

T
729

101174

101174

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

“EXPRESIÓN DE CITOCROMO P450 DURANTE UN PROCESO
INFLAMATORIO PRODUCIDO POR *Citrobacter rodentium*.”

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN QUE
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. BEATRIZ HERNÁNDEZ DE LA CRUZ
MATRÍCULA 205382475

COMITÉ TUTORAL

Tutor: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS
Asesor: Q.F.B. ROSA EUGENIA REYES REYES
Asesor: DR. VÍCTOR RAFAEL CORIA JIMÉNEZ

OCTUBRE, 2008

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS**

**“EXPRESIÓN DE CITOCROMO P450 DURANTE UN PROCESO
INFLAMATORIO PRODUCIDO POR *Citrobacter rodentium*.”**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN QUE PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
PRESENTA**

**Q.F.B. BEATRIZ HERNÁNDEZ DE LA CRUZ
MATRÍCULA 205382475**

COMITÉ TUTORAL

Tutor: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS

Asesor: Q.F.B. ROSA EUGENIA REYES REYES

Asesor: DR. VÍCTOR RAFAEL CORIA JIMÉNEZ

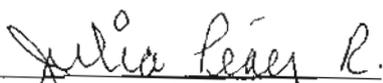
OCTUBRE, 2008

**“EXPRESIÓN DE CITOCROMO P450 DURANTE UN PROCESO
INFLAMATORIO PRODUCIDO POR *Citrobacter rodentium*.”**

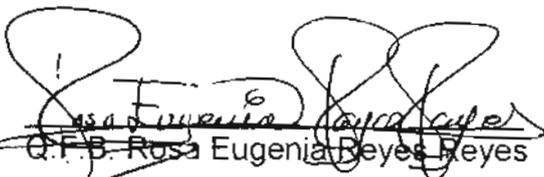
Vo. Bo.

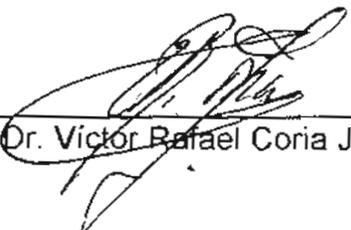
COMITÉ TUTORAL

Tutor(a):

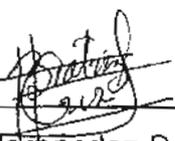

Dra. Julia Pérez Ramos

Asesor(a):


Q.F.B. Rosa Eugenia Reyes Reyes


Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez

Alumno(a):


Beatriz Hernández De la Cruz
Matrícula: 205382475

**“EXPRESIÓN DE CITOCROMO P450 DURANTE UN PROCESO
INFLAMATORIO PRODUCIDO POR *Citrobacter rodentium*.”**

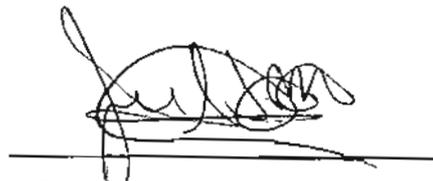
JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

PRESIDENTE:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joaquín', written over a horizontal line.

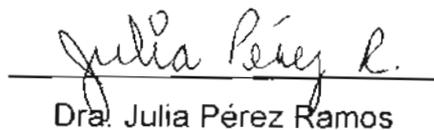
Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos

VOCAL:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco', written over a horizontal line.

Dr. Francisco Javier López Muñoz

SECRETARIO (A):

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Julia Pérez R.', written over a horizontal line.

Dra. Julia Pérez Ramos

RESUMEN

En humanos y animales las infecciones o estímulos inflamatorios modulan cambios en la actividad y nivel de expresión de las isoformas de citocromo P450 (CYP) en el hígado así como en tejidos extrahepáticos tales como riñón y cerebro (Morgan, 1997). La actividad de las isoformas del CYP hepático son afectadas por varios estímulos infecciosos e inflamatorios y esto tiene una consecuencia clínica y toxicológica. Por ello se requiere realizar un estudio para determinar la expresión del citocromo P450 a través de un proceso inflamatorio con *Citrobacter rodentium*, el agente etiológico de la hiperplasia colónica murina. Los signos tempranos de la hiperplasia se presentan 4 días después de la infección con un adelgazamiento de la mucosa alcanzando su máximo entre 10 y 12 días postinfección (Frankel, 1996). En este estudio encontramos que los ratones se infectaron con el agente etiológico, sin embargo no observamos pérdida de peso, que es una consecuencia de la hiperplasia colónica murina, también se observó la expresión de citocinas proinflamatorias como son interleucina-6, factor de necrosis tumoral α y otros componentes como la óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa-2, los cuales presentaron un incremento en su expresión en los días 4, 8 y 12 postinfección con respecto al control. Se encontraron cambios en la expresión de los diferentes citocromos estudiados, en el caso de CYP1A2, tanto en hígado como en el duodeno se observa una disminución en su expresión en el día 4 manteniéndose hasta el día 8 en el duodeno, en CYP3A11 se presenta disminución sólo en el día 4 pero en el hígado y no en el duodeno; sin embargo en CYP2C29 se observan cambios más evidentes en el duodeno en donde hay una disminución en la expresión en el tiempo de monitoreo que fue de 12 días en donde apreciamos más este efecto. Podemos concluir que el proceso inflamatorio inducido por *C. rodentium* en ratones Balb/c machos afecta la expresión de los citocromos CYP1A2 y CYP2C29 en hígado y en duodeno, para CYP3A11 sólo se encontró disminución de la expresión en el hígado.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar un posgrado de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca.

Al laboratorio G-007 de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco por el apoyo brindado para la realización del proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi madre porque con su paciencia y cariño incondicional me ayudó a terminar la maestría al hacerse cargo de uno de mis grandes tesoros, mi hijo.

A mi esposo por su amor y comprensión.

Al comité tutorial conformado por la Q.F.B Rosa Eugenia Reyes Reyes, Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez y en especial a la Dra. Julia Pérez Ramos por su apoyo incondicional, tiempo y guía para la realización del proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
MARCO TEÓRICO	11
El citocromo P-450.....	12
Estructura y localización celular.....	12
Mecanismo de acción	14
Nomenclatura	17
Isoenzimas pertenecientes al complejo.....	17
Papel fisiológico y especificidad de sustrato.....	26
Mecanismos de inducción e inhibición de CYP.....	26
Relación con las enfermedades infecciosas.....	29
Respuesta del huésped a la infección.....	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	35
METODOLOGÍA	36
Establecimiento de la colonización de <i>C. rodentium</i> en ratones Balb/c.....	36
Preparación del inóculo.....	36
Animales y tratamiento.....	36
Seguimiento de la pérdida de ganancia en peso.....	37
Detección de citocinas proinflamatorias.....	37
Determinación de la expresión de citocromo P450	38
Extracción de RNA total.....	38
Síntesis de DNA complementario	39
Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR).....	39
Análisis densitométrico.....	40
Análisis estadístico.....	41
RESULTADOS	41
Proceso de colonización y pérdida de la ganancia en peso.....	41
Proceso inflamatorio.....	42

Expresión de CYP durante el proceso inflamatorio	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS	51

INTRODUCCIÓN

Las enzimas de citocromo P450 (CYP) son una familia de hemoproteínas, localizadas en la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos y de otros tejidos.

El término citocromo P450 se refiere a una familia de proteínas involucradas en el metabolismo de compuestos xenobióticos, los cuales incluyen contaminantes ambientales de origen natural y sintético con propiedades carcinogénicas y mutagénicas, así como fármacos de amplio espectro (Morgan 2001). De igual forma, las isoformas del CYP metabolizan compuestos endógenos como ácidos grasos y esteroides.

En humanos y animales las infecciones o estímulos inflamatorios modulan cambios a nivel de la expresión de varias isoformas de citocromo P450 en el hígado así como en tejidos extrahepáticos tales como riñón y cerebro. La actividad del sistema de P450 hepático es modulada por estímulos infecciosos e inflamatorios y esto tiene una consecuencia clínica y toxicológica.

Algunos fármacos deben ser convertidos a sus metabolitos activos por enzimas P450 y la modulación de su metabolismo durante una respuesta inflamatoria puede reducir el efecto terapéutico o tóxico (Yung *et al.*, 2001).

Citrobacter rodentium es una bacteria que se ha usado como un modelo murino de infección bacteriana, es el equivalente a la infección con *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) O157:H7 en el humano. La patología colónica murina producida por *C. rodentium* es indistinguible de la producida por EPEC y EHEC, con características de lesiones de adherencia y esfacelamiento sobre las células intestinales (Schauer *et al.*, 1993).

Las cepas de EPEC y EHEC están implicadas en diarrea y/o disentería en humanos. EPEC es el principal agente causal de la diarrea infantil en países desarrollados. EHEC es un patógeno de importancia mundial que produce diarrea, siendo la manifestación más seria la diarrea sanguinolenta que puede progresar a una disfunción fatal debido a una falla renal aguda (síndrome urémico hemolítico),

particularmente en niños. *EPEC* coloniza el intestino delgado mientras que *EHEC* coloniza primariamente el intestino grueso (Nataro, 1998).

C. rodentium, previamente designado *Citrobacter freundii* biotipo 4280, es el agente etiológico de la hiperplasia colónica murina, es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, cuya vía de transmisión puede ser por contacto directo o por comida contaminada (Luperchio & Shauer, 2001).

La hiperplasia colónica murina es una enfermedad natural que ocurre en ratones de laboratorio y esta infección se caracteriza por dilatación e hiperplasia de las criptas, proliferación de las células epiteliales, adelgazamiento de la mucosa y presencia de una superficie apical diferente en el enterocito. Los ratones infectados experimentalmente presentan un gran número de bacterias que colonizan el colon distal y se observan adheridas a la superficie epitelial. Los signos tempranos de la hiperplasia se presentan 4 días después de la infección con un adelgazamiento de la mucosa alcanzando su máximo entre 10 y 12 días postinfección (Frankel *et al.*, 1996).

Los síntomas clínicos de la infección con *Citrobacter rodentium* son específicos para cada cepa de ratones, entre las más importantes podemos mencionar: pérdida de peso, depresión y falta de crecimiento. Se ha demostrado que la colonización de *C. rodentium* comienza en el ciego, o válvula ileocecal, seguida del establecimiento de la infección colónica y la depuración sigue la misma ruta (Luperchio & Shauer, 2001).

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar y analizar la expresión del citocromo P450 durante el proceso infeccioso e inflamatorio producido por *C. rodentium* en ratones Balb/c de 4 semanas de edad.

MARCO TEÓRICO

Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos, estos compuestos pueden penetrar por ingestión, inhalación, por vía parenteral o a través de la piel. Entre los mismos se incluyen fármacos, cosméticos, aditivos alimenticios, pesticidas, productos de uso doméstico, derivados de la combustión de carburantes, residuos procedentes de la industria química, etc.

Los xenobióticos son compuestos de naturaleza lipofílica por lo que pueden atravesar con relativa facilidad las membranas biológicas, acceder al interior de las células y unirse a estructuras celulares de carácter lipofílico (Reichchart & Feyereisen, 2001). Pueden ocasionar efectos inmediatos o a largo plazo, lo que se evita gracias a que poseemos los sistemas enzimáticos que llevan a cabo su biotransformación, la cual se realiza en dos fases (Orellana *et al.*, 2004):

a) En la fase 1 los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, etc. b) En la fase 2 los metabolitos generados se combinan con moléculas endógenas de carácter polar como ácido glucorónico, sulfatos, acetato, el tripéptido glutatión o algunos aminoácidos para aumentar su solubilidad en agua y así facilitar la eliminación del organismo (Winters & Cederbaum, 1993).

En general, las enzimas de fase 1 son proteínas catalíticas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen enzimas con actividad monooxigenasa, como el citocromo P-450 o la flavin monooxigenasa, diversas oxidasas (alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, amino oxidasas, aromatasas), la epóxido hidrolasa o esterases y amidasas hepáticas y plasmáticas. El citocromo P-450 es sin duda el miembro más destacado de este grupo de enzimas.

Citocromo P-450

En 1940, se descubrió que diversas sustancias, entre los que se encuentran los fármacos, hormonas esteroidales y pesticidas, eran metabolizadas a través de reacciones de oxidación de función mixta. Reacciones de oxidación, dioxigenación y monooxigenación fueron determinados en los microsomas del hígado, pero las enzimas que llevaban a cabo estas reacciones no fueron descubiertas sino hasta 1958 cuando Garfinkel y Klingenberg detectaron un pigmento unido a monóxido de carbono con una absorción máxima a 450 nm (Lewis, 1996). Omura y Sato en 1964 identificaron este pigmento como una hemoproteína de citocromo tipo b y desde entonces estas proteínas son nombradas como enzimas citocromo P450 (Guengerich, 1993).

El término citocromo P450 (CYP) se refiere a una familia de proteínas involucradas en el metabolismo de compuestos xenobióticos, con propiedades carcinogénicas y mutagénicas, así como fármacos más empleados en la práctica médica (Morgan, 2001). De igual forma, el CYP metaboliza compuestos endógenos como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos (Capdevila *et al.*, 2002).

En un principio se pensó que los CYPs eran proteínas exclusivamente hepáticas, esta idea inicial se descartó al comprobarse la presencia de estas enzimas en prácticamente todo el organismo e incluso algunas sólo se localizaban en tejidos extrahepáticos. No obstante, el hígado es el órgano con mayor expresión de estas enzimas y en él se encuentran tanto los P-450 implicados en reacciones fisiológicas como los encargados del metabolismo de xenobióticos. Entre los diferentes tejidos en los que se expresa encontramos el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos y placenta (Ding & Kamisky, 2003).

Estructura y localización celular

La mayoría de los CYP están formados por 400-500 aminoácidos de los cuales cerca de 55% son de naturaleza apolar; la mitad hemo es protoporfirina IX y el ligando axial para el hierro es un residuo de cisteína ubicado cerca del extremo carboxi-terminal de la proteína. Numerosos agentes que reaccionan con los

grupos sulfhidrilos convierten al CYP a una forma inactiva llamada P420 (Coon *et al.*, 1992).

En general los P-450 tienen un peso molecular que oscila entre 50 y 60 kDa. La similitud en la secuencia de aminoácidos entre los diferentes P-450 es relativamente baja, llegando a ser menor del 20% en algunos casos (Reichhart & Feyereisen, 2001).

De forma general, la molécula de la enzima está constituida por una combinación de regiones α -hélice y de hojas β fundamentalmente en la región de la proteína que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables son las que constituyen los lugares de anclaje a la membrana o de unión y reconocimiento de sustratos. La región conservada del grupo hemo, centro catalítico de la enzima, refleja un mecanismo común de transferencia de electrones, protones y de activación de oxígeno (Williams *et al.*, 2000).

La enzima permanece anclada a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo amino-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana. Esta hélice transmembrana está seguida, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana.

En los mamíferos, los CYPs están unidos a la membrana de la mitocondria y en especial a la del retículo endoplásmico liso (microsomas) Fig. 1 (Goeptar *et al.*, 1995).

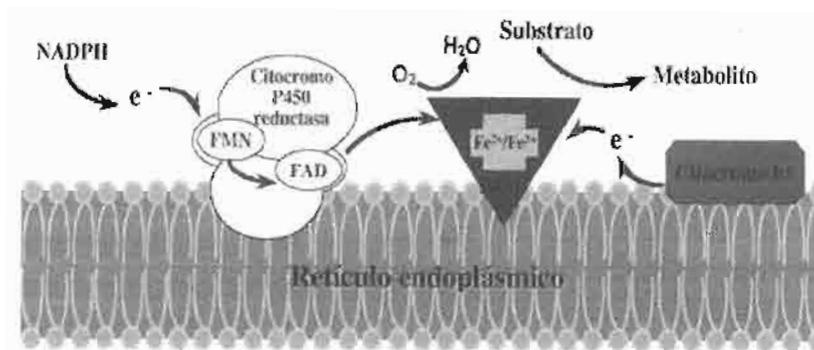
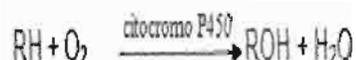


Fig. 1. Localización del sistema citocromo P-450 en la membrana del retículo endoplásmico, modificado de (Vergeles & Waskell, 1995).

Mecanismo de acción

Muchas de las reacciones de monooxigenación llevadas a cabo por las enzimas CYP se resumen de la siguiente manera:



Donde RH es el sustrato y ROH representa el metabolito hidroxilado (Lewis, 1996).

Se requiere una molécula de oxígeno y una molécula de agua es liberada al final de la reacción junto con el metabolito hidroxilado. La fuente de protones y electrones necesarios para la reacción varía dependiendo de la localización de la enzima.

En el caso del sistema del retículo endoplásmico microsomal, el sistema de la monooxigenasa dependiente del citocromo P450 consiste en una cadena de transporte electrónico cuyos componentes son el citocromo P450, la NADPH-citocromo P450-reductasa, la NADH-citocromo b5-reductasa y el citocromo b5 y cuya interacción se ve facilitada por la fluidez del medio fosfolipídico en que se encuentran inmersas. La primera es una hemoproteína, las enzimas mencionadas en segundo y tercer lugar son flavoproteínas transportadoras de electrones y la última es una hemoproteína que también actúa de transportadora (Lewis, 1996).

La NADPH-citocromo P450-reductasa (Fp1) es una flavoproteína que tiene una importancia fundamental al momento de donar electrones, al contrario que el P450 no presenta isoformas y su concentración está en relación 1:10 a 1:30 con el P450. El citocromo b5 es una hemoproteína implicada en el proceso de oxidación de xenobióticos. Esta hemoproteína interviene en la donación de un segundo electrón al citocromo P450 y juega una función importante en el metabolismo de xenobióticos. La NADH-citocromo b5-reductasa (Fp2) acompaña a la proteína anterior y presenta las mismas características que la Fp1 (Díaz, 2004).

Muchos de los detalles de los intermediarios y mecanismos involucrados en los estados químicos que definen una reacción catalizada por enzimas CYP aun no han sido elucidados. El centro catalítico de los P-450 es el átomo de hierro

hexacoordinado (con los 4 anillos de la protoporfirina IX, con el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y con el disolvente, normalmente agua). Los sustratos pueden unirse al P450 de diferentes maneras, unos se unen a la parte de la proteína y otros al grupo hemo. Estos tipos de unión se pueden investigar por espectrofotometría, ya que la unión de los distintos sustratos presenta cambios apreciables en el espectro aparece. Las variaciones espectrales reflejan cambios en el llamado "estado conformacional o de excitación" del átomo de Fe del grupo hemo.

El átomo de Fe tiene 6 lugares de unión para ligandos, 4 de éstos están ocupados en uniones con el grupo de la protoporfirina, el 5º es ocupado por un anión tiolato de un residuo adyacente de cisteína de la cadena polipeptídica, mientras que el 6º puede ser ocupado por un grupo hidroxilo de la proteína o una molécula de agua. La unión de un sustrato al P450 produce cambios en las características de la 6ª posición de unión. Estos cambios están referidos a cambios en la configuración electrónica del átomo de Fe (Díaz, 2004).

Antes de iniciar la reacción, la enzima se encuentra presente en el estado oxidado Fe^{3+} disponible para su unión con el sustrato y el bolsillo del grupo hemo está ocupado generalmente por una molécula de agua.

El primer paso del proceso catalítico consiste en la unión del sustrato y el desplazamiento del solvente en la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. Como consecuencia de ello se originan cambios en el estado de *spin*, en el potencial redox y en el máximo de absorbancia de la hemoproteína. En el segundo paso se produce la reducción del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso (el Fe^{3+} del grupo hemo pasa a Fe^{2+}) gracias al aporte de un electrón y al aumento en el potencial redox originado en el paso anterior. El tercer paso es la unión del oxígeno molecular para formar un complejo superóxido y en el cuarto paso se produce el aporte de un segundo electrón con la formación de una especie activada de oxígeno. A partir de este punto el mecanismo no se conoce con certeza. La naturaleza de la especie activada de oxígeno es desconocida, se piensa que pudiera ser una mezcla de complejos hierro-peroxo o hierro-oxo con la

hemoproteína). El resultado final sería la liberación de uno de los átomos de oxígeno en forma de una molécula de agua y la incorporación del otro en el sustrato. En la Figura 2 está representado el proceso que daría lugar a la formación de un metabolito hidroxilado. El resultado de la actividad enzimática del P-450 no siempre es la inserción de oxígeno en la molécula del sustrato, pudiendo catalizar también reacciones de deshidratación, deshidrogenación, isomerización, dimerización, e incluso reducción.

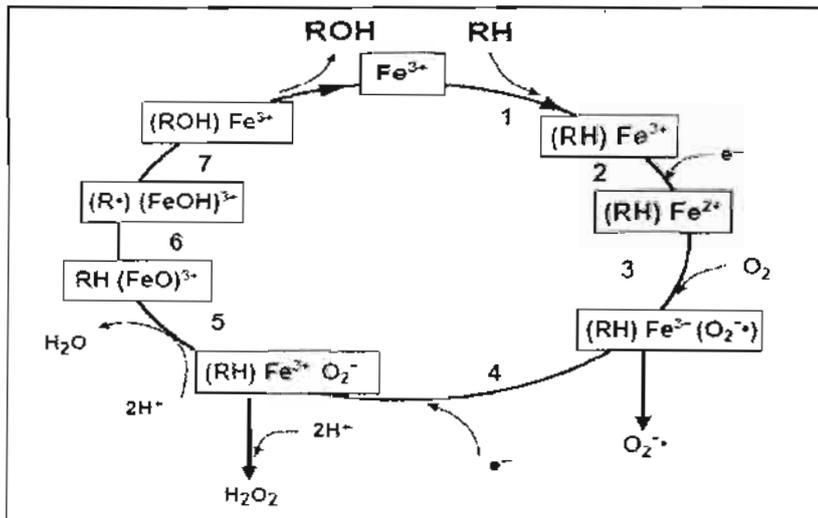


Fig. 2. Esquema simplificado del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP) propuesto por Coon, *et al.*, 1992. En él, el Fe³⁺ representa al hierro del grupo hemo del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

El desacoplamiento del ciclo catalítico del P-450 se produce cuando los electrones del cofactor NADPH son consumidos sin formación de metabolitos oxidados. Esto ocurre cuando: a) el intermediario Fe²⁺-O₂ se autooxida liberando anión superóxido y regenerando la enzima en estado férrico b) el intermediario Fe³⁺-hidroperóxido se disocia en una molécula de H₂O₂ y enzima férrico; o c) la especie Fe=O en lugar de oxidar el sustrato es reducida a una molécula de agua por transferencia adicional de electrones (Ortiz & De Voss, 2002).

Nomenclatura

A finales de la década de los 80 el número elevado de enzimas de citocromo P450 conocidos hizo que la comunidad científica se planteara la necesidad de establecer criterios de nomenclatura que evitara la aparición de posibles ambigüedades (Nebert *et al.*, 1987).

El avance en las técnicas de biología molecular proporcionó un sistema de clasificación fácil basado en la homología en la secuencia de aminoácidos. Los genes conocidos que codifican para los citocromos P450 han sido agrupados en subfamilias.

Las enzimas son nombradas con el prefijo CYP seguida por un número arábigo designando la familia, una letra mayúscula del alfabeto el cual se refiere a la subfamilia y un número arábigo el cual designa el gen que codifica una enzima específica (por ejemplo: CYP1A1) (Galli & Feijoo, 2002). Las enzimas de una misma familia son homólogas en más del 40% de la secuencia de aminoácidos mientras que las enzimas de la misma subfamilia son similares en 70 % o más en su secuencia de aminoácidos (Gibson & Skett, 1994).

Isoenzimas pertenecientes al sistema de citocromo P450

Los P-450 constituyen una superfamilia de hemoproteínas que pueden encontrarse en diversas especies (bacterias, hongos, plantas, insectos, nemátodos, peces, aves, mamíferos) y para los que se supone un origen común. Todos los P-450 identificados a lo largo de la escala filogenética (desde bacterias hasta mamíferos) se nombran según el mismo criterio y se incluyen dentro de la misma clasificación. Algunos P-450 son comunes a varias especies (por ejemplo CYP1A2 y CYP2E1 presentes en diferentes mamíferos y roedores, Tabla 1) y otros son característicos de una especie en particular (como CYP2A6 o CYP3A4 exclusivos del hombre). En cualquier caso, cada especie presenta su propio patrón de P-450 (Nelson, 2003).

Tabla 1. Principales familias CYP que metabolizan fármacos en el hombre, ratón y rata.

Familia	Subfamilia	Humano	Ratón	Rata
CYP1	A	1A1	1A1	1A1
		1A2	1A2	1A2
	B	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6	2A4	2A1
		2A7	2A5	2A2
		2A13	2A12	2A3
			2*22	
	B	2B6	2B9	2B1
		2B7	2B10	2B2
				2B3
	C	2C8	2C29	2C6
		2C9	2C37	2C7
		2C18	2C38	2C11
		2C19	2C39	2C12
			2C40	2C13
			2C44	2C22
			2C50	2C23
		2C54		
		2C55		
	D	2D6	2D9	2D1
		2D7	2D10	2D2
		2D8	2D11	2D3
			2D12	2D4
			2D13	2D5
			2D22	2D18
			2D26	
			2D34	
			2D40	
	E	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A4	3A11	3A1/3A23
		3A5	3A13	3A2
		3A7	3A16	3A9
		3A43	3A25	3A18
			3A41	3A62
			3*44	

Familia CYP1

En esta familia se incluyen dos subfamilias: CYP1A, constituida por las isoenzimas CYP1A1 y CYP1A2 y la subfamilia CYP1B, a la que pertenece el CYP1B1. Estas tres enzimas comparten una serie de características. En todos ellos, el control transcripcional de la expresión de la enzima tiene lugar a través de la vía del

receptor nuclear *Ah* (*Aryl hydrocarbon receptor*) (González *et al.*, 1998). Además, los tres participan de forma destacada en procesos de activación de procarcinógenos. Sin embargo, presentan notables diferencias en su actividad metabólica y su distribución en diversos tejidos.

Las enzimas CYP1A1 y CYP1A2 desempeñan un papel importante en la activación de algunos procarcinógenos, convirtiéndolos en metabolitos intermediarios que pueden originar mutaciones al unirse al DNA (Shimada *et al.*, 1996). El CYP1A1 activa el benzo (a) pireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos y el CYP1A2 participa fundamentalmente en la activación de nitrosaminas, aflatoxina B1 y aminas aromáticas (Pelkonen & Raunio, 1997).

El CYP1A1 es una enzima extrahepática. Su expresión constitutiva es muy baja, pero es inducible por ligandos del receptor nuclear *Ah* (hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas, humo del tabaco) por lo que la exposición a estos compuestos aumenta de forma significativa sus niveles en tejidos como el pulmón, la placenta, la glándula mamaria o los linfocitos (Whitlock, 1999). CYP1A1 presenta formas polimórficas, algunas de las cuales se han relacionado con una mayor incidencia del cáncer de pulmón en algunos grupos de población. En ratón, rata, perro, mono y humano. CYP1A muestra una conservación alta entre especies, con una identidad arriba del 80%.

CYP1A2 se expresa principalmente en el hígado y muy débilmente en tejidos extrahepáticos en humanos, rata y ratón. En el hígado humano constituye el 13% del total del contenido de CYP. (Shimada *et al.*, 1994) CYP1A2 esta involucrado en el metabolismo de <4% de los fármacos que hay en el mercado (fenacetina, ropinirol, acetaminofen teofilina y cafeína, clozapina, olanzapina, tacrina y ondansetrón) (Zuber *et al.*, 2002).

Se trata de una enzima inducible por hidrocarburos, compuestos indólicos de algunos vegetales o algunos fármacos (fenitoína, omeprazol) (Han *et al.*, 2002). Se han identificado variantes alélicas de la enzima, algunas de las cuales se correlacionan con una mayor o menor respuesta al efecto inductor del humo del

tabaco, lo que podría explicar, al menos en parte, la elevada variabilidad que presenta esta enzima entre diferentes individuos (Nyeki *et al.*, 2003).

CYP1A1 y CYP1A2 están bajo regulación transcripcional del locus Ah (aril hidrocarburo). Ambas isoformas son inducibles no sólo por los alimentos o por el humo del cigarro, sino también por fármacos y sus perfiles de inducción son completamente similares entre especies.

La ingestión de los hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como 3-metilcolantreno (3-MC) en rata, ratón, mono y perro permite el incremento de los niveles de proteína de CYP1A en numerosos tejidos, tales como el intestino, hígado y pulmón. En el humano, se ha reportado que el fármaco antiulceroso omeprazol induce CYP1A2 en el hígado.

El efecto del omeprazol sobre CYP1A2 es un ejemplo de la regulación de expresión génica dependiente de especie, el cual también es observado en CYP3A (Branch *et al.*, 200).

La inducción de CYP1A1 por hidrocarburos aromáticos policíclicos mediado por el receptor Ah resulta en la formación de diol-epóxidos mutagénicos/ carcinogénicos en tejidos blanco, incluyendo el hígado (Coulson *et al.*, 2003).

Además de la inducción, la inhibición enzimática es aun más relevante clínicamente y ha sido descrita tanto para CYP1A1 como CYP1A2. Los ejemplos incluyen la coadministración de enoxacino, un antibiótico del grupo de las quinolonas, que es capaz de inhibir CYP1A2 produciendo una disminución del aclaramiento de R-warfarina, un sustrato de CYP1A2 (Toon *et al.*, 1987). Así también, el fármaco furafilina inhibe la actividad de CYP1A2 en el humano, ratón, rata y perro en diferente magnitud, mientras que en el mono no se observa inhibición.

El CYP1B1 es el miembro de la familia más recientemente caracterizado, se expresa de forma constitutiva en el riñón, próstata, glándula mamaria o el ovario, pero no en el hígado (Stoilov *et al.*, 1997). En general su expresión basal es mayor que la del CYP1A1 y participa tanto en el metabolismo de estrógenos como de hidrocarburos aromáticos policíclicos y de aminas heterocíclicas. Se ha sugerido

un posible papel como modulador de ciertos procesos de crecimiento y diferenciación, así como una sobreexpresión del mismo en algunos tumores (Murray *et al.*, 1997).

Familia CYP2

La subfamilia CYP2 es la más compleja de los P450 encontrados en el humano y especies animales, constituida por el mayor número de miembros, los cuales están organizados en más de 20 subfamilias. A diferencia de la familia CYP1, sus miembros no comparten vías comunes de regulación de la expresión y la naturaleza química de los sustratos de estas enzimas es muy heterogénea.

Se han identificado 3 miembros de la subfamilia CYP2A en el hombre: CYP2A6, CYP2A7 y CYP2A13. El CYP2A6 representa aproximadamente el 5% del total de los CYPs que se expresan en el hígado y es inducible por fenobarbital y otros fármacos antiepilépticos (Sotaniemi, *et al.*, 1995). Esta enzima interviene en la activación de algunos procarcinógenos como aflatoxina B1 o nitrosaminas del humo del tabaco, en la metabolización de la nicotina y en la biotransformación de algunos fármacos (Pelkonen, *et al.*, 2000). El CYP2A7 es una proteína no funcional y el CYP2A13 se expresa en forma importante en la mucosa olfativa (Gu *et al.*, 2000).

El CYP2B6 es el único miembro de la subfamilia CYP2B que se expresa en el hígado humano y representa un contenido menor al 1% del total de P-450 (Mimura *et al.*, 1993). Su inducción está mediada por el receptor nuclear CAR (*constitutive active receptor*) y probablemente también por PXR (*pregnane X receptor*) (Sueyoshi *et al.*, 1999). Entre los sustratos del CYP2B6 se han identificado compuestos tóxicos y algunos fármacos.

En el humano, la subfamilia CYP2C está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 16% de los fármacos que se encuentran en el mercado (Doherty *et al.*, 2002). La subfamilia CYP2C en el hombre está integrada por cuatro genes: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 y CYP2C19. Las isoformas principales son CYP2C8 y CYP2C9, siendo el 35% y 60% respectivamente del total de CYP2C, mientras que CYP2C18 (4%) y CYP2C19 (1%) son las isoformas

CYP2C que tienen menor expresión (Romkes *et al.*, 1991). CYP2C8, CYP2C9 y CYP2C19 están localizados en el hígado y constituyen aproximadamente el 20% del total de CYP450, CYP2C18 se expresa abundantemente en la epidermis (Zaphiropoulos *et al.*, 1997), CYP2C8 se expresa principalmente en el hígado, pero su RNAm también puede ser detectado en el riñón, glándula adrenal, cerebro, útero, glándulas mamarias, ovario y duodeno (Klose *et al.*, 1999). CYP2C8 está involucrado en el metabolismo de retinol y ácido retinoico y en la oxidación del fármaco anticancerígeno paclitaxel (Rahman *et al.*, 1994). Además del hígado, el RNAm de CYP2C9 también es detectado en el riñón, testículos, glándula adrenal, próstata, ovarios y duodeno (Klose *et al.*, 1999).

Entre ellos, el CYP2C9 es el que presenta mayor contenido en hígado humano. Los sustratos del CYP2C9 suelen ser moléculas débilmente lipofílicas que se comportan como ácidos débiles.

Se ha identificado la existencia de polimorfismos genéticos del CYP2C9, pero se desconocen sus consecuencias funcionales, a pesar de que esta enzima cataliza el metabolismo de un gran número de compuestos de gran interés terapéutico tales como fármacos hipoglucemiantes (tolbutamida, glipizida), anticonvulsivante fenitoína, el enantiómero S del anticoagulante warfarina y numerosos antiinflamatorios tales como el ibuprofeno, diclofenaco, piroxicam, tenoxicam, ácido mefenámico (Goldstein *et al.*, 1994), el antihipertensivo losartan (McCrea *et al.*, 1999) y el diurético torasemida (Kidd *et al.*, 1999; Miners *et al.*, 2000).

El CYP2C9 metaboliza la mayor parte de estos sustratos a través de reacciones de hidroxilación. Se trata, en general, de moléculas de carácter ácido, ionizadas a pH fisiológico, posiblemente con un heteroátomo y anfipáticas (la región hidrofóbica se corresponde con el lugar de hidroxilación).

El CYP2C19 ha sido detectado en el hígado y duodeno (Lapple *et al.*, 2003). También CYP2C19 ha mostrado metabolizar varios fármacos como S-mefenitoína, omeprazol y otros inhibidores importantes de la bomba de protones, ciertos antidepressivos tricíclicos como la imipramina (Skjelbo *et al.*, 1991).

A diferencia del CYP2C9, los sustratos del CYP2C19 suelen ser moléculas neutras o de carácter básico y moderadamente lipofílicas. En el humano no se han reportado diferencias para las isoformas de CYP2C entre hombres y mujeres (Reid *et al.*, 2002).

Dentro de la subfamilia CYP2D, en el hombre sólo se ha identificado el CYP2D6, el cual se expresa en hígado y no es inducible. El CYP2D6 es considerado la segunda enzima en importancia en el metabolismo de fármacos (después del CYP3A4), ya que se estima que más del 25% de los fármacos son sustratos del mismo (Smith *et al.*, 1998). Los sustratos de esta enzima son en general moléculas ligeramente hidrófilas con al menos un átomo de nitrógeno de carácter básico.

El CYP2E1, el único miembro de la subfamilia CYP2E identificado en la especie humana. Se expresa en el hígado (alrededor del 10% del P-450 total en este tejido) y también en otros tejidos, aunque de forma menos importante. Esta enzima participa en la activación de ciertos carcinógenos (hidrocarburos halogenados, nitrosaminas) y en el metabolismo de solventes de uso común como etanol, acetona o benceno (Sheweita *et al.*, 2000). Se conocen pocos fármacos metabolizados por el CYP2E1 entre los que cabe destacar el paracetamol, clorzoxazona o ciertos anestésicos (p.e. halotano, enflurano). Se trata en general, de moléculas pequeñas (peso molecular < 200 kDa) y neutras (Smith *et al.*, 1997). Una de las características del CYP2E1 es su inducibilidad por etanol y otros compuestos (acetona, isoniazida), pero también por ciertos estados fisiopatológicos tales como la diabetes o el ayuno (Wang *et al.*, 2003).

En el resto de subfamilias pertenecientes a la familia CYP2 se incluyen diversas enzimas con expresión baja (muchos son sólo extrahepáticos) y con poca relevancia desde el punto de vista funcional.

Familia CYP 3A

En el hombre, esta familia contiene una única subfamilia que comprende cuatro genes: *Cyp3a4*, *3a5*, *3a7* y *3a43*. Son enzimas con una alta homología en la

secuencia de aminoácidos (>85%), con características funcionales (actividad catalítica) muy similares.

La subfamilia 3A juega un papel muy importante en el metabolismo de xenobióticos y tiene una amplia especificidad de sustrato. Es altamente inducible y puede inhibirse por numerosos fármacos. Se han reportado grandes diferencias interindividuales en el metabolismo mediados por CYP3A.

La subfamilia CYP3A es la más importante de todas las enzimas que metabolizan fármacos en el humano porque esta subfamilia está involucrada en la biotransformación de aproximadamente el 50% de los fármacos disponibles en el mercado, aunque su contenido en el hígado es sólo del 30% de CYP total. Algunos ejemplos de fármacos metabolizados por CYP3A son terfenadina, las benzodiazepinas, midazolam y triazolam, quinidina, lidocaína, carbamazepina, nifedipino, dapsona, eritromicina, dextrometorfano, etc. (Zuber *et al.*, 2002). Además de fármacos, CYP3A está involucrado en la oxidación de una variedad de sustratos endógenos, tales como esteroides, ácidos biliares y ácido retinoico (Marill *et al.*, 2000).

En el humano se expresan cuatro genes CYP3A, *Cyp3a4*, *3a5*, *3a7* y *3a43*. CYP3A4 y CYP3A5 son las isoformas más abundantes en el hígado y participan en la biotransformación de la mayoría de los fármacos. CYP3A4 y CYP3A5 se expresan en hígado, estómago, pulmón, intestino y tejido renal (Dresser *et al.*, 2000).

El nivel de contenido de CYP3A4 es alto en el hígado, pero también es expresado en el duodeno, yeyuno e íleon (31, 23 y 17 pmol/mg proteína microsomal respectivamente) (Paine *et al.*, 1997). Éste es localizado en el ápice de los enterocitos y juega un papel importante en el metabolismo de fase I de los xenobióticos.

La proteína CYP3A y su actividad catalítica disminuye longitudinalmente a lo largo del intestino delgado (Kolars *et al.*, 1992). Además, la glicoproteína P puede influir en el proceso metabólico, reciclando fármacos entre los enterocitos y el lumen, incrementando así la exposición del fármaco a las enzimas metabólicas del

intestino (Benet *et al.*, 2003). De esta manera, la cantidad de un fármaco administrado oralmente que alcanza la circulación sistémica puede ser reducida por el metabolismo hepático e intestinal.

Los CYP3A son inducidos por ciertos fármacos entre los que se encuentran anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoina, carbamazepina), agentes antimicrobianos (rifampicina) y glucocorticoides (dexametasona) (Thummel *et al.*, 1998).

Se estima que la mitad de los fármacos con rutas metabólicas conocidas son metabolizados por el CYP3A4 y en esta larga lista se incluyen agentes terapéuticos de notable importancia como la eritromicina, midazolam, ciclosporina A, lidocaína o nifedipino (Guengerich *et al.*, 1999).

La administración simultánea de dos o más fármacos es una práctica terapéutica común y cabe la posibilidad de que dichos fármacos sean metabolizados por la misma enzima, probablemente el CYP3A4, lo cual podría originar la aparición de interferencias metabólicas debido a la competencia de dos fármacos por la enzima, lo que puede dar lugar a variaciones importantes, en los niveles plasmáticos de los fármacos. Estas interacciones pueden ser peligrosas en el caso de fármacos con índices terapéuticos muy estrechos.

Un ejemplo de interacción metabólica es la coadministración de un fármaco inductor del CYP3A4 y otro metabolizado por esta enzima. El aumento de la actividad CYP3A4 dará lugar a una rápida metabolización del fármaco, por lo que su concentración plasmática no alcanzará el nivel deseado y el fármaco se mostrará ineficaz.

El resto de P-450 tiene una escasa repercusión en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos, al tratarse de enzimas implicadas fundamentalmente en el metabolismo de sustratos endógenos.

Papel fisiológico y especificidad de sustrato

El CYP tiene un papel importante en las vías de detoxificación de compuestos exógenos (xenobióticos) y en el metabolismo de compuestos endógenos (tales como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos). En algunos casos, los CYP también catalizan el metabolismo de ciertas sustancias en su forma no tóxica a metabolitos tóxicos. Generalmente, las reacciones dependientes de CYP resultan en el cambio de una sustancia a un producto más polar el cual es fácilmente excretado (Gibson & Skett, 1994).

El CYP cataliza una amplia variedad de reacciones, incluyendo epoxidaciones, N-deaquilaciones, O-deaquilaciones, S-oxidaciones, hidroxilaciones y dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el tejido, reacciones de reducción (Guengerich, 2001). Entre sus sustratos se incluyen tanto moléculas pequeñas como otras mucho mayores (p. e. etanol y ciclosporina, con pesos moleculares de 40 y 1203 Da, respectivamente), aromáticas o lineales, tanto planas como globulares, que contengan o no heteroátomos.

Esta amplia especificidad de sustrato es debida a la existencia de múltiples formas de la enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente. La gama de reacciones químicas catalizada y la amplia especificidad de sustrato característico de estas enzimas, hacen del CYP uno de los catalizadores más versátiles conocidos (Orellana *et al.*, 2004).

Mecanismos de inducción e inhibición de CYP

El estudio de los mecanismos de inducción de las enzimas CYP es todavía un campo en desarrollo pero se sabe que existe más de una vía por medio de la cual la inducción puede llevarse a cabo. Sin embargo, en la mayor parte de los casos ocurre a nivel transcripcional (Lewis, 1996). Éste es el caso de la inducción de CYP1A1 por hidrocarburos aromáticos mediante la unión al receptor Ah, en la que una sustancia específica se une a un receptor, que es translocado al núcleo de la célula donde puede conjugarse con otras proteínas y elementos de respuesta para inducir la transcripción génica (Morgan, 1997).

Otros inductores de CYP se unen a proteínas represoras y afectan el proceso de inducción incrementando la estabilización de la proteína, actuando de una manera parecida a una hormona la cual regula la expresión a nivel postranscripcional (Morgan, 1997). Como un ejemplo, el mecanismo de inducción de CYP2E1 por el etanol, llamado estabilización de proteína (y/o la estabilización de RNAm), en donde debido a la unión del alcohol a una secuencia del gen *Cyp2e1* que está involucrada en la degradación de la enzima, se mantienen los niveles altos de la isoforma (Lewis, 1996).

La inducción de una isoforma de CYP depende de la concentración del inductor presente de tal manera que una sustancia a concentraciones bajas puede actuar como inductor y a concentraciones altas inhibir la expresión de CYP (Lewis, 1996; Guengerich, 1993).

Los niveles y la actividad de las enzimas CYP también pueden ser disminuidos. Esto puede ser el resultado de la presencia de inhibidores, la baja expresión basal del gen y las modificaciones postraduccionales que causan la pérdida de actividad. Generalmente, la actividad de la isoforma CYP es proporcional a la concentración de la enzima y a su correspondiente RNAm.

La expresión génica de CYP puede ser regulada fuertemente por hormonas (Gibson & Skett, 1994). Las enzimas CYP esteroideogénicas que están involucradas en la producción de estradiol y progesterona, pueden expresarse a diferentes niveles dependiendo de la etapa del ciclo menstrual. Este control en la expresión de CYP específico (por ejemplo: aromatasa en células granulosa) es ejercido por las concentraciones combinadas de la hormona folículo estimulante y la hormona luteinizante. Otro ejemplo, es la regulación de todas las isoformas CYP específicas del sexo conocidas por la hormona de crecimiento. El mecanismo exacto mediante el cual se lleva a cabo este control de expresión génica está aun bajo investigación (Gibson & Skett, 1994; Lewis, 1996).

La naturaleza ubicua y las funciones vitales del citocromo P450 hacen que las alteraciones en los niveles de enzima CYP450 sean potencialmente peligrosas y un punto crítico a ser considerado en el metabolismo de fármacos y químicos.

Esto es un campo de interés principal ya que se ha observado que las enzimas de CYP pueden fluctuar en circunstancias específicas (González, 1992).

Varios factores pueden modificar la expresión y actividad de CYP a diversos niveles de síntesis de proteínas, tales como la incorporación del grupo hemo a la haloenzima, o alterar la actividad del proceso total de CYP. Estos factores son determinados por circunstancias tales como la función y localización (órgano o tejido) de la enzima, género, estado de desarrollo del organismo, exposición a químicos ambientales (humo de cigarro), y componentes de la dieta (por ejemplo el jugo de pomelo).

La expresión hepática de los CYPs varía entre diferentes individuos como consecuencia de factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales. No obstante, el patrón de P-450 en un individuo no sólo está controlado a nivel genético, sino que también está modulado por otros factores, entre ellos la edad y el sexo (Blanco *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que algunas formas del P-450 sólo se expresan en ratas macho, mientras que otras son específicas de las hembras. El origen de estas diferencias parece ser la existencia de un control hormonal dependiente del sexo. En otras especies de roedores o en primates también se han observado ciertas variaciones ligadas al sexo, aunque en todos los casos la magnitud de las diferencias es inferior a la observada en la rata (Mugford *et al.*, 1998).

Asimismo, la influencia de la dieta y del estado nutricional del individuo ha sido ampliamente estudiada. La expresión del P-450 puede modularse por cambios en los niveles de macro o micronutrientes, por el ayuno y la reducción en la ingesta calórica, o por la presencia en los alimentos de otros componentes que no pueden considerarse como nutrientes y que pueden producir inducción o inhibición de los P-450 (Kotlyar *et al.*, 1999).

Diferentes estados fisiológicos como el embarazo o el ayuno, alteraciones fisiopatológicas que afectan a la homeostasis general del organismo, entre los que se incluyen desequilibrios hormonales, procesos inflamatorios, obesidad, neoplasias, etc. o enfermedades hepáticas, tales como esteatosis, cirrosis o

tumores hepáticos, modifican la expresión del P-450 y su capacidad funcional (Orellana *et al.*, 2004).

Aunque la modulación de las diversas enzimas es selectiva por especie y difiere entre las diversas patologías, en general los niveles de CYP hepáticos están disminuidas, causando un potencial y documentado deterioro del efecto y en algunos casos, el aumento de la toxicidad de ciertos fármacos (Cheng *et al.*, 2001).

Relación con las enfermedades infecciosas

Es importante conocer el proceso de regulación de las isoformas, el tiempo en el que ocurre, la magnitud y los órganos que afecta para ser capaces de predecir qué alteraciones conocidas por el metabolismo del fármaco ocurren durante la enfermedad, particularmente para aquellas con índices terapéuticos estrechos, ya que las enzimas CYP están implicadas en el metabolismo de sustratos fisiológicos tales como esteroides y eicosanoides, los cambios en la actividad en los niveles enzimáticos podrían ser reflejados en alteraciones de estos sistemas, el cual podría afectar en turno, la respuesta inflamatoria (Lewis, 1996).

La estimulación del sistema inmune se observó primero al afectar el metabolismo de fármacos cuando se disminuía la capacidad de metabolizar fármacos de enzimas de citocromo P450 reportado en 1970 en estudios *in vivo* como *in vitro*. (Morgan, 1997). Otro componente de la estimulación del sistema inmune esta comprometido por la producción de citocinas. Entre otras funciones, las citocinas son importantes en la regulación de la producción de proteínas de fase aguda en respuesta a la inflamación e infección (Morgan, 1997).

Numerosos compuestos se han analizado y establecido una relación entre la disminución de la expresión de enzimas CYP específicos (tales como CYP1A1, CYP1A2, y CYP3A3) y la producción de citocinas IL-1, IL-2, IL-6, y TNF- α (Renton & Nicholson, 2000; Lewis, 1996).

Debería notarse que aunque todos los tipos de infección generalmente son considerados como un grupo, se sospecha que las infecciones parasitarias,

bacterianas y virales tienen diferentes modelos de respuestas inflamatorias los cuales podrían causar alteraciones específicas de CYP características de cada enfermedad. Por este camino, no todas las isoformas de CYP son alteradas en la misma medida o en la misma dirección bajo diferentes estados de la enfermedad y algunos son modificados bajo un tipo de infección que puede permanecer inalterado bajo otros.

El estímulo originado, en humanos y animales, por una infección o inflamación conduce a cambios en la actividad y niveles de expresión de varias isoformas de P450 en el hígado así como en tejidos extrahepáticos tales como el riñón, pulmón, intestino y cerebro. La modulación de citocromo P450 puede originar un incremento en la toxicidad clínica de fármacos con bajo índice terapéutico, de igual manera, algunos fármacos deben ser convertidos a su metabolito farmacológicamente activo por enzimas de CYP y la supresión de su metabolismo durante una respuesta inflamatoria puede reducir o incluso no alcanzar el efecto terapéutico (Morgan, 1997).

Se ha demostrado en animales de experimentación que las enfermedades infecciosas o inflamatorias, modulan la expresión de los CYP en el hígado (Morgan 2001). Infecciones bacterianas, virales o parasitarias, endotoxinas bacterianas (un modelo de sepsis), inductores de interferones o citocinas inflamatorias tales como la IL-1, IL-6, y Factor de necrosis tumoral α (TNF- α), pueden suprimir la expresión del CYP por diferentes mecanismos, por ejemplo, en el hígado de rata la mayoría de los CYPs son suprimidos por un estímulo inflamatorio, a excepción de la subfamilia CYP4A que es inducida; este efecto es específico de especie (Barclay *et al.*, 1999).

Como un modelo de infección bacteriana, *Citrobacter rodentium* es el equivalente murino de la infección con *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) O157:H7 en el humano. La patología colónica murina producida por *C. rodentium* es indistinguible de la producida por EPEC y EHEC. (Schauer, *et al.*, 1993) con características de lesiones de adherencia y esfacelamiento sobre las células intestinales.

Las cepas de *E. coli* tienen la habilidad de causar una gran variedad de enfermedades en humanos. Las infecciones causadas por *E. coli* patógenos pueden ser limitadas a la superficie de la mucosa o pueden diseminarse a todo el cuerpo. Existen tres síndromes clínicos generales en la infección de cepas patógenas de *E. coli*: infección en el tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedades que producen diarrea (Nataro, 1998).

Las cepas de *EPEC* y *EHEC* están implicadas en diarrea y/o disentería en humanos. *EPEC* es el principal agente causal de la diarrea infantil en países desarrollados. *EHEC* un patógeno de importancia mundial que puede encontrarse en los alimentos, produce diarrea, siendo la manifestación más seria la diarrea sanguinolenta que puede progresar a una disfunción fatal debido a una falla renal aguda (síndrome urémico hemolítico), particularmente en niños. *EPEC* coloniza el intestino delgado mientras que *EHEC* coloniza primariamente el intestino grueso.

Estos dos tipos de *E. coli* son distintos de otras cepas *E. coli* patogénicas porque producen una lesión histopatológica distinta sobre las células epiteliales del intestino conocidas como lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E), (Timothy *et al.*, 1995) cuyo mecanismo de virulencia se caracteriza por una destrucción localizada de las microvellosidades, una adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula huésped y la formación de una estructura en pedestal de actina por una reorganización del citoesqueleto (Campellone, 2003 y Simmons, 2003).

C. rodentium, miembro de la familia *Enterobacteriaceae* y un patógeno natural murino es una bacteria Gram-negativa que coloniza predominantemente el colon distal de ratones causando una enfermedad llamada hiperplasia colónica murina transmisible, el cual induce colitis y proliferación celular de las criptas (Vallance *et al.*, 2003). *C. rodentium* proporciona un excelente modelo *in vivo* para investigar interacciones patógeno-huésped bajo condiciones fisiológicas, con la habilidad de manipular tanto al patógeno, como al huésped. La visualización de la infección utilizando imágenes de bioluminiscencia de *C. rodentium* indica que a las pocas horas de una administración oral con 10^8 - 10^9 organismos, el sitio de la

colonización inicial es la superficie del tejido linfoide del ciego, dos a tres días después la bacteria puede ser vista en el colon distal (Wiles, *et al.*, 2004). Por lo que es considerado como un excelente modelo para el estudio de la infección *EPEC* y *EHEC* en el humano y para la colitis (Jurjus *et al.*, 2004).

Sin embargo, se conoce muy poco acerca del impacto de la colitis sobre la función del P450 hepático e intestinal o la expresión en humanos y animales (Weidenbach *et al.*, 2000). La ausencia de modelos animales de especies menores para estudiar los mecanismos de patogenicidad *EPEC* y *EHEC*, es una razón, para que el modelo de infección con *C. rodentium* en ratones sea el adecuado y el de elección para estudiar la respuesta huésped-patógeno que presenta lesiones de adherencia y esfacelamiento (Simmons *et al.*, 2002).

Respuesta del huésped a la infección

La infección de ratones con *C. rodentium* causa hiperplasia e inflamación del colon. Para combatir la colonización de tal bacteria, el huésped requiere de diferentes mecanismos de defensa inmunológica para la eliminación del patógeno (Simmons, 2003).

En primera instancia hay infiltración de macrófagos, linfocitos y neutrófilos en la mucosa. En ratones normales, la infección desaparece entre la tercera y sexta semana adquiriendo una efectiva inmunidad contra una segunda exposición al patógeno. La colonización bacteriana está limitada a la mucosa intestinal, y pocas bacterias alcanzan sitios sistémicos o torrente sanguíneo.

La respuesta celular del huésped se caracteriza por la infiltración en la mucosa de células TCD3⁺ seguidas de CD4⁺. Se presenta la transcripción de citocinas como interleucina 12 (IL-12), interferón γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Maaser *et al.*, 2004).

El papel de la IL-12 en la infección con *C. rodentium* es regular la magnitud de respuesta de IFN- γ en el inicio de la infección, aumentando así la activación de fagocitos, favoreciendo la respuesta inmune de células Th1 e inhibiendo la respuesta Th2 (Vallance, 2003).

Hasta ahora, los estudios han identificado la expresión elevada de varias citocinas Th1 incluyendo interferón gama (IFN- γ) que contribuye a la defensa del huésped y al daño al tejido en el colon inflamado de ratones infectados. Otro elemento de respuesta del huésped es el óxido nítrico (NO), que es un componente central de la inmunidad innata y un efectivo agente antimicrobiano. El incremento en la expresión de iNOS se observa frecuentemente durante la inflamación colónica y es inducido en respuesta a IFN- γ y al lipopolisacárido; por lo tanto, la expresión de iNOS y la subsecuente liberación de NO podrían contribuir no sólo a la defensa del huésped sino también al daño en el tejido durante la infección con patógenos que causan lesiones A/E (Vallance *et al.*, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los miembros individuales de la familia de enzimas CYP biotransforman un sinnúmero de sustratos que han sido extensamente estudiados en animales de experimentación, principalmente por su relevancia en el metabolismo hepático de diversos fármacos. Existen evidencias de que los procesos inflamatorios e infecciosos pueden afectar la expresión de las diferentes isoformas de citocromo P450. Por lo anterior consideramos que son necesarios estudios funcionales que permitan evaluar la expresión de enzimas de CYP en modelos de inflamación e infección, ya que el cambio en la expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de fármacos podría afectar la eficacia de los medicamentos o bien originar efectos tóxicos (Morgan, 1997).

HIPÓTESIS

El proceso infeccioso e inflamatorio originado por la colonización de *Citrobacter rodentium* modula la expresión de citocromo P450 en la mucosa intestinal de ratones Balb/c.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión de citocromo P450 durante el proceso infeccioso e inflamatorio por *Citrobacter rodentium* en ratones Balb/c.

Objetivos Específicos

- ❖ Establecer la colonización de *Citrobacter rodentium* en la mucosa intestinal de ratones Balb/c.
- ❖ Comprobar la presencia del proceso inflamatorio como consecuencia del establecimiento de la infección en el modelo experimental.
- ❖ Estudiar la expresión de citocromo P450 durante el proceso inflamatorio.

METODOLOGÍA

En el presente trabajo se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c, los cuales fueron divididos en dos grupos: un grupo control y un grupo que fue infectado con la bacteria *C. rodentium*. Los ratones correspondientes de cada grupo fueron sacrificados en los tiempos seleccionados postinfección para extraer el colon y realizar cuenta bacteriana, en primer lugar para dar seguimiento al proceso infeccioso. Como segundo paso se utilizó el colon y el hígado para evaluar el proceso inflamatorio mediante la búsqueda de citocinas proinflamatorias y simultáneamente se estudió la expresión del citocromo P450 en hígado y duodeno.

Establecimiento de la colonización de *C rodentium* en ratones Balb/c

Preparación del inóculo

El cultivo bacteriano fue preparado en 100 ml de caldo Luria con ácido nalidíxico (100 µg/ml) inoculado con 100 µl de una solución stock de *C. rodentium* DBS100 y se incubó durante 16-18 hrs a 37°C. Después de la incubación la bacteria fue cosechada por centrifugación a 8000 x g durante 15 min, la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador de fosfato salina pH 7.4 (PBS) y posteriormente se lavó dos veces con la solución anteriormente descrita. El paquete celular obtenido se ajustó a una concentración de 2.5×10^9 - 5×10^{10} UFC / ml por espectrofotometría óptica.

Animales y tratamiento

Se utilizaron 40 ratones Balb/c de cuatro semanas de edad, libres de patógenos (comprobados por coprocultivo y examen coproparasitoscópico) proporcionados por la UPEAL-bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, los cuales tuvieron libre acceso a agua y alimento, con periodos de luz y oscuridad de 12 horas y mantenidos a una temperatura de 22 a 25° C.

Los ratones fueron divididos en dos grupos: el control y el tratado. Al grupo control se le administró 200 µl de PBS estéril y al tratado se le administraron 200 µl (2.5×10^9 - 5×10^{10} UFC / ml) del inóculo bacteriano por vía intragástrica. El

estudio tuvo un seguimiento de 20 días durante los cuales los ratones se sacrificaron cada 4 días (4 ratones por grupo).

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, en los tiempos seleccionados postinfección, El colon distal de 4-6 cm fue removido (desde el ano hasta la válvula ileocecal). El intestino fue homogeneizado mecánicamente y el número de bacterias en el órgano homogeneizado fue determinado por cuenta viable usando el medio de Mac Conkey con antibiótico (ácido nalidíxico 100 µg/ml). (Vallance, *et al*, 2002). La identificación de *C. rodentium* se realizó usando las siguientes pruebas bioquímicas: Kligler, SIM, Citrato de Simmons, Rojo de metilo-Voges Proskauer (RMVP) para la determinación de glucosa, lactosa producción de H₂S, indol, movilidad, y utilización de citrato como única fuente de carbono.

Seguimiento de la pérdida de ganancia en peso

El seguimiento de ganancia o pérdida de peso para el grupo control y el grupo infectado se determinó diariamente desde el día cero hasta el día 20. Los ratones de ambos grupos fueron pesados antes de la infección, para contar con el peso inicial.

Detección de citocinas proinflamatorias

Para detectar el proceso inflamatorio, se removió el hígado y el colon y se llevó a cabo la búsqueda de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF α y otros componentes que también participan en el proceso inflamatorio como iNOS y COX-2, por medio de la obtención del RNA total, la síntesis del cDNA y la amplificación por la técnica de PCR. El gen constitutivo de β actina fue utilizado como control interno. El proceso inflamatorio se determinó a los 4, 8 y 12 días. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos específicos

gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Longitud del fragmento (pb)
β actina	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	228
COX-2	GCGAGCTAAGAG CTTCAGGA	TCATACATTCCCCACGGTTT	212
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	159
iNOS	CACCTTGGAGTTCACCCAGT	ACCACTCGTACTTGGGATGC	170
TNF- α	CTGGGACAGTGACCTGGACT	GCACCTCAGGGAAGAGTCTG	204

Determinación de la expresión de citocromo P450

Para determinar la expresión de citocromo P450 se removi6 la primera porci6n del intestino delgado y el h6gado, al igual que en el proceso anterior se llev6 a cabo la obtenci6n del RNA total, la s6ntesis del cDNA y amplificaci6n por la t6cnica de PCR, para estudiar la expresi6n de CYP1A2, CYP3A11 y 2C29 como se describe a continuaci6n.

Extracci6n de RNA total

Para la extracci6n de RNA total se utiliz6 un estuche de Promega SV Total RNA Isolation System, cuya metodolog6a es la siguiente: se homogeneizaron 50-60 mg de tejido en 1 ml de amortiguador de lisis (con 2-mercaptoetanol). A 175 μ l del lisado anterior se le adicionaron 350 μ l del amortiguador de diluci6n mezclando por inversi6n de 3 a 4 veces. El lisado se incub6 en un ba6o Mar6a a 70 $^{\circ}$ C durante 3 minutos y posteriormente se centrifug6 a 14000 x g durante 10 min.

Al sobrenadante se le adicionaron 200 μ l de etanol al 95% y la mezcla se pas6 por una columna por centrifugaci6n a 14000 x g durante 1 min. Posteriormente a la columna se le a6adieron 600 μ l de soluci6n de lavado de RNA, centrifugando a 14000 x g durante 1 min. A la columna se le adicion6 50 μ l de amortiguador con DNAsa y MnCl₂ (soluci6n proporcionada en el estuche), se incub6 a temperatura ambiente durante 15 min. Al t6rmino de la incubaci6n, se agregaron 200 μ l de soluci6n para inhibir la actividad de la DNAsa y se centrifug6 14000 x g durante 1 min.

A la columna se le realizaron dos lavados (600µl y 250µl) como se describió anteriormente. El RNA fue obtenido eluyendo la columna con 100 µl de agua libre de nucleasas. El RNA se conservó a -72 °C hasta su uso.

El RNA total se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y la pureza se determinó por medio de la relación de absorbancia obtenidas a 260 y 280 nm. La integridad del RNA se determinó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes (formaldehído al 6 % y MOPS 1 X). La agarosa fue disuelta en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), posteriormente se agregó formaldehído, MOPS y bromuro de etidio, se mezclaron y se vertieron en un molde de electroforesis.

Las muestras para el corrimiento electroforético se prepararon con formamida al 50 %, formaldehído 6.5 %, MOPS 1 X, se mezclaron y calentaron a 65°C durante 15 min. Al finalizar la incubación las muestras fueron colocadas en hielo y se les adicionó 3 µl de amortiguador de carga (glicerol 40 % y xileno-cianol 0.25%). La electroforesis se corrió a 70 voltios constantes. El RNA fue visualizado en un transiluminador bajo luz ultravioleta.

Síntesis de DNA complementario

La síntesis del cDNA se realizó por transcripción reversa a partir de una mezcla de reacción de 25 µl: a 1 µg de RNA total se le adicionaron 500 pg de hexámeros al azar más agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 15 µl, se desnaturizó a 70°C durante 10 min, la mezcla desnaturizada se colocó en hielo y posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos: 5 µl de amortiguador 5X, 200U de enzima M-MLV, 0.5 mM de dNTPs y agua libre de nucleasas necesaria para ajustar los 25µl de mezcla de reacción. Se incubó durante 60 min a 37°C.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR fue realizada en las siguientes condiciones: 25 µl de mezcla de reacción con los siguientes componentes a una concentración final de 2 mM MgCl₂, amortiguador de la enzima 1X, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM del oligonucleótidos, 1.25U Taq Gold Pol, 1 µl de cDNA y agua libre de nucleasas necesaria para 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de

desnaturalización de 94°C durante 10 min seguido de 35 ciclos de 30 segundos en cada una de las siguientes temperaturas, desnaturalización a 94°C, alineamiento a 60°C, y elongación a 72°C. Seguida de un paso final de extensión de 72°C durante 10 min. Es importante mencionar que la temperatura de alineamiento para todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio fue de 60°C.

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.0 % en amortiguador de Tris-borato EDTA, teñido con bromuro de etidio y capturado en un procesador de imágenes.

Cada uno de los oligonucleótidos empleados fueron tomados de la literatura y analizados en el Centro Nacional de información biotecnológica (NCBI) para la comparación de nucleótidos por la herramienta de búsqueda de alineación local básico (BLASTn) y se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos específicos

gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	Tamaño esperado (pb)
β actina	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	228
CYP 1A2	CACTAACGGCAAGAGCATGA	TCTGAAGCTTGCTGACGAGA	182
CYP3A11	CAGCTTGGTGCTCCTCTACC	CTCTGGGTCTGTGACAGCAA	214
CYP2C29	GGACAGAGACCACAAGCACA	GGCGTCTGTATAGGGCATGT	158

Análisis densitométrico

El análisis de la expresión del RNAm fue determinado por densitometría utilizando un procesador de imágenes que nos da unidades arbitrarias de la intensidad de la banda, tomando como referencia el gen constitutivo de la β -actina. Los datos obtenidos de la densitometría se relacionaron considerando los resultados de la intensidad de la banda del gen de interés sobre el gen constitutivo.

Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como la media \pm 1 desviación estándar de la media para cada grupo. El análisis estadístico se desarrolló usando el paquete estadístico SPSS versión 12. Se realizó análisis de varianza de una-vía para determinar la diferencia entre los grupos de estudio así como la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Un valor para p menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Proceso de colonización y pérdida de la ganancia en peso.

Los ratones en estudio fueron colonizados por la cepa de *Citrobacter rodentium* DBS100 alcanzando un mayor grado de infección en el día 12 ($8.47E+07$ UFC/ g de colon) éste resultado es el promedio de tres experimentos independientes \pm una desviación estándar donde n es igual a 4 ratones. A partir del día 16 se ve una disminución del número de colonias en donde se puede considerar que comienza la depuración de la infección.

El efecto sistémico de la infección con *C. rodentium* sobre el huésped es la morbilidad del ratón infectado y la pérdida de peso durante el proceso de infección, las diferencias observadas en la pérdida de ganancia en peso entre el grupo control y el grupo de estudio se mantuvieron a lo largo del tiempo y no hubo significancia estadística. Fig. 3b (los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes \pm una desviación estándar donde n es igual a 4 ratones estudiados. $p < 0.05$)

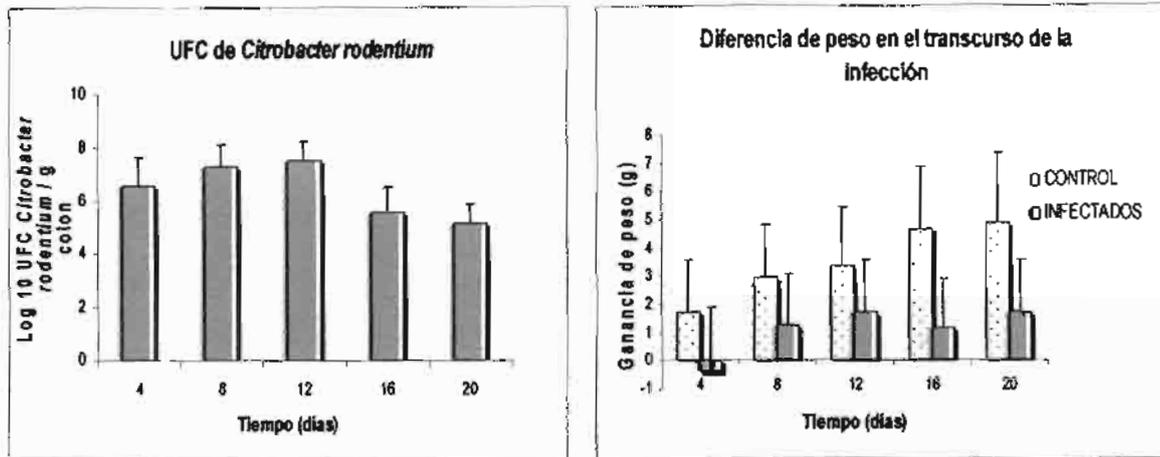


Fig.3. a) UFC de *C. rodentium* presentes en el colon de ratones infectados en el transcurso de la infección. b) determinación de la pérdida de ganancia en peso en el transcurso de la infección.

Proceso inflamatorio

Se determinó la expresión de las citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) tanto en hígado como en colon, como evidencia del proceso inflamatorio.

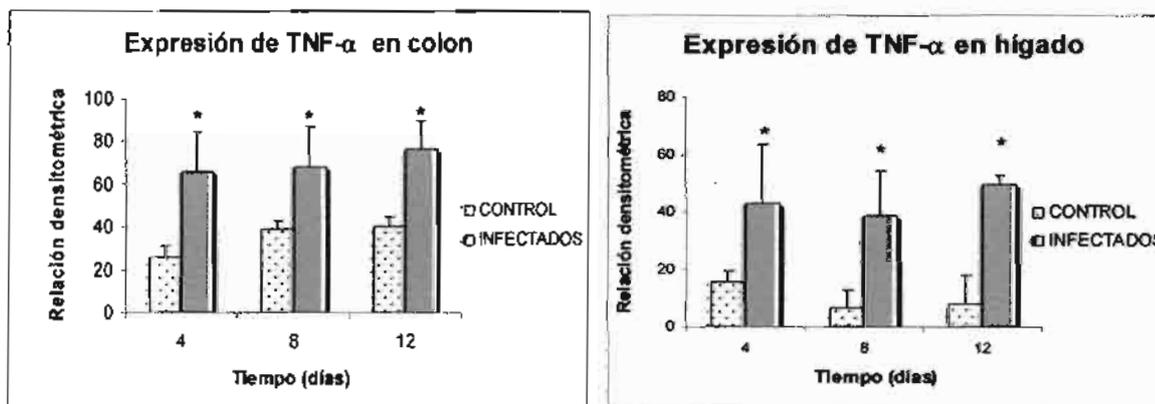


Fig. 4. a) Expresión de TNF- α en colon, b) Expresión de TNF- α en hígado.

Los resultados muestran que hay inducción en la expresión de TNF- α en colon y en hígado (Fig. 4), en ambos se observa que los niveles de RNAm en el grupo infectado es mayor con respecto al control, así también se mantienen los niveles de expresión a lo largo del proceso infeccioso. Esto pudiera deberse a que el incremento presentado en las UFC de *C. rodentium* presenta una tendencia similar y la cantidad de bacterias es parecido a los que se encontraron a los días 8 y 12.

Los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes donde n=2 (control) y n=3 (infectados)

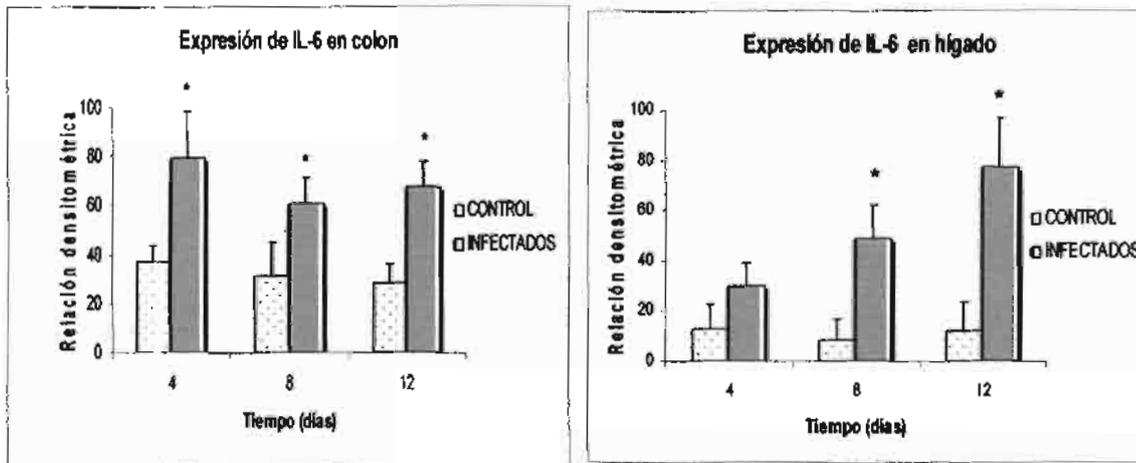


Fig 5. a) Expresión de IL-6 en colon, b) Expresión de IL-6 en hígado.

En la expresión de IL-6, se observó que el grupo tratado presenta mayor expresión de esta citocina con respecto al control manteniéndose los niveles de expresión en el colon, Fig. 5a, mientras que en el hígado se observa un aumento gradual de IL-6 a lo largo del tiempo Fig. 5b. En los dos tejidos se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo de estudio. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes donde n=2 (control) y n=3 (infectados)

También se determinó la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de Ciclooxygenasa-2 (COX-2), las cuales se sabe que están involucradas en el proceso inflamatorio y que su expresión se induce durante este proceso infeccioso. En la Fig. 6, se observa una inducción en los niveles de expresión de iNOS y COX 2 que se mantiene a lo largo del tiempo. Nuestros resultados muestran diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado para los dos casos. El aumento en la expresión de COX-2 nos indica que el proceso inflamatorio, está presente en el tejido donde se estableció la infección ya que estas dos enzimas se evaluaron sólo en el colon.

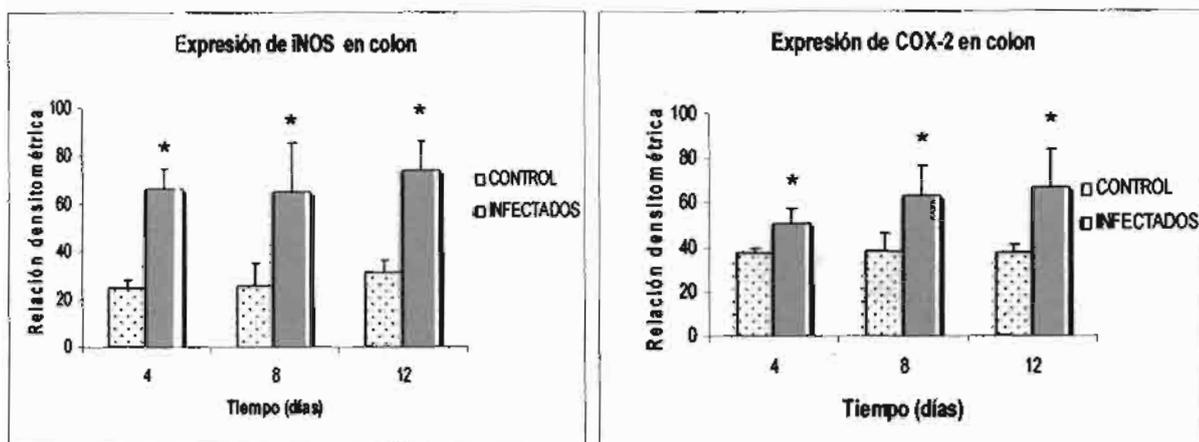


Fig 6. a) Expresión de iNOS en colon, b) Expresión de COX 2 en colon.

De acuerdo a los datos observados anteriormente en donde es evidente que se presenta una inducción en la expresión de los diferentes mediadores de la inflamación podemos decir que se estableció el proceso inflamatorio y se analizará su repercusión en la modulación del citocromo P450. Los citocromos (CYP) analizados se eligieron de acuerdo a la relevancia que tienen en el metabolismo de fármacos en el humano; 1A2, 2C9 y 3A4 en el humano y sus homólogos en el ratón 1A2, 2C29 y 3A11 respectivamente. Estos se evaluaron en el hígado y en el intestino delgado (duodeno), donde anteriormente se ha reportado que se expresan.

Expresión de CYP durante el proceso inflamatorio

Todos los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes donde n=2 (control) y n=3 (infectados). La expresión de CYP1A2 se mantiene igual tanto en el grupo control como en el grupo de estudio aunque existe diferencia significativa en el día 4 para el hígado Fig. 7a, la irregularidad que presenta el control de este día nos hace descartar esta diferencia, por lo que podemos decir que los niveles de expresión se mantienen constantes en estos dos grupos de estudio. Para el caso de duodeno Fig. 7b observamos diferencias significativas en los días 4 y 8 en los que el nivel de expresión del grupo infectado es menor con respecto al control, en el cual si hay una modulación a la baja de la expresión de este CYP.

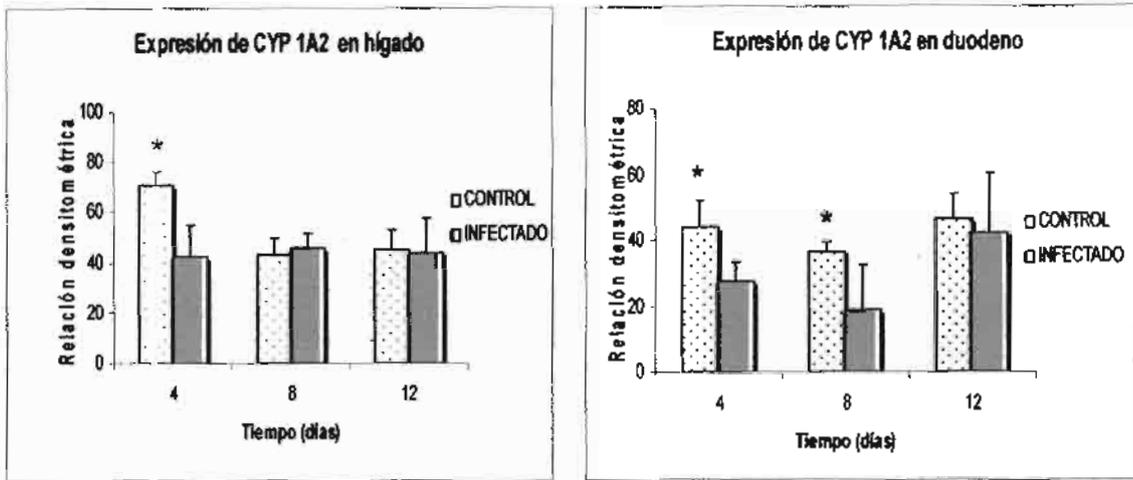


Fig. 7 a) Expresión de CYP1A2 en hígado, b)) Expresión de CYP1A2 en duodeno.

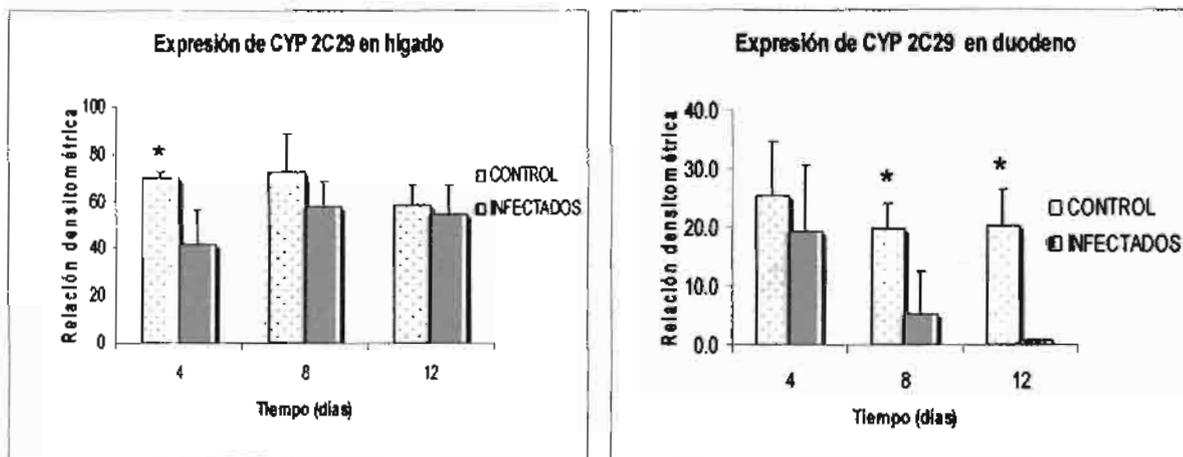


Fig. 8 a). Expresión de CYP2C29 en hígado b) Expresión de CYP2C29 en duodeno.

Podemos apreciar en la Fig. 8 cómo el CYP2C29 es el más afectado por el proceso infeccioso e inflamatorio, en el hígado se observó disminución de la expresión al día 4 presentando significancia estadística con respecto al control. En el duodeno Fig. 8a se muestra que disminuyen los niveles de expresión de CYP2C29 en los días 8 y 12 del grupo tratado, observamos mayor efecto ya que existe significancia estadística en los días 8 y 12 con respecto al control y al tiempo.

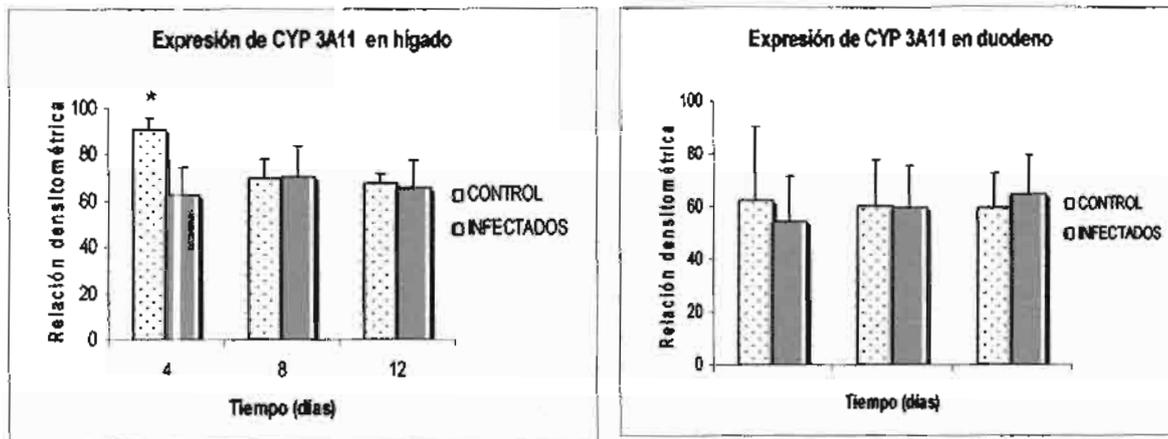


Fig.9 a). Expresión de CYP3A11 en hígado b) Expresión de CYP3A11 en duodeno..

También se detectó una disminución en el CYP3A11 sólo en el hígado, con una diferencia significativa en el día 4 (Fig. 9a). Sin embargo, debido a la inconsistencia en los controles de este día, desechamos esta diferencia y podemos decir que la expresión de CYP3A11 no se ve afectada en ninguno de los dos tejidos. Lo que se ha observado en estos CYPs es que algunos presentan una disminución en los niveles de expresión por lo que la infección con *C. rodentium* y el proceso inflamatorio que se desencadena tiene una modulación sobre los CYPs más relevante en el duodeno de los ratones Balb/c.

DISCUSIÓN

La actividad y la expresión de las diversas isoformas de CYP son alteradas en procesos patológicos. Aunque la modulación de las diversas enzimas es especie selectiva y difiere entre las diversas patologías, en general los niveles de CYP hepáticos están disminuidos, causando un potencial y documentado deterioro del efecto y, en algunos casos, el aumento de la toxicidad de ciertos fármacos (Cheng & Morgan, 2001).

En general, existe poco conocimiento del efecto de las enfermedades sobre la actividad del CYP en seres humanos, a pesar de que existen numerosas evidencias que demuestran que el CYP se encuentra alterado en modelos animales de diabetes, hipertensión y obesidad (Farrel, 2001).

En animales de experimentación, se ha demostrado que las enfermedades infecciosas o inflamatorias y aquellos agentes que estimulan células de la línea monocito/macrófago o sus productos (citocinas e interferones) causan profundos cambios en la expresión de los CYP en el hígado (Morgan, 2001). En este estudio presentamos el efecto de la infección de *C. rodentium* sobre la expresión de las citocinas IL-6 y TNF- α y la modulación de los CYPs 1A2, 3A11 y 2C29 en un modelo experimental, produciendo hiperplasia colónica murina y que es un equivalente de las lesiones de adherencia y esfacelamiento sobre las células intestinales producidas en el humano por *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC) O157:H7 (Schauer et al., 1993).

La expresión del citocromo P450 y por consecuencia la biotransformación de fármacos se altera durante la operación de los mecanismos de defensa del huésped. Esto tiene implicaciones importantes en la inflamación y la infección cuando la capacidad del hígado y otros órganos para metabolizar fármacos está comprometida severamente, en la mayoría de los casos las formas de CYP son reguladas a la baja a nivel de transcripción génica con un resultado en la disminución de su correspondiente RNAm, proteína y actividad enzimática. La pérdida en el metabolismo de fármacos esta canalizada predominantemente por la producción de citocinas que en última instancia modifican factores de transcripción específicos. (Renton, 2004)

Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la liberación de citocinas endógenas es responsable de la modulación del citocromo (Chen et al., 1992). En este trabajo, la producción de citocinas se llevó a cabo por el proceso infeccioso e inflamatorio que desarrolla la bacteria *Citrobacter rodentium*. La colonización del colon presentó gran número de bacterias a partir del día 4, aunque existen reportes en donde se dice que el pico es de 10^9 UFC entre el día 5-14 pi (postinfección) esto depende de la cepa de ratón así como del género, en un estudio previo en el cual se utilizaron hembras se comprobó que éstas presentaban mayor número de bacterias en el colon, así como mayor morbilidad (datos no mostrados). En los ratones de estudio la máxima cantidad de bacterias se encontró en el día 12 con $8.47E+07$ UFC/ g de colon. Así también no se aprecia

una correlación entre el estado de infección y la pérdida de peso en el modelo experimental a pesar de que comienza a disminuir el número de colonias aisladas en los días 16-20 no se observa una recuperación de ganancia en peso

El proceso inflamatorio que induce esta bacteria se llevó a cabo analizando algunos componentes de la respuesta inflamatoria como IL-6, TNF- α , COX-2 e iNOS. Los resultados mostraron una sobreexpresión de los RNAm estudiados tanto en hígado como en colon en el grupo infectado con *C. rodentium*.

Durante el tiempo en que se mantiene un gran número de bacterias colonizando el colon, que se presenta hasta el día 12 en la curva de colonización, se encontró tanto para las citocinas como para COX-2 e iNOS, una sobreexpresión en comparación con el grupo control lo que nos indica que los mecanismos de defensa del huésped se mantienen presentes, ya que un factor importante durante el proceso infeccioso por *C. rodentium* lo constituyen las células epiteliales desempeñando un papel crucial en la defensa del huésped frente a los patógenos que producen lesiones E/A y de alguna forma producir algunas sustancias que dañen al patógeno como podrían ser defensinas o radicales libres de nitrógeno como el óxido nítrico, aumentando la expresión de iNOS (Vallance *et al.*, 2002).

La sobreexpresión de los diferentes mediadores se mantiene a lo largo del tiempo tanto en el hígado como en el colon, se observa un aumento aparente pero no alcanza significancia estadística, lo que nos hace suponer que están interviniendo otros componentes tratando de regular los niveles y así mantener la homeostasis del organismo.

Se determinó la expresión de CYP1A2, 2C29 y 3A11 en hígado y duodeno, estos citocromos son expresados principalmente en el hígado y muy débilmente en el duodeno, los resultados indican que hay una regulación a la baja en los CYP1A2 y 2C29, sin embargo, en los dos casos es más evidente en el duodeno que en el hígado. CYP2C29 presenta mayor inhibición en el día 12, aunque este efecto no lo vemos en el hígado, quizás la concentración en la que se encuentran en cada órgano éste marcando esta diferencia o existen otros mecanismos en el hígado que regulan su expresión.

Para el caso de CYP3A11, en el día 4 hay una diferencia significativa con respecto al control en el hígado, aunque en el duodeno no se observan cambios. Pan y colaboradores, en un estudio realizado para ver la influencia de IL-6 y TNF- α sobre la expresión de RNAm de CYP en el ratón, encontraron que el RNAm de CYP1A2 fue inhibido en un 67% por IL-6 y 59% por TNF- α , mientras que CYP3A11 y CYP2E1 no fueron afectadas por ninguna de las dos citocinas estudiadas (Pan *et al.*, 2000).

Por ejemplo, IL-6 regula a la baja el RNAm de CYP2C11, pero no de CYP3A2, en ratas. Esta selectividad es importante en la perspectiva clínica y toxicológica porque esto implica que los efectos sobre el RNAm de CYP puede ser modificado por múltiples mecanismos. La disminución en la expresión del RNAm de los diferentes CYPs analizados puede atribuirse a estas dos citocinas que también fueron analizados en el presente estudio, sin embargo este efecto se observa sólo en el día 4 para dos de los CYPs.

CONCLUSIONES

En este estudio se presentó el efecto de agentes involucrados en la respuesta inflamatoria sobre la expresión constitutiva de los CYPs, 1A2, 3A11 y 2C29 usando como modelo de infección e inflamación la bacteria *Citrobacter rodentium*.

Se estableció la colonización con la bacteria de estudio en el colon de ratones machos Balb/c presentando un mayor número de bacterias en el día 12 postinfección, siendo el día 16 en donde se comienza a observar una disminución en el número de colonias y en donde se supone que comienza la depuración de la infección. Se comprobó el proceso inflamatorio producido por este patógeno mediante la sobreexpresión de los diferentes mediadores estudiados como IL-6, TNF- α , COX2 e iNOS, los cuales mostraron una inducción en sus niveles de expresión en el transcurso que duró la infección tanto en hígado como en colon comparados con el grupo control.

Los resultados confirman nuestra hipótesis que las enzimas metabolizadoras de los fármacos muestran diferencias en su expresión con respecto a la respuesta de las citocinas (inflamación) en la mucosa intestinal de ratones Balb/c. El efecto de la colonización de *C. rodentium* en el colon y en el hígado modulan la expresión del RNAm (regulación en baja) de CYP 2C29 y 1A2 en el duodeno, la regulación de CYP3A11 no se ve afectada por la sobreexpresión de los diferentes mediadores analizados en ninguno de los dos tejidos estudiados.

Podemos concluir que se alcanzó el objetivo principal y que logramos determinar como se modulan los CYPs estudiados en este proceso infeccioso e inflamatorio producido por *C. rodentium*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adedoyin A., Prakash C., O'Shea D., Blair I., Wilkinson G. (1994) Stereoselective disposition of hexobarbital and its metabolites: relationship to the S-mephenytoin polymorphism in caucasian and chinese subjects. *Pharmacogenetics*, **4**: 27-38
- Andersson T., Regardh C., Lou Y., Zhang Y., Dahl M., Bertilsson L. (1992) Polymorphic hydroxylation of S-mephenytoin and omeprazole metabolism in Caucasian and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*, **2**: 25-31
- Anzenbacher P. & Anzenbacherova E. (2001) Cytochromes P-450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*, **58**:737-747
- Barclay T., Peters J., Sewer M., Ferrari L., González F., Morgan E. (1999) Modulation of cytochrome P450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferators activated receptor alpha dependent. *J Pharmacol Exp Ther*, **290**: 1250-1257
- Benet L., Cummins C., Wu Y. (2003) Transporter-enzyme interactions: implications for predicting drug-drug interactions from in vitro data. *Curr Drug Metab*, **4**: 393-398
- Blanco G., Harrison P., Evans W., Relling M. (2000) Human cytochrome P-450 maximal activities in pediatric versus adult liver. *Drug Metab Dispos*, **28**: 379-382
- Branch R., Adedoyin A., Frye R., Wilson J., Romkes M. (1999) In vivo modulation of CYP enzymes by quinidine and rifampin. *Clin Pharmacol Ther*, **68**:401-411
- Campellone K. & Leong J. (2002) *Tails of two tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli O157:H7*. *Curr opinion in microbiol*, 2003; **6**: 82-90.
- Capdevila J., Harris R., Falck J. (2002) Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci*, **59**: 780-789
- Chen J, Strom A, Gustafsson J, Morgan E. (1995) Suppression of the constitutive expression of cytochrome P450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: Comparison with induction of acute-phase genes and

demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol Pharmacol* **47**:940–947

Cheng P., Morgan E. (2001) Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. *Curr Drug Metab*, **2**: 165-183

Cheung Y., Kerr A., McFadyen M., Melvin W., Murray G. (1999) Differential expression of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 in human kidney tumours. *Cancer Lett*, **139**:199-205

Coon M., Ding X., Pernecky S., Vaz A. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J*, **6**: 669-673

Coulson M., Gibson G., Plant N., Hammond T., Graham M. (2003) Lansoprazole increases testosterone metabolism and clearance in male Sprague-Dawley rats: implications for Leydig cell carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, **192**:154-163

Díaz B. (2004) Control de la síntesis de los estrógenos (ii): Agentes antiaromatasa. *Biocáncer*, **2**:1-16

Ding X. & Kaminsky L. (2003) Human extrahepatic cytochromes P-450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**:149-173

Doherty M. & Charman W. (2002) The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism?. *Clin Pharmacokinet*, **41**:235-253

Domanski T., Finta C., Halpert J., Zaphiropoulos P. (2001) cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol*, **59**:386-392

Dresser G., Spence J., Bailey D. (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*, **38**:41-57

Farrel G. (1999) Effects of disease on expression and regulation of CYPs. *Mol Aspects Med*, **20**: 55-70

- Galli E. & Feijoo L. (2002) Citocromo P-450 y su importancia clínica, revisión actualizada. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, **65**:187-201
- Gellner K., Eiselt R., Hustert E., Arnold H., Koch I., Haberl M., Deglmann C., Burk O., Buntfuss D., Escher S., Bishop C., Koebe H., Brinkmann U., Klenk H., Kleine K., Wojnowski U. (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics*, **11**:111-121
- Gibson G. & Skett P. (1994) Introduction to Drug Metabolism. Chapman & Hall, Glasgow.
- Goeptar A., Sheerens H., Vermeulen N. (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol*, **25**: 25-65
- Goldstein J. & de Morais S. (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2Csubfamily. *Pharmacogenetics*, **4**: 285-299
- Gonzalez F. (1992) Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*, **13**:346-352
- Gonzalez F. & Fernandez P. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos*, **26**: 1194-1198
- Guengerich F. (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**:1-17
- Guengerich F. (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv*, **3**:4 194-204
- Guengerich F. (2001) Uncommon P450 catalysed reactions. *Curr Drug Metab*, **2**: 93-115
- Guengerich P. (1993) Cytochrome P450 Enzymes. *Am Sci*, **81**:440-447
- Gonzalez F. & Fernandez P. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos*, **26**:1194-1198
- Han X., Ouyang D., Chen X., Shu Y., Jiang C., Tan Z., Zhou H. (2002) Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol*, **54**: 540-543

- Higgins L., Frankel G., Douce G., Dougan G., MacDonald T. (1999) *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, **67**:3031-3039
- Jurjus A., Khoury N., Reimund J. (2004) Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **50**:81-92
- Kidd R., Straughn A., Meyer M., Blaisdell J., Goldstein J., Dalton J. (1999) Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele. *Pharmacogenetics*, **9**:71-80
- Klose T., Blaisdell J., Goldstein J. (1999) Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol*, **13**:289-295
- Kolars J., Schmiedlin-Ren P., Schuetz J., Fang C., Watkins P. (1992) Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest*, **90**:1871-1878
- Kotlyar M. & Carson S. (1999) Effects of obesity on the cytochrome P-450 enzyme system. *Int J Clin Pharmacol*, **37**:8-19
- Lapple F., Richter O., Fromm M., Richter T., Thon K., Wisser H., Griese E., Eichelbaum M., Kivisto K. (2003) Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics*, **13**:565-575
- Lewis D. Cytochromes P450: Structure, function and mechanism. (1996) Taylor & Francis Ltd. Bristol, PA. USA.
- Luperchio S. & Shauer D. (2001) Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microb and Infect*, **3**:333-340.
- Marill J., Cresteil T., Lanotte M., Chabot G. (2000) Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-trans-retinoic acid principal metabolites. *Mol Pharmacol*, **58**:1341-1348

- Maaser C., Housley M., Imura M., Smith J., Villance B., Finday B., Schreiber J., Varki N., Kagnoff M., Eckmann L. (2004) Clearance of *Citrobacter rodentium* requires B cell but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. *Infect Immun*, **69**: 3315-3324
- McCrea J., Cribb A., Rushmore T., Osborne B., Gillen L., Waldman S., Bjornsson T., Spielberg S., Goldberg M. (1999) Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther*, **35**:348-352
- Mimura M., Baba T., Yamazaki H., Ohmori S., Inui Y., Gonzalez F., Guengerich F., Shimada T. (1993) Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, **21**:1048-1056
- Miners J., Coulter S., Birkett D., Goldstein J. (2000) Torsemide metabolism by CYP2C9 variants and other human CYP2C subfamily enzymes. *Pharmacogenetics*, **10**:267-270
- Morgan T. (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev*, **29**:1129-1188
- Morgan T. (2001) Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: Why and how? *Drug Metab Dispos*; **29**:207-212
- Mugford C. & Kedderis G. (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev*, **30**:441-498
- Murray G., Taylor M., McFadyen M., McKay J., Greenlee W., Burke M., Melvin W. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P-450 CYP1B1. *Cancer Res*, **57**: 3026-3031
- Nataro J. & Kaper J. (1998) Diarrheagenic, *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, **11**: 142-201
- Nebert D., Adesnik M., Coon M., Estabrook R., Gonzalez F., Guengerich F., Gunsalus J., Johnson E., Kemper B., Levin W., Philips J., Sato R. Waterman M. (1987) The P-450 gene superfamily recommended nomenclature. *DNA*, **6**:1-11

- Nelson D. (2003) Comparison of P-450s from human and fungus: 420 million years of vertebrate P-450 evolution. *Arch Biochem Biophys*, **409**:18-24
- Nyeki A., Buclin T., Biollaz J., Decosterd L. (2003) NAT2 and CYP1A2 phenotyping with caffeine: head-to-head comparison of AFM1J vs. AAMU in the urine metabolite ratios. *Br J Clin Pharmacol*, **55**:62-67
- Omura, T. (1999) Forty years of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun*, **266**: 690-698
- Orellana M. & Guajardo V. (2004) Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev Méd Chile*, **132**:85-94
- Ortiz P. & De Voss J. (2002) Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P-450. *Nat Prod Rep*, **19**:477-493
- Paine M., Khalighi M., Fisher J., Shen D., Kunze K., Marsh C., Perkins J., Thummel K. (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**:1552-1562
- Pan J, Xiang Q, Ball S. (2000) Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase Chain reaction method to study the effects of cytokines on Cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metab Dispos*, **28**(6):709-713.
- Pelkonen O. & Raunio H. (1997) Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect*, **4**:767-774
- Rahman A., Korzekwa K., Grogan J., Gonzalez F., Harris J. (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res*, **54**:5543-5546
- Reid J., Kuffel M., Ruben S., Morales J., Rinehart K., Squillace D., Ames M. (2002) Rat and human liver cytochrome P-450 isoform metabolism of ecteinascidin 743 does not predict gender-dependent toxicity in humans. *Clin Cancer Res*, **8**: 2952-2962

Reichhart W, & Feyereisen R. (2001) Cytochromes P-450: a success story. *Gen Biol*, **1**:1-8

Renton K. & Nicholson T. (2000) Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolisaccharide-evoked localized inflammation in the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **294**:524-430

Renton K. (2004) Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab*; **5**(3):235-43.

Romkes M., Faletto M., Blaisdell J., Raucy J., Goldstein J. (1991) Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*, **30**:3247-3255

Schauer D., Falkow S. (1993) Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun*, **61**:2486- 2492

Shimada T., Hayes C., Yamazaki H., Amin S., Hecht S., Guengerich F., Sutter T. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res*, **56**:2979-2984

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, **270**:414-423

Simmons C., Goncalves N., Gahem M., Bajaj M., Clare S., Neves B., Frankel G., Dougan G., MacDonald T. (2002) Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial, pathogen. *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN. *The J. Immunol*, **168**:1804-1812

Simmons C., Clare P., Ghaem-Maghani M., Uren T., Rakin J., Huett A., Goldin R., Lewis D., MacDonald T., Strugnell R., Frankel G., Dougan G. (2002) Central role for B lymphocytes and CD4⁺T cell in immunity to infection by attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, **71**: 5077-5086

- Sheweita S. (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab*, **1**:107-132
- Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, **270**: 414-423
- Skjelbo E., Brosen K., Hallas J., Gram L. (1991) The mephenytoin oxidation polymorphism is partially responsible for the N-demethylation of imipramine. *Clin Pharmacol Ther*, **49**:18-23
- Smith D., Ackland M., Jones B. (1997) Properties of cytochrome P-450 isoenzymes and their substrates. Part 2: properties of cytochrome P-450 substrates. *Drug Discov Today*, **2**:479-486
- Smith D., Abel S., Hyland R., Jones B. (1998) Human cytochrome P-450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica*, **12**:1095-1128
- Sotaniemi E., Rautio A., Backstrom M., Arvela P., Pelkonen O. (1995) CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *Br J Clin Pharmacol*, **39**:71-76
- Stoilov I., Akarsu A., Sarfarazi M. (1997) Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1(CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet*, **6**:641-647
- Sueyoshi T., Kawamoto T., Zelko I., Honkakoski P., Negishi M. (1999) The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*, **274**:6043-6046
- Thummel K. & Wilkinson G. (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **38**:389-430
- Timothy K. & Donnenberg S. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Microbiol*, **92**:1664-1668

- Toon S., Hopkins K., Garstang F., Aarons L., Sedman A., Rowland M. (1987) Enoxacin warfarin interaction: pharmacokinetic and stereochemical aspects, *Clin Pharmacol Ther*, **42**:33-41
- Torres G., Zhou X., Kaper J. (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*, **73**:1 18–29
- Vallance B., Deng W., Jacobson K., Finday B. (2003) Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun*, **71**: 3443-3453
- Vallance B., Deng W., Knodler L., Finlay B. (2002) Mice lacking T and B lymphocytes develop transient colitis and crypt hyperplasia yet suffer impaired bacterial clearance during *Citrobacter rodentium* Infection. *Infect Immun*, **70**:2070-2081
- Vergeres G. & Waskell L. (1995) Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. *Biochimie*, **77**:604-620
- Wang Z., Hall S., Maya J., Li L., Asghar A., Gorski J. (2003) Diabetes mellitus increases the in vivo activity of cytochrome P-450 2E1 in humans. *Br J Clin Pharmacol*, **55**:77-85
- Weidenbach H., Leiz S., Nussler A., Dikopoulos N., Bachem M., Buttenschoen K., Reinshagen M., Beger H., Adler G., Schmid R. (2000) Disturbed bile secretion and cytochrome P450 function during the acute state of experimental colitis in rats. *J Hepatol*, **32**:708-717.
- Whitlock J. (1999) Induction of cytochrome P-4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**:103-125
- Wiles S., Clare S., Harker J., Young A., Dougan D. (2004) Organ specificity colonization and clearance dynamics un vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell Microbiol*, **6**:963-972
- Williams P., Cosme J., Sridhar Y., Johnson E., McRee D. (2000) Mammalian microsomal cytochrome P-450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell*, **5**:121-131

Winters D. & Cederbaum A. (1993) Biochemistry of Cytochrome P450. In Hepatic and bile secretion: *Physiol and pathophysiol*, **27**:407-20

Yang R., Mark M., Gray A., Huang A., Xie M., Zhang M., Goddard A., Wood W., Gurney A., Godowski P. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide induced cellular signalling. *Nature*, **395**:284-288

Zaphiropoulos P. (1997) Exon skipping and circular RNA formation in transcripts of the human cytochrome P-450 2C18 gene in epidermis and of the rat androgen binding protein gene in testis. *Mol Cell Biol*, **17**:2985-2993

Zuber R., Anzenbacherova E., Anzenbacher P. (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med*, **6**:189-198