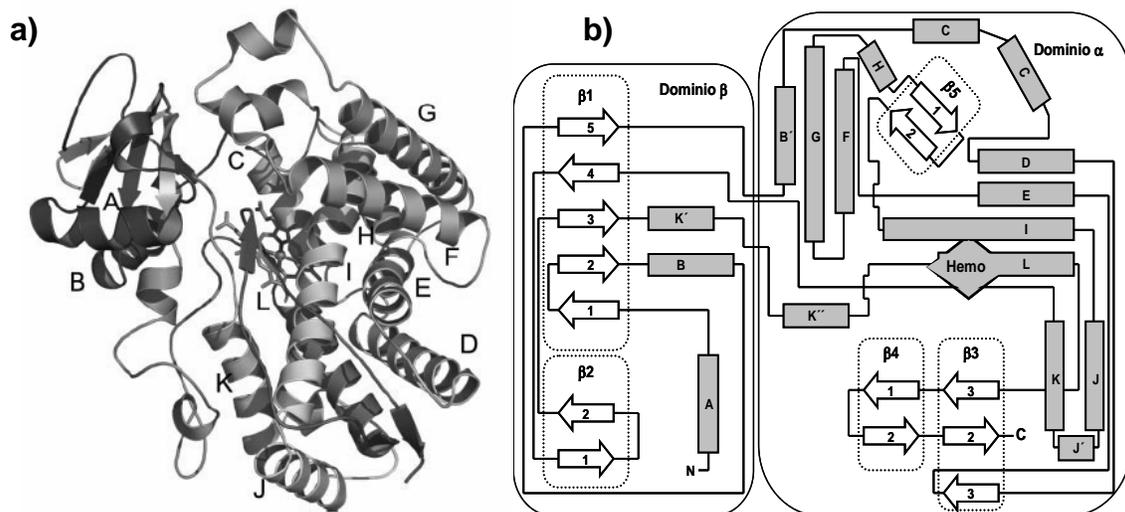


Figura 6. a) Estructura tridimensional de CYP2C9 de humano (Favia et al., 2006). b) Esquema topológico en el que se representa la estructura secundaria y terciaria del CYP102 de la bacteria *Bacillus megaterium*; se muestran los dominios α y β presentes y la región de unión al grupo hemo.

Las flechas representan láminas β plegadas y los cuadros en gris, a las hélices α (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

La clasificación de la superfamilia de genes CYP450, comprende 3 categorías principales: familia, subfamilia e isoforma, que se basa en la construcción de árboles filogenéticos, dendrogramas, secuencia de aminoácidos y afinidad de sustratos. La abreviatura CYP es denominativo de pertenencia a la superfamilia citocromo P450, la asignación de un número arábigo indica la familia a la que pertenece, una letra mayúscula del alfabeto latino (A-Z) indica la subfamilia y finalmente un segundo número indica la isoforma; por ejemplo, CYP2E1 es la isoforma 1 de la subfamilia E, de la familia 2 de CYP450 (Nelson et al., 1993). El primer criterio de clasificación es la homología entre las isoformas de CYP450 que sería alrededor del 16% a nivel de superfamilia, > 40% a nivel de familia y > 55% a nivel de subfamilia; el criterio para clasificar isoformas, varía de acuerdo con cada subfamilia, pero básicamente se aplica el criterio de afinidad por sustratos (Nelson et al., 1993; Ortiz de Montellano, 2005; Otyepka et al., 2007). Con el secuenciado del genoma de varios organismos, a la fecha se han descrito aproximadamente 807 genes distintos de CYP450, agrupados en 711 familias (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, 2007), de los cuales se han descrito 57 en humanos (*Homo sapiens sapiens*), 102 en ratón (*Mus musculus*), ~60 en rata (*Rattus norvegicus*), 54 en perro (*Canis familiaris*), 84 en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), 74 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, 3 en la levadura de la cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*), 111 en el hongo *Aspergillus nidulans* y 323 en la planta del arroz (*Chlamydomonas reinhardtii*), por mencionar algunos (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

3.2.2 Ciclo catalítico de CYP450

La oxidación de compuestos orgánicos por CYP450 es un proceso sumamente complejo, que incluye probablemente 9 pasos independientes, en los que la proteína sufre cambios conformacionales. Estudiar el ciclo catalítico en general no ha sido fácil, al menos en las formas de la enzima existentes en eucariontes, donde se ha observado que el anclaje y el ambiente hidrofóbico proporcionado por

la membrana lipídica es importante en la actividad de estas enzimas; sin embargo, algunas aproximaciones se han alcanzado con las formas solubles de algunas bacterias, con modelos computarizados, mutagénesis dirigida, con estudios en el estado pre-estacionario, espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) (Guengerich, 2002; Kempa et al., 2005) y en modelos cinéticos y de mecánica cuántica (Wang et al., 2006). La transferencia de electrones a partir del NADPH es realizada por la enzima accesoria NADPH-CYP450 reductasa (NCR). Esta enzima es del tipo diflavina reductasa, de aproximadamente 75 a 80 kD, que consta de un cofactor FAD (Flavina adenina dinucleótido) y FMN (Flavina mononucleótido) (Munro et al., 2001; Murataliev et al., 2004). La oxidación del NADPH (Figura 7) y la incorporación de O₂ (Figura 8), son procesos cruciales en la actividad de CYP450; recientemente se ha determinado la importancia de las interacciones proteína-proteína para el acoplamiento de NCR con las distintas isoformas de CYP450.

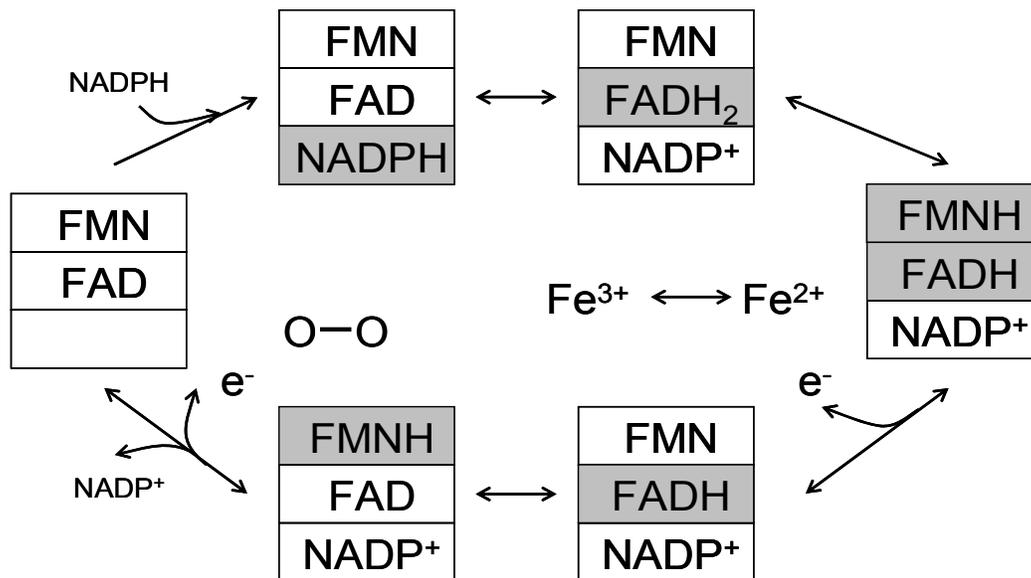


Figura 7. Esquema general de la transferencia de electrones del NADPH hacia los sitios activos FAD (Flavina adenina dinucleótido) y FMN (Flavina mononucleótido) de la enzima NADPH-CYP450 reductasa. 1) Transferencia de electrones a FAD (e⁻), oxidación de NADPH, reducción de FAD (FADH₂). 2) Transferencia del primer e⁻ a FMN. 3) Oxidación de FMN, primer salida del primer e⁻ hacia CYP450 (Oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺ de la protoporfirina IX). 4) Oxidación de FAD, transferencia de segundo e⁻ a FMN. 5) Oxidación de FMN, salida de segundo e⁻ hacia CYP450, formación de complejo hierro-oxo, rompimiento de enlace O—O, formación de agua. 6) Salida de NADP⁺ (Murataliev et al., 2004). Las flechas en doble sentido, indican reversibilidad en cada paso.

El átomo de hierro del grupo hemo de CYP450 es fundamental en el proceso de oxidación de un compuesto. En estado basal, el hierro se encuentra en su forma férrica (Fe^{3+}) unido a una molécula de agua (sexto ligando), al ingresar un sustrato a la bolsa catalítica de la enzima, se puede producir un cambio de espín del átomo de hierro (generalmente de un alto a bajo espín). El hierro contiene 5 electrones distribuidos en los cinco orbitales 3d (d_{xy} , d_{xz} , $d_{x^2-y^2}$, d_{z^2}), los cuales pueden ser perturbados en su estado energético por la presencia de un sustrato; y provocar cambios a un bajo espín, en donde un electrón se encuentra desapareado (Poulos y Raag, 1992).

CYP450 puede catalizar numerosas reacciones de oxidación, tales como hidroxilaciones aromáticas, alifáticas, oxigenación heteroatómica, desalquilación y epoxidación (Lewis, 2001), a través de procesos de óxido-reducción en los que se activa oxígeno molecular (O_2). Estas enzimas incorporan uno de los átomos de oxígeno a un sustrato y el otro lo reducen a agua (H_2O); el proceso comprende una serie de pasos intermedios que pueden ser limitantes (la velocidad con que ocurre alguno de los pasos, es igual a la k_{cat} de la reacción) (Guengerich, 2000), que pueden resumirse en los siguientes:

- 1) En general, el ciclo catalítico de CYP450 inicia con la unión de una molécula de un sustrato al sitio catalítico de la enzima, lo que produce cambios en el espín del átomo de hierro.
- 2) La interacción sustrato-CYP450, también produce cambios conformacionales en CYP450, derivado de una reducción en el potencial redox de la enzima en aproximadamente 100 mV (Wang et al., 2006), lo que favorece su acoplamiento con la enzima NADPH-CYP450 reductasa, la cual le transfiere un electrón de un agente reductor (NADPH en retículo endoplásmico) y promueve la reducción de CYP450, que basalmente se encuentra en su estado férrico (Fe^{3+}) a su estado ferroso (Fe^{2+}).

- 3) La unión de oxígeno molecular al hemo ferroso, forma un complejo dioxígeno con CYP450.
- 4) La entrada de un segundo electrón produce una protonación en el hierro y produce un complejo hidropéroxido.
- 5) La protonación y el rompimiento heterocíclico de uniones O-O, conduce a la producción concurrente de una molécula de agua, para formar un intermediario reactivo hierro-oxo (Paso 6, figura 8).
- 6) Finalmente el átomo de oxígeno del complejo hierro-oxo es transferido al sustrato, para formar un producto oxidado, por lo que una vez que el producto se ha dissociado de CYP450 el ciclo está completo (Fig. 8).

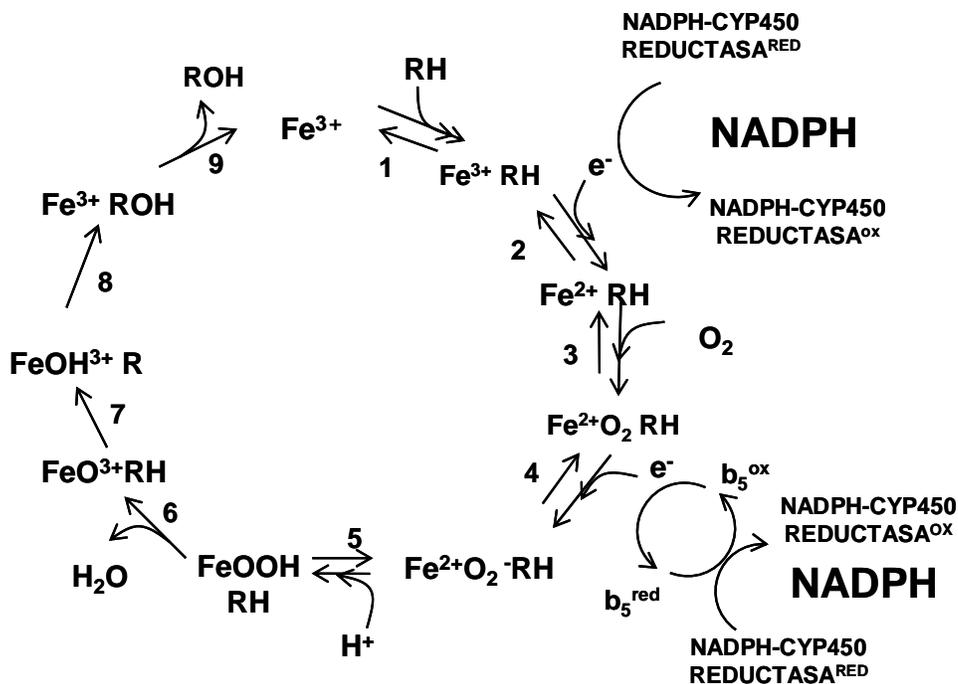


Figura 8. Ciclo catalítico general de CYP450. Debido a que algunos de los pasos intermedios no han sido determinados experimentalmente, este esquema es considerado por muchos como un paradigma, sin embargo, estudios realizados en el estado pre-estacionario y por cristalografía con rayos X (realizados con formas solubles de CYP450 bacterianas) han permitido la caracterización de los pasos 1 a 5, cuyas condiciones limitantes son la entrada de O_2 y el suministro de electrones. El ciclo inicia con la interacción de un sustrato (RH) y culmina con la disociación de un producto oxidado (ROH) de CYP450 (Guengerich, 2002).

3.2.3 Mecanismos que regulan la inducción de CYP450

Mucho del conocimiento que se tiene acerca de la regulación de CYP450, proviene de su participación en el metabolismo de compuestos químicos exógenos, por lo que a CYP450 se le considera como uno de los principales sistemas de defensa del organismo en procesos de desintoxicación. Esta respuesta adaptativa, como Ortiz de Montellano lo describe (2005), surge en primera instancia, de la necesidad que tiene un organismo por aprovechar dicho compuesto, o bien, de lograr su excreción cuando no le sirve; la regulación puede ser considerada primaria, cuando estos compuestos incrementan la expresión de CYP450, ya que la mayoría son sustratos de estas enzimas, o bien secundaria, cuando son los metabolitos los que la provocan. La regulación de CYP450 sucede principalmente a través de dos mecanismos muy complejos: a nivel transcripcional la respuesta es orquestada en la célula por medio de receptores que actúan en el núcleo, como los receptores nucleares (NR) (Figura 9), o el receptor de aril hidrocarburo (AhR) (Figura 11), y a nivel post-transcripcional, por estabilización del RNA mensajero (RNAm) y/o por la estabilización de la enzima.

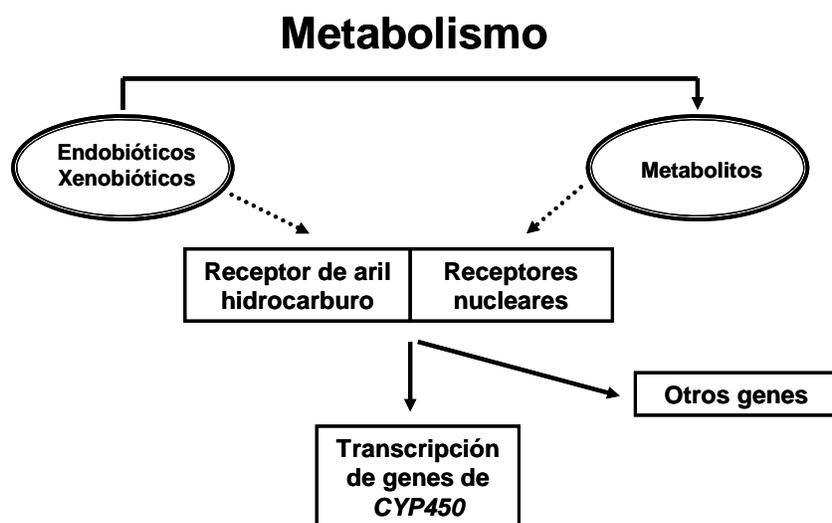


Figura 9. Diversos compuestos endógenos y exógenos pueden modular la expresión de distintas isoformas de CYP450, al interactuar con receptores que pueden inducir la transcripción de estas enzimas. La inducción puede ser directa, cuando el compuesto por sí mismo actúa como agente inductor, o bien de manera indirecta, cuando el inductor es un metabolito producido durante una reacción (Honkakoski et al., 2000).

3.2.3.1 Receptores nucleares

Los receptores nucleares son factores de transcripción dependientes de la unión de ligandos, de los cuales hasta el momento se han descrito más de 100 genes distintos (Honkakoski y Negishi, 2000; Wang y LeCluyse, 2003; Kininis et al., 2007); inicialmente reconocidos como elementos de respuesta a hormonas (por la unión con cortisol, aldosterona, estradiol, progesterona, testosterona, vitamina D y tiroxina), estos receptores presentan una estructura definida por varios dominios funcionales. En la región amino terminal se encuentra el primer dominio de transactivación (AF-1), posteriormente el dominio de unión a DNA (DBD), que es una región altamente conservada; le sigue el dominio de unión a ligando (LBD) y finalmente, en la región carboxilo terminal, se ubica un segundo dominio de activación (AF-2) (Figura 10). El dominio LBD, es uno de los más importantes a nivel de activación, ya que además de ser blanco de una gran variedad de ligandos, también representa un sitio de unión a co-activadores y co-represores, por lo que puede regular la localización celular del receptor (Shi Y, 2007).

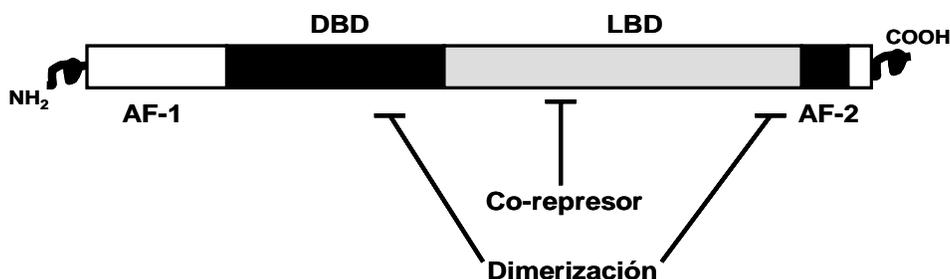


Figura 10. Un receptor nuclear está compuesto por dos sitios de activación, AF-1 y AF-2. Un sitio de unión a ligandos (LDB) y uno de dimerización (DBD), los cuales pueden ser blanco para activadores y represores. En la activación del receptor, se considera determinante la unión del ligando, lo que puede producir que el receptor dimerize con otros receptores, o incluso forme complejos poliméricos; un ejemplo de ello es la heterodimerización del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) y el receptor X de retinoides (RXR) (Savas et al., 1999).

Diversos tipos de compuestos químicos, al igual que los estrógenos y hormonas esteroideas, pueden interaccionar con los receptores nucleares y controlar la expresión de distintos grupos de genes, entre ellos CYP450 y otras enzimas del metabolismo de xenobióticos. La activación inicia con la unión de un ligando al

receptor, lo que provoca que el complejo receptor-ligando se una a regiones promotoras ubicadas en distintos sitios del genoma, conocidas como elementos de respuesta a hormonas y xenobióticos (HRE, XRE); posteriormente, inicia el reclutamiento de proteínas co-activadoras que permiten la apertura de la cromatina, y estabilizan y activan a la RNA polimerasa II (Pol II) (Kininis et al., 2007). Miembros de las familias CYP3A y CYP2 pueden ser inducidas por compuestos como rifampicina, clotrimazol, pregnenolona, carbonitrilo y fenobarbital vía activación del receptor X de pregnano (PXR) y del receptor de androstano constitutivo (CAR) (Savas et al., 1999). El receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) participa en la inducción de miembros de la familia CYP4. Tanto CAR, PPAR y PXR son receptores que pueden heterodimerizar con el receptor X de retinoides (RXR) para unirse a elementos de respuesta y activar la transcripción de genes. Otros receptores como el de estrógenos (ER), puede participar en la inducción de CYP1A, CYP1B y CYP2D; el de glucocorticoides (GR), en la inducción de CYP1A1, CYP1B, CYP2B y CYP3A; el factor nuclear de hepatocitos (HNF-4), induce CYP2A, CYP2C y CYP2D; el receptor de ácido retinoico (RAR), actúa sobre CYP1A, CYP2C, CYP3A4 y CYP26; el receptor para vitamina D, puede activar CYP2D, CYP3A4, CYP27B1 y CYP24, por mencionar sólo algunos ejemplos (Delescluse et al., 2000; Kliewer et al., 2002; Wang y LeCluyse, 2003; Ortíz de Montellano, 2005; Jurutk et al., 2005; Wang et al., 2007).

3.2.3.2 Receptor de aril hidrocarburo (AhR)

El receptor de aril hidrocarburo (AhR), es una proteína soluble de aproximadamente 280 kD (Hoffman et al., 1991), que regula la inducción de genes como CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A8, CYP2S1, CYP2W1, glutatión s-transferasa (GST), 3-aldehído deshidrogenasa, NADPH quinona oxido-reductasa, UDP-glucuronosil transferasa, inhibidores y activadores de plasminógeno e interleucina 1 β (Sogawa y Fujii-Kuriyama, 1997). Los primeros estudios realizados acerca del mecanismo de funcionamiento del AhR, tienen que ver con su

capacidad de responder a la exposición con 3-metilcolantreno y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD). AhR heterodimeriza con el translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburo (Arnt); ambas proteínas se encuentran estructuralmente relacionadas, ya que poseen regiones homólogas de estructura básica de hélice-vuelta-hélice (bHLH) y PER-Arnt-SIM (PAS) (Kawajiri et al., 2007). Las regiones bHLH y PAS, son dominios que se encuentran altamente conservados en distintos factores de transcripción; de hecho, la región PAS mantiene secuencias de aminoácidos altamente conservadas con la proteína del ritmo circadiano (PER) y la proteína single-minded por su nombre en inglés (SIM) de *Drosophila*, y Arnt de humano, de ahí la abreviatura de PAS (Jackson et al., 1986; Hoffman et al., 1991; Nambu et al., 1991; Takahata et al., 1998). AhR puede localizarse tanto en el citosol, como en el núcleo; de hecho contiene señales de localización nuclear (NLS) ubicadas en la región bHLH, y señales de exportación al núcleo en las regiones bHLH y PAS. En ausencia de ligando, AhR se encuentra asociado en complejo con proteínas chaperonas como Hsp90, p23, y ARA9 (XAP2 o AIP); la unión de Hsp90 en NLS, mantiene a AhR en el citosol (Figura 11) (Kazlauskas et al., 2001).

La unión con un ligando favorece la disociación de AhR de las proteínas chaperonas y esto permite que el receptor sea exportado hacia el núcleo, en donde se asocia con Arnt; una vez que el complejo AhR-Arnt se encuentran en el núcleo se unen a regiones de secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) (5'-TNGCGTG-3') (Delescluse et al., 2000). La interacción del complejo AhR-Arnt con XRE y la región promotora, produce cambios en la cromatina, y continúa con la interacción de factores de reclutamiento generales (GTF) como CBP/p300, SRC-1, NcoA-2, p/CIP y la proteína RIP140; lo que también conduce a la activación de la enzima RNA polimerasa II (Pol II) para iniciar la transcripción de genes (Figura 11) (Beischlag et al., 2002; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Kawajiri et al., 2007). AhR puede ser activado por una gran variedad de compuestos químicos endógenos y exógenos, tales como TCDD, 3-metilcolantreno, benzo(a)pireno, benzoflavonas, alcaloides,

aminas aromáticas, omeprazol, bilirrubina, indoles, triptófano, ácido araquidónico, y algunas prostaglandinas (PGG₂) (Denison et al., 2002).

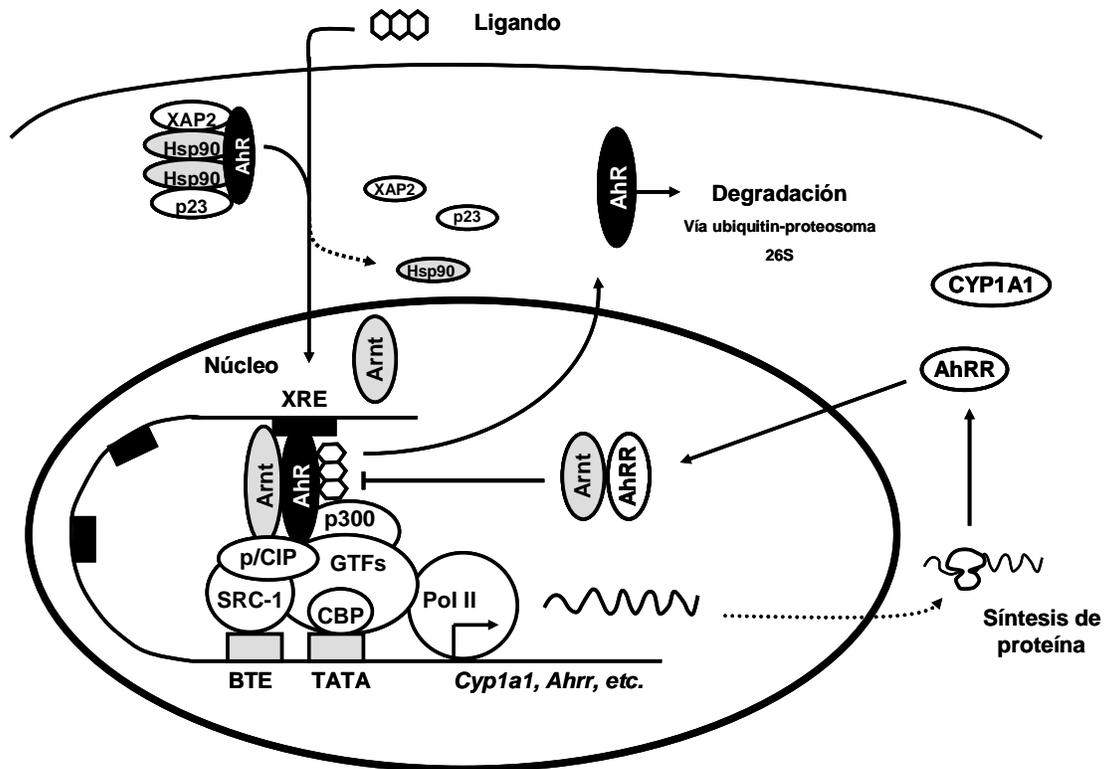


Figura 11. El receptor de aril hidrocarburo (AhR) es una proteína citosólica, que una vez que ha sido activada por un ligando es translocada al núcleo, en donde se une el translocador nuclear de AhR (Arnt); el complejo AhR-Arnt se une a secuencias consenso del DNA, conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos (XRE). La interacción con XRE, provoca cambios en la cromatina, rompimiento de nucleosomas e inicia el reclutamiento de proteínas co-activadoras y acetilasas, lo que activa a la enzima RNA polimerasa II (Pol II) para iniciar la transcripción genética (Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Kawajiri et al., 2007). La acción de AhR puede ser suprimida por la unión con su represor (AhRR) y su posterior degradación vía ubiquitin-26S proteosoma (Ma y Baldwin, 2002; Ma, 2007).

3.2.3.3 Estabilización de RNAm y proteína de CYP450

A nivel post-transcripcional se ha observado que diversos compuestos químicos pueden incrementar los niveles de algunas isoformas de CYP450, por mecanismos que conducen a la estabilización de RNA mensajero, o la estabilización de proteínas (Song et al., 1987; Koop y Tierney, 1990; Novak y Woodcrott, 2000). Se ha observado que la estabilización de RNAm producida por algunos compuestos químicos, tiene que ver con la producción de algunas

proteínas, como la ribonucleoproteína A1 (hnRNP A1) que pueden unirse a las regiones 3'-UTR del RNAm (región 3' de aproximadamente 70 nucleótidos que no se traduce) y protegen las colas de Poli A (colas poli-adeniladas) que finalmente conducen a la estabilización del RNAm (Raffalli-Mathieu et al., 2002; Su y Ding, 2004). Las isoformas de CYP450 que se ha observado pueden ser inducidas por este mecanismo, comprende a miembros de la familia CYP2A, a las isoformas, CYP11B1 y CYP11B2 de humanos, y en otros mamíferos como en rata y ratón (Raffalli-Mathieu et al., 2002; Li et al., 2006; González, 2007).

La inducción de isoformas de CYP450 por estabilización de proteína, se ha observado ampliamente con CYP2E1. Compuestos como el etanol, piridina, pirazol e isoniazida, pueden incrementar de 2 a 8 veces los niveles de la enzima en hígado y cultivos de hepatocitos; sin que se aumenten los niveles de RNAm de CYP2E1 (Ryan et al., 1985; Johansson et al., 1998; Palakodety et al., 1998; Kim y Novak, 1990; Zangar et al., 1993). Este fenómeno se ha confirmado cuando en presencia de inhibidores de la transcripción, compuestos como la piridina, incrementan los niveles de proteína de CYP2E1 (Kim y Novak, 1990), y se ha sugerido que dicha estabilización sucede por la alteración en la degradación de la enzima (Eliasson et al., 1988). Diversos estudios han demostrado que compuestos como el etanol, imidazol, 2-propanol y DMSO, se unen al sitio activo de CYP2E1 y mantienen estables los niveles de la enzima. La vida media de CYP2E1 en microsomas hepáticos de rata oscila alrededor de 6 a 7 hrs, pero el tratamiento con etanol produce que la enzima se mantenga estable hasta 38 hrs, lo cual está relacionado con la disminución en la ubiquitinación de la enzima y su posterior degradación vía proteosoma (Roberts et al., 1995; Goasduff y Cederbaum, 2000).

3.2.4 Cinética enzimática

El estudio de las enzimas se remonta hasta mediados del siglo XIX, época en la que la inquietud por conocer la fuerza vital que mantiene y transforma a los constituyentes de nuestro organismo (Berzelius 1779-1848) y las observaciones

sobre la fermentación alcohólica realizadas por Pasteur (1822-1895), fueron algunos de los hechos que permitieron acuñar el término de enzima, como catalizador biológico (Segel, 1975). Desde principios del siglo XX, la purificación de distintos tipos de enzimas y el análisis de su actividad por medio de modelos matemáticos, han permitido el desarrollo de la cinética enzimática como una herramienta que nos permite conocer diversas características de una enzima, como mecanismos de acción (el orden en el que un sustrato se une, o un producto abandona a la enzima), especificidad por uno o varios sustratos, comportamiento de la enzima en distintas condiciones experimentales (tipo de amortiguador, concentración de sales, pH, temperatura, etc.), así como las alteraciones que pueden ocurrir en presencia de inhibidores o activadores (Segel, 1975). Los estudios de cinética enzimática también pueden ser utilizados para establecer posibles interacciones que suceden *in vivo*, por ejemplo la farmacocinética y farmacodinámica que sigue un fármaco, o la toxicocinética y toxicodinámica en el caso de compuestos tóxicos (Shou, 2002). La cinética más simple que una enzima puede seguir, es la que se acopla al modelo matemático planteado por Henri-Michaelis-Menten, en honor de Víctor Henri (1872-1940), Leonor Michaelis (1875-1949) y Maud Leonora Menten (1879-1960). Este modelo supone que la velocidad inicial de una reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima en una preparación, pero que se incrementa de una forma no lineal, conforme se incrementa la concentración de un sustrato hasta alcanzar una velocidad máxima (Figura 12a) (Segel, 1975). El modelo también hace otras suposiciones, como que la enzima actúa de forma unireactante (transformación de un solo sustrato a la vez), que la enzima reacciona rápidamente con el sustrato y forma el complejo enzima-sustrato (ES), que la enzima libre (E), el sustrato (S) y el complejo ES se encuentran en equilibrio y que la velocidad en la cual ES se disocia a E+S es mucho más rápida que la velocidad en que ES se disocia a E y P (producto) (Figura 12b).

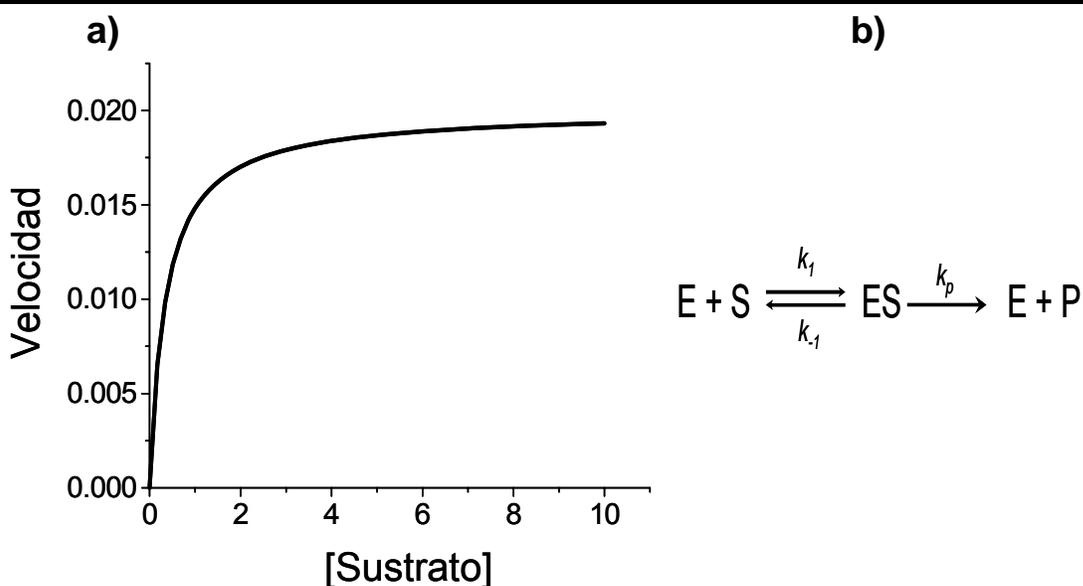


Figura 12. a) Representación teórica de la cinética enzimática de una enzima que se ajusta al modelo de Michaelis-Menten. En este modelo la velocidad inicial de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima, y alcanza un nivel de saturación conforme se incrementa la concentración del sustrato, velocidad máxima (V_{max}). El gráfico se obtuvo a partir de valores teóricos de K_m y V_{max} , en análisis de regresión no lineal, utilizando el programa de Origin version 5. **b)** Esquema de una reacción en el equilibrio rápido. **E** enzima, **S** sustrato, **ES** complejo enzima-sustrato, **P** producto, K_1 , K_{-1} , K_p constantes de disociación.

3.2.5 CYP450 e inflamación

En la últimas 3 décadas se ha determinado que diversos tipos de infección (virales, bacterianas, micóticas y parasitarias) producen alteraciones en la expresión, niveles de proteína y actividad enzimática de distintas isoformas de CYP450, lo cual se ha relacionado con factores producidos como parte de las respuestas inmune e inflamatoria (Morgan, 1997) (Figura 13). Por ejemplo, en hámsters infectados con *Opisthorchis viverrini* se registraron incrementos en la expresión de CYP2A5, la cual metaboliza aflatoxina B₁ (Kirby et al., 1994); resultados similares se obtuvieron en un modelo de infección con *Fasciola hepatica* en ratón en donde también se registró una inducción de CYP2A5 (Montero et al., 1999). En un modelo de infección con cisticercos de *Taenia taeniformis* en hígado de rata, también se registraron incrementos en los niveles de CYP450 totales y en los niveles de proteína y actividad enzimática de las isoformas CYP1A1, CYP2A1 y CYP2B1 debidas a la infección (Montero et al.,

2003); esos incrementos estuvieron relacionados con incrementos en daño genotóxico.

En estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha encontrado que sustancias como TNF α , IL-1 α , IL-6, INF γ , INF β y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, comúnmente producidos durante una respuesta inmune e inflamatoria, pueden afectar los niveles de RNAm, proteína y actividad enzimática de distintas isoformas de CYP450 (Dinarello, 1989; Morgan, 1997).

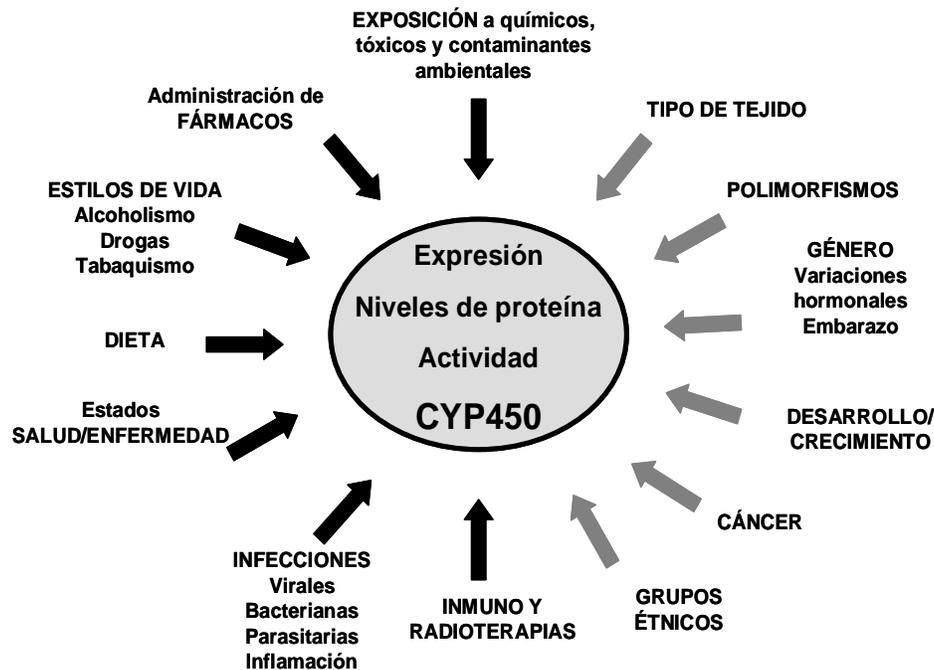


Figura 13. Factores intrínsecos (flechas en gris) y extrínsecos (flechas en negro) a un organismo pueden afectar la expresión de distintas isoformas de CYP450. Muchos autores coinciden en considerar a CYP450 como un grupo de enzimas importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, por su capacidad de responder a distintos tipos de estímulos, tanto endógenos, como exógenos (Nebert 1991). Dentro de este grupo de estímulos, se encuentra el efecto que cualquier tipo de infección, a través de una respuesta inflamatoria, puede producir sobre CYP450.

3.2.6 CYP450 e histamina

Desde hace mucho tiempo se había propuesto que la histamina podría tener un papel importante en la regulación de la proliferación celular (Kahlson y Rosengren, 1968). Con diversos estudios se ha demostrado que esta función se encuentra

regulada por la interacción de la histamina con sitios de unión intracelulares, denominados H_{IC} (sitios de unión intracelular de histamina, diferentes a los receptores H de membrana plasmática) (Brandes et al., 1990; 1992), que más adelante se identificaron como sitios ubicados en la cromatina, núcleo y retículo endoplásmico (Brandes et al., 1997; Brandes et al., 1998; LaBella et al., 2000; Brandes et al., 2000).

Mediante estudios de diferencia espectral con microsomas hepáticos de rata y humano, se determinó que la mayoría de los sitios H_{IC} ubicados en retículo endoplásmico, correspondían a CYP450. En la interacción de la histamina con CYP450, se forma una coordinación del átomo de hierro (en su estado Fe^{3+}) con el anillo imidazol de la histamina y genera un espectro de “tipo II” (cambios espectrales que se definen por la presencia de un pico máximo de absorción de 425 a 435 nm, y uno mínimo de 390 a 405 nm) (Schenkman et al., 1967; Schenkman et al., 1981; Brandes et al., 1998; Dávila-Borja et al., 2007), lo que también se ha observado con isoformas purificadas de CYP3A4, CYP2D6 y CYP1A1 de humano (Brandes et al., 2000). Derivado de estos estudios se ha planteado que el efecto modulador de la histamina en la proliferación celular, podría deberse a que esta amina afecta la actividad de CYP450 y produce un desbalance en la concentración de sus ligandos endógenos; ya que se ha observado que la histamina puede competir con otras aminas biogénicas, como la espermina y espermidina por la unión con CYP450, y con otros compuestos, como la testosterona, androstenediona, progesterona, α y β estradiol, entre muchos más (Brandes et al., 1998; LaBella et al., 2002).

4. Planteamiento del problema

A pesar de que los estudios de diferencia espectral demuestran la interacción de la histamina con CYP450 (Brandes et al., 1990; 1992; 1997, 1998, 2000; Labella et al., 2000; 2002), aún no existen evidencias acerca del efecto que podría tener la histamina en los perfiles de expresión de distintas isoformas de CYP450. Como ya se ha comentado anteriormente, en diversos estudios realizados en humanos y con modelos animales se ha observado que una infección o un estímulo inflamatorio pueden producir alteraciones en la expresión de algunas isoformas de CYP450, en tejidos como el hígado u otros órganos como pulmón, bazo y gónadas (Aitken et al., 2006); pero hasta el momento no se ha caracterizado que la histamina sea uno de los causantes de esos efectos. En el presente estudio se hizo la suposición de que la histamina podría interactuar diferencialmente con CYP450 y nos propusimos estudiar de manera particular el efecto de la histamina en la expresión de isoformas de CYP450 involucradas en procesos de toxicidad y carcinogénesis química como CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2E1, las cuales ya se habían encontrado inducidas en modelos de inflamación/infección en ratas (Montero et al., 2003).

5. Hipótesis

La histamina podría participar en la regulación de la expresión de algunas isoformas de CYP450 relevantes para el metabolismo de tóxicos, en hígado de rata.

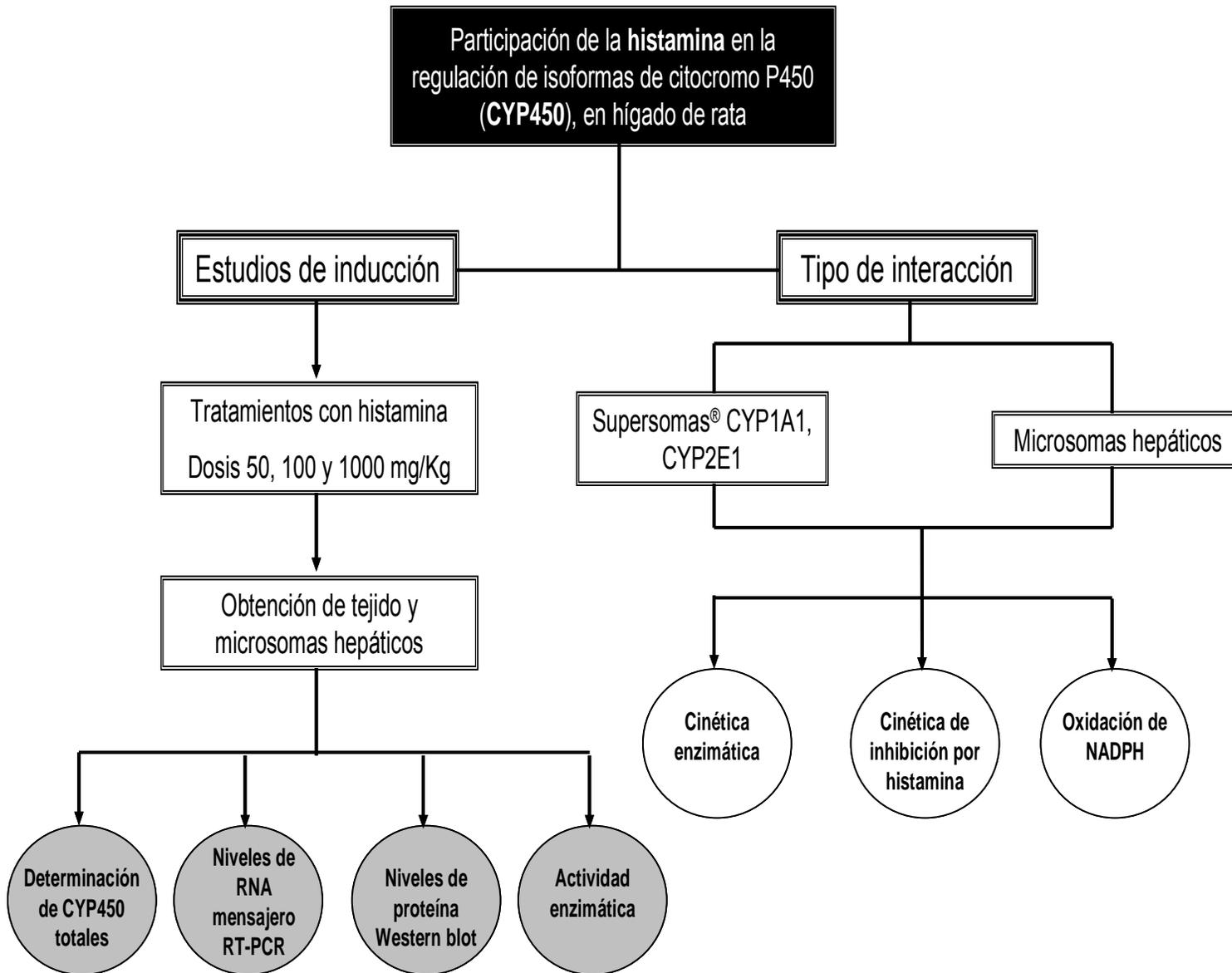
6. Objetivos

General

Determinar si distintas dosis de histamina pueden afectar la expresión en hígado de rata, de isoformas de citocromo P450 importantes en el metabolismo de xenobióticos.

Particulares

- a) Determinar en un modelo de rata in vivo, el efecto de una serie de concentraciones de histamine administradas intraperitonealmente, sobre los niveles de CYP450 hepáticos.
- b) Determinar niveles de CYP450 totales.
- c) Determinar niveles de RNA mensajero de CYP1A1 y CYP2E1
- d) Determinar niveles de proteína CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1.
- e) Determinar la actividad enzimática de CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1.
- f) Determinar si la histamina es un sustrato endógeno de CYP450.



8. Material y Métodos

8.1 Reactivos

Histamina (HA), NADPH, etoxirresorufina (ER), metoxirresorufina (MR), pentoxirresorufina (PR), resorufina, ciclohexanol (CH), dimetil sulfóxido (DMSO), ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), 4-nitrofenol, 4-nitrocatecol, N-nitrosodimetilamina (NDMA), benzo(a)pireno (B(a)P), EDTA, DTT, Triton X-100, 3,3-diaminobenzidina y segundo anticuerpo (IgG) de cabra, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO). Anticuerpos policlonales, elaborados en cabra para CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 de rata y microsomas obtenidos de sistemas de sobre-expresión en células de insecto infectadas con *Baculovirus* (supersomas[®]) de CYP1A1 y CYP2E1 de rata, fueron obtenidas de BD-Gentest (Woburn, MA, USA).

8.2 Tratamientos

Ratas Wistar macho de entre 260 y 315 g de peso corporal, se mantuvieron en cajas de polipropileno, en ciclos de 12 h luz/sombra y con alimento *ad libitum*. Se organizaron grupos de cinco animales, tres de los cuales fueron sometidos a un tratamiento agudo con dosis de 50, 100 y 1000 mg de histamina por Kg de peso corporal, respectivamente (mg/Kg), por inyección intraperitoneal, en una sola dosis por día, durante 3 días; un cuarto grupo, utilizado como control, se trató con el vehículo (NaCl 10% i.p.). Para estudios de cinética enzimática con microsomas hepáticos, un grupo de 5 animales fue tratado con 2.5% (v/v) de ciclohexanol (CH) en agua de beber por 4 días, para inducir CYP2E1 en hígado (Escobar-Garcia et al., 2001) y un segundo grupo se trató intraperitonealmente con benzo(a)pireno (B(a)P), disuelto en aceite de maíz (10 mg/kg de peso corporal), durante 3 días para inducir CYP1A1 (Badary et al., 2003). En todos los tratamientos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

8.3 Inducción de CYP450 por histamina

8.3.1 Preparación de microsomas

La fracción S9 fue preparada de acuerdo con el procedimiento descrito por Maron y Ames (1983). Al realizar la extracción del hígado y considerar su peso en fresco, cada órgano por individuo fue homogenizado y centrifugado a 9,000 g durante 10 min, a 4°C, en una solución de KCl 0.15 M (3 ml/g de peso de hígado), se recuperó el sobrenadante (fracción S9). 10 ml de S9 fueron centrifugados a 100,000 g por 60 min, a 4°C, posteriormente el botón se resuspendió en 10 ml de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 7.4), 0.25 M de sacarosa (Graham y Higgins 1993) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente los microsomas (fracciones de membrana de retículo endoplásmico) se resuspendieron en 3 ml de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 7.4), EDTA 1 mM, DTT 0.1 mM, y 20% de glicerol (v/v). La concentración de proteínas microsomales se determinó espectrofotométricamente a 595 nm, de acuerdo con el método de Bradford (Bradford 1976).

8.3.2 Determinación de CYP450 totales

La cuantificación de CYP450 totales se realizó de acuerdo con el método descrito por Omura y Sato (1964). Se utilizó 1 mg de proteína microsomal por ml de amortiguador de fosfatos de potasio 0.1 M (pH 7.4), EDTA 1.0 mM, 20% de glicerol (v/v) y 0.4 % de Tritón X-100 (v/v). Las muestras fueron procesadas de la siguiente manera: 2 mg de proteína microsomal fueron divididas en partes iguales en dos tubos, con las que se recorrió una línea base de 400 a 500 nm; una de las muestras fue saturada con monóxido de carbono (CO) (1 burbuja/seg) durante 1 min, y posteriormente ambas fueron reducidas con una pizca de ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$); con ambas muestras se obtuvo la diferencia de espectro de CYP450, en un espectrofotómetro de doble haz, marca Camspec M350. Para el cálculo del contenido de CYP450 totales, se utilizó el coeficiente de extinción molar $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omura and Sato 1964).

8.3.3 Obtención de RNA total

Para la obtención de RNA total, dos gramos de tejido fueron almacenados en nitrógeno líquido (~195°C). Muestras de 100 a 200 mg fueron homogenizadas en un 1 ml de TRIzol® y centrifugadas a 12,000 g durante 10 min, una vez que el material insoluble fue removido, se agregaron 200 µl de cloroformo, las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12,000 g, durante 15 min a 4°C. A la fase acuosa resultante se le agregaron 500 µl de alcohol isopropílico para precipitar el RNA a 12,000 g (10 min, 4°C); el botón obtenido (RNA) fue resuspendido en un 1 ml de etanol al 75% (v/v, agua libre de nucleasas) y se centrifugó de nuevo a 7,500 g durante 5 min a 4°C, posteriormente el etanol fue retirado y se dejó secar el botón, para finalmente resuspenderlo en 30 µl de agua libre de nucleasas. Se verificó la integridad de RNA total al observar la presencia de subunidades ribosomales 28s y 18s en gel de agarosa y la concentración se determinó espectrofotométricamente a 260 nm, la pureza se obtuvo a partir del cociente entre los valores de absorbencia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}). Todas las muestras se ajustaron a una concentración final de 100 µg/µl y se almacenaron en alícuotas de 50 µl a 4°C (Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993).

8.3.4 Transcripción reversa-PCR

Para convertir RNAm total en DNA complementario (cDNA), se utilizaron 500 ng de Oligo dT₁₂₋₁₈, 500 ng de RNA total, 0.1 mM de mezcla de dNTPs (2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfato; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y agua libre de nucleasas en un volumen de 18 µl. Las muestras fueron calentadas a 65°C durante 5 min, posteriormente se agregaron 4 µl de amortiguador 5X first-strand (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) y 2 µl de DTT 0.1 M y se incubó a 37°C por dos min en un volumen de 22 µl, finalmente se agregaron 200 unidades (U) de enzima M-MLV transcriptasa reversa (Kotewicz et al., 1985), obteniéndose un volumen final de 25 µl. Las muestras se incubaron a 37°C,

durante 50 min y se detuvo la reacción al calentar a 70°C durante 15 min; el producto final de la reacción es el cDNA.

8.3.5 Amplificación de CYP1A1 y CYP2E1 por PCR

Para la amplificación de CYP1A1 y CYP2E1 se utilizaron 250 ng de cDNA (obtenido de las reacciones de la transcripción reversa), en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 8.3, ficoll 5% (p/v), albúmina sérica bovina 0.25% (p/v), 1 mM de rojo de cresol, 1 mM MgCl₂. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: se utilizaron 500 nM de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de las secuencias de CYP1A1 (Morris y Dávila, 1996) y CYP2E1 (Lindros et al., 1997; Sidorova et al., 2005), y 250 nM para ciclofilina (Cavicchioli et al., 1991; Morris y Dávila, 1996) (Tabla I); 2 U de Taq-DNA polimerasa y 0.1 mM de mezcla de dNTPs, en un volumen final de 25 µl por reacción. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® gradient 5331 (Eppendorf) e iniciaron con un primer paso de 94°C por 2 min, y ciclos de 94°C de temperatura de desnaturalización por 30 s, 54°C de temperatura de alineación por 1 min, 72°C de temperatura de extensión por 1 min y un paso final de 2 min a 72°C. El número de ciclos óptimo de amplificación de CYP1A1 fue de 29 y de 25 para CYP2E1, la región dinámica de amplificación se ubicó entre 26 y 32 para CYP1A1, de 20 a 28 para CYP2E1 y de 20 a 32 para ciclofilina. La ciclofilina se utilizó como control de expresión (gen de mantenimiento). Debido a que las isoformas CYP1A2 y CYP2B1 no presentaron alteraciones en su actividad y niveles de proteína, por efecto de la histamina; en el presente estudio no se determinaron sus niveles de RNAm.

Tabla I
Secuencias de oligonucleótidos usados para RT-PCR

Oligonucleótido	Sentido	Antisentido	Tamaño del producto
CYP1A1	5'-CTGGTTCTGGATACCCAGCTG-3'	5'-CCTAGGGTTGGTTACCAGG-3'	331
CYP2E1	5'-CTCCTCGTCATATCCATCTG-3'	5'-GCAGCCAATCAGAAATGTGG-3'	473
Ciclofilina	5'-CTTCGACATCACGGCTGATGG-3'	5'-CAGGACCTGTATGCTTCAGG-3'	265

Para determinar la cantidad relativa de cDNA amplificado, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) en amortiguador Tris 40 mM, EDTA 0.5 M, ácido acético 0.11 % (v/v), pH 8.0 (TAE); posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio 0.005 % (v/v TAE) y se utilizó un marcador de DNA de 50 pares de bases. Las imágenes de geles se tomaron con una cámara Kodak DC 120 y el análisis de bandas se realizó con el software 1D Image Analysis (Kodak Digital Science). La intensidad de las bandas es expresada en unidades relativas (obtenidas de dividir la intensidad de las bandas de CYP1A1 y CYP2E1 entre los valores de intensidad de la amplificación del gen de mantenimiento celular ciclofilina).

8.3.6 Actividad catalítica de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1

La actividad de CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1 se realizó de acuerdo con los métodos descritos por Burke et al., (1985). Las actividades de cada enzima se determinaron fluorométricamente a partir de la *o*-desalquilación de etoxirresorufina (1 μ M), metoxirresorufina (5 μ M) y pentoxirresorufina (5 μ M) respectivamente. Cada reacción se realizó con amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM (pH 7.6), 500 μ M de NADPH y el sustrato respectivo, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 3 min, posteriormente se agregaron 200 μ g de proteína microsomal/ml para iniciar la reacción; se siguió la formación de resorufina durante 3 min, cada 15 seg, en un fluorómetro Versa Fluor TM de Bio-Rad, utilizando las longitudes de onda de 520 nm de excitación y 585 nm de emisión. La actividad correspondiente a cada enzima fue estimada a partir de una curva estándar de concentraciones conocidas del producto resorufina (5-50 pmoles/ml).

8.3.8 Actividad de CYP2E1

La actividad de CYP2E1 se determinó al medir espectrofotométricamente la formación de 4-nitrocatecol, a partir de la hidroxilación de 4-nitrofenol (Reinke and Moyer 1985). 2 mg de proteína microsomal fueron diluidos en amortiguador de TRIS-HCl 0.5 M, MgCl₂ 0.25 M, con 4-nitrofenol 0.25 mM (pH 7.6) e incubados a

37°C, durante 5 min; posteriormente se inició la reacción al agregar 500 μ M de NADPH e incubar a 37°C por 10 min. Las reacciones fueron detenidas al agregar 0.5 ml de 0.6 N de ácido perclórico, se retiró el excedente de proteína por centrifugación a 9000 g durante 10 min; 1 ml de sobrenadante se mezcló con 0.1 ml de 10 N de NaOH y finalmente la cantidad de 4-nitrocatecol formado se obtuvo a 510 nm en un espectrofotómetro de doble haz luminoso, Camspec M350. La actividad específica de CYP2E1 se calculó a partir de curvas estándar de 4-nitrocatecol (5-50 nmol/ml).

8.3.9 Electroforesis y análisis densitométrico de proteínas

En la detección inmuno-específica de CYP1A1/2, CYP2B1/2 y CYP2E1 (Western blot), se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 7.5 % (SDS-PAGE), con 5 μ g (CYP1A1/2, CYP2B1/2) y 0.05 μ g (CYP2E1) de proteína microsomal; posteriormente se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0.45mm, y se bloquearon con leche descremada al 5% en amortiguador de fosfatos-cloruro de sodio (PBS) durante una noche, a una temperatura de 4°C (Guengerich et al., 1982). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios anti CYP1A1/2, CYP2B1/2 o CYP2E1 por separado durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente, con un segundo anticuerpo anti-IgG biotinilado y estreptavidina conjugada con peroxidasa. El revelado de las bandas de proteína se obtuvo al agregar 3´3-diaminobencidina (0.05% p/v) y peróxido de hidrógeno (0.002% v/v). Las imágenes correspondientes fueron tomadas y procesadas con un BioRad Fluor-S Max Multimager y analizadas con el software Quantity One 1-D version 4.4.1 (Bio-Rad); la intensidad de las bandas detectadas para cada isoforma se expresó en unidades de densidad óptica relativas, obtenidas a partir del cociente de la intensidad neta, entre la intensidad de controles de carga respectivos (5 pmoles de CYP450 de supersomas[®]).

8.4 Estudios de cinética enzimática

Los estudios de cinética enzimática para CYP1A1 y CYP2E1 se realizaron con microsomas hepáticos inducidos para estas enzimas con benzo(a)pireno y ciclohexanol respectivamente, y con supersomas[®].

8.4.1 inhibición de la actividad de CYP1A1 y CYP2E1 por histamina

Para determinar si la histamina podía competir con sustratos conocidos de CYP1A1 y CYP2E1, se utilizaron diferentes concentraciones de histamina en ensayos enzimáticos con microsomas hepáticos y supersomas[®] (Tabla II). Se obtuvieron los valores de las concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀), utilizando el gráfico de Dixon ([histamina] vs 1/velocidad) (Segel, 1975) a partir de las reacciones de *o*-desalquilación de la etoxirresorufina CYP1A1, la hidroxilación de 4-nitrofenol y oxidación de N-nitrosodimetilamina (NDMA) por CYP2E1.

Tabla II

Concentraciones usadas en la cinética enzimática de CYP1A1 y CYP2E1, en microsomas hepáticos de rata y supersomas[®].

CYP1A1		CYP2E1		Histamina [mM]
Etoxirresorufina [μM]	4-nitrofenol [mM]	NDMA [mM]		0.7
0.03	0.25	2		1.5
0.06				3.0
0.12				6.25
0.25				12.5
0.5				25
1				
2.5				
5				
10				
[NADPH]	500 y 100 μM			
[Proteína microsomal]	0.1 mg/ml	(CYP1A1)		
	1 mg/ml	(CYP2E1)		
[Supersomas [®]]	1 pmol/ml	(CYP1A1)		
	25 pmoles/ml	(CYP2E1)		

8.4.2 Oxidación de NADPH

Para establecer si la histamina podía ser metabolizada por CYP1A1 y CYP2E1, se utilizó como indicador la oxidación de NADPH, tanto por microsomas hepáticos, como por supersomas[®]. 2.2 mM de histamina y 0.2 mg/ml de microsomas inducidos con B(a)P, fueron incubados a 37°C por 3 min en amortiguador TRIS-HCl 0.5 M, MgCl₂ 0.25 M (pH 7.6); las reacciones fueron iniciadas al agregar 100 μM de NADPH, para un volumen final de 1 ml. La oxidación de NADPH se midió espectrofotométricamente a 340 nm, en celdas de metacrilato de 1 cm de trayectoria óptica, cada 15 s, durante 3 min (Senler et al., 1985). La actividad enzimática en términos de oxidación de NADPH, fue calculada considerando su coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ en 340 nm (Horecker y Kornberg, 1948). Con los supersomas[®] de CYP1A1, se usó una concentración de 3.2 mM de histamina y un 1 pmol/ml de proteína. La oxidación de NADPH dependiente de histamina fue comparada con la dependiente de ER (1μM) por CYP1A1, los valores de velocidad de la reacción fueron corregidos a partir de la substracción de la oxidación de NADPH independiente de sustrato.

Para CYP2E1 se utilizó 1.2 mM de histamina y 0.2 mg/ml de microsomas inducidos con CH, o 25 pmoles/ml de supersomas[®] de CYP2E1; las muestras fueron procesadas de manera similar a lo ya descrito para CYP1A1, excepto que la oxidación de NADPH se midió fluorométricamente a longitudes de 340 nm de excitación y 460 nm de emisión en un fluorómetro marca Versa-Fluor Bio-Rad. La oxidación de NADPH dependiente de histamina fue comparada con la observada para N-nitrosodimetilamina (NDMA) (2 mM), y corregidas con los valores de oxidación de NADPH inespecífica, en ausencia de sustrato (Horecker y Kornberg, 1948). La actividad específica se obtuvo al considerar curvas estándar de NADPH (12.5 -200 nmol/ml).

8.4.3 Oxidación de NADPH dependiente de la concentración de histamina

Distintas concentraciones de histamina fueron utilizadas para determinar oxidación de NADPH en supersomas[®] de CYP2E1 (Tabla II). 25 pmoles/ml de proteína

diluidos en amortiguador TRIS 0.5 M, MgCl₂ 0.25 M (pH 7.6) e histamina, fueron incubados a 37 °C durante 3 min, posteriormente las reacciones se iniciaron al agregar 100 μM NADPH para obtener un volumen final de 2 ml. La oxidación de NADPH se midió fluorométricamente a 340 nm de excitación y 460 nm de emisión. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se obtuvieron del análisis de regresión no lineal a partir de datos experimentales, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten en el software Origin versión 5. En el análisis cinético también se incluyó la presentación de los datos experimentales en el gráfico de Lineweaver-Burk (Segel, 1975).

8.4.4 Cinética de inhibición de CYP1A1 por histamina

Para determinar el tipo de inhibición producida por histamina en la actividad de CYP1A1, se realizaron diversos ensayos de velocidad inicial con microsomas hepáticos de ratas tratadas con B(a)P y con supersomas[®] de CYP1A1 (Tabla II). En la *o*-desalquilación de etoxirresorufina a resorufina, se determinó que CYP1A1 presentó para ambos sistemas una cinética enzimática de tipo Michaelis-Menten. La Inhibición de la formación de resorufina por histamina, se midió fluorométricamente a las longitudes de onda de 520 nm de excitación y 585 nm de emisión (Burke et al., 1994). Los parámetros cinéticos K_m , V_{max} , K_i y α se obtuvieron a partir del análisis de regresión no lineal, con datos experimentales y utilizando la ecuación de inhibición mixta de Michaelis-Menten con el software Origin versión 5. Los datos de inhibición también son presentados para su análisis en gráficos de Lineweaver-Burk y Hanes (Segel, 1975).

8.4.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos son expresados como promedio \pm desviación estándar. Las comparaciones por grupo fueron analizadas mediante la prueba t de student con valores de $P < 0.05$.

9. Resultados

9.1 Inducción de CYP450 totales por histamina

El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la posible regulación de la histamina sobre isoformas de CYP450 importantes en el metabolismo de xenobióticos, las cuales ya se han observado inducidas en procesos inflamatorios (Montero et al. 2003; Tindberg et al. 1996). El tratamiento agudo con 50, 100 y 1000 mg de histamina, por kilogramo de peso corporal (mg/Kg), produjo incrementos en los niveles de CYP450 totales de microsomas hepáticos de rata (Figura 14). Los máximos niveles de inducción se alcanzaron en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg de histamina y no se observaron incrementos en las ratas tratadas con 50 mg/Kg de histamina, en relación con las ratas del grupo control (vehículo NaCl 10% i.p).

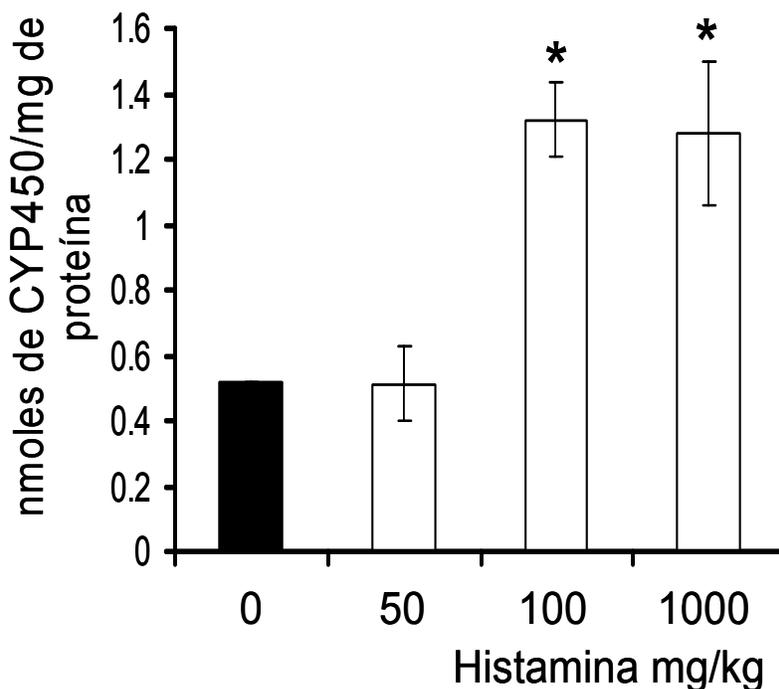


Figura 14. En los tratamientos con las dosis de 100 y 1000 mg/Kg, la histamina produjo un incremento de 2.5 veces por encima de los niveles basales de CYP450 totales de microsomas hepáticos de rata; en cambio las ratas tratadas con la dosis de 50 mg/Kg no presentaron cambios, en comparación con el grupo control. * indica que es significativamente diferente ($P < 0.05$).

9.2 CYP1A1

La histamina también produjo incrementos significativos en los niveles de RNAm (Figura 15) y de la proteína del CYP1A1 hepático (Figura 16). En contraste, la actividad de la enzima sólo se incrementó con las dosis de 100 y 1000 mg/Kg de histamina (Figura 17). CYP1A1 es una de las isoformas de CYP450 que presenta variabilidad interindividual en distintos mamíferos; en humanos se expresa principalmente en pulmón, y en hígado sólo se ha observado incrementada cuando existe exposición a PAH's. En ninguno de los parámetros evaluados sobre la expresión de CYP1A1 se observó un efecto dependiente de la concentración de la histamina y en los niveles de RNAm y actividad enzimática los incrementos máximos se registraron en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg (Figuras 15, 16, 17); aunque la diferencia entre ambas dosis fue de un orden de magnitud, el efecto producido sobre CYP1A1 no fue significativamente diferente, lo que indica que la histamina al inducir a CYP1A1 alcanza niveles de saturación mas allá de la dosis de 100 mg/Kg (Figuras 15, 16, 17).

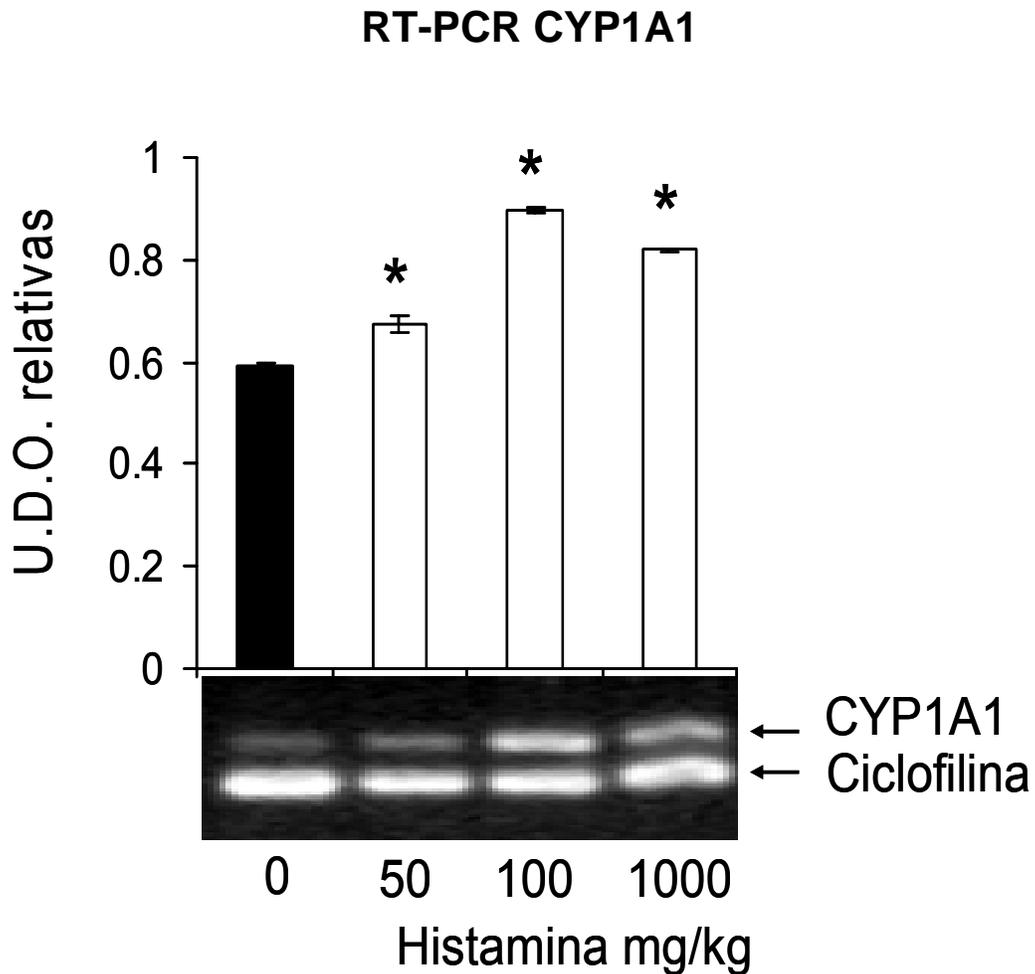


Figura 15. La histamina produjo incrementos de 1.14, 1.5 y 1.4 veces mayores que los niveles de expresión basal de CYP1A1 en hígado de rata, con las dosis de 50, 100 y 1000 mg/Kg de histamina. En la figura se aprecian las unidades de densidad óptica (U.D.O.) relativas, los cuales se obtuvieron al tomar como referencia las U.D.O. de ciclofilina como control de expresión a partir de las imágenes en gel de agarosa de los productos de la amplificación por PCR de DNA complementario de CYP1A1 y ciclofilina, obtenidas de RNA mensajero. En la parte inferior de la figura se presenta una imagen representativa. * indica que es estadísticamente diferente ($P < 0.05$).

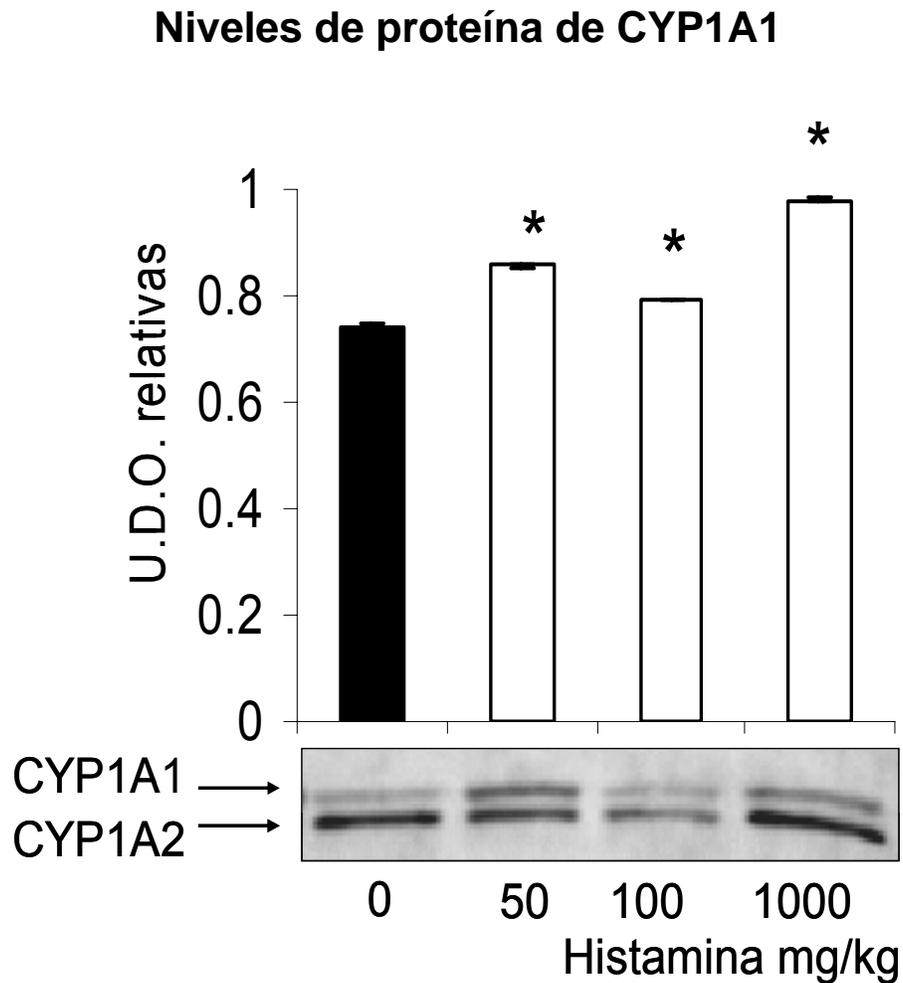


Figura 16. La histamina incrementó los niveles de proteína de CYP1A1. En la figura se presentan las U.D.O. relativas que señalan las diferencias en niveles de proteína de CYP1A1 con los distintos tratamientos. En anticuerpo usado contra CYP1A1 presenta reactividad con la isoforma CYP1A2, lo cual puede distinguirse por las diferencias en movilidad en el inmunoblot. Las bandas superiores corresponden a CYP1A1 (59.4 kD) y las inferiores a CYP1A2 (59.3 kD).

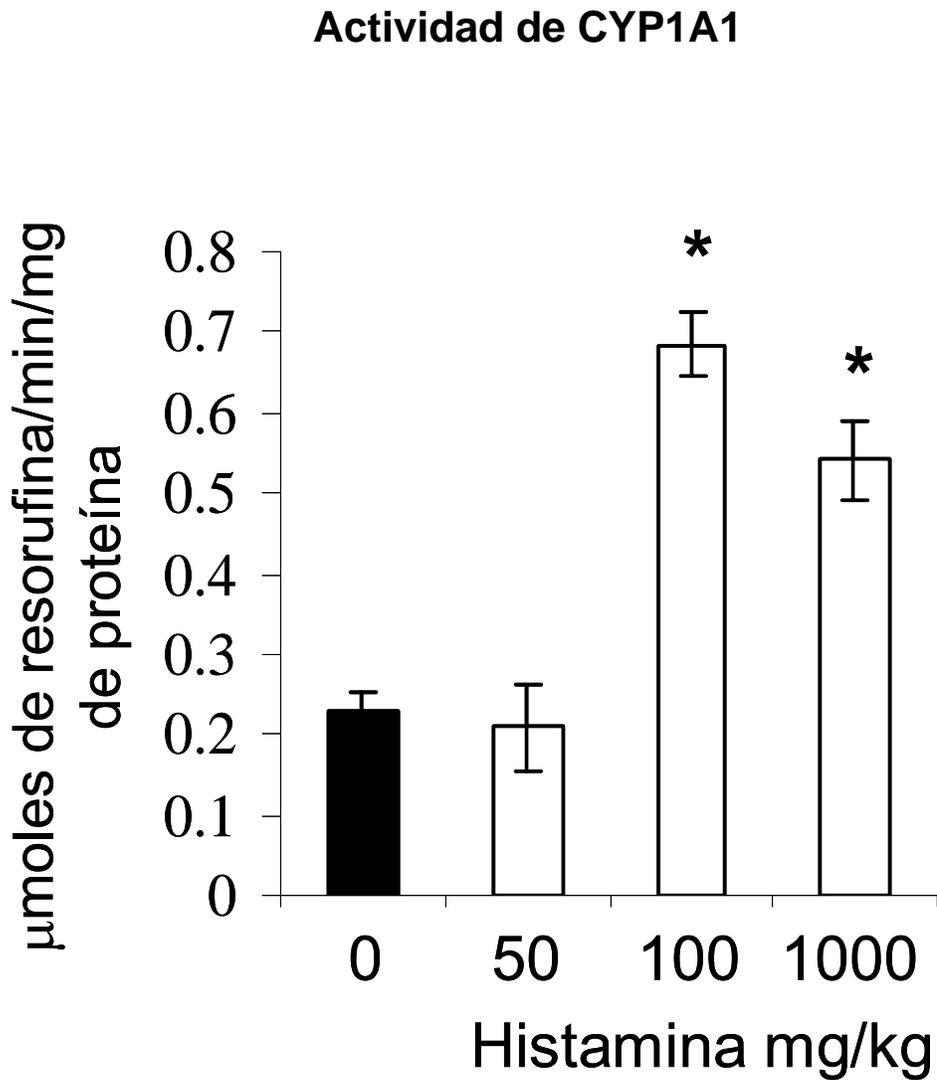


Figura 17. A diferencia de la expresión y niveles de proteína, la histamina incrementó la actividad de CYP1A1 sólo en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg.

9.3 CYP2E1

A diferencia de CYP1A1, CYP2E1 no presentó variaciones significativas en sus niveles de expresión por efecto de la histamina (Figura 18). En contraste, la histamina indujo 1.2 veces los niveles de proteína de CYP2E1 en hígado de rata (Figura 19) y no se observó un efecto por la dosis de histamina, pues el incremento en los niveles de proteína fue igual en todas las dosis. Con respecto a la actividad, el CYP2E1 presentó su máxima inducción (2.5 veces) en la dosis de 50 mg/Kg; en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg de histamina se observaron incrementos de 1.4 y 1.2 veces, respectivamente (Figura 20). CYP2E1 es una isoforma que se expresa constitutivamente en hígado de rata, pero puede ser inducible por etanol, acetona y compuestos orgánicos volátiles (VOC).



RT-PCR CYP2E1

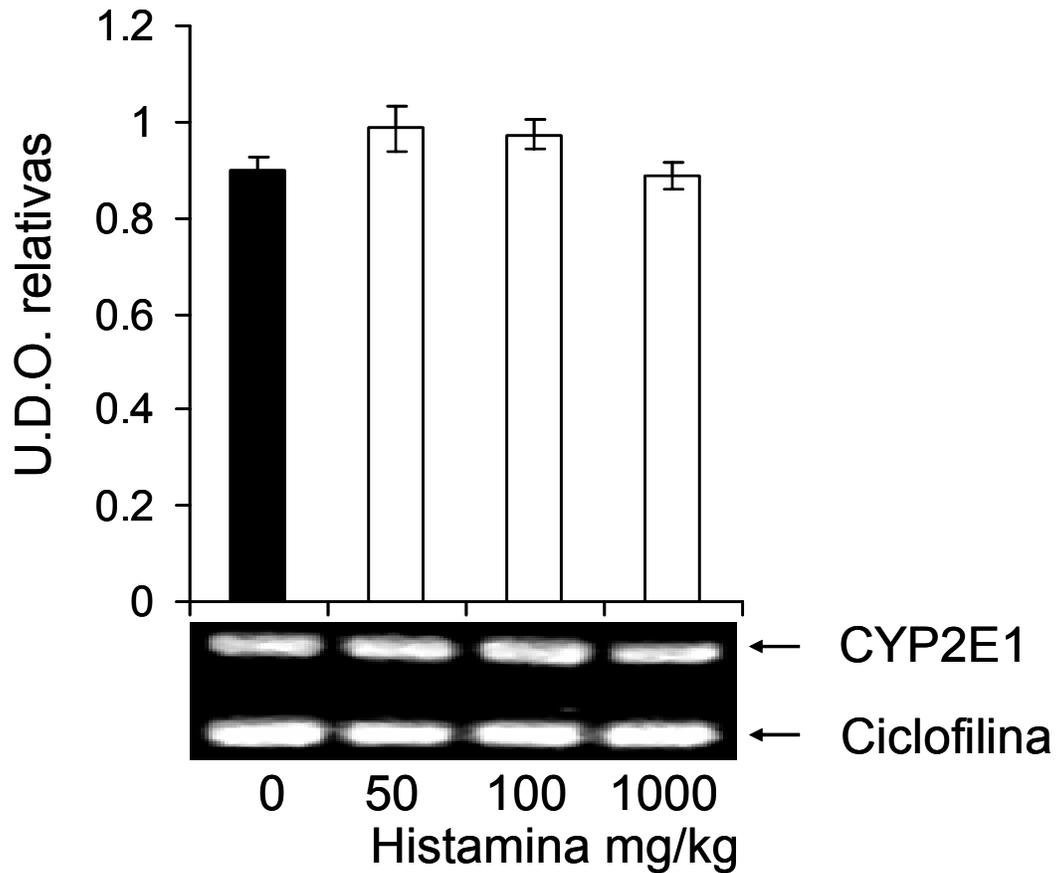


Figura 18. CYP2E1 no presentó variaciones en sus niveles de expresión por efecto de la histamina. En el gráfico se presentan las unidades de densidad óptica (U.D.O.) de CYP2E1 obtenidas a partir de considerar la expresión de la ciclofilina, como control de expresión. También se presenta la imagen de un gel representativo, en el que se observan las bandas correspondientes a CYP2E1 y ciclofilina.

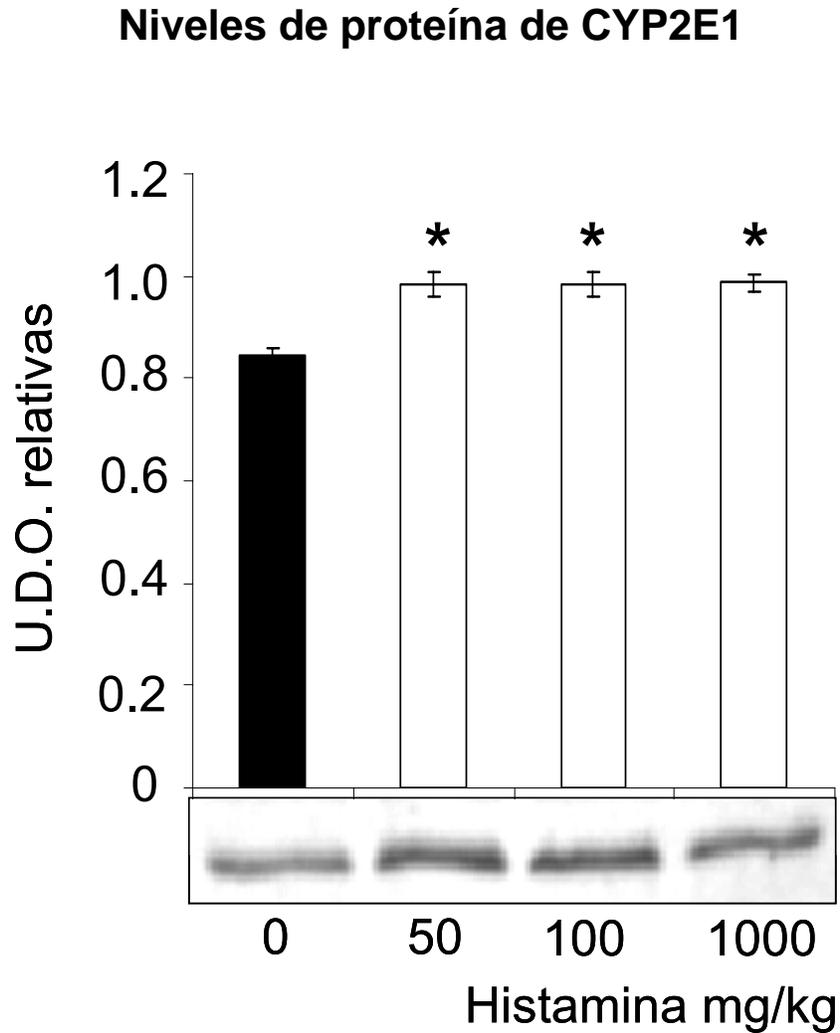


Figura 19. La histamina indujo 1.2 veces la cantidad de proteína CYP2E1 en todos los tratamientos. En el gráfico se presentan las unidades de densidad óptica (U.D.O.) obtenidos a partir del cociente entre las bandas correspondientes a proteínas microsomales de hígado de rata (56.6 kD) entre las U.D.O. de bandas correspondientes a cantidades conocidas de CYP450 de supersomas[®] (no presentadas). * Indica que es estadísticamente diferente ($P < 0.05$).

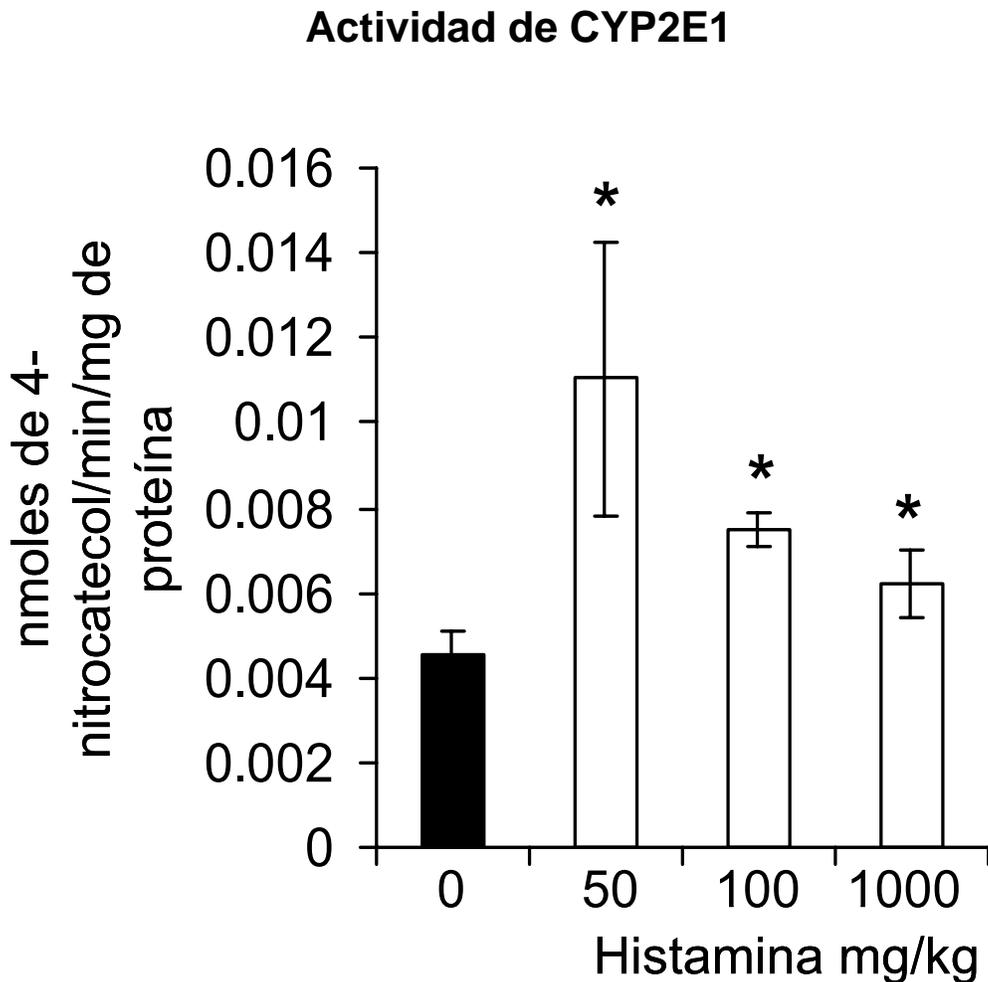


Figura 20. La histamina incrementó la actividad de CYPE1 en 2.5, 1.4 y 1.2 veces, respectivamente. La actividad se obtuvo a partir de la formación de 4-nitrocatecol. *Estadísticamente diferente ($P < 0.05$).

En contraste, CYP1A2 y CYP2B1 no presentaron variaciones en sus niveles de proteína, por efecto de la histamina (Figuras 21 y 22). Resultados similares se observaron con la actividad enzimática, aunque en el caso específico de CYP2B1 se observó una disminución no significativa en su actividad (Figura 22).

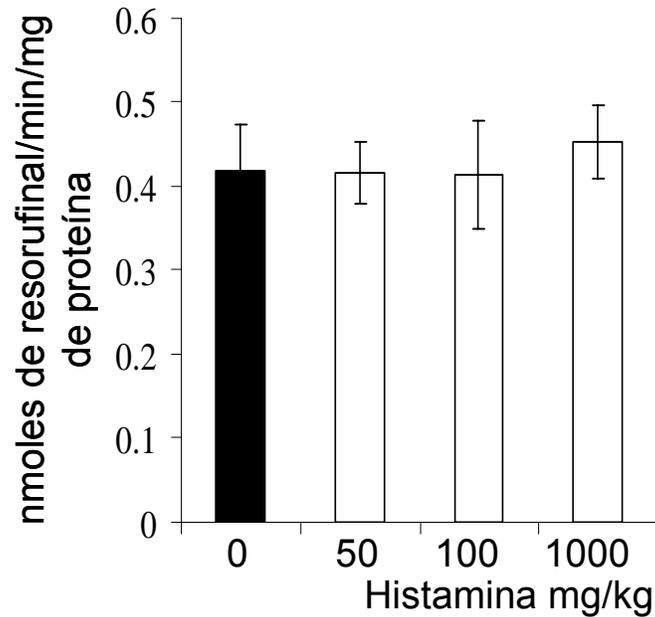


Figura 21. CYP1A2 no presentó variaciones en su actividad y niveles de proteína por efecto de la histamina. (Ver imagen de inmunoblot en figura 16).

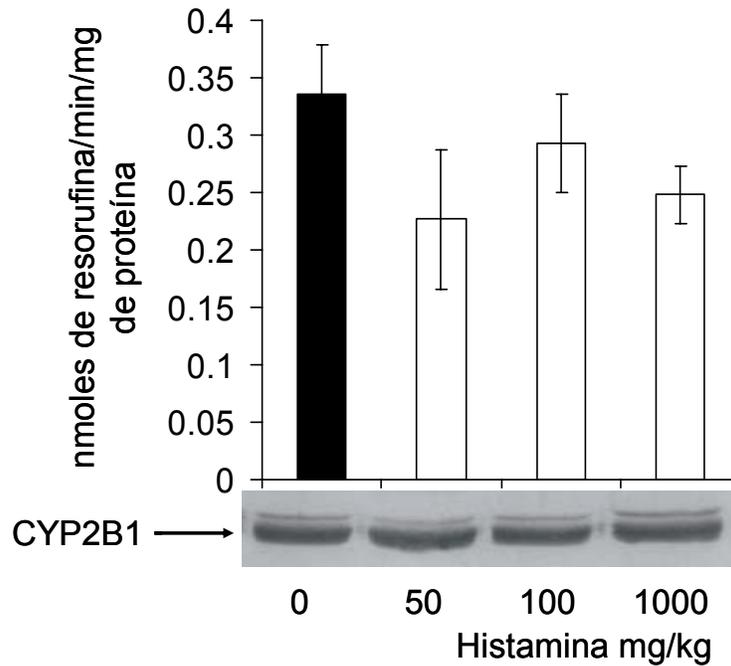


Figura 22. CYP2B1 no presentó variaciones significativas en su actividad por efecto de la histamina. Resultados similares se observaron en sus niveles de proteína. En la figura se aprecia la imagen de las bandas de CYP2B1 detectadas por inmunoelectrotransferencia, la banda superior corresponde a CYP2B2 (55.92 kD) y la inferior a CYP2B1 (55.93 kD).

9.2 Estudios de unión y cinética enzimática

9.2.1 CYP1A1

Diversos estudios acerca de la inducción de distintas isoformas de CYP450, han revelado la existencia de al menos 3 mecanismos diferentes, que incluyen la inducción a través de receptores nucleares, estabilización de RNA mensajero y estabilización de proteína. En la mayoría de los casos se ha observado que el agente inductor actúa al mismo tiempo como sustrato de CYP450 (Nebert 1991). Previamente ya se había descrito la interacción de la histamina con CYP450 (Brandes et al., 1998), sin embargo, aún no se conocía el efecto que podría tener en la expresión de estas enzimas. Debido a la inducción de CYP1A1 y CYP2E1 producida por histamina, un objetivo adicional del presente trabajo fue el de determinar el tipo de interacción de la histamina con ambas enzimas, mediante estudios de cinética enzimática y de oxidación de NADPH, realizados tanto con microsomas hepáticos inducidos para CYP1A1 con benzo(a)pireno (B(a)P) e inducidos con ciclohexanol (CH) para CYP2E1, así como con microsomas sobre-expresados para cada enzima (supersomas[®]).

Se determinaron las concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀) producidas por distintas concentraciones de histamina sobre la actividad de CYP1A1, a partir de la O-desalquilación de la etoxirresorufina; los valores obtenidos fueron de 2.2 y 3.2 mM con microsomas (Figura 23) y con supersomas[®] (Figura 24), respectivamente (Tabla III).

Tabla III. Valores de IC₅₀ obtenidos a partir de la inhibición de la actividad de CYP1A1 y CYP2E1, por histamina.

Microsomas	Tipo de reacción	Sustrato	IC₅₀
Microsomas de hígado de rata, inducidos con B(a)P	O-desalquilación	Etoxirresorufina	2.2 mM (± 0.06)
Supersomas [®] de CYP1A1	O-desalquilación	Etoxirresorufina	3.2 mM (± 0.08)
Microsomas de hígado de rata, inducidos con CH	Hidroxilación	4-nitrofenol	1.2 mM (± 0.2)

Los valores de IC₅₀ fueron calculados a partir de un gráfico de Dixon (1/velocidad vs [histamina]).

IC₅₀ por histamina en microsomas hepáticos de rata y supersomas[®] de CYP1A1

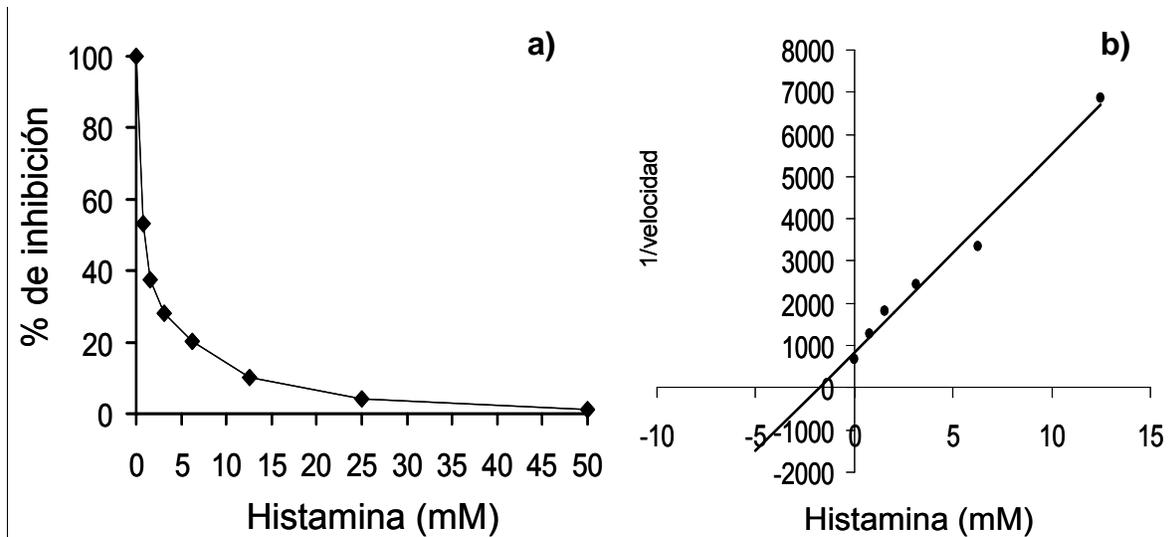


Figura 23. Para determinar los valores de concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀) sobre la actividad de CYP1A1 de microsomas hepáticos, se usaron distintas concentraciones de histamina (Tabla II). **a)** Curva de inhibición de la actividad de CYP1A1 en la *o*-desalquilación de etoxirresorufina. **b)** Gráfico de Dixon (1/velocidad vs [histamina]) a partir del cual se obtuvo el valor de IC₅₀.

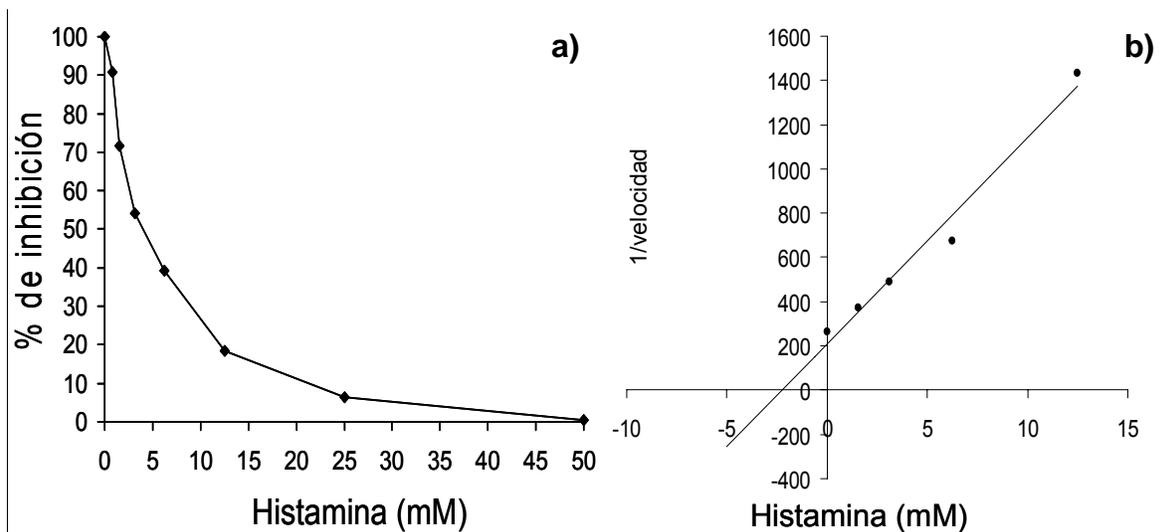
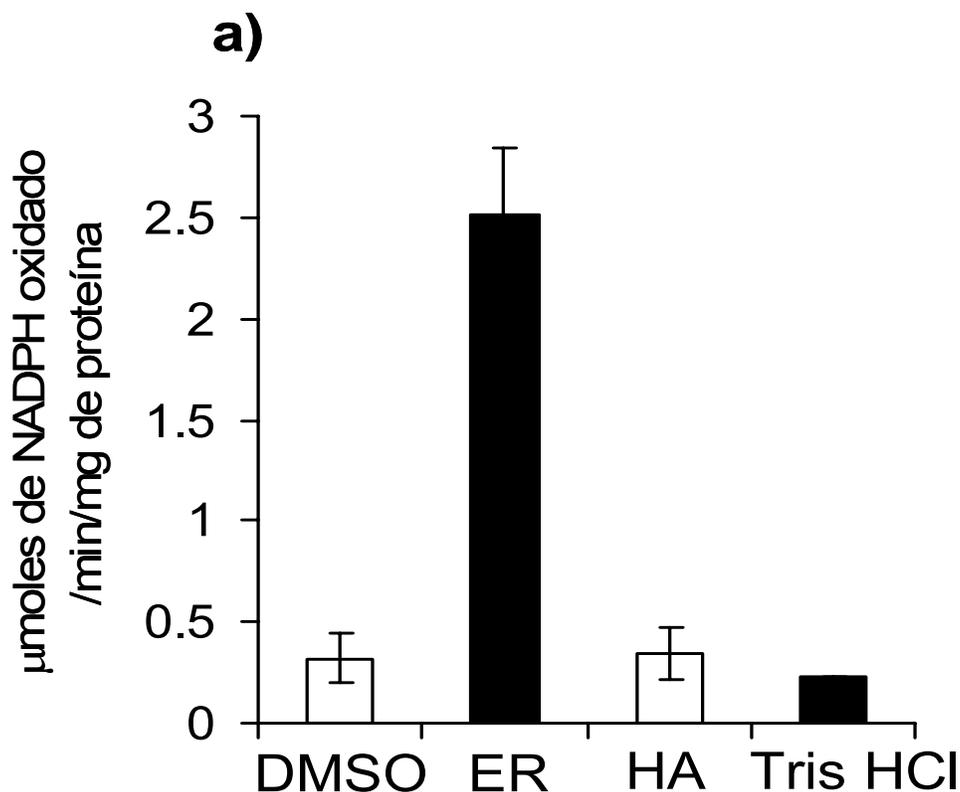


Figura 24. **a)** Curva de inhibición de la actividad de CYP1A1 en supersomas[®]. **b)** Gráfico de Dixon, a partir del cual se obtuvo el valor de IC₅₀ en supersomas[®]. Se usaron las mismas concentraciones de histamina que se usaron con microsomas hepáticos.

La actividad de CYP450 depende de la transferencia de electrones por la enzima NADPH-CYP450 reductasa (Figura 7 y 8), en donde el NADPH es oxidado a su forma NADP^+ al ceder los electrones. Las concentraciones obtenidas de los valores de IC_{50} se utilizaron para determinar oxidación de NADPH dependiente de CYP450 en presencia de histamina, con el fin de determinar si esta amina es un sustrato de CYP1A1. Sin embargo, la histamina no favoreció la oxidación de NADPH, lo que indica que la histamina no es metabolizada por CYP1A1 (Figura 25a y b).

Oxidación de NADPH dependiente de microsomas hepáticos de rata y supersomas® de CYP1A1, en presencia de histamina



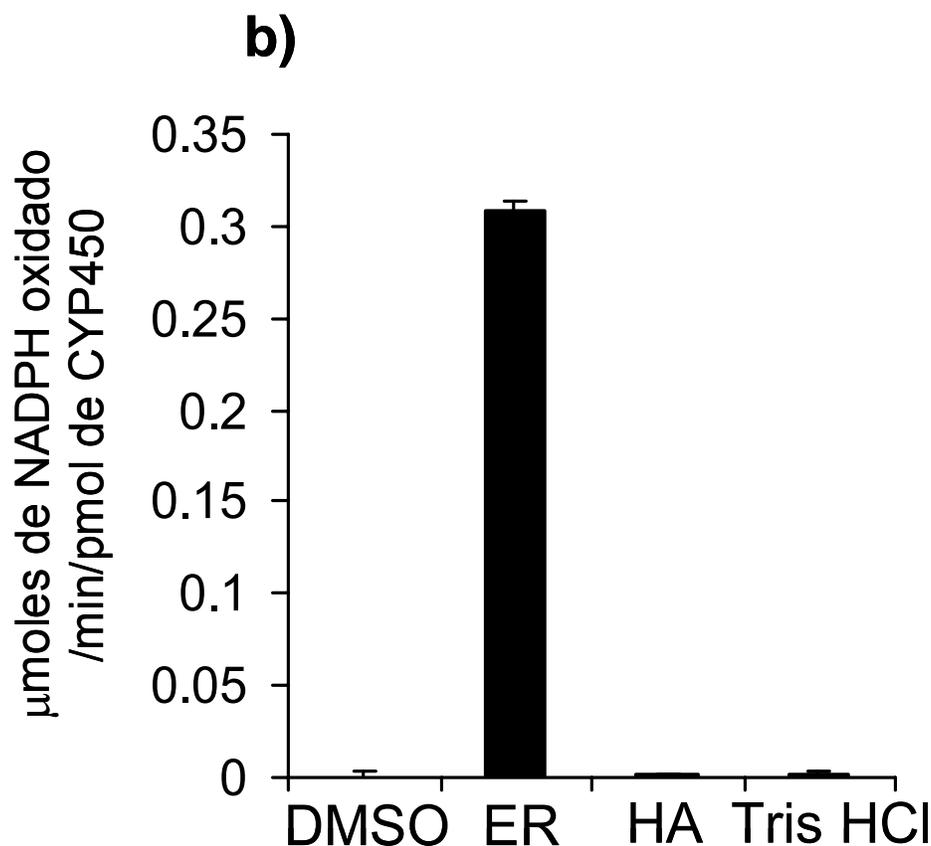


Figura 25. Para determinar si la histamina es un sustrato de CYP1A1, se utilizó como indicador de actividad a la oxidación de NADPH en presencia de histamina 2.2 mM y 3.2 mM, con microsomas y supersomas[®] respectivamente. **a)** Oxidación de NADPH de microsomas hepáticos de rata, inducidos para CYP1A1 con B(a)P. **b)** Oxidación de NADPH de supersomas[®] de CYP1A1. En ambas gráficas se observa la oxidación de NADPH dependiente de etoxirresorfina (ER) como control de la actividad de CYP1A1. Adicionalmente se consideró la oxidación de NADPH espontánea, en presencia del solvente utilizado para histamina (Tris HCl, 50 mM, pH 7.6) y etoxirresorufina (DMSO).

Al determinar que la histamina no es un sustrato de CYP1A1, el siguiente paso fue caracterizar el tipo de inhibición que produce en la actividad de la enzima. Utilizando la α -desalquilación de la etoxirresorufina, en la que CYP1A1 cataliza la producción de resorufina, se obtuvo el modelo cinético de CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata y supersomas[®]; en ambos casos se observó que CYP1A1 presenta una cinética del tipo Michaelis-Menten (Figura 26 y 27). Los parámetros cinéticos fueron K_m de 0.77 y 0.35 μM con microsomas y supersomas[®], respectivamente y valores de V_{max} de 0.011 $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína y 0.02 $\mu\text{moles/min/pmol}$ de CYP450, respectivamente.

Cinética de CYP1A1 (*o*-desalquilación de etoxirresorufina) de microsomas hepáticos de rata

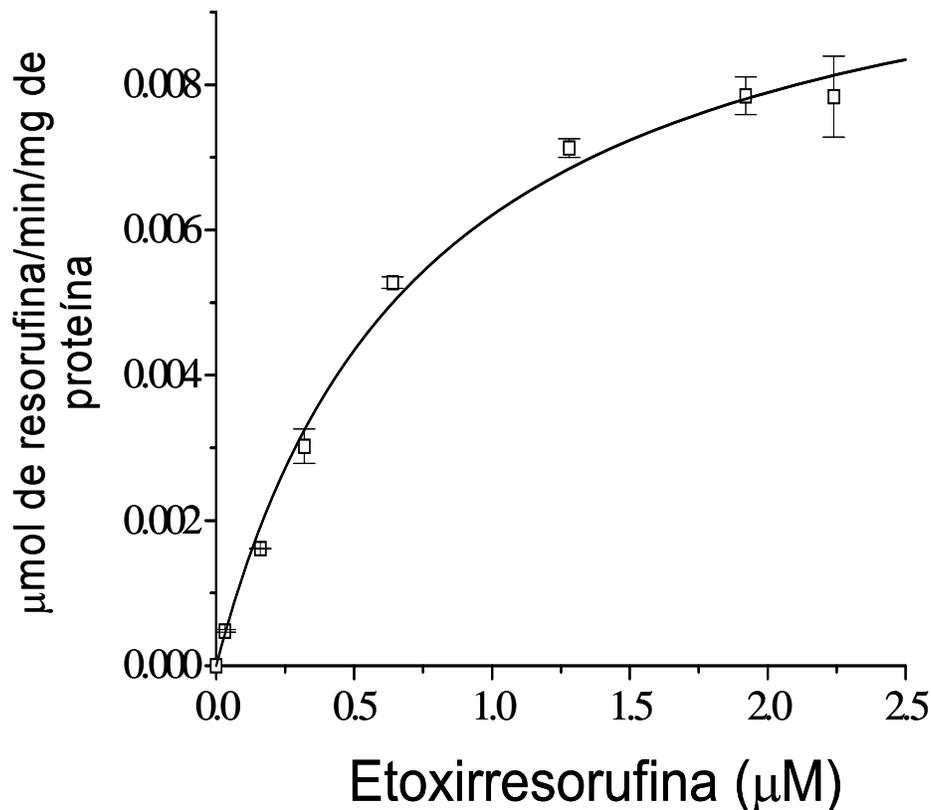


Figura 26. CYP1A1 presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten en microsomas hepáticos de ratas tratadas con B(a)P. El modelo, tal y como se aprecia en el gráfico; alcanza un punto de saturación que depende de la cantidad de enzima disponible para asociarse con un sustrato, en este caso la etoxirresorufina. El valor de la constante de disociación K_m fue de $0.77 \mu\text{M}$ y de velocidad máxima V_{max} $0.011 \mu\text{moles/min/mg}$ de proteína. En la gráfica los puntos (\square) corresponden al promedio de datos experimentales, con sus desviaciones estándar correspondientes. La línea corresponde al ajuste obtenido del análisis no lineal con el software Origin versión 5.

Cinética de CYP1A1 en supersomas[®]

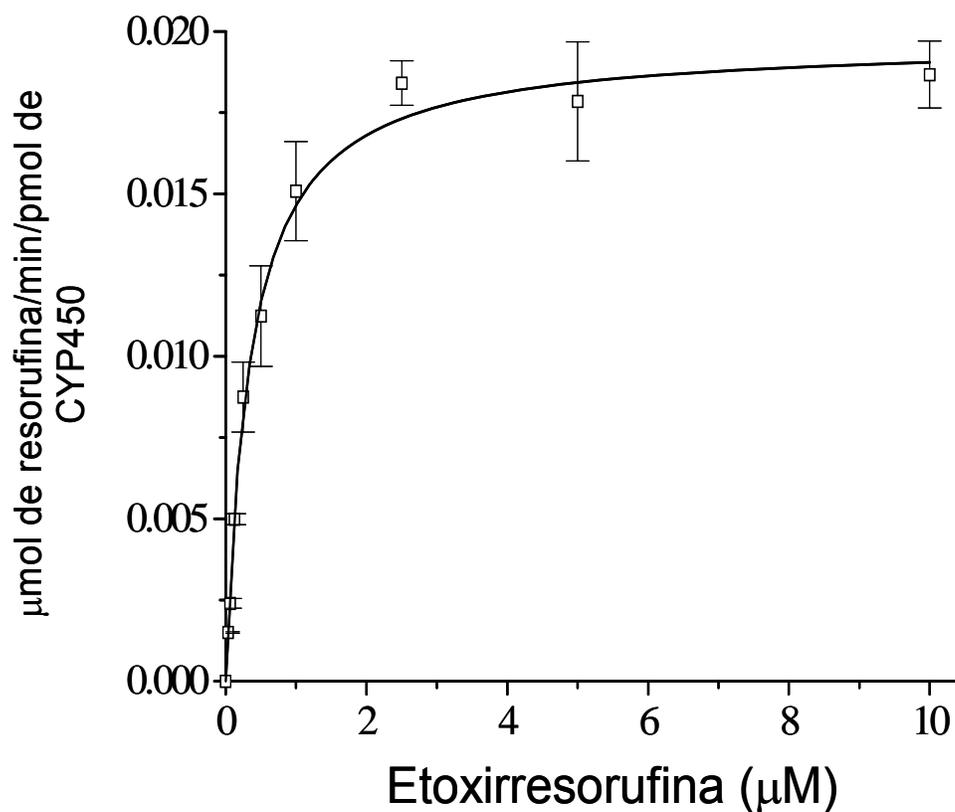


Figura 27. De manera similar a lo observado con microsomas hepáticos, CYP1A1 presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten en supersomas[®]. Los parámetros obtenidos fueron K_m 0.35 μM y V_{max} 0.02 $\mu\text{moles/min/pmol}$ de CYP450. En el gráfico se presentan los promedios de datos experimentales (\square) y sus desviaciones estándar correspondientes, la línea corresponde al ajuste realizado con el modelo no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten.

En concentraciones mayores a 12.5 mM de histamina, la actividad de CYP1A1 fue totalmente inhibida, ya que se produjeron incrementos en el pH de la solución. En microsomas hepáticos, así como con supersomas® de CYP1A1, la histamina actuó como un inhibidor de tipo mixto, los valores de K_i y α fueron de 1.6 mM y 7 con microsomas y 3.4 mM y 4 en supersomas® (Figura 28a,b y 29a y b). El valor de α indica que la unión de la histamina con la enzima produce un incremento de 7 y 4 veces en la K_m por el sustrato, esto es, que la afinidad por el sustrato disminuye en 7 y 4 veces. Para ambos sistemas microsomales, la histamina presentó el mismo mecanismo de inhibición, y sugiere que la histamina afecta la transformación de la etoxirresorufina a resorufina por CYP1A1, confirmando que la histamina no es sustrato de CYP1A1, ya que en un mecanismo de inhibición mixta el inhibidor se une a un sitio en la enzima que involucra sólo parcialmente al sitio activo.

Cinética de inhibición de CYP1A1 por histamina

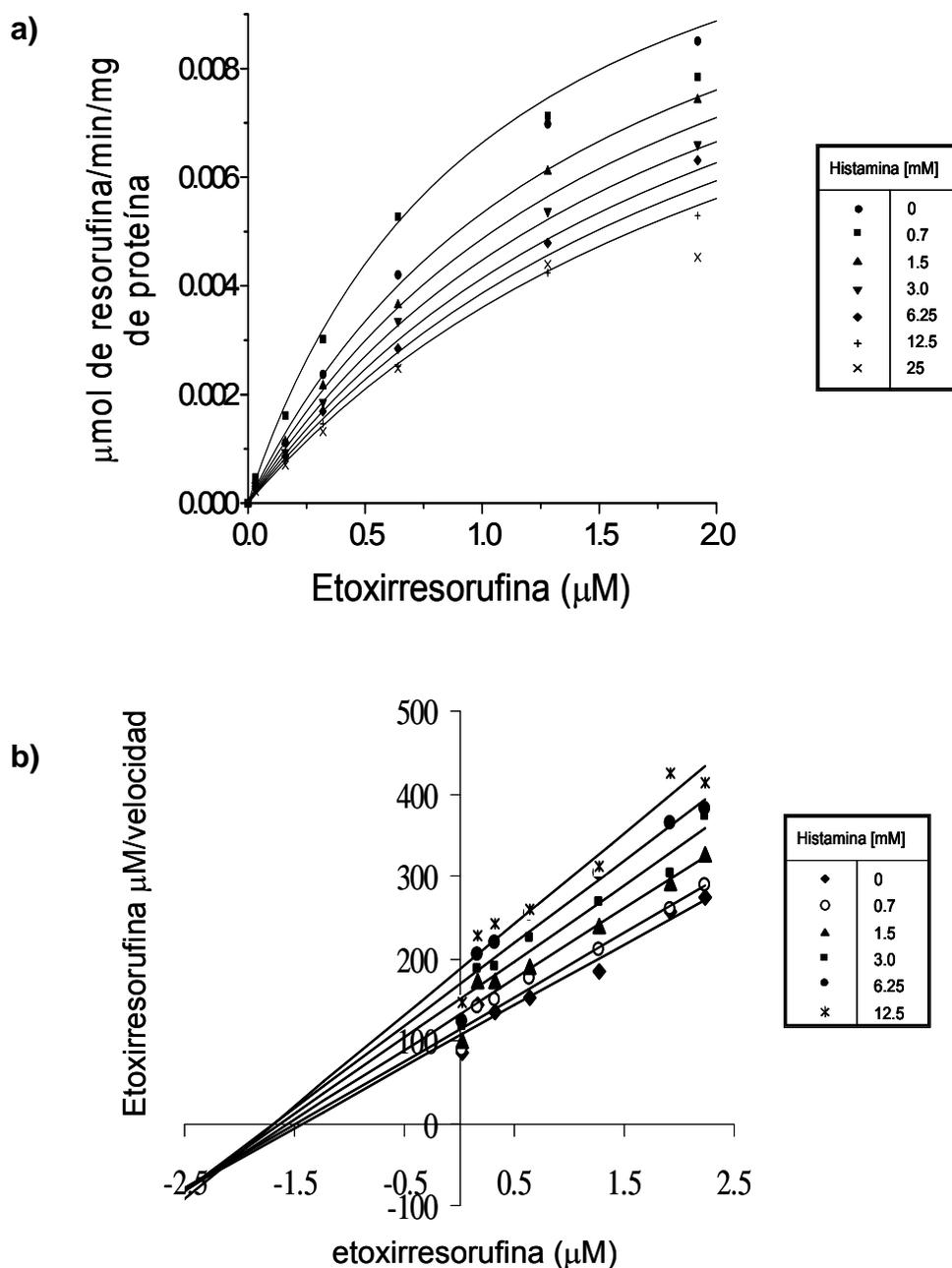


Figura 28. a) Análisis no lineal (Software Origin versión 5) obtenido a partir de datos experimentales de cinética enzimática de CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata, para un modelo de inhibición mixta producido por la histamina. b) Gráfico de Hanes (etoxirresorufina $\mu\text{M}/\text{velocidad}$ vs etoxirresorufina μM). La intersección de las líneas en el tercer cuadrante del plano confirma que el tipo de inhibición producida por histamina en la actividad de CYP1A1, es mixta.

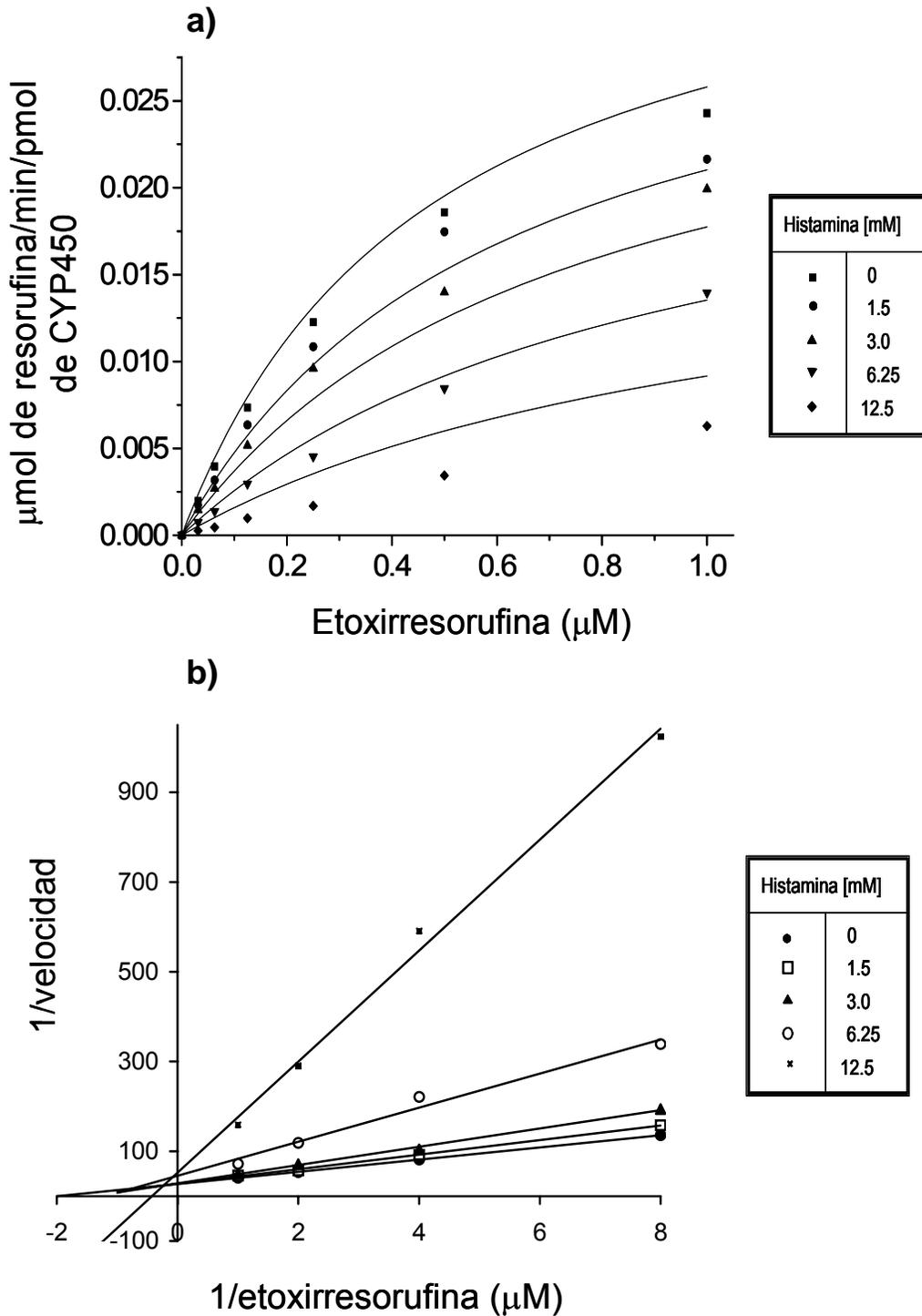


Figura 29. a) Modelo no lineal de la inhibición producida por histamina en la actividad de CYP1A1 de supersomas[®] obtenido con datos experimentales (Software Origin versión 5). **b)** Gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad}$ vs $1/\text{etoxiressorufina } \mu\text{M}$). La intersección de las líneas en el segundo cuadrante, confirma que el tipo de inhibición producida por histamina en la actividad de CYP1A1, también es mixta.

Tabla IV. Tipo de cinética enzimática de CYP1A1 en microsomas hepáticos de ratas (inducidos con B(a)P) y supersomas®, y valores de los parámetros cinéticos obtenidos de datos experimentales. Adicionalmente se presenta el tipo de inhibición producida por histamina en ambos sistemas, las constantes de inhibición y las ecuaciones que representan cada modelo.

SISTEMA MICROSOMAL	MODELO CINÉTICO	TIPO DE INHIBICIÓN PRODUCIDO POR HISTAMINA
	PARÁMETROS CINÉTICOS	
<i>Microsomas de hígado de rata, inducidos con B(a)P</i>	<i>Michaelis-Menten</i>	<i>Mixta</i>
	K_m 0.77 μ M V_{max} 0.011 μ moles/min/mg de proteína	K_i 1.6 mM α 7
<i>Supersomas® de CYP1A1</i>	<i>Michaelis-Menten</i>	<i>Mixta</i>
	K_m 0.35 μ M V_{max} 0.02 μ moles/min/pmol de CYP450	K_i 3.4 mM α 4
<i>Ecuación</i>	$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$	$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m \left[\frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}} \right] + [S]}$
K_m : constante de disociación	[S]: concentración de sustrato	α : factor que modifica el valor K_m , cuando el inhibidor se une a la enzima
V_{max} : velocidad máxima	[I]: concentración de inhibidor	Nota: el valor de α , para una inhibición mixta es mayor a 1
K_i : constante de inhibición	V: velocidad	

La inhibición de la actividad de CYP1A1 por histamina es reversible y no afecta los niveles de holoproteína (proteína activa). Para determinar la reversibilidad en la inhibición, se utilizó la concentración de 12.5 mM de histamina, ya que previamente se había determinado que concentraciones mayores producían

cambios significativos en el pH de la solución (datos no presentados). En esta concentración la histamina inhibió en un 86% la actividad de CYP1A1 microsomal, posteriormente, después de centrifugar a 9000 *g* y reactivar la reacción, al resuspender los microsomas en amortiguador de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, pH 7.6, agregar NADPH (500 μM) y etoxirresorufina (1 μM); el CYP1A1 recuperó su actividad en 79% (Figuras 30 y 31).

Utilizando la misma concentración de histamina, también se determinó que no se afectan los niveles de proteína activa de CYP450 (microsomas hepáticos de rata, inducidos con B(a)P). El método que se utilizó, fue el anteriormente descrito por Omura y Sato (1964): un mg de proteína microsomal/ml de solución se burbujeó con CO (monóxido de carbono) en ausencia y presencia de histamina (12.5 mM). La diferencia de espectro obtenida de las mediciones entre 400 y 500 nm, no mostró diferencias en el espectro de absorción de CYP450, y los niveles de CYP450 totales y la fracción de P420 (especies de CYP450 parcialmente desplegadas que presentan un máximo de absorción a 420 nm) fueron muy similares (Figura 31).

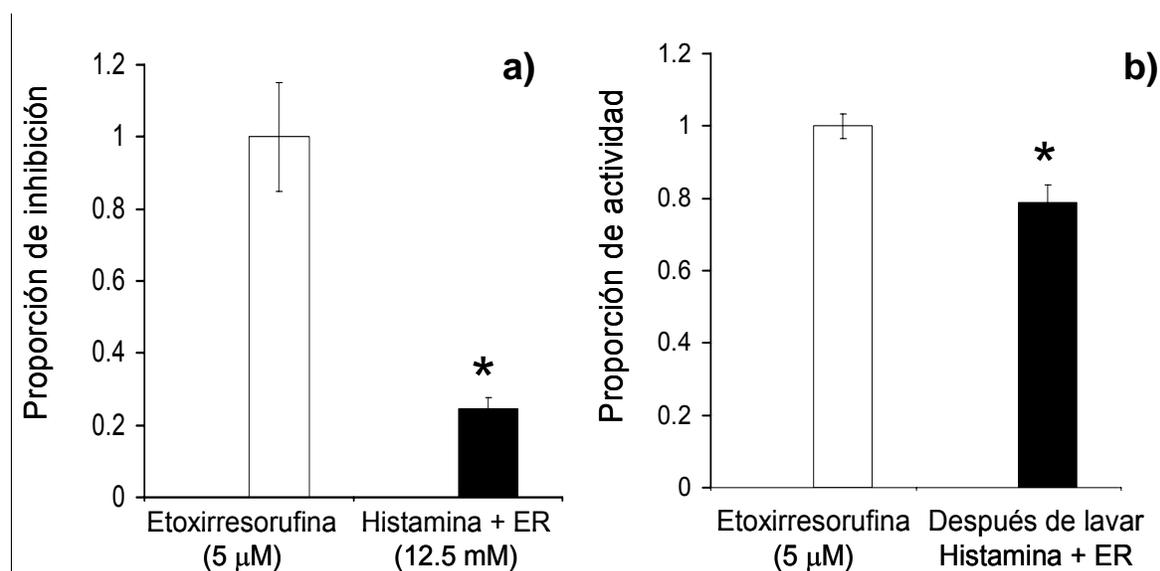


Figura 30. a) La histamina inhibió en un 76% la actividad de CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata. **b)** Después de centrifugar a 9000 *g*, la actividad de CYP1A1 se recuperó en un 79%. ER etoxirresorufina (5 μM). * Estadísticamente diferente (P < 0.001).

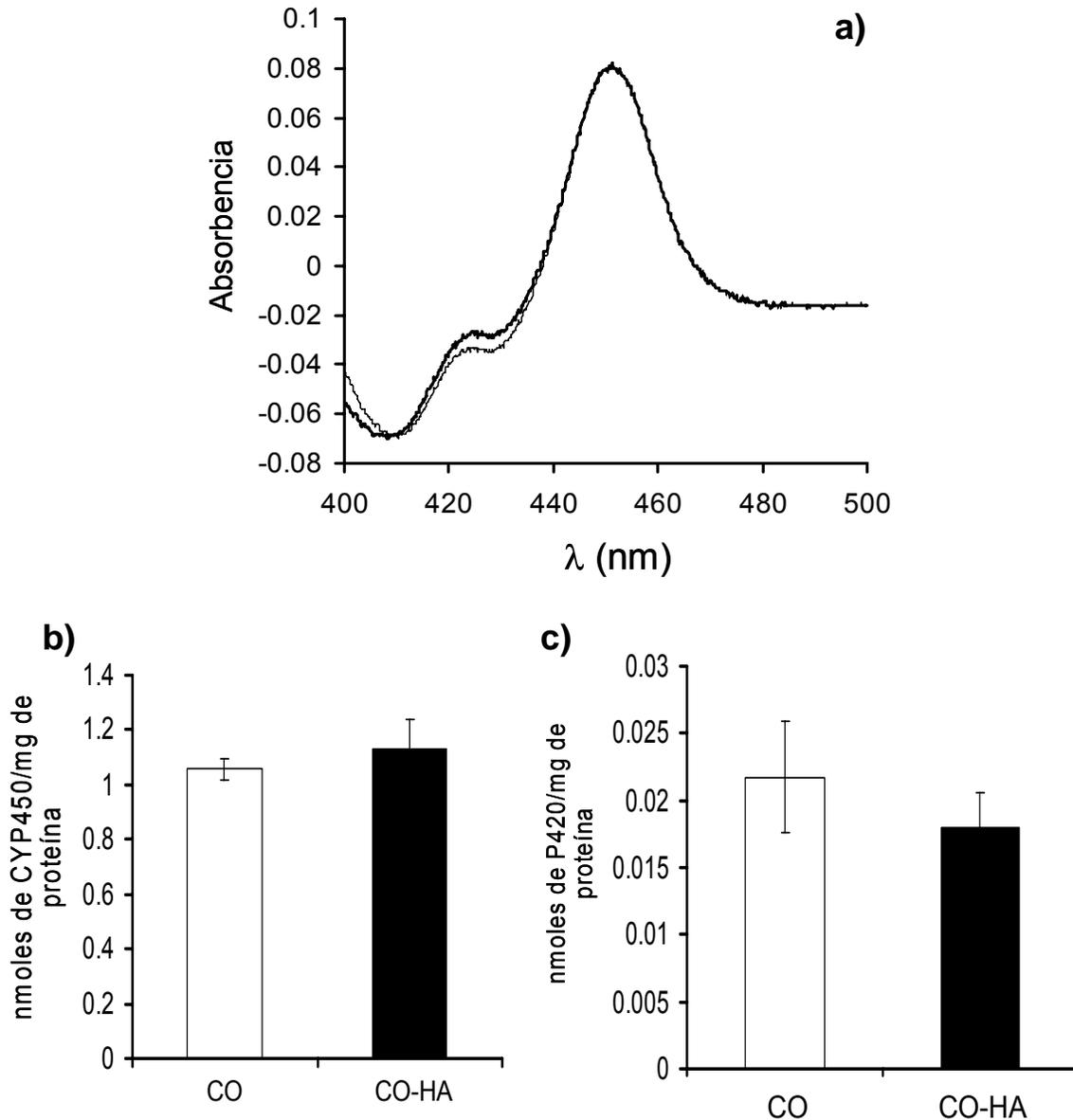
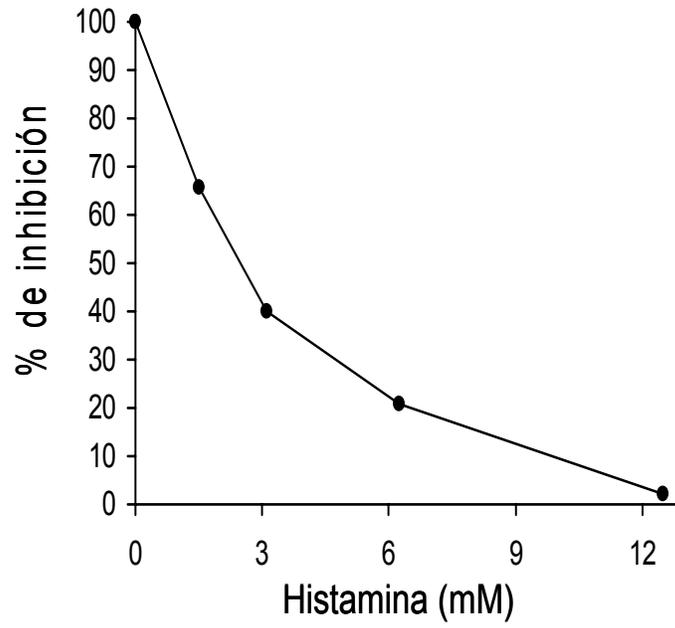


Figura 31. La histamina no altera el espectro de absorción de CYP450, ni los niveles de holoproteína. **a)** Espectro de absorción de CYP450 en presencia de CO (línea gruesa) y 12.5 mM de histamina-CO (línea delgada). Se observa el pico máximo de absorción a 450 nm, y un pico mínimo a 420 nm, que corresponde a especies parcialmente desplegadas de CYP450. **b)** Niveles de CYP450 totales. **c)** Niveles de P420 totales.

9.2.2 CYP2E1

Al estudiar CYP2E1, la histamina compitió con el 4-nitrofenol, un sustrato clásico de CYP2E1, e inhibió su metabolismo (Figura 32). La IC_{50} fue 1.2 mM (Tabla III); y dicha concentración se usó para determinar si la histamina producía oxidación de NADPH dependiente de CYP2E1, tanto en microsomas hepáticos de ratas tratadas con ciclohexanol (inducidas para CYP2E1), como con supersomas[®] de CYP2E1. En ambos casos, la histamina produjo oxidación de NADPH, lo que sugiere que la amina biogénica es un sustrato de esta enzima (Figura 33). Cabe mencionar que en el caso de microsomas hepáticos no fue posible diferenciar la oxidación de NADPH espontánea (en ausencia de sustrato), de la dependiente de N-nitrosodimetilamina (NDMA) e histamina (datos no presentados); lo cual se debe a que en microsomas hepáticos de distintos mamíferos, CYP2E1 oxida NADPH en ausencia de sustrato. En supersomas[®] de CYP2E1 al incrementar las concentraciones de histamina, se observó que la oxidación de NADPH presenta una curva típica Michaelis-Menten, lo que sugiere que la histamina es metabolizada por CYP2E1 (Figura 34). Los valores de los parámetros cinéticos fueron K_m de 2 mM y V_{max} de 0.1 nmol/min/pmol de CYP450 en supersomas[®] de CYP2E1. En supersomas[®], el sistema se encuentra enriquecido con citocromo b_5 , lo que permite un mejor acoplamiento en la transferencia de electrones desde el NADPH hacia CYP2E1 (como aceptor de electrones) por la enzima NADPH-CYP450 reductasa, y lo hace dependiente de la presencia de un sustrato (Guengerich y Johnson, 1997).

a)



b)

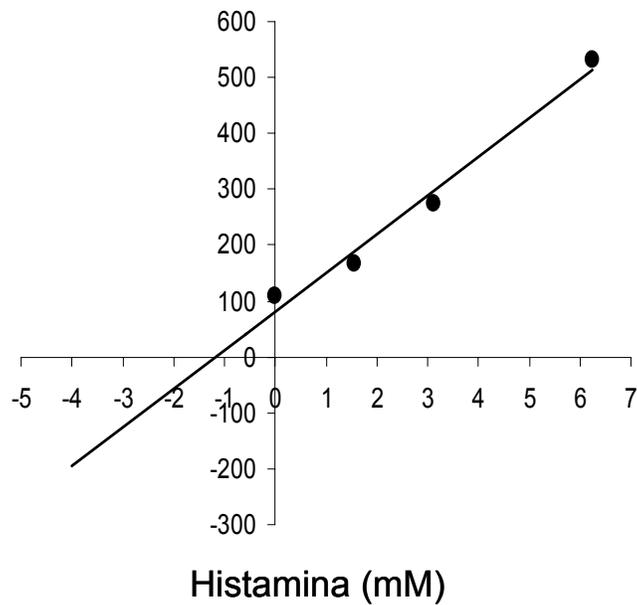


Figura 32. a) Se muestra la curva de inhibición de la actividad de CYP2E1 en supersomas[®]. **b)** Gráfico de Dixon, a partir del cual se obtuvo el valor de IC₅₀.

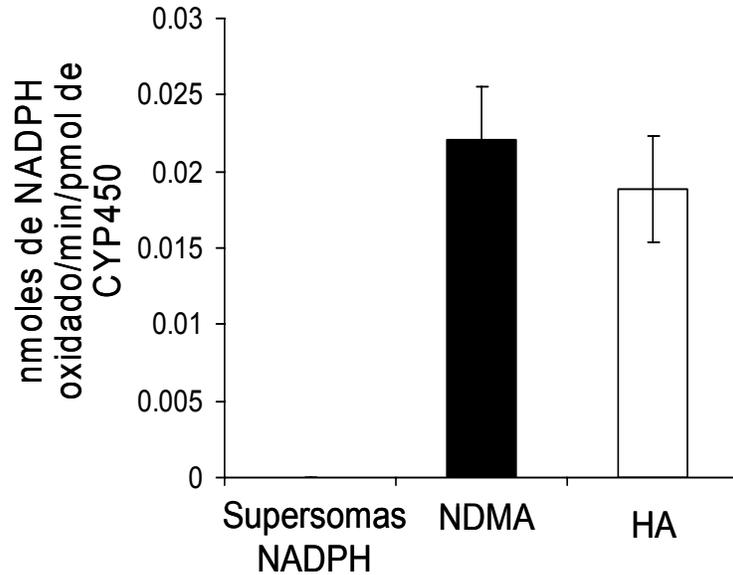


Figura 33. La oxidación de NADPH por supersomas[®] de CYP2E1 en presencia de histamina indica que la amina es metabolizada por esta enzima. La oxidación de NADPH por histamina es similar a la observada en presencia de N-nitrosodimetilamina (NDMA), un sustrato típico de CYP2E1. En el gráfico también se observa que la oxidación espontánea en ausencia de sustrato es nula, lo que apoya que la oxidación de NADPH observada sea dependiente de la presencia de un sustrato.

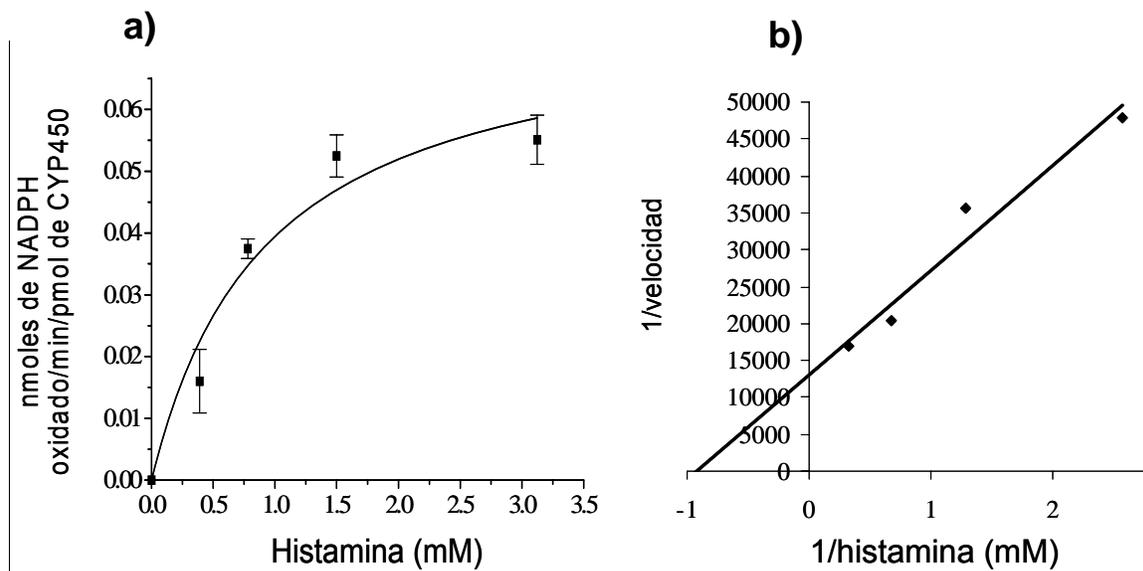


Figura 34. a) La oxidación de NADPH por supersomas[®] de CYP2E1, es dependiente de la concentración de histamina y presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten. **b)** Gráfico de Lineweaver-Burk ($1/\text{velocidad}$ vs $1/\text{histamina}$ mM), las constantes K_m de 2 mM y V_{max} de 0.1 nmol/min/pmole de CYP450 se obtuvieron mediante el análisis de datos experimentales en un modelo de regresión no lineal (software Origin version 5).

10. Discusión

Diversos estudios han demostrado que la histamina puede regular la proliferación celular a través de su interacción con CYP450 (Brandes et al., 1990; Brandes et al., 1992; Brandes et al., 1997; Brandes et al., 1998; LaBella et al., 2000; Brandes et al., 2000); y se ha propuesto que dicha interacción modula la actividad catalítica de estas enzimas, afectando los niveles homeostáticos de endobióticos que regulan la expresión de genes y el crecimiento celular, incluyendo a los mismos genes de CYP450 (Brandes et al., 1997). En el presente estudio, la inyección intraperitoneal de histamina incrementó los niveles hepáticos de CYP1A1 y CYP2E1 en rata; los estudios realizados in vitro demuestran que la histamina interacciona con ambas enzimas, de manera similar a como ya se ha reportado para algunas isoformas humanas y CYP450 totales (Brandes et al., 1990; Brandes et al., 1992; Brandes et al., 1997; Brandes et al., 1998; LaBella et al., 2000; Brandes et al., 2000), lo que demuestra que la histamina es un ligando endógeno para CYP450. La inducción de CYP1A1 es de relevancia toxicológica, debido a que esta enzima participa en la activación metabólica de una gran variedad de carcinógenos químicos como el benzo(a)pireno y el dimetilbenzo(a)antraceno (Lewis et al., 2001), los cuales están ampliamente relacionados con la generación de daño genotóxico y cáncer pulmonar en humanos. A nivel endógeno, CYP1A1 se encuentra expresado en niveles muy bajos en hígado de rata y participa en el metabolismo de estradiol, testosterona y bilirrubina; además, existen reportes de alteraciones hormonales ligadas a la inducción de esta enzima (Bittar and Jefcoate, 1996). CYP1A1 puede inducirse por compuestos como el 3-metilcolantreno, el cual puede incrementar más de 20 mil veces la actividad de CYP1A1 y más de 1000 veces sus niveles de RNAm (Sidorova et al., 2005); resultados similares se han observado con la dioxina TCDD (Okino et al., 2007) y benzo(a)pireno (Cheng et al 2007) (Tabla V). Por su parte CYP2E1 es una de las enzimas de Fase I (metabolismo de xenobióticos) que participa en el metabolismo de compuestos orgánicos volátiles como el benceno, tetracloruro de carbono (CCl₄), cloroformo, estireno y cloruro de vinilo (Caro and Cederbaum 2004; Jesek

2005), y constituye una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hepatocitos, en los que produce aproximadamente el 30% del total de estos factores (Mates y Sánchez-Jimenez, 2000). En cuanto a funciones endógenas, a CYP2E1 se le ha relacionado con el metabolismo de cuerpos cetónicos provenientes del metabolismo de carbohidratos, y más recientemente se le ha propuesto un papel importante en el mantenimiento de los estados de óxido/reducción de la célula (Zangar et al., 2004). A diferencia de CYP1A1, CYP2E1 es una enzima que se expresa de manera constitutiva en hígado de humano y rata, en donde presenta una abundancia relativa del 7% del total de CYP450 en ese órgano (Masimirembwa et al., 1999). CYP2E1 es inducible de 2 a 3 veces por compuestos como la acetona, ciclohexanol, etanol, benceno y pirazol (Tabla V) (Roberts et al., 1995; Escobar-García et al., 2001).

La inducción producida por histamina sobre CYP1A1 fue moderada, en comparación con la observada por compuestos exógenos (Tabla V) (Sidorova et al., 2005; Okino et al., 2007; Cheng et al., 2007), pero es similar a la producida por inductores endógenos como triptófano, hemo y bilirrubina, observada en distintos modelos de estudio (Heath-Pagliuso et al., 1998; Sinal y Bend, 1997), así como a la reportada en un modelo de inflamación en hígado de rata (Montero et al., 2003), lo que apoya la propuesta de que la histamina es un inductor natural de CYP1A1. También se observó que cada parámetro evaluado mostró diferentes valores de inducción; por ejemplo, en las ratas que fueron tratadas con la dosis de 100 mg/Kg de histamina, se observaron incrementos de 1.5 veces en los niveles de transcripción, 1.1 veces en los niveles de proteína y 3 veces en la actividad (Figuras 15 a 17), en comparación con los animales del grupo control. Este comportamiento ya se ha observado también en estudios de inducción de CYP1A1 por compuestos exógenos, como el anteriormente descrito con 3-metilcolantreno y otros más (Sidorova et al., 2005; Rodríguez-Antona et al., 2001).

Tabla V. Patrones de inducción producidos por distintos compuestos químicos *in vivo*, sobre los parámetros de expresión CYP1A1 y CYP2E1 en hígado de rata, registrados en diferentes estudios.

INDUCCIÓN DE CYP1A1 EN HÍGADO DE RATA					
Inductor	Vía de exposición/dosis	RNAm	Proteína	Actividad	Referencia
Benzo(a)pireno	Intraperitoneal 50 mg/Kg	6600 veces	N.D.	N.D.	Harrigan et al., 2006
3-metilcolantreno	Intraperitoneal 25 mg/Kg	1000 veces	N.D.	20,000 veces	Sidorova et al., 2005
Mezclas de PAH's	Gástrica 21 µg/Kg	2.2 veces	N.D.	5.4 veces	Chaty et al., 2007
Infección/inflamación en hígado		N.D.	N.D.	2.1 veces	Montero et al., 2003
Menadiona (análogo de la vitamina K ₃)	Oral 15 mg/Kg	11.8 veces	N.D.	5.5 veces	Sidorova et al., 2005
INDUCCIÓN DE CYP2E1 EN HÍGADO DE RATA					
Acetaminofen	Intraperitoneal 500 mg/Kg	0.6	0.6 veces	1.6 veces	Kim et al., 2007
Nicotina	Subcutánea 0.1–1.0 mg/Kg	N.D.	1.5 veces	N.D.	Micu et al., 2003
Acetona	Oral 5% (v/v) agua de beber	S.D.	2.5 veces	3.2 veces	González-Jasso, et al., 2003
Etanol	3 g/Kg	S.D.	1.9 veces	1.9 veces	Howard et al., 2001
Benceno	Intraperitoneal 5 mmoles/Kg	2.2 veces	2.0 veces	1.4 veces	González-Jasso, et al., 2003
Pirazol	Intraperitoneal 150 mg/Kg	N.D.	N.D.	2-3 veces	Kukielka y Cederbaum, 1995

N.D. Se refiere a que en dicho estudio no fue determinado

S.D. Se refiere a que en el parámetro estudiado no se registraron diferencias estadísticamente significativas, en comparación con un grupo control.

En los experimentos con CYP2E1, la inducción de los niveles de proteína y actividad producidos por el tratamiento con histamina fueron comparables con los observados en presencia de inductores exógenos como el etanol y ciclohexanol (Tabla V) (Escobar-Garcia et al., 2001; Caro and Cederbaum 2004). En ninguno de los parámetros evaluados sobre la inducción de CYP450 totales, CYP1A1 y CYP2E1, se observaron variaciones dependientes de la dosis de histamina (Figuras 14 a 20), lo que contrasta con la inducción por compuestos químicos exógenos, en donde la mayoría de las veces se obtienen respuestas dependientes de la dosis. De hecho, en el caso de CYP450 totales y la actividad de CYP1A1, el rango de inducción obtenido entre las dosis de 100 y 1000 mg/Kg de histamina, no fue significativamente diferente entre sí, a pesar de que la diferencia entre las dos dosis es de un factor de 10, por lo que se piensa que el efecto de la histamina en la inducción de CYP450 alcanza niveles de saturación (Figuras 14, 17). En los resultados de inducción de CYP2E1 se observó otro tipo de comportamiento. Por

ejemplo, los incrementos en los niveles de proteína fueron 1.2 veces para los tres tratamientos (50, 100 y 1000 mg/Kg) (Figura 19); en cambio, se registró mayor variación en la actividad, en donde CYP2E1 presentó un incremento máximo (2.5 veces) en la dosis más baja de histamina (50 mg/Kg) (Figura 20). Los incrementos en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg no fueron significativamente diferentes entre sí, y fueron menores que los de la dosis más baja (1.4 y 1.2 en 100 y 1000 mg/Kg respectivamente), pero diferentes del grupo control (Figura 20).

En lo que inicialmente han planteado Nebert, Brandes, LaBella y colaboradores, en cuanto a que la histamina puede modular la actividad de CYP450 (Nebert, 1991; Brandes et al., 1990; Brandes et al., 1992; Brandes et al., 1997; Brandes et al., 1998; LaBella et al., 2000; Brandes et al., 2000), nuestros resultados también indican que la histamina participa en la regulación de la expresión de isoformas como CYP1A1 y CYP2E1. Lo cual también se apoya en estudios, en los que ambas enzimas se han visto inducidas en ratones knockout para histidina descarboxilasa, lo que sugiere un papel importante de la histamina en la regulación de CYP1A1 y CYP2E1; estos ratones presentan, además desregulación hormonal (Pap et al., 2002; Tamási et al., 2003). Aunque la inducción de CYP1A1 por histamina sucedió a nivel transcripcional, aún no podemos decir que esto haya sucedido a través de la interacción de la histamina con el receptor de aril hidrocarburo, o bien con receptores nucleares. Por lo que toca a CYP2E1, se ha reportado que el principal mecanismo de inducción de la enzima es por estabilización de su proteína; en este sentido se ha planteado que CYP2E1 podría presentar, además de su sitio activo, uno o más sitios de unión para ligandos, que podrían bloquear mecanismos de degradación de la enzima como ubiquitinación y fosforilación. El etanol, por ejemplo, incrementa la vida media de CYP2E1 que normalmente oscila alrededor de 6 a 7 hrs, hasta 38 hrs, y también inhibe la ubiquitinación del CYP2E1 y su posterior degradación por proteosoma en retículo endoplásmico (Roberts et al., 1995; Goasduff y Cederbaum, 2000). La estabilización de CYP2E1 por un sustrato no ha sido fácil de elucidar, pues la imposibilidad de contar con formas cristalinas de la enzima, y

en general de CYP450 en eucariontes, no ha favorecido el estudio de la interacción con sustratos y otros ligandos.

Es ampliamente reconocido que un proceso de inflamación puede producir la inducción de algunas isoformas de CYP450, de hecho, CYP1A1 y CYP2E1 se han visto inducidas en procesos inflamatorios, tanto en hígado de rata, como en cultivos celulares de astrocitos (Montero et al., 2003; Tindberg et al., 1996). Hasta el momento se han descrito 57 genes distintos de CYP450 en humanos, 109 en ratón y aproximadamente 60 en rata (Ortiz de Montellano, 2005; ICGEB, 2007); en el presente estudio, los incrementos registrados en los niveles de CYP450 totales producidos por la histamina en hígado de rata (Figura 14), sugieren que otras isoformas de CYP450 podrían estar siendo inducidas. Adicionalmente, la falta de efecto sobre las isoformas CYP1A2 y CYP2B1 (Figuras 21 y 22), sugiere una interacción diferencial de la histamina al inducir a CYP450.

También se ha observado que en inflamaciones crónicas, la respuesta de CYP450 varía con respecto al tiempo que dura la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, CYP2A1 (*Cyp2a5* en ratón) se induce en las primeras etapas de la infección, pero alcanza niveles normales en infecciones de varios meses (Montero et al., 2003). En contraste, CYP1A1 y CYP2B1 se inducen después de varios días de infección (Montero et al., 2003), lo que sugiere que la inducción diferencial de estas enzimas responde a variaciones en la concentración de algunos mediadores de la inflamación en relación con el tiempo. En el presente estudio, la máxima inducción de CYP1A1 producida por histamina, se alcanzó en las dosis de 100 y 1000 mg/Kg, mientras que la inducción de CYP2E1 se obtuvo con la dosis menor (50 mg/Kg), lo que es acorde con lo anteriormente descrito (Figura 17 y 20).

El mecanismo por el cual la histamina podría participar en la regulación de CYP450 aún no es claro, a pesar de que los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que puede seguir los mecanismos clásicos de inducción por inductores. Sin embargo, no se puede descartar un efecto que podría derivar de la interacción de la histamina con sus respectivos receptores; en nuestro estudio no

se pudo determinar si la inducción de CYP1A1 y CYP2E1 podía suceder por este mecanismo, pues el uso de antihistamínicos, como la terfernedina (H1) y cimetidina (H2) mimetizaron el efecto de la histamina sobre CYP450, pues ambos indujeron a CYP1A1 y CYP2E1 en hígado de rata (datos no presentados). Estos resultados coinciden con otros estudios en los que también se ha reportado que distintos tipos de antihistamínicos inducen a CYP450, y que inclusive compiten con otros ligandos por CYP450, incluyendo a la histamina (Pasanen et al., 1986; LaBella et al., 1992, Hamelin et al., 1998). Por lo anterior resulta un tanto complejo el evaluar si el efecto producido por la histamina en la expresión de ambas enzimas se debe a la producción de mensajeros intracelulares como consecuencia de la activación de los receptores de histamina. De hecho, CYP1A1 y otras isoformas como CYP2A1 (*Cyp2a5* en ratón) se han visto inducidas por efecto de la producción de AMPc, activación de MAP cinasas y a proteína cinasa C; mensajeros que también son producidos como parte de la activación de los receptores H1 y H2, los cuales también se encuentran expresados en hígado (Cheng et al., 1996; Imoto et al., 1985; García-Sáinz et al., 1985, Vitala et al., 2001) (Figura 34).

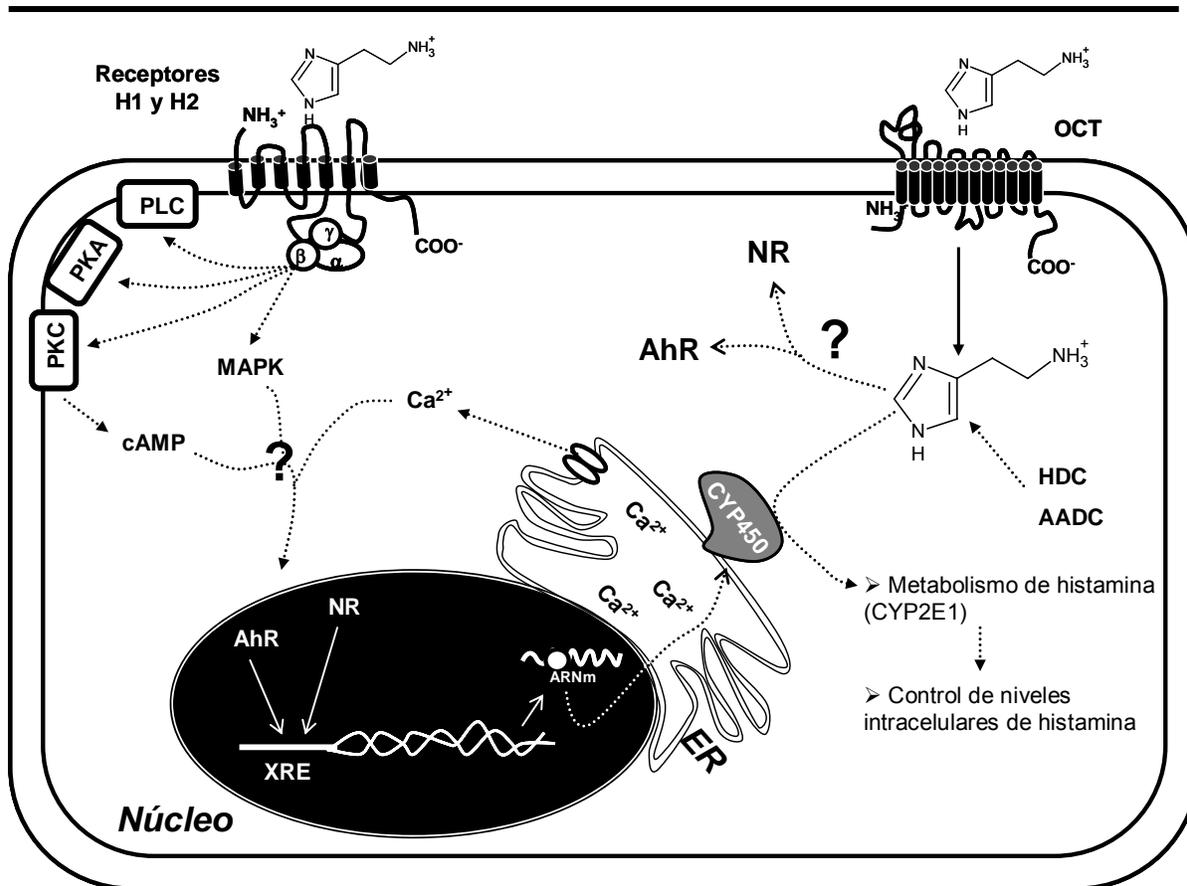


Figura 34. Modelo teórico en el que se plantean los posibles mecanismos de inducción de CYP450 por histamina. Al incrementarse la concentración intracelular de histamina, CYP2E1 podría inducirse para modular sus niveles y promover su catabolismo. La interacción con otras isoformas como CYP1A1, al inhibir su actividad, sugiere que la histamina podría regular el metabolismo de algunos compuestos endógenos que son sustratos de CYP450. Se plantea que la histamina induce a CYP450 mediante tres mecanismos posibles, 1) por estabilización de proteína, como ya se observó con CYP2E1. 2) Por activación de la transcripción, vía receptor de aril hidrocarburo (AhR), o bien receptores nucleares (NR). 3) Por vías de señalización derivadas de la activación de receptores de histamina. **AADC** L-aminoácido aromático descarboxilasa, **AhR** receptor de aril hidrocarburo, **AMPc** adenosina monofosfato cíclico, **ER** retículo endoplásmico, **HDC** histidina descarboxilasa, **MAPK** proteínas cinasas activadas por mitógeno, **NR** receptores nucleares, **OCT** transportador de cationes orgánicos, **PKA** proteína cinasa A, **PKC** proteína cinasa C, **XRE** elementos de respuesta a xenobióticos.

El principal mecanismo de inducción descrito para CYP1A1 sucede a través de la activación del receptor citoplasmático de aril hidrocarburo (AhR) (Figura 11); dicho receptor también participa en la regulación de la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y enzimas como la ciclooxigenasa (Sogawa et al., 1997). Diversos estudios han propuesto que la inflamación producida por algunos compuestos químicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, sucede por

la activación de este receptor y su acción sobre la expresión de mediadores de la inflamación. Sin embargo, en el caso específico de la inducción de CYP1A1 por histamina, es necesario comentar que en el estudio de la modulación de esta enzima por compuestos imidazólicos, no se ha demostrado que la inducción suceda por la vía de AhR, y se ha propuesto que dicha inducción podría suceder por la activación de receptores nucleares, lo que posiblemente suceda con la histamina. De hecho se ha observado que CYP1A1 puede inducirse por vías que involucran la activación de los receptores nucleares RAR y RXR, aún por ligandos típicos de AhR, como TCDD y B(a)P (Delescluse et al., 2000).

La interacción de la histamina con CYP450, podría estar relacionada con el mantenimiento de los niveles de histamina intracelular, y CYP2E1 participaría en su inactivación. Pero al mismo tiempo, la histamina estaría participando en la regulación, no solo de la expresión de isoformas de CYP450, sino también de su actividad, al competir con sustratos endógenos, lo cual dependería de la concentración; de esta manera se explicaría que al incrementarse los niveles de histamina intracelular, CYP450 se induzca en respuesta a los incrementos de histamina. Por ejemplo, se ha caracterizado que los niveles intracelulares de la histamina se incrementan durante el proceso de proliferación, no sólo por la inducción en la actividad de HDC, sino también porque se libera la histamina que se mantiene unida en algunos sitios de la cromatina nuclear, pero hasta el momento no se había caracterizado el efecto en la expresión de CYP450 (Brandes et al., 2000).

La histamina ocupa un papel central en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria (Dy and Schneider 2004). Los principales sitios de degradación de la histamina se ubican en el sistema nervioso central, pulmón, riñón e hígado (Horton et al., 2005; Ogasawara et al., 2006), en todos estos tejidos se ha descrito la presencia de distintas isoformas de CYP450, entre las cuales se encuentran CYP1A1 y CYP2E1, aunque el hígado es el órgano que presenta la mayor abundancia de CYP450. Las vías comunes de degradación de la histamina,

comprenden reacciones de metilación, acetilación y desaminación oxidante (Figura 2). El metabolismo de la histamina por CYP2E1, representaría una nueva vía de inactivación de la histamina a nivel intracelular. Pues los resultados de oxidación de NADPH observados en el presente estudio para CYP2E1, tanto con microsomas hepáticos, como con supersomas[®], en presencia de histamina; sugieren fuertemente que esta amina es un sustrato para CYP2E1. Lo cual también se apoya en resultados obtenidos a partir de estudios de HPLC, por el químico Javier Belmont, en este laboratorio; en donde se demuestra que existe desaparición de la histamina por acción catalítica de CYP2E1 en microsomas hepáticos de rata y supersomas[®] de CYP2E1 (Dávila-Borja et al., 2007). Además, la inducción de CYP1A1 y CYP2E1 producida por la histamina, puede tener relevancia fisiológica, particularmente en condiciones donde los niveles de la amina se encuentren elevados, tales como en una respuesta alérgica, por componentes de la dieta, por un proceso inflamatorio, proliferación celular, durante el embarazo, tumorigénesis, carcinogénesis, angiogénesis e inmunoterapias (Hellstrand et al., 1998; Falus et al., 2001; Dy and Schneider 2004). A nivel molecular, la interacción de isoformas de CYP450 con un sustrato presenta variaciones significativas por la composición de los residuos de aminoácidos que definen el ambiente hidrofóbico alrededor de su grupo hemo (sitio activo), lo que se traduce en diferencias de afinidad por un sustrato entre las distintas isoformas. En los estudios de cinética enzimática con CYP1A1 y CYP2E1, realizados con microsomas hepáticos de rata y supersomas[®], se determinó que ambas enzimas presentan diferencias significativas en su afinidad por la histamina (Tabla III y IV); estos resultados coinciden con los observados en estudios espectrales realizados con microsomas hepáticos de rata, en los que se reportaron diferentes constantes de disociación (K_d), de 0.00014, 0.018 y 2.3 mM, que se propuso que correspondían a diferentes isoformas de CYP450 (Brandes et al., 1998); posteriormente se demostró que esos sitios de unión correspondían a tres de las isoformas más abundantes en hígado (Brandes et al., 2000). Las constantes de inhibición (K_i) obtenidas en nuestros estudios de cinética enzimática con CYP1A1,

fueron de 1.6 mM en microsomas hepáticos de rata, con una IC₅₀ de 2.2 mM (Tabla III); estas concentraciones se encuentran dentro del rango de las reportadas para estudios espectrales (Brandes et al., 1998; Dávila-Borja et al., 2007). Aunque cabe mencionar que las diferencias encontradas en estudios previos, podrían deberse también a variaciones en las condiciones experimentales usadas. Por ejemplo, en los estudios de diferencia espectral hechos por Brandes (1998) se usaron microsomas hepáticos de rata no inducidos en soluciones con pH de 8.5 (Brandes et al., 2000) y este pH puede modificar la carga eléctrica de la histamina (pKa₁ de 5.78, pKa₂ de 9.75), lo que podría reflejarse en las diferencias de afinidad observadas. Pero mas allá de las condiciones experimentales, es claro que la interacción de la histamina con CYP450 es de relevancia fisiológica para la célula, ya que se ha descrito que dicha interacción es importante en la proliferación de hepatocitos (Brandes et al., 1990; Brandes et al., 1992; Brandes et al., 1997). Además, como ya se ha discutido anteriormente, la histamina puede inducir de manera distinta a CYP1A1 y CYP2E1, y mantiene diferencias de afinidad *in vitro* por ambas enzimas, y por otro lado, los niveles de histamina en hígado oscilan alrededor de 233 µg/g (2.1 mM) (Fogel et al., 1990). Por todo lo anterior, consideramos que las interacciones de la histamina con CYP450 son factibles en condiciones fisiológicas de la célula. De hecho, las constantes de disociación obtenidas en el presente estudio son del rango de la concentración reportada en hígado. Sin embargo, otras variables podrían afectar la interacción de la histamina con CYP450, tales como la expresión específica de un tejido y los niveles de proteína y actividad de distintas isoformas de CYP450; en este mismo sentido, los niveles de histamina varían de acuerdo con cada tipo de tejido. Por ejemplo, se han reportado concentraciones de 1.47 µM en suero, 5.3 nM en el hipotálamo de humano, 1 nM en el tálamo y 1.7 nM en el septum (Lintunen et al., 2001; Karavodin et al., 2003), lo que sugiere que la interacción de la histamina y CYP450 podría presentar diferencias significativas en tejidos extrahepáticos, como de hecho se observó en tejidos de corteza cerebral en donde la histamina no ejerció ningún efecto en los niveles de expresión, proteína y actividad de CYP1A1

y CYP2E1 (datos no presentados). Las principales fuentes de histamina en el sistema nervioso central se ubican en las neuronas histaminérgicas, células especializadas encargadas de producir, almacenar y liberar a la histamina. Una vez que la histamina es producida por acción de HDC en estas células, es incorporada a vesículas por acción de transportadores VMAT y ahí puede ser almacenada por varios días. Aunque hasta el momento no se ha detectado específicamente la presencia de isoformas de CYP450 en este tipo neuronas (Meyer et al., 2007), se propone que la interacción de la histamina con CYP450 en estas células tendría que suceder mucho antes de que la amina sea incorporada a las vesículas de almacenamiento; lo mismo aplicaría para otros tipos celulares que almacenan histamina, como las células ECL en el sistema digestivo.

Anteriormente, se ha observado que CYP1A1 y CYP2E1 pueden ser inducidos por imidazoles (Navas et al., 2003; Eliasson et al., 1988), los cuales en algunos casos pueden ser metabolizados al mismo tiempo por CYP450, o inhibir su actividad (Rogerson et al., 1976). Otros estudios no pudieron determinar si la histamina podía ser metabolizada por CYP450; por ejemplo, Morris et al., (1989) demostró que la histamina no es metabolizada por CYP2D6. La histamina afecta la actividad de CYP1A1 y produce una inhibición de tipo mixto (Figuras 28 y 29), es decir, que la histamina al unirse a CYP1A1 no impide la unión con la etoxirresorufina y se forman 2 complejos ternarios CYP1A1-ER y CYP1A1-HA-ER que son catalíticamente activos, pues también conducen a la formación del producto resorufina (Figura 36). Al unirse la histamina con CYP1A1, modifica la afinidad de la enzima por la etoxirresorufina (K_m), lo cual está representado en la figura 36 por el factor α ; sin embargo, también se observa que este factor puede modificar al mismo tiempo la afinidad de CYP1A1 por la histamina, representado por el valor de K_i . En una inhibición de tipo mixto el valor de α siempre es mayor a 1. También se determinó que la histamina inhibe la actividad de CYP1A1 de manera reversible y que no afecta los niveles de la proteína activa (Figuras 30 y 31).

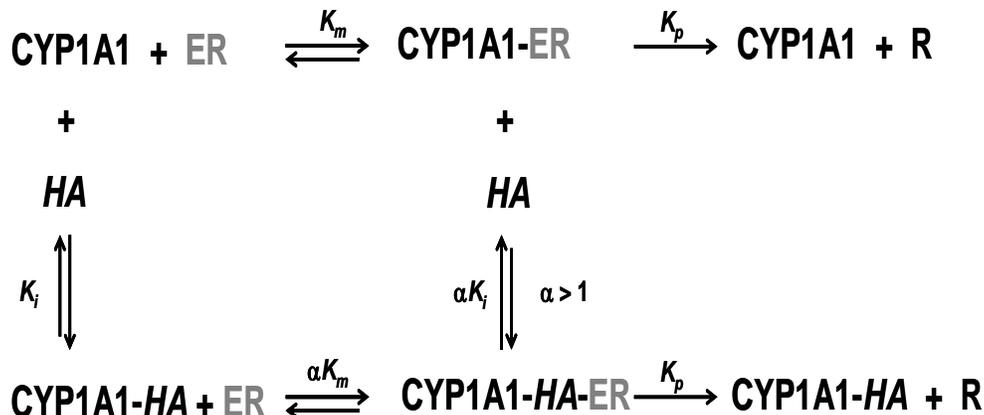


Figura 36. Esquema teórico en equilibrio rápido, en el que se representa el tipo de inhibición producida por la histamina sobre la actividad de CYP1A1. En una inhibición de tipo mixto, la unión del inhibidor, en este caso la histamina, no impide la unión de la enzima con su sustrato, por lo que existe formación de un producto. Como se observa en la figura, son dos los complejos productivos, CYP1A1-ER y CYP1A1-HA-ER, que conducen a la formación de resorufina. Al unirse la histamina con CYP1A1, modifica la afinidad de la enzima por la etoxirresorufina (K_m), lo cual está representado en la figura por el factor α ; sin embargo, también se observa que este factor puede modificar al mismo tiempo la afinidad de CYP1A1 por la histamina, representado aquí por el valor de K_i . En una inhibición de tipo mixto el valor de α , siempre es mayor a 1. **ER** etoxirresorufina, **HA** histamina, **R** resorufina.

Por lo que toca a CYP2E1, se determinó que la histamina es un sustrato para esta enzima, ya que se observó una oxidación importante de NADPH en presencia de histamina, comparable a la oxidación observada con otros sustratos, tales como N-nitrosodimetilamina (NMDA) (Figuras 33). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con estudios de HPLC (Dávila et al., 2007), en los que se reporta el metabolismo de histamina por CYP2E1 en supersomas[®] de rata. También se demostró que la oxidación producida por CYP2E1 en presencia de histamina, es dependiente de la concentración y presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten, las constantes K_m y V_{max} fueron de 2 mM y de 0.1 nmol/min/mg de proteína respectivamente (Figura 34), y el valor de IC_{50} , de 1.2 mM (Tabla III). De manera similar a como se ha propuesto para CYP1A1, las constantes calculadas apoyan la propuesta de que el metabolismo de histamina por CYP2E1, podría suceder en condiciones fisiológicas dentro en la célula.

Finalmente es importante considerar que CYP450 es una superfamilia de enzimas con un papel central en la activación metabólica de una gran variedad de

compuestos químicos, como fármacos, drogas, compuestos carcinógenos, y en general, en procesos de desintoxicación. Pero estas enzimas también ocupan un papel preponderante en la regulación de la homeostasis y el control de los niveles de compuestos endógenos que participan en procesos importantes de la célula (Nebert, 1991; Brandes et al., 2000). La inactivación de compuestos tóxicos por CYP450, se ha propuesto como un mecanismo adaptativo que busca proteger al organismo del daño producido por un agente exógeno (Ortiz de Montellano, 2005); en este sentido, funciones similares se han descrito para una respuesta inflamatoria y el sistema inmune. La relación entre ambos procesos aún no es clara, pero nuestros resultados sugieren que ambos podrían mantenerse en constante comunicación a través de la generación de mensajes químicos, en donde la histamina podría ser uno de estos mensajeros. Esto también se apoya en el hecho de que distintos tipos de compuestos químicos pueden producir inflamación, y que este estímulo puede estar relacionado con su toxicidad (Ganey et al., 2001; Luster et al., 2001). El acetaminofén o paracetamol (N-(4-hidroxifenil) etanamida), es un analgésico que produce inflamación en hígado, por la generación de NO•, quimiocinas y activación de células de Kupffer. Los pesticidas organofosforados que actúan a nivel del sistema nervioso central (SNC), además de originar alergias, también producen inflamación crónica en vías respiratorias e inmunotoxicidad (Li, 2007). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), como el benzo(a)pireno, son compuestos que producen inmunosupresión y estimulan la producción de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-8, IFN γ y TNF α (Dalton et al., 2002; Lecreur et al., 2005). Adicionalmente se ha reportado que los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) incrementan los niveles de histamina en plasma (Kimata, 2004). De manera general se piensa que la inflamación producida por un agente químico, podría estar relacionada con la generación de daño tisular y la producción de necrosis, lo que podría iniciar la fijación de macrófagos en células endoteliales y epiteliales adyacentes, las cuales serían estimuladas para producir factores de la inflamación, como histamina, IL-1, TNF α y ROS (Luster et al., 2001).

11. Conclusiones

1. In vivo, la histamina incrementó los niveles de CYP450 en hígado de rata.
2. La histamina indujo a CYP1A1 y CYP2E1, pero no a CYP1A2 y CYP2B1.
3. La inducción observada en los niveles de transcripción de CYP1A1, pero no de CYP2E1, sugiere que la histamina induce por mecanismos diferentes a ambas enzimas. Posiblemente por la activación de la transcripción de genes en el caso de CYP1A1, y por estabilización de proteína en el caso de CYP2E1.
4. El incremento en los niveles de CYP450 totales, sugiere que otras isoformas podrían ser inducidas por histamina.
5. La respuesta en la inducción de CYP450 totales, CYP1A1 y CYP2E1, no fue dependiente de la dosis de histamina.
6. La histamina no es sustrato de CYP1A1; en cambio, actúa como un inhibidor de tipo mixto de su actividad.
7. Se sugiere que la histamina es un sustrato de CYP2E1.
8. CYP2E1 presentó mayor afinidad por la histamina que CYP1A1.
9. Los parámetros cinéticos obtenidos para ambas enzimas, sugirieron que la interacción de la histamina con CYP1A1 y CYP2E1 podría suceder en condiciones fisiológicas; ya que las constantes de disociación obtenidas corresponden a los niveles de histamina detectados en hepatocitos.
10. Se sugiere que esta CYP2E1 podría participar en el mantenimiento de los niveles intracelulares de la histamina. A su vez, la histamina al interactuar con isoformas como CYP1A1 e inhibir su actividad, podría controlar los niveles de ligandos endógenos de CYP450.

12. Perspectivas

- I. En el presente estudio se demostró que la histamina puede inducir e interactuar diferencialmente con distintas isoformas de CYP450. A la fecha se han descrito 57 genes de CYP450 en humanos, de las cuales aproximadamente 22 se expresan en hígado (Ortiz de Montellano, 2005), por lo que sería importante el estudiar las interacciones que se podrían producir entre la histamina y otras isoformas de CYP450. Por ejemplo, CYP2A6 (CYP2A1 en rata), que es una de las enzimas que se ha visto inducida en distintos modelos de inflamación, y que también se le ha relacionado con hepatocarcinogénesis en poblaciones humanas, o isoformas de la familia CYP3A, que son de las más abundantes en hígado de humanos, rata y ratón.
- II. Los estudios de oxidación de NADPH y HPLC, demuestran que la histamina es metabolizada por CYP2E1 (Dávila et al., 2007). Es importante determinar el metabolito que se estaría produciendo por la degradación de la histamina, dependiente de CYP2E1.
- III. CYP450 presenta diferencias de expresión tejido-específicas. De manera similar, existen diferencias en la concentración de histamina en distintos tipos de tejido, lo que hace importante caracterizar el tipo de interacciones entre la histamina y distintas isoformas de CYP450, así como su efecto en la expresión de estas enzimas.
- IV. En hepatocitos de humano y rata se ha reportado la presencia de los receptores H1 y H2 para histamina. El mecanismo general de vías de señalización para estos receptores, comprende la producción de AMPc, Ca^{2+} y la activación de MAP cinasas, la mayoría de los cuales pueden participar en la inducción de CYP450. En el presente estudio no fue posible caracterizar el efecto producido por la interacción de la histamina con ambos receptores, ya que los antagonistas utilizados

(terfenadina y cimetidina), mimetizaron el efecto sobre CYP450. Por esto es recomendable el estudio en modelos knockout para ambos receptores, o modelos en los que se utilicen inhibidores de vías de señalización.

- V. Determinar mediante estudios de radioligando y marcadores de la transcripción de genes, si existe interacción entre la histamina y los receptores de aril hidrocarburo (AhR) y nucleares.
- VI. Estudiar en modelos animales y cultivos celulares, las consecuencias fisiológicas (desregulación hormonal, producción ácido araquidónico, etc.) y toxicológicas (mayor producción de especies reactivas de oxígeno y activación de compuestos mutagénicos) que podría ocasionar la interacción de un exceso de histamina con distintas isoformas de CYP450.

13. Referencias bibliográficas

1. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET (2006) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 123-149.
2. Akdis CA, Blaser K (2003) Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **112**:15-22.
3. Anichtchik OV, Rinne JO, Kalimo H, Panula P (2000) An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Exp Neurol* **163**:20-30.
4. Ambroziak W, Pietruszko R (1991) Human aldehyde dehydrogenase activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines, and polyamines. *J Biol Chem* **266**:13011-13018.
5. Arrang JM, Morisset S, Gbahou F (2007) Constitutive activity of the histamine H3 receptor. *Trends Pharmacol Sci.* En impresion. Doi:10.1016/j.tips.2007.05.002.
6. Ash ASF, Schild HO (1966) Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmac* **27**:427-39.
7. Atkins WM, Lu WD, Cook DL (2002) Is there a toxicological advantage for non-hyperbolic kinetics in cytochrome P450 catalysis? *J Biol Chem* **277**: 33258-33266.
8. Badary O, AbdEl-Gawad H, Taha R, Ali A and Hamada F (2003) Effects of benzo[a]pyrene on tissue activities of metabolizing enzymes and antioxidant system in normal and protein-malnourished rats. *J Biochem Mol Toxicol* **17**:86-91.

-
9. Bar-nun S, Kreibich G, Adesnik M, Alterman L, Negishi M, Sabatini DD (1980) Synthesis and insertion of cytochrome P-450 into endoplasmatic reticulum membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:965-969.
 10. Beischlag TV, Wong S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O (2002) Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biology* **22**:4319-4333.
 11. Bittar EE, Jefcoate CR (1996) Functions of cytochrome P450 in relation to structure and regulation. *Adv Mol Cell Biol* **14**.
 12. Black SD (1992) Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J* **6**:680-684.
 13. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein- dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
 14. Bongers G, Bakker RA, Leurs R (2007) Molecular aspects of the histamine H3 receptor. *Biochem Pharmacol* **73**:1195-1204.
 15. Brandes LJ, Sukhu B and Bogdanovic P (1990) Does intracellular histamine mediate mast cell histamine release: as an intracellular messenger. *Biochem Biophys Res Commun* **167**:665-672.
 16. Brandes LJ, Bogdanovic P, Tong J, Davie JR and LaBella (1992) Intracellular histamine and liver regeneration: high affinity binding of histamine to chromatin, low affinity binding to matrix, and depletion of nuclear storage pool following partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* **184**:840-847.

-
17. Brandes LJ, Queen GM and LaBella (1997) Salutary clinical response of prostate cancer to antiandrogen withdrawal: assessment of flutamide in an in vitro parameter predictive of tumor growth enhancement. *Clin Cancer Res* **3**:1357-1361.
 18. Brandes LJ, Queen GM and LaBella (1998) Potent interaction of histamine and polyamines at microsomal cytochrome P450, nuclei and chromatin from rat hepatocytes. *J Cell Biochem* **69**:233-243.
 19. Brandes LJ, Queen GM and LaBella (2000) N,N-diethyl-2[4(phenylmethyl)phenoxy] ethanamine (DPPE), a chemopotentiating and cytoprotective agent in clinical trials: interaction with histamine of cytochrome P450 3A4 and other isozymes that metabolize antineoplastic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* **45**:298-304.
 20. Burke M, Thompson S, Weaver R, Wolf C and Mayer R (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* **48**:923-936.
 21. Caro A and Cederbaum A (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**:27-42.
 22. Cavicchioli L, Flanigan TP, Dickson JG, Vantini G, Toso RD, Fusco M, Walsh FS, Leon A (1991) Choline acetyltransferase messenger RMA expression in developing and adult rat brain: regulation by nerve growth factor. *Brain Res Mol Brain Res* **9**:319-325.
 23. Chaty S, Rodius F, Lanhers MC, Burnel D, Vasseur P (2007) Induction of CYP1A1 in rat liver after ingestion of mussels contaminated by Erika fuel oils. *Arch Toxicol*. En impression.

-
24. Cheng Y, Tukey R (1996) Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **271**:26261-26266.
 25. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-9.
 26. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**:532-537.
 27. Chung JY, Kim JY, Kim WR, Lee SG, Kim YJ, Park JE, Hong YP, Chun YJ, Park YC, Oh S, Yoo KS, Yoo YH, Kim JM (2007) Abundance of aryl hydrocarbon receptor potentiates benzo[a]pyrene-induced apoptosis in Hepa1c1c7 cells via CYP1A1 activation. *Toxicology* **235**:62-72.
 28. Dalton TP, Puga A, Shertzer HG (2002) Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem Biol Interact* **141**:77-95.
 29. Dávila-Borja VM, Belmont JA, Espinosa JJ, Moreno-Sánchez R, Albores A, Montero RD (2007) Induction of CYP1A1 and CYP2E1 in rat liver by histamine: binding and kinetics studies. *Arch Toxicol* **81**:697-709.
 30. de Esch IJP, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R (2005) The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:462-469.
 31. Del Valle J, Gantz I (1997) Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **273**:987-996.
 32. Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* **153**:73-82.

-
33. Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* **141**:3-24.
 34. Dinarello, C (1989) Interleukin-1 and biologically related cytokines. *Adv Immunol* **25**:246-351.
 35. Dy M and Schneider E (2004) Histamine-cytokine connection in immunity and haematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **15**:393-410.
 36. Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. (1988) Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **150**:436-443.
 37. Ekins S, Ring BJ, Binkley SN, Hall SD, Wrighton SA (1998) Autoactivation and activation of the cytochrome P450s. *Int J Clin Pharm Ther* **36**:642-651.
 38. Escobar-Garcia D, Camacho-Carranza R, Perez I, Dorado V, Arriaga-Alba M and Espinosa-Aguirre J (2001) S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole. *Mutagenesis* **16**:523-528.
 39. Falus A, Hegyesi H, Lazar-Molnar E, Pos Z, Laszlo V and Darvas Z (2001) Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol* **22**:648-652.
 40. Favia AD, Cavalli A, Masetti M, Carotti A, Recanatini M (2006) Three-Dimensional model of the human aromatase enzyme and density functional parameterization of the Iron-containing protoporphyrin IX for a molecular dynamics study of heme-cysteinato cytochromes. *Proteins* **62**:1074-1087.
 41. Fernando H, Davydov DR, Chin CC, Halpert JR (2007) Role of subunit interactions in P450 oligomers in the loss of homotropic cooperativity in the cytochrome P450 3A4 mutant L211F/D214E/F304W. *Arch Biochem Biophys* **460**:129-140.

-
42. Fleming JV, Sánchez-Jiménez F, Moya-García AA, Langlois MR, Wang TC (2004) Mapping of catalytically important residues in the rat L-histidine decarboxylase enzyme using bioinformatic and site-directed mutagenesis approaches. *Biochem J* **379**:253-261.
43. Fogel WA, Chmielecki C, Gralek M and Maslinski C. (1990) Histamine metabolism in diabetic rats. *Agents Actions* **30**:243-246.
44. Fujii-Kuriyama Y, Mimura J (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:311-317.
45. Ganey PE, Roth RA (2001) Concurrent inflammation as a determinant of susceptibility to toxicity from xenobiotic agents. *Toxicology* **169**:195-208.
46. García-Sáinz JA, De la Garza MA, Contreras-Rodríguez JL, Nájera-Alvarado A (1985) Effects of histamine on metabolism of isolated rat hepatocytes: roles of H1 and H2 histamine receptors. *Mol Pharm* **31**:253-258.
47. Garfinkel D (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* **77**:493-509.
48. Geneste O, Raffalli F, Lang MA (1996) Identification and characterization of a 44 kDa protein that binds specifically to the 3'-untranslated region of CYP2a5 mRNA: inducibility, subcellular distribution and possible role in mRNA stabilization. *Biochem J* **313**:1029-1037.
49. Giguere V, Yang N, Segui P (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* **331**: 91-4.

-
50. Goasduff T and Cederbaum AI (2000) CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90. *Arch Biochem Biophys* **379**:321-330.
51. González FJ (2007) The 2006 Bernard B. Brodie Award lecture CYP2E1. *Drug Metab Dispos* **35**:1-8.
52. González-Jasso E, López T, Lucas D, Berthou F, Manno M, Ortega A, Albores A. (2003) CYP2E1 regulation by benzene and other small organic chemicals in rat liver and peripheral lymphocytes. *Toxicol Lett* **144**:55-67.
53. Graham J and Higgins J (1993) Biomembrane protocols: isolation and analysis. *Methods Mol Biol* **19**:1-18.
54. Guengerich FP, Wang P and Davidson NK (1982) Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P450 in rats, rabbits and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **21**:1698-1706.
55. Guengerich FP and Johnson WW (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-Cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry* **36**:14741-14750.
56. Guengerich FP (2000) Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biol Chem* **383**:1553-1564.
57. Hamelin BA, Bouayad A, Drolet B, Gravel A, Turgeon J (1998) In vitro characterization of cytochrome P450 2D6 inhibition by classic histamine H1 receptor antagonist. *Drug Metab Dis* **26**:536-539.
58. Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, Olson JR (2006) Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung

following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro* **20**:426-38.

59. Heath-Pagliuso S, Rogers W, Tullis K, Seidel S, Cenijn P, Brouwer A and Denison M (1998) Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* **37**:11508-11515.
60. Hellstrand K, Hermodsson S, Naredi P, Mellqvist U and Brune M (1998) Histamine and cytokine therapy. *Acta Oncol* **37**:347-353.
61. Heron A, Rouleau A, Cochoisa V, Pillota C, Schwartzb JC, Arrang JM (2001) Expression analysis of the histamine H3 receptor in developing rat tissues. *Mech Dev* **105**:167-173.
62. Hodgson E, Smart RC (2001) Introduction to biochemical toxicology. 3rd edn. Wiley Inter-science. New York.
63. Honkakoski P and Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**:321-337.
64. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (Dioxin) receptor. *Science* **252**:954-958.
65. Horecker B and Kornberg A (1948) The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J Biol Chem* **175**:385-390.
66. Hornyak S, Gehlsen K and Haaparanta T (2003) Histamine dihydrochloride protects against early alcohol-induced liver injury in a rat model. *Inflammation* **27**:317-327.
67. Horton JR, Sawada K, Nishibori M, Cheng X (2005) Structural basis for the inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs. *J Mol Biol* **353**:334-344.

-
68. Howard LA, Micu AL, Sellers EM, Tyndale RF (2001) Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:542-50.
69. Imoto M, Tsuchie K, Tanaka M, Sugiyama S, Ozawa T (1985) Predominance of histamine H1 receptors on liver plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **127**:885-889.
70. Isim EM, Guengercih FP (2007) Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* **282**:6863-6874.
71. Jackson FR, Bargiello TA, Yun SH, Young MW (1986) Product of per locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature* **320**:185-188.
72. Janssen DB, Dinkla IJ, Poelarends GJ, Terpstra P (2005) Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ Microbiol* **7**:1868-1882.
73. Jefcoate CR (1978) Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical difference spectroscopy. *Methods Enzymol* **52**:258-279.
74. Jezek P and Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:2478-2503.
75. Jigorel E, Vee M, Boursier-Neyret C, Bertrand M and Fardel O (2005) Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **33**:1418-1422.
76. Johansson I, Ekstrom G, Scholte B, Puzycki D, Jornvall H, Ingelman-Sundberg M (1998) Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry* **27**:1925-1934.

-
77. Jurutk PW, Thompson PD, Whitfield GK, Eichhorst KR, Hall N, Domínguez CE, Hsiek JC, Haussler CA, Haussler MR (2005) Molecular and functional comparison of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3) and the novel vitamin D receptor ligand, lithocholic acid, in activating transcription of cytochrome P450 3A4. *J Cell Biochem* **94**:917-943.
78. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA (2001) Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* **413**:420-425.
79. Jutel M, Blaser K, Akdis CA (2005) Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol* **137**:82-92.
80. Kahlson G and Rosengren E (1968) New approaches to the physiology of histamine. *Physiol Rev* **48**:155-196.
81. Karavodin L, Jensen R, Sarno M and Gehlsen K (2003) Toxicology and toxicokinetics of acute and subchronic administration of histamine dihydrochloride in rats. *Drug Chem Toxicol* **26**:35-49.
82. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*. En impresión. doi:10.1016/j.abb.2007.03.038.
83. Kazlauskas A, Sundstrom S, Poellinger L, Pongratz I (2001) The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* **21**:2594-2607.
84. Kempa CA, Maréchal JD, Sutcliffe MJ (2005) Progress in cytochrome P450 active site modeling. *Arch Biochem Biophys* **433**:361-368.
85. Kim SN, Seo JY, Jung da W, Lee MY, Jung YS, Kim YC (2007) Induction of hepatic CYP2E1 by a subtoxic dose of acetaminophen in rats: increase in

dichloromethane metabolism and carboxyhemoglobin elevation. *Drug Metab Dispos* **35**:1754-1758.

86. Kimata H (2004) Effect of exposure to volatile organic compounds on plasma levels of neuropeptides, nerve growth factor and histamine in patients with self-reported multiple chemical sensitivity. *Int J Hyg Environ Health* **207**:159-163.
87. Kim SG and Novak RF (1990) Induction of rat hepatic P450IIE1 (CYP2E1) by pyridine: evidence for a role of protein synthesis in the absence of transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun* **166**:1072-1079.
88. Kininis M, Chen BS, Diehl AG, Isaacs GD, Zhang T, Siepel AC, Clark AG, Kraus WL (2007) Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters. *Mol Cell Biol* en impresión.
89. Kirby GM, Pelkonen P, Vatanasapt V, Camus AM, Wild CP, Lang MA (1994) Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinog* **11**:81-89.
90. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine Rev* **23**:687-702.
91. Kondo S, Imamura I, Shinomura Y, Matsuzawa Y, Fukui H (1995) Determination of histidine decarboxylase mRNA in various rat tissues by the polymerase chain reaction. *Inflamm Res* **44**:111-115.
92. Koop DR, Tierney DJ. (1990) Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450IIE1. *Bioessays* **12**:429-435.

-
93. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF (1985) Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* **35**:249-258.
94. Kukielka E, Cederbaum AI (1995) Increased production of hydroxyl radical by pericentral microsomes compared to periportal microsomes after pyrazole induction of cytochrome P450E1. *Biochem Biophys Res Commun* **215**:698-705.
95. Kumaki K, Sato M, Kon H and Nebert DW (1978) Correlation of type I, type II, and reverse type I difference spectra with absolute changes in spin state of hepatic microsomal cytochrome P-450 iron from five mammalian species. *J Biol Chem* **253**:1048-1058.
96. LaBella FS, Queen GM and Brandes LJ (2000) Interactive binding at cytochrome P450 of cell growth regulatory bioamines, steroid hormones, antihormones and drugs. *J Cell Biochem* **76**:686-694.
97. LaBella FS, Queen G, Glavin G, Durant G, Stein D, Brandes LJ (1992) H3 receptor antagonist, thiperamide, inhibits adrenal steroidogenesis and histamine binding to adrenocortical microsomes and binds to cytochrome P450. *Br J Pharmacol* **107**:161-164.
98. Li Q (2007) New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J Nippon Med Sch* **74**:92-105.
99. Lin TCE, Chien SC, Hsu PC, Li LA (2006) Mechanistic study of polychlorinated biphenyl 126-induced *CYP11B1* and *CYP11B2* up-regulation. *Endocrinology* **147**:1536-1544.
100. Lintunen M, Hyytiä P, Sallmen T, Karlstedt K, Tuomisto L, Leurs R, Kiiänmaa K, Korpi ER and Panula P (2001) Increased brain histamine in an

alcohol-preferring rat line, and modulation of ethanol consumption by H3 receptor mechanisms. *FASEB J* **15**:1074-1076.

101. Lecureur V, Le Ferrec E, N'diaye M, Le Vee M, Gardyn C, Gilot D, Fardel O (2005) ERK-dependent induction of TNF α expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett* **579**:1904-1910.
102. Lewis D.F (2001) Guide to cytochromes P450: structure and function. Taylor and Francis, London.
103. Li Q (2007) New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *J Nippon Med Sch* **74**:92-105.
104. Liebler DC, Guengerich FP (2005) Elucidating mechanism of drug-induced toxicity. *Nature* **4**:411-420.
105. Lindros KO, Oinonen T, Johansson I and Ingelman-Sundberg M (1997) Selective centrilobular expression of the aryl hydrocarbon receptor in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:506-511.
106. Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S (1962) Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* **237**:89-93.
107. Luster MI, Simeonova PP, Gallucci RM, Bruccoleri A, Blazka ME, Yucesoy B (2001) Role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* **120**:317-321.
108. Ma Q (2001) Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab* **2**:149-164.

-
109. Ma Q and Baldwin KT (2002) A cycloheximide-sensitive factor regulates TCDD-induced degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *Chemosphere* **46**:1491-1500.
110. Ma Q (2007) Aryl hydrocarbon receptor degradation promoting factor (ADPF) and the control of the xenobiotic response. *Mol Interv* **7**:133-137.
111. Margaret KM, Woo MH, Mcleod HL (2002) Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm* **59**:2061-2069.
112. Maron D and Ames B (1983) Revised methods for Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* **113**:173-215.
113. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Noguchi H, Kakuma T, Endo M, Seike M, Watanabe T, Yoshimatsu H (2005) The role of histamine H1 receptor and H2 receptor in LPS-induced liver injury. *FASEB J* **19**:1245-1252.
114. Masimirembwa CM, Otter C, Berg M, Jonsson M, Leidvik B, Jonsson E, Johansson T, Backman A, Edlund A, Anderson TB (1999) Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab Dispos* **27**:1117-1122.
115. Mates M and Sanchez-Jimenez F (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **32**:157-170.
116. McLean KJ, Clift D, Lewis DG, Sabri M, Balding PR, Sutcliffe MJ, Leys D, Munro AW (2006) The preponderance of P450s in the Mycobacterium tuberculosis genome. *Trends Microbiol* **14**:220-228.
117. Medina MA, Correa-Fiz F, Rodríguez-Caso C, Sánchez-Jiménez F (2005) A comprehensive view of polyamine and histamine metabolism to the light of new technologies. *J Cell Mol Med* **9**:854-864.

-
- 118.Meyer RP, Gehlhaus M, Knoth R, Volk B (2007) Expression and function of cytochrome p450 in brain drug metabolism. *Curr Drug Metab* **8**:297-306.
- 119.Montero R, Gentile GJ, Frederick L, McMannis J, Murphy T, Silva G, Blankespoor H, Gentile JM (1999) Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis* **14**:217-220.
- 120.Montero R, Serrano L, Dávila VM, Ito A and Plancarte A (2003) Infection of rats with *Taenia taeniformis* metacestodes increases hepatic CYP450, induces the activity of CYP1A1, CYP2B1 and COH isoforms and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo[a]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B1. *Mutagenesis* **18**:211-216.
- 121.Morgan ET (2004) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* **29**:1129-1188.
- 122.Morris CQ, Tucker GT, Crewe HK, Harlow JR, Woods HF and Lennard MS (1989) Histamine inhibition of mixed function oxidase activity in rat and human liver microsomes and in the isolated perfused rat liver. *Biochem Pharmacol* **38**:2639-2644.
- 123.Morris DL, Davila JC (1996) Analysis of rat cytochrome P450 isoenzyme expression using semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Biochem Pharmacol* **52**:781-792.
- 124.Munro AW, Noble MA, Robledo L, Daft SN, Chapman SK (2001) Determination of the redox properties of human NADPH-Cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* **40**:1956-1963.
- 125.Murataliev MB, Feyereisen R, Walker FA (2004) Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta* **1698**:1-26.

-
- 126.Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA, Crews ST (1991) The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**:1157-1167.
- 127.Navas J, Chana A, Herradon B and Segner H (2003) Induction of CYP1A by the N-imidazole derivative, 1-benzylimidazole. *Environ Toxicol Chem* **22**:830-836.
- 128.Nebert DW (1991) Proposed role of drug-metabolizing enzymes: regulation of steady state levels of the ligands that effect growth, homeostasis, differentiation, and neuroendocrine functions. *Mol Endocrinol* **5**:1203-1214.
- 129.Nebert DW and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**:1155-1162.
- 130.Nelson D, Kamataki T, Waxman D, Guengerich FP, Estabrook R, Feyereisen R, González F, Coon M, Gunsalus I, Gotoh O, Okuda K and Nebert D. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names and nomenclature. *DNA Cell Biol* **12**:1-51.
- 131.Neve EP, Eliasson E, Pronzato MA, Albano E, Marinari U, Ingelman-Sundberg M (1996) Enzyme-specific transport of rat liver cytochrome P450 to the Golgi apparatus. *Arch Biochem Biophys* **333**:459-465.
- 132.Novak RF, Woodcroft KJ (2000) The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch Pharm Res* **23**:267-282.
- 133.Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K (2006) Recent Advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a

-
- histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci* **101**:24-30.
134. Ohshima H, Bartsch (1994) Chronic infections and inflammatory process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Drug Metab Dispos* **30**:42-46.
135. Okino ST, Quattrochi LC, Pookot D, Iwahashi M, Dahiya R (2007) A dioxin-responsive enhancer 3' of the human CYP1A2 gene. *Mol Pharmacol*. En impresión.
136. Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* **239**:2370-2378.
137. Ortiz de Montellano PR (2005) Cytochromes P450: structure, mechanism, and biochemistry. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
138. Otyepka M, Skopalík J, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2006) What common structural features and variations of mammalian P450s are known to date? *Biochim Biophys Acta* **1770**: 376-389.
139. Palakodety RB, Clejan LA, Krikun G, Feierman DE, Cederbaum AI (1988) Characterization and identification of a pyrazole-inducible form of cytochrome P-450. *J Biol Chem* **263**:878-884.
140. Panula P, Lintunen M, Karlstedt K (2000) Histamine in brain development and tumors. *Semin Cancer Biol* **10**:11-14.
141. Pap E, Rácz K, Kovács J K, Varga I, Buzás E, Madarász B, Földes A, Szalai C, Watanabe T, Ohtsu H, Ichikawa A, Nagy A, Falus A (2002) Histidine decarboxylase deficiency in gene knockout mice elevates male sex steroid production. *J Endocrinol* **175**:193-199.

-
- 142.Pasanen M, Arvela P, Pelkonen O, Sotaniemi E, Klotz U (1986) Effect of five structurally diverse H₂-receptor antagonist on drug metabolism. *Biochem Pharmacol* **35**:4457-4461.
- 143.Phillips I and Shepard E (1998) Cytochrome P450 protocols. *Methods Mol Biol* **107**:25-33.
- 144.Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ (1987) High resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* **195**:687-700.
- 145.Poulos TL, Raag R (1992) Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation and electron transfer. *FASEB J* **6**:674-678.
- 146.Raffalli-Mathieu F, Glisovic T, Ben-David Y, Lang MA (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and regulation of the xenobiotic-inducible gene Cyp2a5. *Mol Pharmacol* **61**:795-799.
- 147.Reinke L and Moyer M (1985) p-nitrophenol hydroxylation: a microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* **13**:548-552.
- 148.Renton KW (2004) Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* **5**:235-243.
- 149.Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE (1995) Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. *J Biol Chem* **270**:29632-29635.
- 150.Rodríguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gómez-Lechón MJ, Castell J (2001) Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* **393**:308-315.

-
151. Rogerson TD, Wilkinson CF and Hetarski K (1976) Steric factors in the inhibitory interaction of imidazoles with microsomal enzymes. *Biochem Pharmacol* **26**:1039-1042.
152. Rushmore TH, Kong ANT (2004) Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* **3**:481-490.
153. Ryan DE, Ramanatham L, Lida S, Thomas PE, Haniu M, Shively JE, Lieber CS, Levin W (1985) Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *J Biol Chem* **260**:6385-6393.
154. Santini R, Myrand S, Elferink C and Reiners J (2001) Regulation of CYP1A1 induction by dioxin as a function of cell cycle phase. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:718-728.
155. Savas U, Griffin KJ, Johnson EF (1999) Molecular mechanisms of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol* **56**:851-857.
156. Schenkman JB, Remmer H, Estabrook (1967) Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* **3**:113-123.
157. Schenkman JB, Sligar SG, Cinti DL (1981) Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacol Ther* **12**:43-71.
158. Schwelberger HG (2007) The origin of mammalian plasma amine oxidases. *J Neural Transm* **114**:757-762.
159. Segel IH (1975) Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, New York.

-
160. Senler TI, Dean WL, Pierce WM and Wittliff JL (1985) Procedures for measuring cytochrome P-450 dependent hydroxylation activity in reproductive tissues. *Anal Biochem* **144**:152-158.
161. Shi Y (2007) Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today* **12**:440-445.
162. Shimada T, Tsumura F, Yamazaki H (1999) Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome p-450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **27**:1274-1280.
163. Shou M (2002) Kinetic analysis for multiple substrate interaction at the active site of cytochrome P450. *Met Enzimol* **357**:261-276.
164. Sidorova YA, Grishanova AY, Lyakhovich VV (2005) Rat hepatic CYP1A1 and CYP1A2 induction by menadione. *Toxicol Lett* **155**:253-258.
165. Sinal CJ and Bend JR (1997) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol* **52**:590-599.
166. Skaper SD, Facci L, Kee WJ, Strijbos Paul JLM (2001) Potentiation by histamine of synaptically mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurones: a possible role for mast cells. *J Neurochem* **76**:47-55.
167. Sligar SG, Denisov IG (2007) Understanding cooperativity in human P450 mediated drug-drug interactions. *Drug Metab Rev* **39**:567-579.
168. Smit MJ, Hoffmann M, Timmerman H, Leurs R (1999) Molecular properties and signaling pathways of the histamine H1 receptor. *Clin Exp Allergy* **29** suppl 3:19-28.

-
- 169.Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1997) Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor. *J Biochem* **122**:1075-1079.
- 170.Song BJ, Matsunaga T, Hardwick JP, Park SS, Veech RL, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ (1987) Stabilization of cytochrome P450j messenger ribonucleic acid in the diabetic rat. *Mol Endocrinol* **1**:542-547.
- 171.Svensson CK, Tomilo M (1992) Effect of h2-receptor antagonists on rat liver cytosolic acetyl CoA: arylamine n-acetyltransferase activity. *Drug Metab Dispos* **20**:74-78.
- 172.Su T and Ding X (2004) Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:285-294.
- 173.Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and Clock. *Biochem Biophys Res Commun* **248**:789-794.
- 174.Tamási V, Fülöp AK, Hegyi K, Monostory K and Falus A (2003) Upregulation of cyp2e1 and cyp3a activities in histamine-deficient histidine decarboxylase gene targeted mice. *Cell Biol Int* **27**:1011-1015.
- 175.Tanimoto A, Matsuki Y, Tomita T, Sasaguri T, Shimajiri S, Sasaguri Y (2004) Histidine decarboxylase expression in pancreatic endocrine cells and related tumors. *Pathol Int* **54**:408-412.
- 176.Tindberg N, Baldwin HA, Cross AJ and Ingelman-Sundberg M (1996) Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol Pharmacol* **50**:1065-1072.
- 177.Tsuchiya Y, Nakajima M and Yukoi T (2005) Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett* **227**:115-124.

-
178. Vitala P, Posti K, Aija Lindfors A, Pelkonen O, Raunio H (2001) cAMP mediated upregulation of CYP2A5 in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **280**:761-767.
179. Wang LD, Wang M, Todisco A, Grand E, del Valle J (2000) The human histamine H2 receptor regulates c-jun and c-fos in a differential manner. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:1246-1255.
180. Wang H, LeCluyse EL (2003) Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacokinet* **42**:1331-1357.
181. Wang Y, Li Y, Li Y, Ma X, Yang S, Yang L (2006) Investigations into the analysis and modeling of the cytochrome P450 cycle. *J Phys Chem B* **110**:10139-10143.
182. Wang K, Mendy AJ, Dai G, Lou HR, He L, Wan YS (2007) Retinoids activate the RXR/SXR-mediated pathway and induce the endogenous CYP3A4 activity in Huh7 human hepatoma cells. *Toxicol Sci* **92**:51-60.
183. Werck- Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**:1-9.
184. Wilkinson CF, Hetnarsky K and Yellin TO (1972) Imidazole derivatives—a new class of microsomal enzyme inhibitors. *Biochem Pharmacol* **21**:3187-3192.
185. Wilkinson CF, Hetnarsky K, Cantwell GP and Di Carlo FJ (1974) Structure-activity relationships in the effects of 1-alkylimidazoles on microsomal oxidation in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* **23**:2377-2386.
186. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angova HC, Vinkovic DM, Jhoti H (2003) Crystal structure of human cytochrome P450C9 with bound warfarin. *Nature* **424**:464–468. Worth GA, King PM, Richards WG (1990) Histamine tautomerism and its mode of action. *Biochim Biophys Acta* **1036**:158-161.

-
187. Worth A, King PM, Richards WG (1990) Histamine tautomerism and its mode of action. *Biochim Biophys Acta* **1036**:158-161.
188. Yamamoto A, Masaki R, Tashiro Y (1985) Is cytochrome P-450 transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in rat hepatocytes? *J Cell Biol* **101**:1733-1740.
189. Yellin TO (1979) Histamine receptors. Medical and Scientific Books, New York.
190. Zangar RC, Springer DL, Buhler DR (1993) Alterations in cytochrome P-450 levels in adult rats following neonatal exposure to xenobiotics. *J Toxicol Environ Health* **38**:43-55.
191. Zangar RC, Davydov DR, Verma S (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**:316-331.
192. <http://www.icgeb.trieste.it/>
193. <http://cathwww.biochem.ucl.ac.uk>
194. <http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>