



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CONSECUENCIAS TOXICOLÓGICAS DE LA INDUCCIÓN DE
CYP2E1 EN CEREBELO DE RATA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA
QFB ANA CAROLINA VALENCIA OLVERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.
DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M

MÉXICO, D.F., SEPTIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"El hombre sabe que no puede abarcar su universo con su sol y sus estrellas. Lo que le parece mucho más insoportable es estar condenado a dejar pasar de largo también al otro infinito, al cercano, al que está al alcance de la mano."

El libro de la risa y el olvido - Milán Kundera (1978)

Para los “piscianos” de mi vida:
Ángeles, mi ma y mayor inspiración humana y académica.
Alberto, mi compa, mi amor, mejor amigo y compañero de vida.

Para Felipe, el ser de luz, maestro y motor de mis días.
Para Ángel Gonzalo.
Para mi hermosa familia, Germán, Angelita y Luz, los amo.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Javier Espinosa del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas en colaboración con el Dr. Julio Morán Andrade en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para el trabajo se contó con el apoyo de la beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT y el apoyo PAPIIT DGAPA-UNAM (IN214908)

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por su confianza, apoyo incondicional y sus grandes enseñanzas académicas y de vida.

Al Dr. Julio Morán Andrade por recibirme en su laboratorio y permitirme ser parte de su extraordinaria familia académica y por su valiosa contribución en mi formación.

Al Dr. Óscar Próspero García por su disponibilidad y comentarios en el desarrollo de este trabajo y por sus charlas tan amenas y formativas.

Al jurado: el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez, la Dra., María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, el Dr. Arnulfo Albores Medina y la Dra. Milagros Méndez Ubach por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus excelentes sugerencias.

Al Dr. Camacho por sus aportaciones en este trabajo y su amistad.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández por su apoyo técnico para la realización del trabajo y su invaluable amistad.

A la Maestra en Ciencias Guadalupe Domínguez por su valiosa aportación técnica en el desarrollo de este trabajo.

A mi madre, la Dra. Ángeles Olvera por su tiempo, inspiración amor y asistencia.

A mi esposo, Alberto Montiel, por su amor, paciencia y apoyo sin el cual me hubiera sido muy difícil terminar este proyecto.

A mi hermana Luz de Carmen Valencia por su tiempo y apoyo.

A mi hermana Ángeles Valencia y mi padre Germán Valencia por su incondicional apoyo y cariño.

A mi familia política por su soporte y amistad.

A la Dra. Berenice Hernández Enríquez por su tiempo dedicado a la revisión de la tesis y su asistencia durante y después de mi trabajo de doctorado.

A la profesora Isaura Carrera por su educación tan útil y permanente.

A mis amigas Perla Leal y Giovanna Salamanca por sus extraordinarias y trascendentales enseñanzas al inicio de mi doctorado así como su apoyo y amistad.

A mis amigos Alicia Güemez, Pedro Arcelus, Fernando Rascón, Liliana Gómez, Alejandra Saavedra, Edith Molina y Caro Labastida por su inspiración a la distancia.

A mis amigos de laboratorio Sitlali, Cynthia, Mariana, Angélica y Mauricio por su ayuda y amistad. A todos los integrantes de los laboratorios BL302 y C206 por hacer amenas las horas de trabajo y su asistencia.

A mi querida familia Valencia por todo su cariño.

A mi otra familia, María Díez y Adriana Ochoa por estar siempre presentes.

A mis tíos adoptivos Jorge, Esther, Jano, Tei, Domen, Lucía, Pepe, Gloria, Carlos y Chepi por su apoyo en los tiempos difíciles.

A CONACyT por la beca para la realización del doctorado

Al Posgrado de Ciencias Biomédicas

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas

Al Instituto de Fisiología Celular

A la Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Citocromos P450 y su importancia.....	3
1.2 Citocromo P450 en cerebro.....	7
1.2.1 Metabolismo de sustratos endógenos.....	8
1.2.2 Metabolismo de Xenobióticos	10
1.3 Toxicidad asociada a Citocromo P450	
1.3.1 Citocromo P450 y activación metabólica de fármacos.....	14
1.3.2 Interacciones farmacéuticas.....	17
1.3.3 Citocromo P450 como generador de especies reactivas de oxígeno.....	19
1.4 Citocromo P450 2E1 (CYP2E1).....	22
1.4.1 CYP2E1 como generador de especies reactivas de oxígeno.....	27
1.4.2 CYP2E1 como activador de sustratos.....	29
1.4.3 Inducción de CYP2E1 por xenobióticos.....	30
1.4.3.1 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por isoniazida.....	32
1.4.3.2 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por etanol.....	35
1.4.3.3 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por acetaminofén.....	37
1.5 Citocromo P450 2E1 en cerebro.....	40
II. ANTECEDENTES	43
2.1 CYP2E1 y neurotoxicidad	44
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
IV. HIPÓTESIS	46
V. OBJETIVOS	47
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 Materiales.....	47
6.2 Cultivo de Células Granulares de Cerebelo de Rata.....	47
6.2.1 Tratamiento con inductores.....	48
6.3 Evaluación de la expresión e inducción de CYP2E1	
6.3.1 Inmunocitoquímica.....	48
6.3.2 Western blot.....	48
6.4 Medición de la generación de especies reactivas de oxígeno	
6.4.1 Oxidación del Dihidroetidio.....	49

6.4.2	Medición del glutatión y glutatión oxidado.....	50
6.4.3	Inmunocitoquímica para 8-oxo-desoxi-guanosina.....	50
6.5	Medición de Viabilidad Celular.....	50
6.6	Análisis Estadístico	51
VII. RESULTADOS		
7.1	Expresión del CYP2E1 en células granulares de cerebelo.....	52
7.2	Inducción del CYP2E1 y sus consecuencias toxicológicas por el tratamiento con isoniazida en células granulares de cerebelo	
7.2.1	Inducción del CYP2E1 por isoniazida.....	54
7.2.2	La inducción del CYP2E1 con isoniazida a varias concentraciones y tiempos no genera un daño significativo en células granulares de cerebelo.....	56
7.2.3	El tratamiento con isoniazida induce ROS en presencia de BSO en CGC.....	57
7.2.4	El CYP2E1 es el responsable de la generación de ROS por el tratamiento con isoniazida y BSO.....	59
7.2.5	El incremento de los ROS da como la resultado la oxidación del DNA y puede prevenirse con la inhibición del CYP2E1 o el tratamiento con antioxidante....	60
7.2.6	El tratamiento con BSO e INH genera muerte celular y esto se puede prevenir inhibiendo al CYP2E1 o las ROS generadas.....	61
7.2.7	CYP2E1 no participa en el daño generado por isoniazida en células granulares de cerebelo con niveles bajos de glutatión a 24 horas de tratamiento.....	62
7.3	Inducción del CYP2E1 y sus consecuencias toxicológicas por el tratamiento con etanol en células granulares de cerebelo.	
7.3.1	Inducción CYP2E1 por etanol.....	66
7.3.2	El tratamiento con etanol no incrementa los niveles de ROS generados en las CGC ni compromete la viabilidad celular.....	67
7.3.3	El tratamiento con BSO y etanol incrementa los niveles de ROS y compromete la viabilidad celular en las CGC.....	68
7.4	Inducción del CYP2E1 y sus consecuencias toxicológicas por el tratamiento con acetaminofén en células granulares de cerebelo.	
7.4.1	Neurotoxicidad por acetaminofén (AAP).....	69
7.4.2	Las ROS y el CYP2E1 participan en la muerte de las CGC por AAP.....	70
7.4.3	Generación de ROS por el tratamiento con acetaminofén en las CGC.....	71
7.4.4	Inducción del CYP2E1 por acetaminofén.....	71

VIII. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	73
IX. CONCLUSIONES	81
X. BIBLIOGRAFÍA	82
XI. APÉNDICE	102

Índice de Figuras

1.	Estructuras de los Citocromos P450 (CYP) y Complejo microsomal.....	4
2.	Formación de metabolitos reactivos a partir de moléculas “toxicóforas”.....	15
3.	Toxicidad por activación metabólica de fármacos.....	16
4.	Interacciones farmacéuticas.....	18
5.	Ciclo catalítico de los CYP.....	21
6.	Estructura del sitio activo del Citocromo P450 2E1 (CYP2E1).....	26
7.	Mecanismos de citotoxicidad asociada a CYP2E1 en hepatocitos.....	28
8.	Inducción del CYP2E1 por estabilización de la proteína.....	32
9.	Metabolismo hepático de la isoniazida (INH).....	33
10.	Metabolismo y mecanismo de citotoxicidad por el acetaminofén (AAP).....	39
11.	Metabolismo del etanol en cerebro	43
12.	Inducción del CYP2E1 por INH en cerebro e hígado de rata.....	44
13.	Diagrama de flujo de la metodología.....	51
14.	Expresión del CYP2E1 en Células Granulares del Cerebelo (CGC) por inmunocitoquímica.....	52
15.	Expresión y cuantificación del CYP2E1 en CGC por western blot.....	53
16.	Inducción del CYP2E1 por INH en CGC.....	55
17.	Viabilidad y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el tratamiento con INH.....	56
18.	Producción de ROS por el tratamiento con INH y Butionin sulfoximina (BSO).....	58
19.	Participación del CYP2E1 en la generación de ROS por BSO e INH.....	59
20.	Oxidación del DNA por el tratamiento con BSO e isoniazida y participación del CYP2E1.....	60
21.	Viabilidad celular y participación del CYP2E1 por el tratamiento con BSO e INH.....	61
22.	Curso temporal de la generación de ROS por el tratamiento con INH y BSO.....	62
23.	Viabilidad de CGC después del tratamiento con BSO e INH a las 24 horas de tratamiento.....	63

24	Viabilidad de CGC después del tratamiento con BSO e INH a las 24 horas de tratamiento agregando antioxidante a diferentes tiempos.....	64
25	Viabilidad de CGC después del tratamiento con BSO e INH a las 24 horas de tratamiento agregando inhibidores de la NADPH oxidasa.....	65
26	Inducción del CYP2E1 por etanol en CGC.....	66
27	Viabilidad y generación de ROS por etanol en CGC.....	67
28	Viabilidad y generación de ROS por etanol y BSO en CGC.....	68
29	Neurotoxicidad por acetaminofén (AAP) en CGC.....	69
30	Participación del CYP2E1 y las ROS en la neurotoxicidad por AAP.....	70
31	Generación de ROS por el tratamiento con AAP en CGC.....	71
32	Inducción del CYP2E1 por AAP en CGC.....	72
33	Esquema propuesto de las consecuencias toxicológicas de la inducción del CYP2E1 en cerebelo de rata.....	79

Índice de tablas

1.	Citocromos P450 en humanos clasificados según su sustrato.....	5
2.	Ejemplos de sustratos para el Sistema Nervioso Central metabolizados por los CYP	11
3.	Sustratos metabolizados por el CYP2E1.....	24
4.	Fármacos que promueven daño hepatotóxico por la acción del CYP2E1..	29
5.	Evidencias sobre la presencia e inducción del CYP2E1 en cerebro.....	41

Abreviaturas

8-oxo-dg 8-desoxi-guanosina

AAP Acetaminofén

AD Enfermedad del Alzheimer

ADH Alcohol deshidrogenasa

AOM Azoximetano

BSO Butionin sulfoximina

CCl₄ Tetracloruro de carbono

CGC Células Granulares de Cerebelo

CYP Citocromo P450

CYP2E1 Citocromo P450 2E1

DDI Interacciones farmacéuticas

DILI Daño al hígado inducido por fármacos

DNA Ácido Desoxirribonucleico

EtOH Etanol

EUKA Eukarion-134

GSH Glutación total

GSSG Glutación oxidado

INH Isoniazida

JNK Quinasa c-Jun N-terminal

KO Ratón deficiente (knockout)

MTMPyP Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porpirin pentacloruro

NAC N-acetil cisteína

NAPQI N-acetil-p benzoquinoneimina

NDMA N-nitroso dimetilamina

NOX NADPH Oxidasa

PD Enfermedad del Parkinson

Phe Fenilalanina

RNA Ácido Ribonucleico

RNA_m Ácido Ribonucleico mensajero

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

RESUMEN

El citocromo P450 (CYP) es una familia de enzimas muy versátiles en la naturaleza involucradas en el metabolismo oxidativo de moléculas endógenas y exógenas (xenobióticos). En los últimos años, se han encontrado varias evidencias que sugieren que la familia de enzimas del Citocromo P450 puede contribuir en el metabolismo *in situ* de xenobióticos dentro del Sistema Nervioso Central (SNC). En el hígado, algunos xenobióticos pueden ser metabolizados por los CYP en productos reactivos que pueden dañar e inclusive matar a las células. El Citocromo P450 2E1 (CYP2E1) es una isoforma que puede generar metabolitos activos y/o una considerable cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que puede inducir citotoxicidad en varios tejidos. El presente estudio exploró la posibilidad de que una inducción del CYP2E1 en el cerebro, sea capaz de generar ROS y promover un daño significativo.

Como modelo de estudio se utilizaron cultivos primarios de células granulares de cerebelo (CGC) conservadas durante 8 días *in vitro*. Primeramente se demostró la presencia del CYP2E1 en los cultivos primarios. Posteriormente, se demostró que el CYP2E1 es inducible con tres inductores hepáticos: etanol, isoniazida y acetaminofén. La inducción del CYP2E1 con etanol e isoniazida no genera ROS ni modifica el estado redox de la célula. Sin embargo, si se agotan los niveles de glutatión con butionin sulfoximina (BSO), el tratamiento con etanol e isoniazida genera ROS y compromete la viabilidad de las células a las 12 horas de tratamiento. La muerte y la generación de ROS por el tratamiento con BSO y etanol o isoniazida pueden ser inhibidas al incluir un inhibidor específico del CYP2E1 o antioxidantes. La generación de ROS por el CYP2E1 en células tratadas con BSO e isoniazida da por resultado la oxidación del DNA. Tratamientos de 24 horas con BSO e isoniazida generan la muerte de un 90% de las CGC independiente de la actividad del CYP2E1, aunque la inclusión de antioxidantes o inhibidores de la NADPH oxidasa inhiben la muerte.

En el caso del acetaminofén, un tratamiento de 24 horas genera muerte y estrés oxidativo, que puede ser bloqueado por la inclusión de inhibidores del CYP2E1. El daño es mucho mayor que el encontrado con los otros dos inductores.

Los resultados sugieren que la inducción del CYP2E1 puede ser un factor causal de daño neurodegenerativo, cuya intensidad dependerá de los xenobióticos que participen en la inducción así como de las condiciones fisiológicas en que se encuentre la célula.

ABSTRACT

Increasing evidence suggests that brain cytochrome P450 (CYP) can contribute to the *in situ* metabolism of xenobiotics. In the liver, xenobiotics can be metabolized by CYP into more reactive products that can damage hepatocytes and induce cell death. In addition, normal CYP enzymatic activity produces reactive oxygen species (ROS) that contribute to cell damage through oxidative mechanisms. CYP2E1 is a CYP isoform that can generate ROS and induce cytotoxicity in multiple tissue types. The aim of this study was to determine whether CYP2E1 induction by ethanol, acetaminophen or isoniazid can induce significant brain cell impairment. Exposure of primary cerebellar granule cultured neurons to the three chemicals, increased CYP2E1 expression. Only the treatment with acetaminophen resulted in reactive oxygen species (ROS) production and cell death and these effects were inhibited with a pre-treatment of CYP2E1 inhibitors, 4-methyl pyrazole or diallyl sulfide, or to a mimetic of superoxide dismutase/catalase, Eukarion-134. To analyze whether the antioxidant response of cerebellar granule neurons is sufficient to protect against the ROS generated by isoniazid or ethanol induction of CYP2E1, we lowered cellular GSH levels with L-buthionine sulfoximine (BSO). This BSO treatment depletes glutathione but it does not compromise cell viability. A significant increase in ROS production was found in BSO-treated cells after ethanol or isoniazid exposure at the time when CYP2E1 is induced. These effects were attenuated by simultaneous exposure to CYP2E1 inhibitors or antioxidants. In some treatments the neuronal damage was larger suggesting that the damage is also a product of idiosyncratic drug reactions. These results contribute significant data about how typical liver enzymes like CYP2E1 could represent a risk of *in situ* neuronal damage.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Citocromo P450 y su importancia

El término Citocromo P450 (CYP) se refiere a una familia de enzimas muy versátiles en la naturaleza involucradas en el metabolismo oxidativo de moléculas orgánicas. Estas proteínas se han conservado a lo largo de la evolución y se pueden encontrar en bacterias, hongos, plantas, mamíferos y humanos. Son hemoproteínas que utilizan oxígeno molecular y dos cofactores para catalizar una gran variedad de inserciones de oxígeno estereoespecíficas y regioselectivas en compuestos exógenos o endógenos de peso molecular variado. Estos procesos son de vital importancia para los organismos, ya que participan en la desintoxicación de compuestos exógenos como fármacos, drogas de abuso, pesticidas y otros contaminantes ambientales y en la biosíntesis y metabolismo de eicosanoides, colesterol, sales biliares, esteroides, aminos biogénicas, vitamina D3 y ácido retinóico.

Los CYP existen como hemoproteínas de aproximadamente 500 aminoácidos y un grupo prostético de Hierro-Protoporfirina IX. De manera altamente conservada, se pueden localizar 12 estructuras α -hélice y 4 láminas beta. El grupo prostético hemo es el centro catalítico de la enzima (Figura 1A). El grupo tiol de una cisteína altamente conservada se coordina al hierro de manera opuesta al sitio de coordinación al oxígeno, lo que le da propiedades espectrales y funcionales únicas a los CYP. La conservación espacial es mucho mayor en el centro catalítico y difiere sustancialmente en la región de unión al sustrato y anclaje a la membrana (Johnson & Stout, 2013).

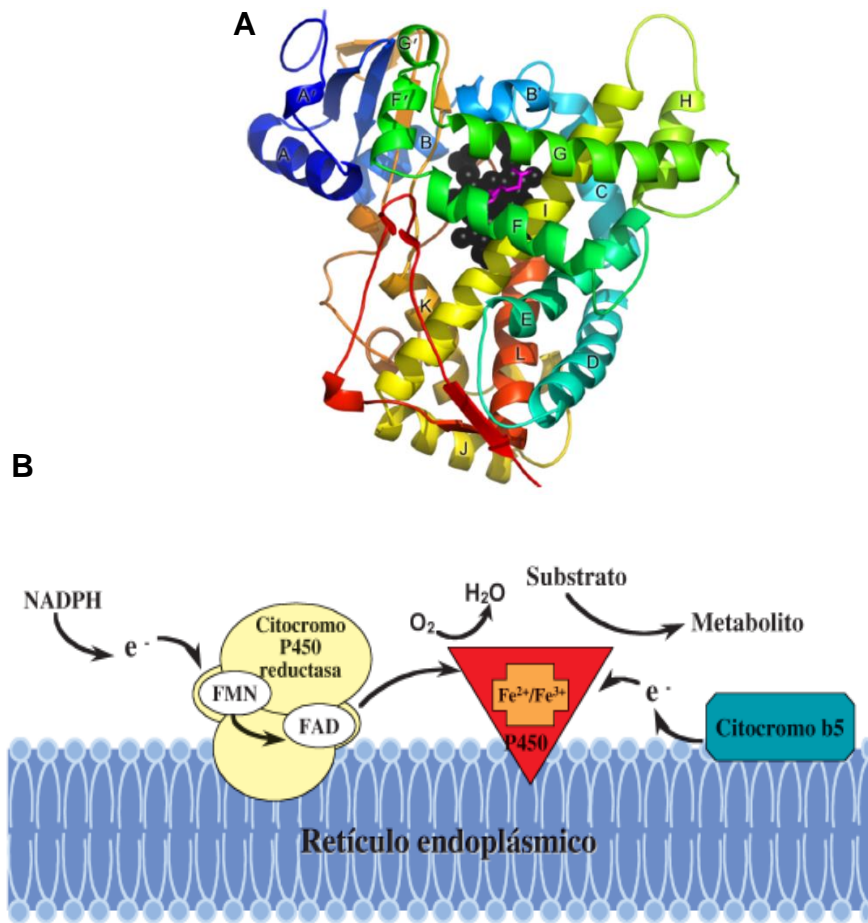


Figura 1 Estructura de los Citocromo P450 y complejo microsomal. A. Estructura general de los CYP en humano. El polipéptido está coloreado de azul a rojo del lado N terminal al carboxilo terminal indicando la mayoría de las α -hélice. El grupo hemo se muestra como una esfera negra y su ligando como palitos magenta. Imagen tomada de (Porubsky *et al.*, 2008) **B.** Complejo microsomal tomado de (Donato, 2004). En azul está representada la membrana del retículo endoplásmico, en amarillo y azul claro, la Citocromo P450 reductasa (CPR) y el citocromo b5 respectivamente que donan los electrones. El CPR utiliza como co-factor el flavín mononucleótido (FMN). En rojo está señalado el CYP, el ciclo catalítico se explica en el capítulo 1.3.3.

En eucariontes, los CYP se encuentran intracelularmente acoplados a una membrana ya sea del retículo endoplásmico liso (citocromo p450 microsomal) o de la membrana interna de la mitocondria, junto con otras enzimas donadoras de electrones como la citocromo P450 reductasa, el citocromo b5, y en el caso de la mitocondria, la ferredoxina reductasa (Figura 1B)

El término P450 se deriva de la longitud de onda donde se encuentra el mayor pico de absorbancia (450 nm) del CYP reducido y formando un complejo con monóxido de

carbono. Para su nomenclatura se toma en cuenta la similitud en la secuencia de aminoácidos. A todos los miembros de una familia de CYP que poseen más del 40% de similitud se les asigna un número. Una sub-familia está representada por proteínas con más del 55% de similitud y se le asigna una letra. Finalmente, se asigna otro número que indica específicamente al miembro de la subfamilia (Nelson, 2009).

En humanos existen 57 genes que codifican para los CYP; éstos se encuentran expresados en casi todos los tejidos. Dependiendo de su función, los diferentes CYP se pueden encontrar distribuidos en diferentes tejidos del organismo, por ejemplo, los CYP implicados en la biosíntesis de esteroides se encuentran en órganos esteroidogénicos como testículos, ovarios y placenta.

Una manera de clasificar a los CYP en mamíferos, es tomando en cuenta los sustratos que oxidan (Tabla 1); casi una cuarta parte de ellos está involucrada en el metabolismo de esteroides. Cinco de los CYP de humano tienen función en el metabolismo de las prostaglandinas, incluyendo los CYP que sintetizan el tromboxano y la prostaciclina (5A1, 8A1). Seis de los CYP tienen la función de metabolizar las vitaminas solubles en lípidos (A y D). En mamíferos, alrededor de un tercio de los CYP se encuentra en el hígado, cuya principal función es la degradación de xenobióticos, de los cuales sobresalen 6 isoformas: CYP1A2, 3A4, 2C9, 2C19, 2D6 y 2E1. Por otro lado, aún se tiene información limitada acerca de una cuarta parte de los CYP a los cuales se les llama huérfanos, ya que se conoce su estructura, localización y secuencia, más no su función (Tabla 1).

Tabla 1. CYP humanos agrupados según su tipo de sustrato principal.

Sustratos endógenos					Sustratos exógenos		Huérfanos	
Ácidos Grasos	Eicosanoides	Vitaminas	Esteroides		Xenobióticos			
	4F2	2R1	1B1	17A1	1A1	2C19	2A7	4F22
2J2	4F3	24A1	7A1	19A1	1A2	2D6	2S1	4V2
2U1	4F8	26A1	7B1	21A1	2A6	2E1	2W1	4X1
4A11	4F12	26B1	8B1	27A1	2A13	2F1	3A43	4Z1
4B1	5A1	26C1	11A1	39A1	2B6	3A4	4A22	20A1
	8A1	27B1	11B1	46A1	2C8	3A5	4F11	27C1
			11B2	51A1	2C9	3A7		
					2C18			

Muchos de los CYP enlistados como que tienen sustratos endógenos también pueden metabolizar sustratos exógenos y viceversa. Modificado de (Dutheil *et al.*, 2008).

Las mutaciones en varios genes CYP causan errores innatos del metabolismo y contribuyen a muchas enfermedades clínicamente relevantes (Nebert & Russell, 2002).

A diferencia de muchas enzimas, los CYP generalmente pueden metabolizar muchos sustratos y formar toda una variedad de productos. Esto aplica mayoritariamente en el caso de los CYP metabolizadores de xenobióticos; un solo CYP, por ejemplo el CYP3A4, puede oxidar cientos de sustratos diferentes.

Los xenobióticos son compuestos químicos de bajo peso molecular que se pueden encontrar en un organismo pero no son sintetizados por él. Son moléculas a las que estamos expuestos ya sea voluntaria (fármacos, drogas de abuso, alimentos) o involuntariamente (contaminación ambiental). Para su desintoxicación y eliminación, es necesario convertirlos en metabolitos hidrofílicos; a este proceso se le llama metabolismo de fase I y los CYP participan en un 70-80% de este proceso. Ya que nuestro organismo desconoce las estructuras químicas de casi todos los xenobióticos, es necesario que tenga una gran variedad de enzimas que sean versátiles y promiscuas y así realizar una gran cantidad de reacciones químicas.

Además de su función fisiológica y metabólica, a los CYP se les ha relacionado también con procesos de mutagénesis y toxicidad, debido a que existen evidencias de que algunas isoformas son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species) o de activar compuestos exógenos en agentes nucleofílicos y propiciar la formación de aductos con biomoléculas como proteínas o DNA, derivando en toxicidad o cáncer (Capítulo 1.3.2).

Desde su descubrimiento, ha existido un gran interés en los CYP debido a sus aplicaciones en una gran variedad de campos incluyendo la bioquímica, biotecnología, química, ciencias ambientales, enzimología, microbiología, fisiología, farmacología, ciencias de las plantas y toxicología (Furge & Guengerich, 2006). De hecho, únicamente en la década pasada se pueden encontrar más de 3000 publicaciones por año relacionadas a los CYP.

Los CYP involucrados en el metabolismo de fármacos, comúnmente muestran polimorfismos que derivan en fenotipos de individuos metabolizadores rápidos o lentos, lo

cual se relaciona directamente con algunos de los efectos secundarios de los fármacos. Con estos conocimientos, las compañías farmacéuticas son muy cautelosas en el desarrollo de medicamentos que puedan interactuar con estos CYP. Para los procesos de prueba y registro de nuevos medicamentos, la FDA requiere de la información relacionada con el metabolismo de cada nuevo fármaco por CYP, además de datos de inhibición o inducción de estas proteínas. Debido a ello, las compañías farmacéuticas tienen grupos de investigación asignados para predecir interacciones farmacológicas (Capítulo 1.3.2) y variaciones en biodisponibilidad. Ya aprobados los fármacos, toda esta información está disponible para los pacientes y los médicos.

Inicialmente, los CYP se descubrieron en hígado (Klingenberg, 1958; Omura & Sato, 1964), por lo que durante mucho tiempo se pensó que estaban localizados exclusivamente en tejido hepático y que su única función era eliminar las toxinas hidrofóbicas. Fue hasta mucho tiempo después cuando se describió que estas enzimas pueden encontrarse en tejidos extrahepáticos y que los CYP participan en reacciones propias del metabolismo endógeno. Los CYP existen en el tejido intestinal donde pueden contribuir hasta con el 50% del metabolismo de primer paso de un fármaco. También se pueden encontrar en piel, seno, pulmón, cerebro y corazón, donde apenas se están empezando a conocer su participación o función en condiciones fisiológicas normales o de enfermedad. Recientemente se ha demostrado que los CYP pueden ser funcionales en sitios extra-hepáticos tales como pulmón, colon (Ding & Kaminsky, 2003) y cerebro (Ferguson & Tyndale, 2011). Esto ha generado mucho interés por las implicaciones que tendría la inducción *in situ* de CYP con funciones fisiológicas específicas o el metabolismo de compuestos en tejidos que están particularmente expuestos a ciertas toxinas. Tal es el caso de la inducción de CYP1A y metabolismo de toxinas del tabaco. Dicho de otra manera, las variaciones en la regulación o expresión de los CYP pueden jugar un papel importante en la desregulación regional de metabolitos endógenos activos, en el daño tejido-específico y/o en el efecto de fármacos *in situ*.

1.2 CYP en cerebro

El caso de los CYP en cerebro es el tema de estudio más reciente en cuanto a la función e impacto fisiológico de los CYP extrahepáticos. Los CYP en cerebro se expresan aproximadamente el 3% respecto a la expresión en hígado (Sasame *et al.*, 1977). La

expresión depende de la región del cerebro; por ejemplo, en humanos se tiene una concentración mayor en tallo cerebral y cerebelo y una expresión menor en el estriado y el hipocampo (Bhamre *et al.*, 1992; Tirumalai *et al.*, 1998), aunque cada isoforma presenta un patrón de expresión distinto.

Existen algunos CYP que son mayormente expresados en cerebro que en otros tejidos como el CYP2D4, CYP2D18 y el CYP46A1 (Komori, 1993; Kawashima & Strobel, 1995; Nishimura *et al.*, 2003). Los CYP se encuentran en diferentes regiones y tipos celulares y en concentraciones distintas, inclusive pueden superar las concentraciones hepáticas en ciertas neuronas específicas (Miksys *et al.*, 2000). Como se puede observar en la Tabla 1, casi todos los CYP de humano se pueden encontrar en cerebro (isoformas resaltadas en rojo). Sin embargo, no se sabe acerca de la regulación e implicación biológica de todos los casos. A continuación se explicará con más detalle las evidencias que apoyan la participación de algunos CYP en el metabolismo de sustratos endógenos y exógenos. Para mayor información se recomienda consultar las revisiones (Haining & Nichols-Haining, 2007; Ferguson & Tyndale, 2011)

1. 2. 1 Metabolismo de sustratos endógenos

Los sustratos endógenos que se puede metabolizar en el cerebro son: el ácido araquidónico por las sub-familias 2J, 2U y 4A; algunas hormonas como la melatonina por las sub-familias 1A y 1B; algunos neurotransmisores principalmente por la isoforma CYP2D6; vitaminas por las sub-familias 27B, 26B y CYP24 y esteroides por las sub-familias 11B, 11A, 17A, 7A, 7B, 8B, 27A, 46A, 19A y las isoformas CYP2D6, CYP1A1 y CYP1B1. Actualmente se tienen evidencias convincentes de la importante función fisiológica que tienen los CYP2D6, CYP2C9, CYP19A1 y CYP46A1 en el cerebro.

Algunas de las primeras evidencias de que los CYP realizan funciones endógenas importantes fueron proporcionadas por estudios en pruebas de personalidad. Principalmente se ha estudiado al CYP2D6 con respecto a posibles efectos genéticos y diferentes niveles de activación cerebral durante pruebas cognitivas, de personalidad y vulnerabilidad a desórdenes mentales (Llerena *et al.*, 1993; Roberts *et al.*, 2004; Dorado *et al.*, 2007). El CYP2D6 se expresa en cerebro y metaboliza sustratos neuronales endógenos, lo que sugiere que estas asociaciones se pueden manifestar, por lo menos en

parte, debido al metabolismo alterado de compuestos en el SNC. El CYP2D6 puede participar en la formación de neurotransmisores como catecolaminas, dopamina (Bromek *et al.*, 2011) y serotonina (Yu *et al.*, 2003) y el metabolismo de la anandamida (Snider *et al.*, 2008) y la progesterona (Hiroi *et al.*, 2001).

El CYP2C19 metaboliza serotonina a hidroxilamina (Fradette *et al.*, 2004) así como las hormonas testosterona, progesterona y estradiol, que afectan la función cerebral y los rasgos de personalidad como la agresividad (Montoya *et al.*, 2012).

El CYP19 o aromatasa se expresa predominantemente en regiones límbicas e hipotalámicas aunque se encuentra también en corteza y cerebro medio (MacLusky *et al.*, 1994). La aromatasa, vía el metabolismo del estradiol y la interacción de éste con sus receptores específicos, promueve varios efectos regulatorios cruciales en procesos neuronales como sobrevivencia celular, brote axonal, diferenciación neuronal y plasticidad, (Azcoitia *et al.*, 2001; Kretz *et al.*, 2004; Prange-Kiel *et al.*, 2006; McCarthy, 2009; Saldanha *et al.*, 2009). El CYP19 puede metabolizar la testosterona al estradiol las cuales pueden influenciar en la agresividad, impulsividad y ansiedad.

La expresión del CYP46 está casi restringida al cerebro. El mecanismo más importante para eliminar el colesterol del cerebro es la conversión de colesterol en 24S-hidroxicolesterol por el CYP46 (Lutjohann *et al.*, 1996; Bjorkhem *et al.*, 1998). Se sabe muy poco de la regulación transcripcional del *CYP46*; únicamente se conoce que el estrés oxidativo puede ser un factor que influye en su transcripción (Martin *et al.*, 2008; Sodero *et al.*, 2011b) por lo que se ha relacionado al CYP46 con neurodegeneración. Por ejemplo, se ha demostrado que en edades avanzadas, la actividad sináptica puede contribuir a la pérdida de colesterol por la activación del CYP46 y que este proceso depende de la generación de estrés en cultivos primarios de hipocampo (Sodero *et al.*, 2011a) Además, ratones que no expresan el CYP46 muestran una reducción en tareas de aprendizaje y de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo, debido a deficiencias en la eliminación del colesterol (Kotti *et al.*, 2006). De manera más directa, existen asociaciones de mutaciones en el gen del *CYP46* y el riesgo de presentar la Enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés, Alzheimer Disease) (Kolsch *et al.*, 2002; Papassotiropoulos *et al.*, 2003; Borroni *et al.*, 2004)

El hecho de que tantos compuestos neuroquímicos puedan ser metabolizados por los CYP, sugiere que cualquier cambio o diferencia en sus niveles puede causar cambios sutiles pero importantes en la homeostasis neuroquímica.

1. 2. 2 Metabolismo de sustratos exógenos (xenobióticos)

El metabolismo de xenobióticos se lleva a cabo principalmente por las familias 1-3 de los CYP, las cuales se encuentran casi en su totalidad en el cerebro (Tabla 1). Algunas isoformas como CYP1A1, CYP2B, CYP2E1 y CYP3A4 se encuentran predominantemente en neuronas, mientras que otras se encuentran en neuronas y células gliales.

Debido a la lipofiliidad de varios xenobióticos, una gran cantidad de éstos puede cruzar la barrera hematoencefálica, pudiendo así ser metabolizados en zonas específicas del cerebro y generar microambientes especiales (Dutheil *et al.*, 2008). Existen varios estudios que demuestran el metabolismo de una gran cantidad de fármacos y toxinas por microsomas obtenidos de cerebro (Tabla 2) (Cohn *et al.*, 1977; Miller *et al.*, 1986; Anandatheerthavarada *et al.*, 1993a; Upadhyia *et al.*, 2001). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en cerebro existen los cofactores adecuados y apropiados *in vivo* para hacerlos funcionales (Khokhar & Tyndale, 2011; 2012), como se explicará más adelante.

La expresión de un CYP específico dentro de un órgano, puede verse incrementada sustancialmente en respuesta a ciertos agentes químicos conocidos como inductores. Muchos inductores de CYP hepáticos tienen efectos similares en cerebro como la inducción del CYP2B por fenobarbital (Kapoor *et al.*, 2007) la inducción del CYP1A1 por la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Huang *et al.*, 2000; Sanchez-Martin *et al.*, 2011) y la inducción del CYP2D6, CYP2B y CYP2E1 por la nicotina (Joshi & Tyndale, 2006a; Yue *et al.*, 2008; Khokhar *et al.*, 2010b). La inducción puede ser órgano-específico, lo cual indica que existe una regulación diferente entre el cerebro y el hígado. Por ejemplo, el CYP2D, que es esencialmente no inducible en hígado, puede inducirse con fármacos como la nicotina y la clozapina (Hedlund *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 2008).

Tabla 2. Ejemplos de sustratos para el sistema nervioso central metabolizados por 3 CYP metabolizadores de fármacos

Enzima	Fármacos que actúan en el SNC	Sustratos endógenos	Drogas de abuso o toxinas
CYP2B6	Bupropion, diazepam, cetamina, metadona, meperidona, nicotina, Fenobarbital, fenciclidina, propofol, setralina, selegilina, tramadol	17-β estradiol, anandamida, ácido araquidónico, serotonina, testosterona	3,4-metilenedioxi-anfetamina (éxtasis), clorpirifós, ciclofosfamida, DEET, Favirenz, ifosfamida, malatión, paraquat, paratión, metadona, nicotina, fenobarbital
CYP2D6	Amilriptilina, brofaromina, clomipramina, codeína, citalopram, clozapina, desipramina, dextrometorfán, etilmorfina, fluoxetina, fluvoxamina, haloperidol, hidrocodon, imipramina, mianserina, mirtazapina, nicergolina, nortriptalina, mianseirna, mirtazapina, nicergolina, nortriptalina, oxicodon, Paroxetina, perfenazina, risperidona, tramadol Trnulcupromina, venlafaxina, zuclopentixol	5-metoxitriptamina, anandamida, progesterona, tiramina	MPTP, paratión, tamoxifén, codeína, metil morfina
CYP2E1	Enflurano, felbamato, halotano, isoflurano, sevoflurano, trimetadiona	17-β estradiol, ácido araquidónico, estrona, prostangladina	Acetaminofén, acetona, anilina, benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo, clozoxazona, etanol, NNK, fenol, teofilina, tricloroetano

SNC=Sistema nervioso central; DEET=N,N-dietil-m-toluamida; MPTP=1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NNK=4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona. Modificado de (Miksys & Tyndale, 2013)

Además de conocerse que los CYP metabolizadores de xenobióticos están presentes y son funcionales en el cerebro, actualmente se tienen ciertas evidencias de las consecuencias resultantes por la alteración en la actividad de los CYP en este tejido:

- Alteración en la eficacia de los fármacos

Las respuestas a la acción de los fármacos en el SNC no siempre están directamente reguladas con los niveles del fármaco o del metabolito en plasma. Una explicación de esta disociación aparente, puede ser el metabolismo local del fármaco. El trabajo pionero más importante respecto a la influencia de los CYP en el cerebro y del metabolismo *in situ*, es el realizado por el grupo de Rachel Tyndale (Khokhar & Tyndale, 2011). En dicho trabajo, el metabolismo *in situ* es el que determina el efecto de somnolencia del fármaco propofol. Los animales en donde se encuentra el CYP2B1 inducido en cerebro, duermen 60% menos que los controles después de la administración de Propofol. Por otro lado, la inhibición del CYP2B1 aumenta el tiempo de somnolencia en los animales. Los efectos de

somnolencia correlacionan directamente con la concentración del fármaco en el cerebro y no en plasma (Khokhar & Tyndale, 2011). El mismo grupo reportó un resultado similar cuando se inhibe al CYP2D y se ve afectado la eficiencia terapéutica de la codeína (Zhou *et al.*, 2013).

- **Farmacodependencia**

Los estudios que relacionan a la farmacodependencia con los CYP en el cerebro se han realizado principalmente desde un enfoque farmacogenético (Ray *et al.*, 2009; Khokhar *et al.*, 2010a). Existen algunos estudios relacionados con la dependencia a la nicotina. Las variaciones genéticas en la enzima CYP2A6, que es la principal responsable del metabolismo de la nicotina en el hígado, afectan varias de las conductas que presentan los fumadores (Tyndale & Sellers, 2001; Bagdas *et al.*, 2014). Además, las variaciones genéticas en el CYP2B6 influyen en la dependencia a la nicotina, esto es, los metabolizadores lentos por CYP2B6 progresan a una dependencia al tabaco más rápidamente y tienen más dificultad en abandonarlo que los metabolizadores normales (Lee *et al.*, 2007). Esta enzima no contribuye al metabolismo hepático de la nicotina o en los niveles de nicotina en plasma, pero está presente en el cerebro donde puede metabolizar la nicotina y otros sustratos endógenos como la serotonina y algunos neuroesteroides.

- **Neurotoxicidad**

La mayoría de los estudios que relacionan los CYP en el cerebro y la neurotoxicidad se enfocan directamente en el metabolismo de neurotoxinas. El citocromo más estudiado en este aspecto es el CYP2D6 debido a su participación en el metabolismo de un gran número de fármacos en el SNC (Tabla 2) y al alto número de polimorfismos que presenta. El CYP2D6 metaboliza e inactiva varios compuestos que causan síntomas parkinsonianos como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el paratión, la *iso*-quinolina y las β -carbolinas (Tabla 2) (Zanger *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009a). Existen evidencias de que individuos con un genotipo de metabolizador lento, están en un mayor riesgo de generar enfermedad del parkinson (PD, por sus siglas en inglés, Parkinson Disease) y éste es aún mayor cuando se exponen a pesticidas neurotóxicos (McCann *et al.*, 1997;

Elbaz *et al.*, 2004). Los niveles del CYP2D6 en el cerebro son menores en los enfermos del PD, lo cual disminuiría su capacidad de metabolismo y desintoxicación (Mann & Tyndale, 2010; Mann *et al.*, 2012). De igual forma, el CYP2D6 es en parte responsable de la formación de metabolitos tóxicos de la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, éxtasis) y además, los efectos del MDMA se ven alterados por polimorfismos de la enzima (Carmo *et al.*, 2006; Perfetti *et al.*, 2009).

Por otro lado, la toxicidad del insecticida clorpirifós depende del metabolismo primario del CYP2B. Un decremento de la actividad del CYP2B en el cerebro disminuye la producción del metabolito y con ello los efectos neurotóxicos (Khokhar & Tyndale, 2012)

Las enfermedades de Alzheimer (AD) y Parkinson (PD) son enfermedades altamente prevalentes que representan un porcentaje alto de las enfermedades neurodegenerativas. La mayoría de los casos de AD y PD ocurren de manera esporádica y generalmente se acepta que ocurren a través de la interacción de factores genéticos y ambientales. Por otro lado, se sabe que en varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de AD, PD, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés, Amiotrophyc lateral sclerosis) ocurre un incremento en el estrés oxidativo asociado a la muerte celular (Li *et al.*, 2013).

Debido a la participación de los CYP en la activación de neurotoxinas y la generación de ROS se han hecho varios estudios de correlación entre los polimorfismos de los CYP metabolizadores de xenobióticos con el riesgo de padecer estas enfermedades. La mayoría de los resultados obtenidos son negativos (McCann *et al.*, 1997; Riedl *et al.*, 1998; Sabbagh *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000; Woo *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002; Scordo *et al.*, 2006; Popat *et al.*, 2011). Sin embargo, existen algunos estudios positivos del CYP2D6 Y CYP2E1 y una mayor incidencia de PD (Atkinson *et al.*, 1999; Bon *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002; Elbaz *et al.*, 2004; Shahabi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010)

El presente trabajo propone que, además de la neurotoxicidad asociada a la activación de neurotoxinas específicas por citocromos, existe también aquella debida a la activación metabólica de fármacos y/o a la generación de ROS, que serán explicadas en el capítulo siguiente.

1.3 Toxicidad asociada a Citocromo P450

1.3.1 Citocromo P450 y activación metabólica de fármacos

La mayoría de los trastornos hepáticos agudos en el humano son causadas por fármacos (Lee, 2003); a éste fenómeno se le llama daño al hígado inducido por fármacos (DILI, por sus siglas en inglés, Drug induced liver injury).

Muchos de los casos de DILI en los Estados Unidos y el Reino Unido son el resultado de transformaciones intrínsecas al fármaco, es decir, que debido a su estructura, puede ser modificado por enzimas de fase I, haciéndolos más tóxicos. La toxicidad de los fármacos puede generarse por varios mecanismos de los cuales los CYP participan en un alto porcentaje, ya sea por interacciones farmacológicas (capítulo 1.3.2) o por activación metabólica del fármaco (Miller & Miller, 1966; Park *et al.*, 1998; Smith & Obach, 2009; Baillie & Rettie, 2011). Los P450s que contribuyen a este proceso son los CYP 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2A13, 2E1, 2C9, 3A4 y 2D6.

Mucho de lo que se conoce del mecanismo por el cual los fármacos y otros xenobióticos se convierten a intermediarios reactivos es gracias a los trabajos de Brodie Mitchell y Gillete con el popular analgésico y antipirético acetaminofén (AAP) (Mitchell *et al.*, 1973) (Capítulo 1.4.3.3). A grandes rasgos, el AAP es metabolizado a una iminquinona muy reactiva que disminuye considerablemente los niveles de glutatión (GSH), llevando así al daño y muerte celular (Capítulo 1.4.3.3). El entendimiento de lo importante del metabolismo del acetaminofén para su toxicidad, ha sido de gran importancia en el campo de la farmacotoxicología, ya que la estructura *p*-aminofenol que contiene el AAP está embebida en muchos otros agentes terapéuticos como el diclofenaco (Tang, 2003), la nefazodona (Kalgutkar *et al.*, 2005b), la trazodona (Kalgutkar *et al.*, 2005a), la tacrina (Madden *et al.*, 1995), la amodiaquina (Jewell *et al.*, 1995) y el lapatinib (Teng *et al.*, 2010), de los cuales también se ha encontrado aductos con GSH *in-vitro* e *in vivo*. De hecho, ahora se aprecia que una gran variedad de compuestos con anillos de benceno sustituidos con heteroátomos, pueden someterse a activación metabólica (normalmente catalizada por los CYP) para generar productos “quinoides” electrofílicos (quinonas, iminquinonas, metil-quinona, etc.) que pueden unirse de manera covalente a macromoléculas celulares y en algunos casos, progresar a toxicidad hepática (Figura 2). Estas relaciones

metabolismo-estructura han resultado en el desarrollo de “estructuras alerta” o “toxicóforos”, es decir, una lista de grupos funcionales que pueden metabolizarse y generar moléculas reactivas potencialmente tóxicas.

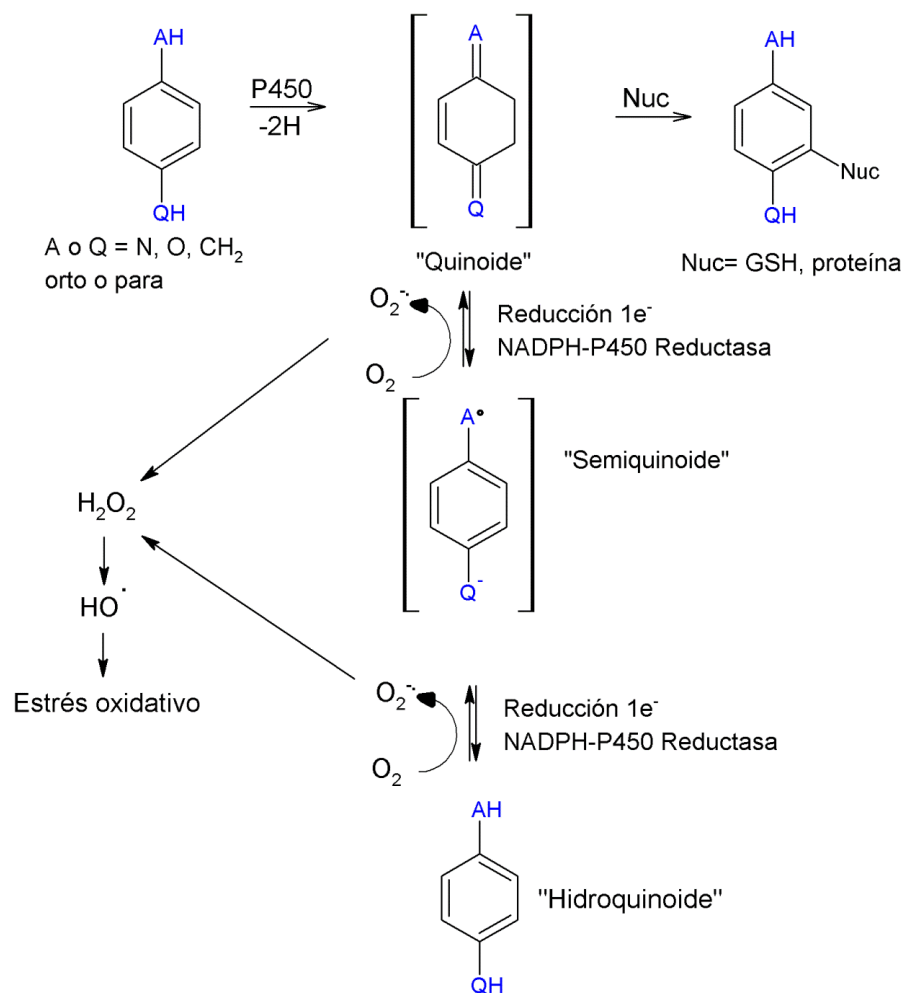


Figura 2. Formación de metabolitos reactivos a partir de moléculas “toxicóforas”. La activación metabólica de un heteroátomo sustituido en benceno, deriva a un intermediario “quinoide” reactivo que puede modificar covalentemente a proteínas y/o causar estrés oxidativo. Modificado de (Baillie & Rettie, 2011)

Los metabolitos reactivos pueden unirse de manera irreversible y modificar muchos componentes celulares como enzimas, proteínas mitocondriales, RNA, DNA y lípidos (Figura 3). El mecanismo por el cual pueden causar daño hepático varía; por ejemplo, los metabolitos pueden unirse a proteínas hepáticas y formar aductos, los cuales resultan en una respuesta inmune (Zhou *et al.*, 2005). Pueden también inhibir directamente mecanismos hepatocelulares funcionales, como la bomba de flujo de sales biliares (BSEP), que puede resultar en daño hepático (Funk *et al.*, 2001). Además, los metabolitos

reactivos pueden disminuir por completo los niveles de glutatión que pueden resultar en estrés oxidativo y muerte, como ocurre con el acetaminofén (Capítulo 1.4.3.3).

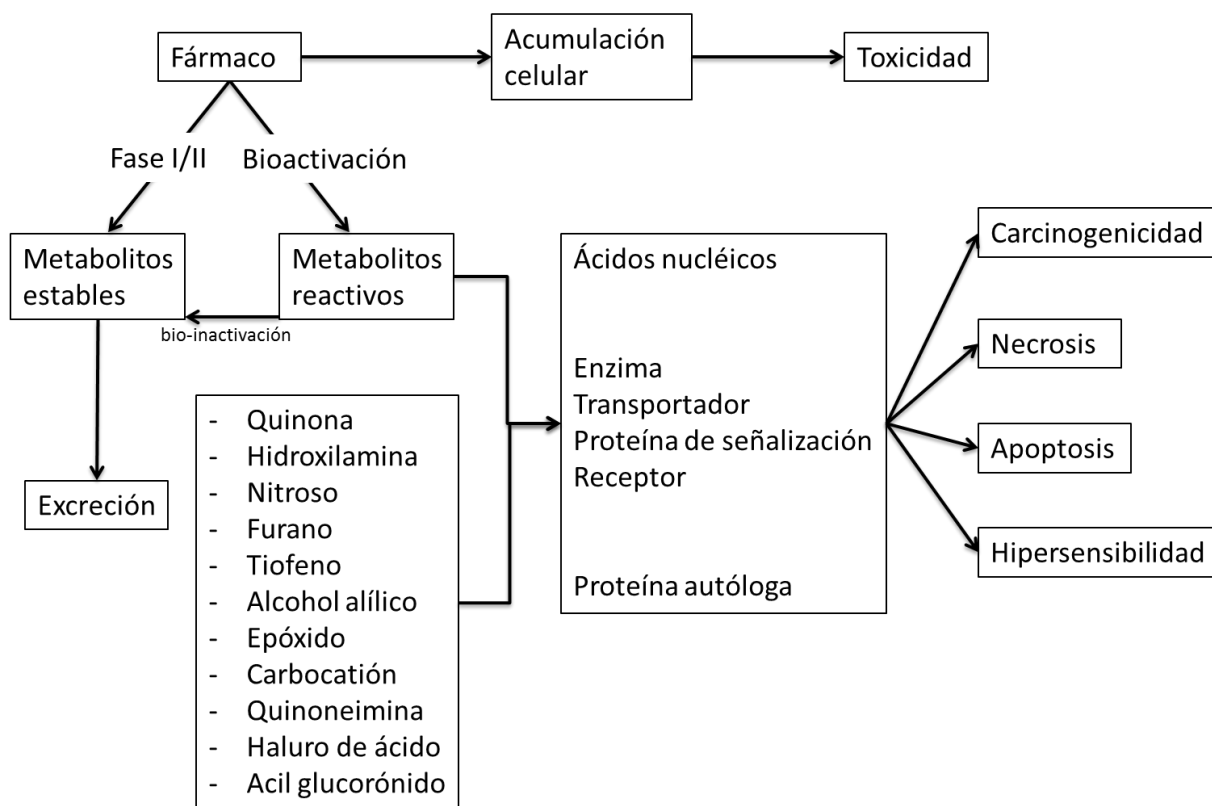


Figura 3 Relación entre metabolismo de fármacos y toxicidad. La toxicidad de fármacos puede ocurrir ya sea por la acumulación del fármaco o por la activación metabólica a través de la formación de metabolitos reactivos, los cuales, si no son destoxificados, pueden modificar covalentemente macromoléculas biológicas. La identidad de la macromolécula y la consecuencia funcional de su modificación, determinará la respuesta toxicológica. Modificado de (Srivastava *et al.*, 2010)

Cuando los intermediarios reactivos, aun los que tienen una vida media corta, son capaces de unirse covalentemente al DNA pueden provocar mutaciones, rompimiento de cadena, y derivar en cáncer. De los compuestos carcinógenos (que provocan cáncer), un 66% es activado por los CYP, especialmente por las familias 1 a 3 (1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2E1 y 3A4). Ejemplos de éstos carcinógenos químicos son: hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos nitropolicíclicos (derivados de la combustión incompleta de hidrocarburos); aminas heterocíclicas (de carnes carbonizadas); aminas aromáticas (de pigmentos, plaguicidas, humo del tabaco y farmacéuticos) y nitrosaminas (del humo del tabaco y de alimentos a partir de nitritos y nitratos). Para una lista de los carcinógenos activados por los CYP se sugiere consultar (Rendic & Guengerich, 2012).

1.3.2 CYP e interacciones farmacológicas

Las interacciones farmacológicas o fármaco-fármaco (DDI, por sus siglas en inglés, Drug-Drug Interactions) se refieren a la modificación del efecto de un fármaco por la acción de otro fármaco cuando se administran conjuntamente y uno de ellos aumenta o disminuye la acción del otro. Las interacciones farmacológicas son una de las causas más comunes de las reacciones adversas de fármacos y estas manifestaciones son más frecuentes en las personas de tercera edad debido a las poli-terapias a los que son sometidos (Johnell & Klarin, 2007; Gallelli *et al.*, 2010)

Los CYP participan en las interacciones farmacéuticas de tipo farmacocinéticas en el proceso de metabolismo. Muchas DDIs están relacionadas con la inhibición o inducción de los CYP (Figura 4).

Los DDIs basados en la inhibición constituyen la mayor proporción de las DDIs relevantes desde el punto de vista clínico (Palleria *et al.*, 2013). En este proceso, la actividad de la enzima es reducida debido a una interacción directa con el fármaco, usualmente comienza con la primera dosis del inhibidor mientras que la extinción de la inhibición es relacionada con la vida media de los fármacos (Murray, 1997). La inhibición metabólica puede ser reversible o irreversible y los efectos clínicos son influenciados por los mecanismos de inhibición.

La inhibición competitiva ocurre cuando el inhibidor y el sustrato compiten por el mismo sitio de unión en la enzima, este tipo de interacción es directa y rápidamente reversible. La interacción depende de la constante de unión del sustrato contra el inhibidor y la concentración del fármaco.

La inhibición irreversible ocurre cuando el metabolito que resulta de la oxidación del sustrato se une de manera covalente a la enzima. El inhibidor reducirá el metabolismo del sustrato e incrementará el efecto o la toxicidad del sustrato. Si el fármaco es un pro-fármaco, el efecto se verá reducido (Murray, 1997).

Las interacciones farmacológicas que involucran una inducción enzimática no son tan comunes como las interacciones basadas en inhibición, sin embargo, son importantes en la clínica. La exposición a contaminantes ambientales así como varios fármacos pueden resultar en la inducción de los CYP. El mecanismo más común es la activación

transcripcional que resulta en un incremento en la síntesis de más proteína. El efecto de la inducción resulta en una oxidación más rápida del fármaco y así su eliminación o activación (Figura 4) (Grange *et al.*, 1994; Backman *et al.*, 1996; Rambeck *et al.*, 1996; Cropp & Bussey, 1997). Estas reacciones de inducción de la enzima, también ocurren por fumar y por grandes periodos de consumo de fármacos o de alcohol como se mostrará en el capítulo 1.4.3

Concentraciones plasmáticas e intervalo terapéutico

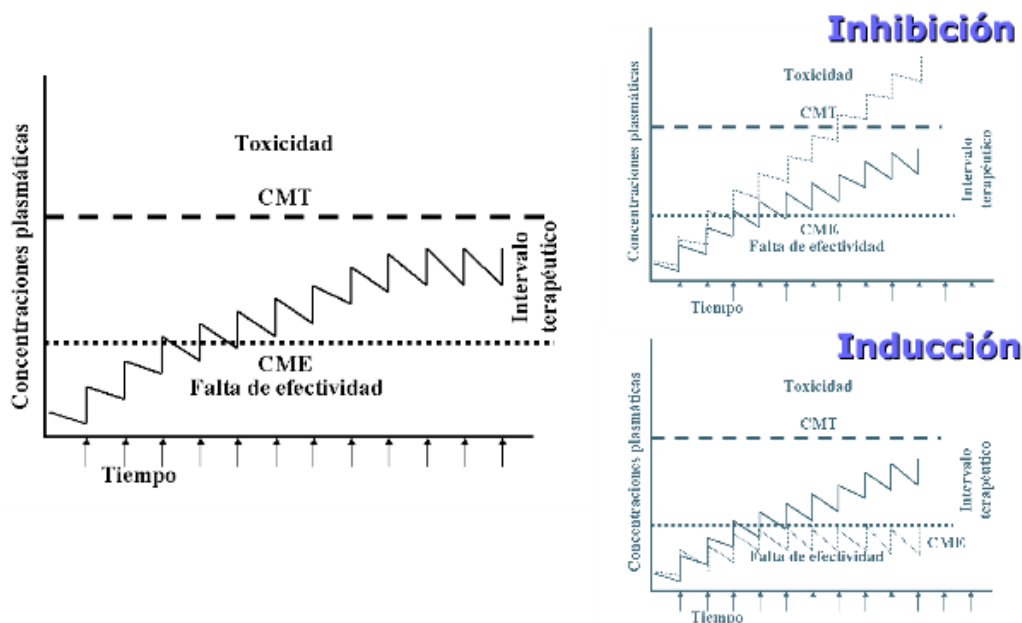


Figura 4. Alteraciones en las concentraciones plasmáticas de fármacos por interacciones farmacéuticas. Tomado de (Lourdes, 2010). Concentración plasmática del fármaco después de diferentes tiempos de tratamiento. **CMT**, Concentración mínima tóxica; **CME**, Concentración mínima efectiva del fármaco. **Izquierda**, condición sin DDI donde las concentraciones del fármaco permanecen en el intervalo terapéutico. **Derecha arriba**, el caso de DDI de inhibición donde las concentraciones del fármaco superan la CMT. **Derecha abajo**, el caso de DDI de inducción donde las concentraciones del fármaco se encuentran por debajo del CME.

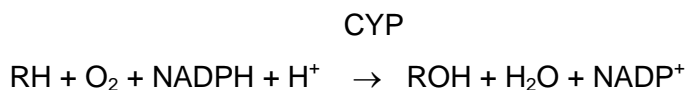
1.3.3 Citocromo P450 como generador de especies reactivas de oxígeno

Las ROS son pequeñas moléculas derivadas del oxígeno altamente inestables. Ejemplo de ellas son el ion superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, los peróxidos orgánicos, y el peroxinitrito. Cuando ocurre un desequilibrio donde las especies oxidantes están en mayor proporción que las antioxidantes se conoce como estrés oxidativo y a éste se le ha relacionado con diversos padecimientos como envejecimiento (Martin & Grotewiel, 2006), insuficiencia cardiaca (Tsutsui *et al.*, 2008), enfermedades hepáticas (Webb & Twedt, 2008) artritis reumatoide (Hitchon & El-Gabalawy, 2004), enfermedades degenerativas del ojo (Njie-Mbye *et al.*, 2013), carcinogénesis (Toyokuni, 2008) y enfermedades neurodegenerativas (Reynolds *et al.*, 2007), entre otros.

Algunas isoformas de los CYP son capaces de producir ROS. La cantidad de ROS o el tipo de sustratos “activados” que se generen dependerá de la naturaleza de cada isoforma y de la especificidad del sustrato. La generación de ROS se lleva a cabo durante el ciclo catalítico del CYP.

Ciclo catalítico del CYP

El esquema de reacción de los Citocromo p450 se puede resumir de la siguiente forma:



Sin embargo, las reacciones no están limitadas a una hidroxilación del carbono. Las reacciones típicas del P450 incluyen hidroxilación, dealquilación, epoxidación, oxigenación y dealquilación de heteroátomo, migración de grupos, oxidación de olefinas y acetilenos e inactivación del grupo hemo.

Los CYP metabolizan sustratos obedeciendo al tamaño, a la hidrofobicidad y a los residuos característicos de cada sitio catalítico del CYP en cuestión.

El hierro del grupo hemo se encuentra en su estado basal sexta-coordinado con una molécula de agua (Figura 5) (a), y con un estado de oxidación 3+, teniendo solamente

un electrón desapareado, es decir con un espín de $\frac{1}{2}$; a esto se le conoce como bajo espín. El primer paso de la catálisis consiste en el desplazamiento de esta molécula de agua por el sustrato. El sustrato por lo general se acomoda en el dominio lipofílico del sitio catalítico, incrementando la hidrofobicidad y desalojando a la molécula de agua, con lo cual cambia el espín del Fe formando la estructura pentacoordinada (b); a éste se le llama de alto espín, ya que los 5 electrones del último orbital se encuentran desapareados (espín = $5/2$).

El segundo paso consiste en la reducción del complejo a un estado ferroso $2+$ por un electrón (c). La procedencia de este electrón dependerá del tipo de célula o de la localización del citocromo dentro de ella. En eucariontes, el electrón proviene de la oxidación de una molécula de NADPH por la enzima citocromo P450 Reductasa.

El tercer paso radica en la unión del oxígeno molecular al citocromo en estado $2+$ formando un complejo superóxido (d), el cual es inestable y se puede recomponer en hierro férrico y un anión superóxido.

A partir del cuarto paso no se tienen estructuras caracterizadas, sin embargo, se sabe que debe ocurrir una segunda reducción produciendo especies de oxígeno activadas. El origen de este segundo electrón depende también en la localización del citocromo.

En el quinto y sexto paso se adicionan dos protones al oxígeno, que cuando hay catálisis, propicia el rompimiento del enlace oxígeno-oxígeno y se libera agua. De este paso surge la especie representada como FeO^{3+} (f). Este complejo de alta valencia también puede ser escrito como $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$, pero la configuración electrónica exacta es desconocida.

El séptimo paso, el que supone esencialmente la conversión del sustrato al producto es desconocido. Existen varios mecanismos propuestos, pero lo trascendental es que este especie FeO^{3+} debe “extraer” un protón del sustrato y realizar la reacción la cual puede ser una hidroxilación, una dealquilación, una deshidratación, deshidrogenación, isomerización, dimerización, unión carbono-carbono y otras.

Finalmente el producto es liberado y la enzima regresa a su estado basal en el octavo paso (Ortiz de Montellano, 2005) (Figura 5).

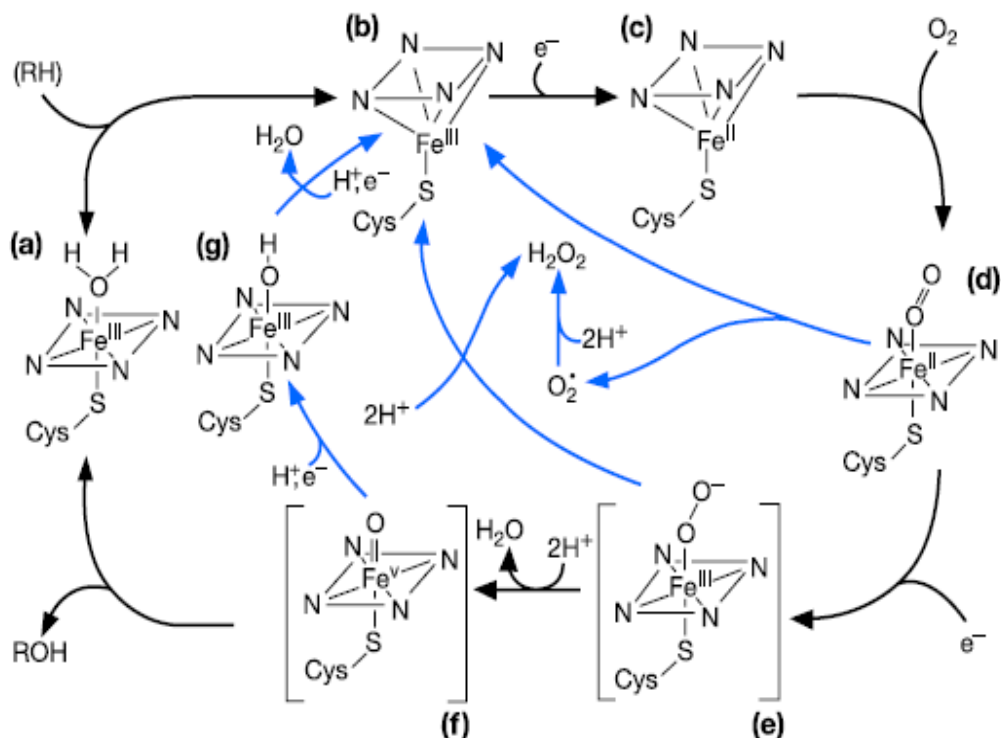


Figura 5 Ciclo catalítico teórico del citocromo P450 Ciclo catalítico de citocromo P450 con sus ramificaciones. Las flechas azules indican los puntos de desvío donde ocurre la “fuga” de productos. Tomado de (Zangar *et al.*, 2004).

Desde las primeras evidencias de la existencia de los CYP, a estos se les ha asociado con la producción de ROS (Thurman *et al.*, 1972), como el ión superóxido (Kuthan *et al.*, 1978). Estos productos alternos surgen debido al “desacoplamiento” del ciclo principalmente en 3 desviaciones o ramificaciones (Loida & Sligar, 1993) (Figura 5, flechas azules).

La primera desviación es la producción del radical ión superóxido gracias al decaimiento de un electrón en el complejo terciario “ferro-superóxido” (Fe-O₂) (d). El segundo punto de desvío es debido a la protonación del oxígeno proximal del complejo “ferro-hidroperóxido” (Fe-H₂O₂) (e) formando así peróxido de hidrógeno. El tercer punto de desvío requiere la adición de 2 electrones más a la especie FeIV (f) para formar una molécula de agua. Los CYP presentan un continuo consumo de NADPH y producción de

ROS aún en la ausencia de sustratos. El que la reacción siga por sus diferentes ramificaciones dependerá de varios factores como del tipo de isoforma, el pase de electrones o protones, la posición y naturaleza del sustrato, el pH, la concentración de oxígeno, la fuerza iónica, y otros (Zhukov & Archakov, 1982; Gorsky *et al.*, 1984; Blanck *et al.*, 1991).

En eucariontes, la eficiencia del transporte de electrones desde el NADPH a través de los acarreadores de electrones al CYP para la monoxigenación del sustrato es baja, comparada con los sistemas de monoxigenasas procariontes. La mayoría de la especies CYP son poco eficientes en cuanto al grado de acoplamiento o eficiencia de reducción del NADPH, aunque varía según el CYP (Gorsky *et al.*, 1984). Aún en la ausencia de cualquier sustrato, la cadena transportadora de electrones microsomal, continúa oxidando NADPH y produciendo ROS. Tomando en cuenta el gran contenido de enzimas microsomales, se puede inferir que éstas pueden ser una fuente importante de ROS en algunos tejidos (Zangar *et al.*, 2004). De los CYP, el CYP2E1 es de los más importantes en cuanto a la generación de ROS, como se explicará en el capítulo 1.4.1

1.4 Citocromo P450 2E1

El CYP2E1 es el único gen de la subfamilia 2E, está localizado en el cromosoma 10 q26.3. A la fecha, ortólogos del CYP2E1 sólo se han demostrado de manera concluyente en especies de mamíferos (Ioannides, 1996). En humanos se ha reportado una alta variabilidad interindividual (Ohtsuki *et al.*, 2012) y diferencias genéticas consistentes con la expresión de la enzima según la etnia, principalmente entre europeos y japoneses (Kim *et al.*, 1996). El CYP2E1 se expresa de manera basal en hígado y se ha encontrado expresión extrahepática en cerebro, mucosa nasal, corteza renal, testículos, ovarios, tracto gastrointestinal y tejido cardíaco (Lieber, 1997; Ronis *et al.*, 1998; Cannady *et al.*, 2003; Joshi & Tyndale, 2006b; Thelen & Dressman, 2009; Michaud *et al.*, 2010; Shayakhmetova *et al.*, 2013)

Su expresión es indetectable en el hígado del feto pero después de varias horas postparto, la actividad y la proteína es considerablemente alta aunque los niveles de RNAm son bajos (Vieira *et al.*, 1996). Los activadores transcripcionales HNF1 α y β -catenina participan en la regulación fisiológica del CYP2E1 (Gonzalez, 2007). De hecho,

el HNF1 α participa en la variación circádica del CYP2E1 en la cual el mensajero del CYP aumenta en la fase tardía de la fase luminosa para disminuir en la fase oscura y la proteína incrementa en la fase oscura (Khemawoot *et al.*, 2007; Matsunaga *et al.*, 2008).

El CYP2E1 se encuentra sobrepresado en la diabetes y el ayuno; este fenómeno se ha explicado por la participación de los cuerpos cetónicos en la inducción de la enzima (Song *et al.*, 1989) y por la inhibición del CYP2E1 RNAm por la insulina. La regulación del CYP2E1 por la insulina es a través de mecanismos tanto transcripcionales como traduccionales que involucran la señalización por PI3-K y mTOR. La ausencia o niveles bajos de insulina elevan el RNAm del CYP2E1 en cultivos primarios de hepatocitos (Woodcroft *et al.*, 2002; Mohri *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2013)

El CYP2E1 puede metabolizar un gran número de sustratos tanto endógenos como exógenos (Tabla 3). El CYP2E1 metaboliza compuestos endógenos como ácidos grasos, incluyendo lípidos asociados a mecanismos de señalización como el ácido araquidónico (AA). Un metabolito importante del ácido araquidónico generado por el CYP2E1 es el ácido 19-hidroxicosatraenoico (19-HETE) (Laethem *et al.*, 1993; Roy *et al.*, 2005) el cual es un potente vasodilatador de los vasos preglomerulares del riñón (Carroll *et al.*, 1996). Por otro lado, el 19-HETE puede inhibir al CYP4, el principal productor de 20-HETE a partir del AA (Schafer *et al.*, 2010). El 20-HETE es un autacoide vascular de cerebro y riñón, además de ser un potente vasoconstrictor (McGiff & Quilley, 1999; Gebremedhin *et al.*, 2000). Además, el CYP2E1 forma epóxidos del AA (14,15-, 11,12- y 8,9-ácidos epoxieicosatrienoicos) y ácido linoleico (9,10- y 12,13-ácidos epoxieicosatrienoicos) (Moran *et al.*, 2000). El papel que juega el CYP2E1 en el metabolismo de estas moléculas puede estar relacionado con su regulación por estados de enfermedad como la obesidad y la diabetes. De hecho, recientemente se han publicado estudios que relacionan la presencia y polimorfismos del CYP2E1 con la hipertensión (Zhang *et al.*, 2005; Cowpland *et al.*, 2006; Polonikov *et al.*, 2013) incluyendo la hipertensión en pacientes diabéticos (Schafer *et al.*, 2010).

Tabla 3. Sustratos metabolizados/activados por CYP2E1.

Alcoholes Aldehídos Cetonas	Compuestos aromáticos	Éteres	Ácidos grasos	Alcanos y alquenos halogenados y no halogenados	Nitrosaminas, azocompuestos	Sustratos reducibles
Acetaldehído Butanol 2-butanona Etanol Glicerol Isopropanol Metanol Propanol Pentanol	Acetaminofén Anilina Benceno Bromobenceno Cafeína Capsaicina Clorzoxazona 3-hidroxipiridina Isoniazida Fenol Piridina p-nitrofenol Pirazol Estireno Tamoxifén Tolueno	Dietil éter Metil t- butil éter	Ácido araquidónico hidroxilación en ω 1 y ω 2 Ácido laurico hidroxilación en ω 1	Acetoacetato Acetol Acetona Acetonitrilo Acrilamida Acrilonitrilo 1,3-butadieno Bromopropano Cloroformo Clorometano Dibromometano Diclorometano 1,1-dicloroetano 1,1- dicloroetileno 1,2- dicloropropano N,N-dimetil acetamida N,N-dimetil formamida Enflurano Etano Etil carbamato 1,2-dicloroetano Halotano Hexano N-metil formamida Pentano Tioacetamida Tricloroetileno Cloruro de vinilo 1-bromo etano	Azoximetano N,N-dietil nitrosamina N,N- dimetil nitrosamina Metil- azoximetanol N-nitroso-2,3- dimetil morfolina N-nitroso pirrolidina	t-butilhidro- peróxido tetracloruro de carbono Cromo [Cr(VI)] Oxígeno

Modificado de (Kessova & Cederbaum, 2003)

Por otro lado, el CYP2E1 puede inducirse por la acetona y metabolizarla (Song *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1994). La acetona puede ser producto de la oxidación de los ácidos grasos y oxidarse a 1,2-propanediol para convertirse en glucosa en la vía del propanediol de la gluconeogénesis (Glew, 2010).

El CYP2E1 es mejor conocido por su habilidad de oxidar compuestos xenobióticos de bajo peso molecular como el etanol, el disulfiram, el halotano, la clorzoxazona y el acetaminofén (Lieber, 1997).

La capacidad de oxidar sustratos de tamaños totalmente opuestos se puede explicar gracias a la estructura de su sitio catalítico. El CYP2E1 exhibe una estructura canónica para todos los CYP (Figura 1A) que consiste en 12 alfa hélices y 4 láminas beta plegadas designadas de A-L y 1-4. El sitio activo o catalítico es pequeño, globular y altamente hidrofóbico (Porubsky *et al.*, 2008) (Figura 6A). El tamaño del sitio activo inmediato (190 Å) es el más pequeño observado de todos los CYP humanos. En la Figura 6 se muestra la comparación del sitio activo del CYP2E1 (Figura 6A) con el sitio activo del CYP3A4, el más grande de los CYP humanos (Fig 6 B). En un sitio adyacente al sitio activo, se encuentra una segunda cavidad adjunta aislada de 77Å. El sitio activo y esta cavidad adyacente se separan únicamente por dos Fenilalaninas (Phe), la 106 y la 298. La Phe298 se rota para poder metabolizar a los ácidos grasos de alto peso molecular (Figura 6C)(Porubsky *et al.*, 2010). Cuando la Phe298 se encuentra virada, el volumen de la cavidad se incrementa a 450 Å lo cual puede contener muy bien a los ácidos grasos.

El CYP2E1 también se distingue de otros CYP por su rápido recambio, ya que *in vivo*, el CYP2E1 constitutivo tiene una vida media corta que va de las 4 a las 7 horas (Zhukov & Ingelman-Sundberg, 1999). El rápido recambio intracelular de la enzima se debe posiblemente en parte a modificaciones covalentes de los radicales que se liberan del CYP2E1 (Capítulo 1.4.1) que alteran a la enzima y ésta se degrada. La corta vida media del CYP2E1 es debida a la desestabilización rápida de la enzima durante su ciclo catalítico, ya que una inhibición del flujo de electrones incrementa la vida media del CYP2E1 a 26h (Zhukov & Ingelman-Sundberg, 1999). La vida media del CYP2E1 puede incrementar hasta 24 horas en la presencia de inductores como la acetona (Song *et al.*, 1989), 4-metil pirazol, etanol, glicerol y dimetil sulfóxido (DMSO) (Yang & Cederbaum, 1997) (Capítulo 1.4.3). La degradación del CYP2E1 es vía ubiquitinación-complejo proteasomal (Banerjee *et al.*, 2000; Goasduff & Cederbaum, 2000; Bardag-Gorce *et al.*, 2002; Huan *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

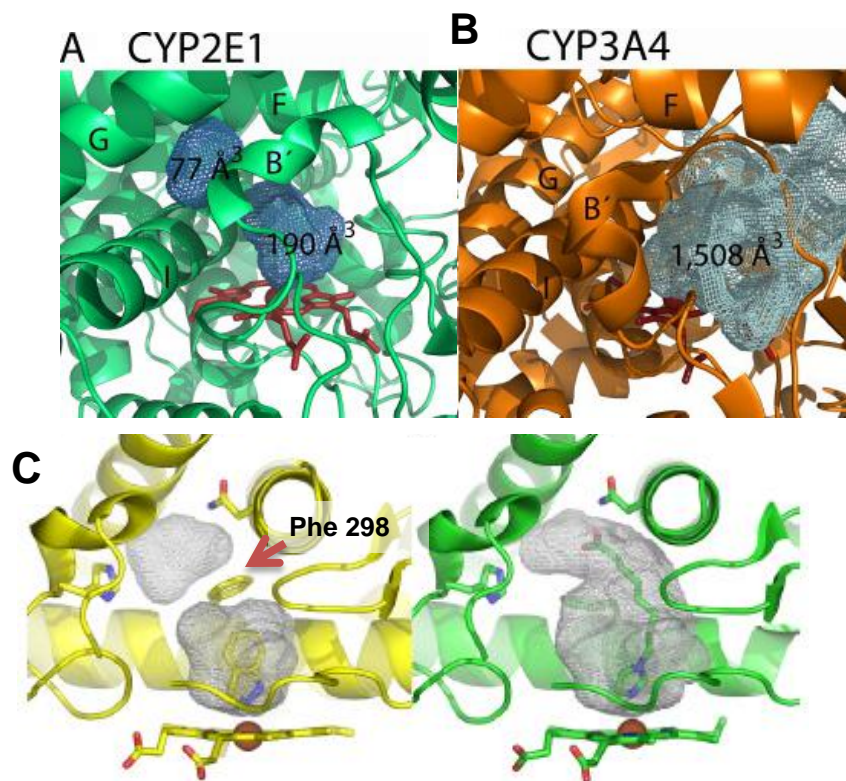


FIGURA 6 Estructura del sitio catalítico del CYP2E1. **A.** Estructura del sitio activo del CYP2E1 por cristalografía y modelado molecular. El espacio se muestra como la malla azul, del lado izquierdo se puede observar la cavidad adyacente. **B.** Sitio catalítico del CYP3A4. **C.** Izquierda, región catalítica cuando el CYP2E1 está unido a un sustrato de bajo peso molecular, derecha, región catalítica cuando el CYP2E1 está unido a un ácido graso. La Phe298 está marcada con una flecha roja. Tomado de (Porubsky *et al.*, 2008; Porubsky *et al.*, 2010).

Además de la preferencia del CYP2E1 por los sustratos de bajo peso molecular como el etanol, la acetona, y otros solventes orgánicos, narcóticos como el halotano y fármacos como la clorzoxazona y el acetaminofén, el CYP2E1 puede metabolizar varias sustancias químicas como contaminantes ocupacionales y ambientales, así como procarcinógenos (Bolt *et al.*, 2003; Trafalis *et al.*, 2010). Debido a la relevancia particular del CYP2E1 en toxicología por la activación metabólica de fármacos y químicos carcinógenos, existe un gran número de estudios farmacogenéticos que exploran la asociación del CYP2E1 con varias patologías, incluyendo vario tipos de cáncer. Por ejemplo, algunos polimorfismos del CYP2E1 se han asociado con susceptibilidades alteradas a cirrosis hepáticas inducidas por etanol y con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de esófago (Trafalis *et al.*, 2010), cáncer de pulmón (Wang *et al.*, 2010b) y cáncer

relacionado a alcohol (Druesne-Pecollo *et al.*, 2009). En los capítulos siguientes se explicarán más a detalle los mecanismos de la toxicidad asociada a CYP2E1.

1.4.1 CYP2E1 como generador de ROS

El CYP2E1 produce ROS de forma más abundante que las demás isoformas (Gorsky *et al.*, 1984). El CYP2E1 exhibe una mayor actividad oxidativa. Un aumento en la actividad oxidativa da por resultado una mayor producción de O_2^- , H_2O_2 y OH° que puede manifestarse en un incremento de la lipoperoxidación dependiente de NADPH (Morgan *et al.*, 1982). La lipoperoxidación puede ser inhibida al utilizar anticuerpos específicos para CYP2E1 (Ekstrom & Ingelman-Sundberg, 1989).

El oxígeno molecular por sí solo parece ser el sustrato más importante del CYP2E1 debido a que, a diferencia de las demás isoformas, el CYP2E1 contiene una elevada proporción de la hemoproteína en el estado de alto espín aún en la ausencia de sustrato (Koop *et al.*, 1982; Guengerich & Johnson, 1997; Porubsky *et al.*, 2008) (Figura 5), es decir, aunque existe el CYP2E1 con el grupo hemo sextacoordinado con agua, muchas otras isoformas existen sin agua con el hierro en una forma pentacoordinada. Esta coordinación facilita la continua entrada del NADPH al ciclo catalítico y la oxidación del oxígeno molecular disponible. Este estado en reposo de alto espín en las cuales en otros CYP se ha mostrado que incrementa su estado redox puede facilitar la generación de los ERO (Das *et al.*, 2007). De igual manera, se ha propuesto que durante el desacoplamiento del ciclo de los CYP, el sustrato puede migrar fuera del hemo, liberando al oxígeno activado y permitiendo así que el oxígeno reaccione de distintas formas (Porter, 2002). Las conexiones transitorias entre el sitio activo y los otros compartimentos en la proteína del CYP2E1 (figura 6 C) pueden facilitar el movimiento del sustrato hacia afuera del grupo hemo ya activado y liberar ROS

Cederbaum y cols. (1998), desarrollaron una línea celular de hepatocitos que sobreexpresa de manera estable el CYP2E1 (Chen & Cederbaum, 1998). Estas células presentan una mayor concentración de ROS, mayor lipoperoxidación (Dai *et al.*, 1993) y una concentración mayor de glutatión (Mari & Cederbaum, 2000) con respecto a los controles, así como una regulación positiva de enzimas antioxidantes como la catalasa, la hemo-oxigenasa y la glutatión transferasa (Cederbaum, 2006). Cuando las células son

sometidas a un reto oxidante como lo puede ser el etanol (Wu & Cederbaum, 1996; 1999; 2013), butionin sulfoximina (BSO) para disminuir los niveles de glutatión (Wu & Cederbaum, 2001a), ácido araquidónico (Chen *et al.*, 1998), hierro (Sakurai & Cederbaum, 1998; Caro & Cederbaum, 2001) o cisplatino (Lu & Cederbaum, 2007), se desencadenan procesos de muerte de tipo apoptótico y necrótico. La figura 7 resume las investigaciones realizadas por Cederbaum y colaboradores durante casi 20 años. Cuando la respuesta antioxidante promovida por factores como el factor nuclear eritroide-2 (Nfr-2), el factor nuclear κ B (Nf κ B) o la proteína activadora-1 (AP-1) se ve rebasada, la célula es sensible a la oxidación de sus componentes (Cederbaum *et al.*, 2001; Wu & Cederbaum, 2005). La mitocondria parece ser el organelo que primeramente se daña por los oxidantes liberados del CYP2E1 (Bai & Cederbaum, 2001; Mari *et al.*, 2002; Bai & Cederbaum, 2006). Una disminución en el potencial de membrana mitocondrial puede liberar factores proapoptóticos como el citocromo c o el factor inductor de apoptosis (AIF) (Wu & Cederbaum, 2002). Algunos productos de la oxidación por CYP2E1 pueden difundir fuera de los hepatocitos y entrar a otras células hepáticas como las estrelladas y estimularlas para producir colágeno y así una respuesta fibrótica (Nieto *et al.*, 2002a; b; Nieto *et al.*, 2003).

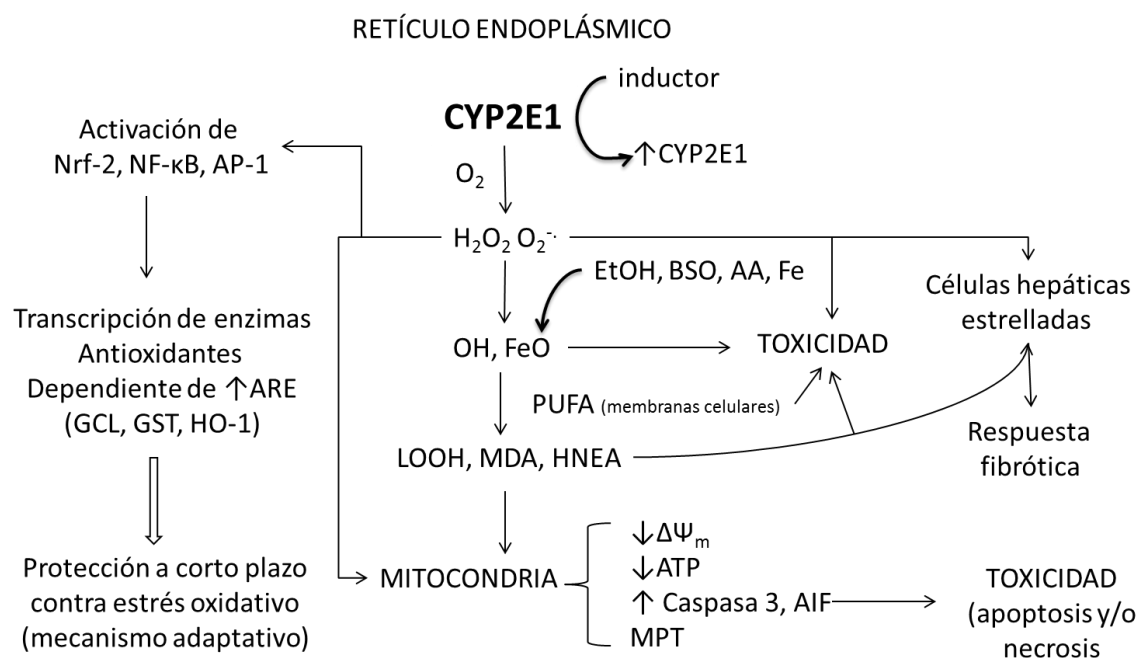


Figura 7 Esquema propuesto por Cederbaum y colaboradores de generación de estrés oxidante y citotoxicidad dependiente de CYP2E1. La inducción del CYP2E1 genera ROS las cuales pueden dañar las membranas celulares y mitocondriales ocasionando muerte celular. AIF, factor inductor de apoptosis; AP-1, proteína activadora 1; ARE, elemento de respuesta antioxidante; ATP, adenosina trifosfato; $\Delta\Psi_m$, potencial de

membrana; GCL, glutamato cisteín ligasa; GST, glutatión-S-transferasa; HNE, 4-hidroxinonenal; HO-1, hemo oxigenasa-1; LOOH, Hidroperóxido lípido; MDA, malondialdehído; MPT, transición de permeabilidad de la membrana; NF-κB, factor nuclear-κB; Nrf2, Factor de transcripción Nrf2; PUFA, ácidos grasos poli-insaturados. Modificado de (Lu & Cederbaum, 2008)

1.4.2 CYP2E1 como activador de sustratos

El CYP2E1 está implicado en la hepatotoxicidad de un gran número de fármacos (Tabla 4). En este trabajo se explicará a profundidad los casos de isoniazida y acetaminofén (Capítulos 1.4.3.1 y 1.4.3.3). De igual forma, el CYP2E1 es uno de los principales CYP que participan en la formación de metabolitos tóxicos a partir de químicos industriales o contaminantes ambientales, muchos de éstos potentes carcinógenos como la tioacetamida, (Ramaiah *et al.*, 2001; Chilakapati *et al.*, 2007), el etanol (Wang *et al.*, 2009b; Millonig *et al.*, 2011) (capítulo 1.4.3.2), la acrilamida (Ghanayem *et al.*, 2005; Ghanayem & Hoffler, 2007), el uretano (Hoffler *et al.*, 2003; Hoffler *et al.*, 2005), el 1-bromoropano (Garner *et al.*, 2007) y la dimetilnitrosamina NDMA (Garro *et al.*, 1981; Zaluzny *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1999; Dey *et al.*, 2002; Arinc *et al.*, 2007).

Tabla 4. Fármacos que promueven daño hepatotóxico por la acción del CYP2E1

Fármaco	Uso clínico	Referencias
Geldanamicina	Anti-tumoral	(Dey <i>et al.</i> , 2006)
Acetaminofén	Analgésico, antipirético	(Dai & Cederbaum, 1995; Lee <i>et al.</i> , 1996; Bae <i>et al.</i> , 2001; Bai & Cederbaum, 2004; Chen <i>et al.</i> , 2008; Chen <i>et al.</i> , 2009; Abdelmegeed <i>et al.</i> , 2010; Knockaert <i>et al.</i> , 2011)
Cisplatino	Anti-canceroso	(Lu & Cederbaum, 2007)
Salicilato de sodio	Anti-inflamatorio	(Wu & Cederbaum, 2001b)
Clorzoxazona	Relajante muscular	(Liederman & Boldus, 1967; Powers <i>et al.</i> , 1986; Peter <i>et al.</i> , 1990)
Ciprofibrato	Anti-hiper lipídémico	(Zangar <i>et al.</i> , 1995)
Clofibrato	Agente reductor de lípidos	(Carpenter <i>et al.</i> , 1996; Cummings <i>et al.</i> , 2001; Raucy <i>et al.</i> , 2004)
Isoniazida	Anti-tuberculoso	(Park <i>et al.</i> , 1993)
Sevoflurano	Anestésico	(Hase <i>et al.</i> , 2000)
Fenobarbital	Anti-convulsionante	(Lee <i>et al.</i> , 2006a)
Fenelzina	Anti-depresivo y ansiolítico	(Runge-Morris <i>et al.</i> , 1996)
Hidrazina	Precursores de fármacos	(Cummings <i>et al.</i> , 2001; Lash <i>et al.</i> , 2007)
Piridina		

Modificado de (Srivastava *et al.*, 2010)

Los ejemplos más claros, estudiados e importantes de la activación metabólica por CYP2E1 ocurre con tetracloruro de carbono, etanol, halotano, acetaminofén, N-nitrosodimetilamina, hexano, 1,3-butadieno, acrilonitrilo, acrilamida y uretano (Tanaka *et al.*, 2000; Bolt *et al.*, 2003; Manibusan *et al.*, 2007; Guengerich, 2008). De hecho, algunos compuestos que son metabolizados por el CYP2E1 se utilizan actualmente como modelos en la investigación científica de hepatotoxicidad (como el tetracloruro de carbono y acetaminofén) y carcinogénesis (azoximetano y N-nitrosodimetil amina). El mecanismo general es el que previamente ya se ha explicado. El CYP2E1 metaboliza al tóxico, convirtiéndolo en una especie altamente reactiva la cual será la responsable del daño (Rechnagel & Glende, 1973; Weddle *et al.*, 1976; Bechtold *et al.*, 1982; Rechnagel *et al.*, 1989; Letteron *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1998; Plaa, 2000; Jaeschke *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003).

Diversos estudios han encontrado relación entre los polimorfismos de CYP2E1 que incrementan su actividad con la susceptibilidad al cáncer esofágico, nasofaríngeo, pulmonar, renal, gástrico, colo-rectal, y hepático en algunos grupos étnicos (Danko & Chaschin, 2005; Trafalis *et al.*, 2010)

Los primeros estudios de activación de carcinógenos se realizaron en el laboratorio del investigador Dr. Charles Lieber. En estos experimentos, Lieber encontró que el tratamiento previo con etanol, incrementa considerablemente la activación de varios procarcinógenos como NDMA, benzo[a]pireno (BP) y pirolizatos de tabaco por microsomas hepáticos e intestinales (Seitz *et al.*, 1978; Lieber, 1979; Garro *et al.*, 1981; Seitz *et al.*, 1981). Este efecto es debido en parte por la capacidad del etanol para inducir al CYP2E1.

. 1.4.3 Inducción de CYP2E1 por xenobióticos

La regulación de la expresión del CYP2E1 es quizá la más compleja de los CYP ya que involucra transcripción de genes, incremento en la traducción del mRNA, eventos epigenéticos y estabilización del mRNA y de la proteína. En el caso de la exposición a xenobióticos, se ha encontrado que la inducción se lleva a cabo principalmente por los dos últimos mecanismos post-transcripcionales (Novak & Woodcroft, 2000). La regulación a este nivel es relativamente rara en los CYP. Los niveles de la proteína y la actividad del

CYP2E1 se elevan de 2 a 8 veces en células hepáticas como respuesta a la exposición a diferentes xenobióticos como el etanol, la piridina, el pirazol y la isoniazida, sin que se aumenten los niveles de su mRNA (Ryan *et al.*, 1985; Palakodety *et al.*, 1988; Kim & Novak, 1990). La unión del inductor al sitio activo es la causa de la estabilización, ya que existe una correlación entre la concentración del inductor necesaria para la estabilización de la proteína y la afinidad de unión entre el CYP2E1 y el agente inductor (Eliasson *et al.*, 1988). La unión de un ligando al sitio activo, mantiene a la enzima en una conformación estable que impide su degradación. Como la síntesis (transcripción) no se ve alterada, la estabilización permite la acumulación de la enzima que, en comparación con los controles, se manifiesta como una inducción (French *et al.*, 2001) (Figura 8). El sitio de unión a ubiquitina está en el sitio de unión al sustrato por lo que mientras que el sustrato esté unido al CYP2E1, el CYP no puede ser degradado por el proteosoma (Banerjee *et al.*, 2000).

Por otro lado, hay reportes de un incremento en los niveles de mRNA después de la exposición a etanol (Ronis *et al.*, 1993), pirazol (Kubota *et al.*, 1988), acetona (Kraner *et al.*, 1993) y piridina. En el caso de los tres últimos, el fenómeno se ha explicado como un mecanismo involucrado con la traducción. Por ejemplo, una exposición a piridina aumenta los niveles de la proteína de CYP2E1 aún en presencia de inhibidores de la transcripción, y no así en presencia de inhibidores de la traducción (Kim & Novak, 1990; Kocarek *et al.*, 2000). En el caso de etanol, se ha propuesto que la regulación es a nivel transcripcional; sin embargo, no se ha encontrado ningún elemento del mecanismo; lo único que se sabe es que el CYP2E1 *de novo* tiene un recambio 4 veces mayor que el CYP2E1 constitutivo (Goasduff & Cederbaum, 2000).

En contraste, los niveles del mRNA basales del CYP2E1 no se correlacionan en lo absoluto con la proteína, por lo que se ha sugerido que existe una importante regulación vía la represión traduccional del microRNA miR-378 (Mohri *et al.*, 2010).

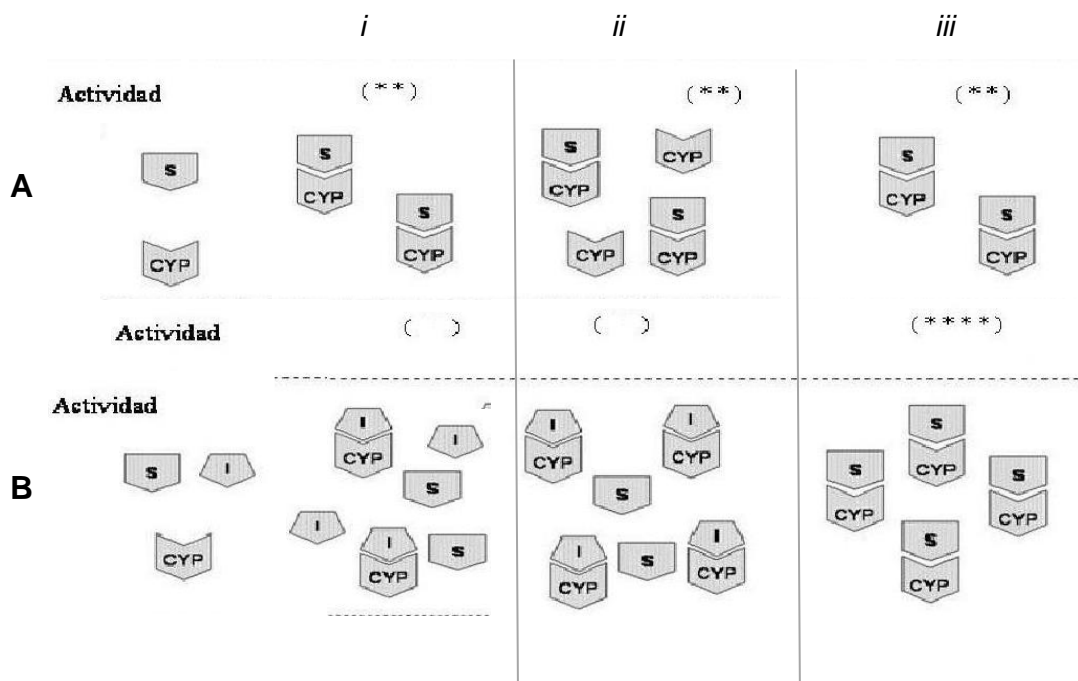


Figura 8 Inducción del CYP2E1 por estabilización de la proteína. Interacciones del Citocromo P450 (CYP), Sustrato (S) e Inductor/Inhibidor (I) que generan la inducción vía estabilización de la proteína. Los asteriscos representan la actividad de los CYP. A) Sistema en ausencia de I (condiciones basales). El rápido recambio de la enzima permite que los CYP se degraden manteniendo siempre una concentración basal. B) Sistema en presencia de I (con tratamiento). i) Comparación de la actividad de CYP en ausencia de I (A) o en presencia de I (B), en el caso de la presencia de I no se ve reflejada ninguna actividad por lo que se comporta como un inhibidor ii) La presencia de I permite que las enzimas que se sintetizan no se degraden de forma natural como en A. iii) Comparación de los niveles de actividad después de un lavado de I (B) o en ausencia de I (A). En el caso de la presencia de un I la actividad aumenta, es decir, actúa como un inductor.

1.4.3.1 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por isoniazida

La isoniazida (INH) o azida del ácido isonicotínico, es el fármaco utilizado como primera opción en el tratamiento y la profilaxis de la tuberculosis, tanto en México (NOM-006-SSA2-1993) como en el resto del mundo (*International Standards of Tuberculosis Care (ISTC)*). La INH en la micobacteria es un pro-fármaco, ya que el producto de la bioactivación en la micobacteria forma un aducto con una proteína involucrada en la síntesis de los ácidos micólicos de la pared celular de la micobacteria (inhA)(Rozwarski *et al.*, 1998; Rawat *et al.*, 2003). (Figura 9A, magenta)

En humanos, su metabolismo hepático consiste en su acetilación por la *N*-acetil transferasa produciendo acetil-isoniazida para posteriormente ser hidrolizado y liberar ácido nicotínico y acetilhidrazina. La acetil hidrazina puede transformarse en hidrazina,

que a su vez se elimina como amoníaco y el ácido nicotínico puede conjugarse con glucurónidos o glicerol para su eliminación (Figura 9B).

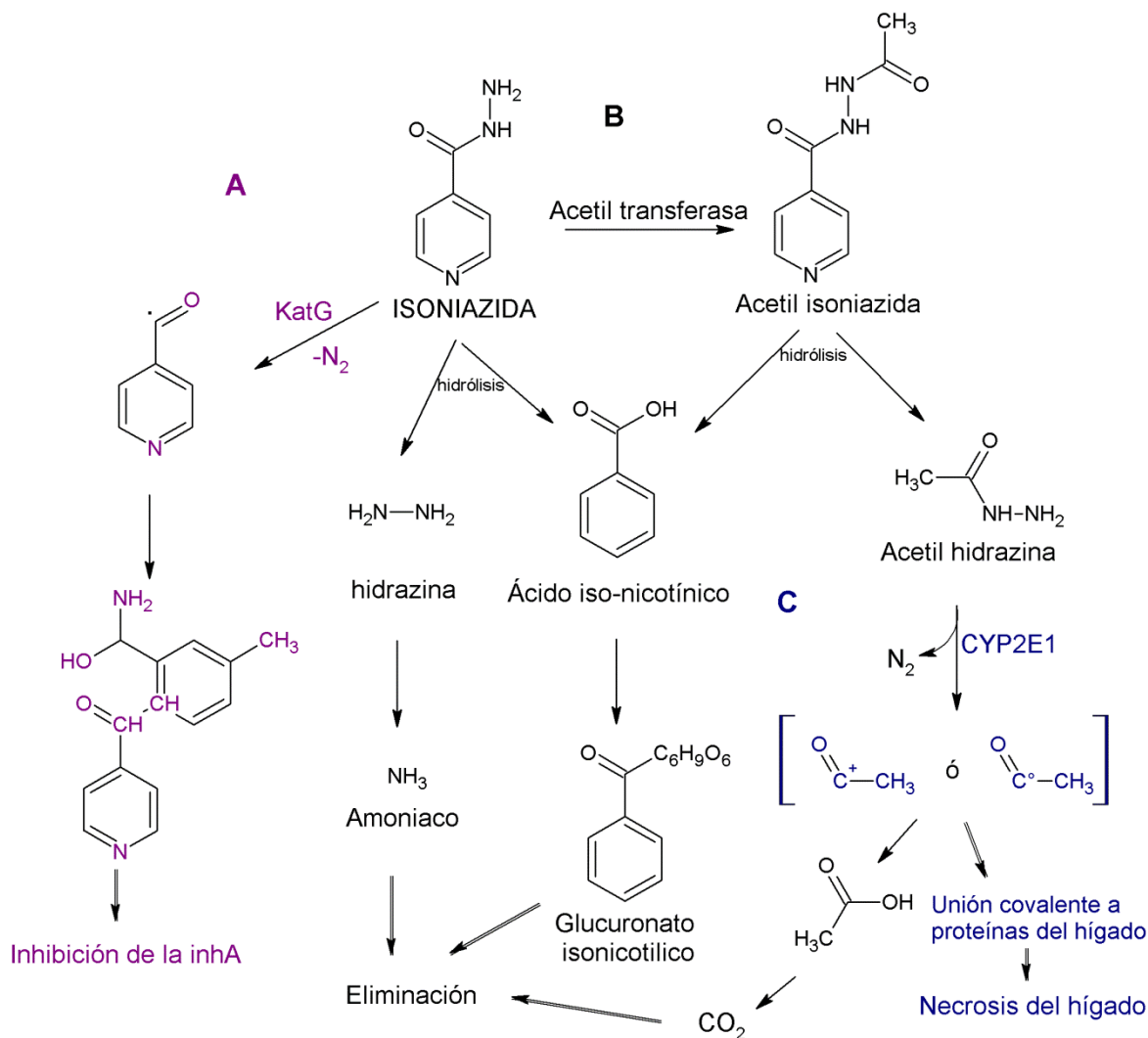


Figura 9. Metabolismo de la isoniazida. **A.** Metabolismo que se lleva a cabo en *m. tuberculosis*, KatG, peroxidasa de la micobacteria, InhA, enzima que participa en la síntesis de los ácidos micólicos. **B.** Metabolismo de la INH en hígado de humanos. **C.** Vía de hepatotoxicidad por el metabolismo de CYP2E1. Modificado de (Preziosi, 2007; Srivastava *et al.*, 2010)

Desde el principio a este fármaco lo han acompañado efectos adversos, entre ellos, la interacción con otros fármacos, la hepatotoxicidad y la neuropatía periférica.

La interacción con otros fármacos está relacionada con la capacidad de la INH de inducir su metabolismo vía la inducción del CYP2E1 (Mazze *et al.*, 1982; Ryan *et al.*,

1985; Ryan *et al.*, 1986). El mecanismo de la inducción de CYP2E1 por INH es vía la estabilización de la proteína (Zand *et al.*, 1993) o vía aumento en la eficiencia de la traducción (Park *et al.*, 1993). Mientras la isoniazida esté presente en el organismo, ésta se coordinará con la enzima en su sitio catalítico e inhibirá su actividad (Capítulo 1.3.2). Por otro lado, esta coordinación, estabilizará la enzima impidiendo su degradación y permitiendo su acumulación. Cuando los niveles de INH sanguíneo disminuyen, se libera el sitio catalítico de la enzima y permite que algún sustrato sea metabolizado en todas las enzimas “estabilizadas”. (Epstein *et al.*, 1991; Zand *et al.*, 1993; Chien *et al.*, 1997; O’Shea *et al.*, 1997) (Figura 9).

La hepatotoxicidad de la INH se manifiesta varias semanas después del tratamiento en aproximadamente 1% de los pacientes. La mortalidad es mayor del 10% en pacientes con ictericia (Black *et al.*, 1975; Mitchell *et al.*, 1976) (Zimmerman & Ishak, 1995). Varios estudios en rata (Kattner *et al.*, 1981) y conejo (Sarich *et al.*, 1995; Sarich *et al.*, 1996), así como estudios *in vitro* (Noda *et al.*, 1982), han descrito que la INH es primeramente acetilada a *N*-acetil isoniazida (Figura 9B) la cual es hidrolizada a acetil hidrazina (Timbrell, 1979; Lauterburg *et al.*, 1985; Preziosi, 2007), que será bioactivada por el CYP2E1 al radical acetilo (Figura 9C, azul) (Nelson *et al.*, 1976; Albano *et al.*, 1995; Sarich *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2006b). Los metabolitos bioactivos de INH generados por los CYP, en particular por el CYP2E1, han sido implicados en la hepatotoxicidad inducida por isoniazida en humanos (Huang *et al.*, 2003), ratas (Yue *et al.*, 2004), conejos (Sarich *et al.*, 1999) y líneas celulares de hepatocarcinoma HepG2 (Wu & Cederbaum, 1996). El riesgo de inducir hepatotoxicidad por INH incrementa con la edad y el abuso del alcohol y es mayor cuando la INH se co-administra con otros fármacos, como la rifampicina que induce a los CYP (Yue *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2008; Yue *et al.*, 2009).

No se conoce el mecanismo exacto de cómo el intermediario reactivo induce daño al hepatocito, aunque se ha descrito que existe estrés oxidativo (Sodhi *et al.*, 1997), daño mitocondrial (Chowdhury *et al.*, 2006) y que los metabolitos reactivos y la INH pueden unirse covalentemente a proteínas e inducir una respuesta inmune, especialmente autoinmunidad (Warrington *et al.*, 1978; Warrington *et al.*, 1982; Metushi *et al.*, 2011; Metushi & Uetrecht, 2013; Metushi *et al.*, 2014). La respuesta clínica es muy heterogénea lo cual es típico de las reacciones idiosincráticas mediadas por el sistema inmune (Uetrecht, 2009). No obstante, el metabolismo de la INH por el CYP2E1 está implicado en

la hepatotoxicidad, incluso, recientemente se ha logrado correlacionar polimorfismos del CYP2E1 con la susceptibilidad al daño hepatotóxico por INH (Shen *et al.*, 2006b; Vuilleumier *et al.*, 2006; Huang, 2007; Roy *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010a; Bose *et al.*, 2011; An *et al.*, 2012).

1.4.3.2 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por etanol

El consumo excesivo de alcohol o alcoholismo es un problema mundial que causa morbilidad y mortalidad en poblaciones de varias edades, regiones y etnias (Mokdad *et al.*, 2004; Ginter & Simko, 2009; Brust, 2010). Las enfermedades que derivan del consumo de alcohol incluyen hepatitis alcohólica, la hepatopatía alcohólica o enfermedad alcohólica del hígado (ALD), la cirrosis y los carcinoma hepatocelulares (Orman *et al.*, 2013), así como la promoción de enfermedades como la diabetes y desórdenes neuropsiquiátricos (Brust, 2010). México es uno de los países que presenta mayor mortalidad debido a enfermedades hepáticas en el mundo según la organización mundial para la salud (Organization, 2011). De hecho, las enfermedades relacionadas al hígado constituyen el quinto caso de mortalidad en México (INEGI, 2014). La Secretaría de Salud reporta un promedio de 33 310 disfunciones hepáticas en el 2012, de las cuales 12 540 son por enfermedad alcohólica del hígado (INEGI, 2014).

Debido a que el alcohol (etanol) es altamente soluble en agua, una vez ingerido es rápidamente absorbido por todas las partes del tracto gastrointestinal por difusión simple hacia la sangre y es rápidamente distribuido a todo el cuerpo. La mayoría del metabolismo del etanol ocurre en el hígado. Las enzimas que contribuyen al metabolismo del etanol son las alcohol deshidrogenasas, la catalasa y el CYP2E1 que convierten al etanol al acetaldehído y después las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) convierten al acetaldehído a acetato. La principal enzima encargada de la oxidación del etanol a acetaldehído en hígado es la alcohol deshidrogenasa (ADH), mientras que el CYP2E1 juega un papel importante en concentraciones elevadas y consumo crónico (Caro & Cederbaum, 2004) (Figura 12).

La administración crónica de etanol en ratas induce al CYP2E1 hepático y extrahepático de manera transcripcional y post-traducciona (Tsutsumi *et al.*, 1993;

Roberts *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1995; Yano *et al.*, 2001; Bardag-Gorce *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2012).

Debido a que el CYP2E1 se ve incrementado considerablemente después de la exposición al etanol y que se cuenta con muchas evidencias de que la toxicidad por etanol en hígado se debe a un daño oxidante (Wu *et al.*, 2006), al CYP2E1 y la generación de especies reactivas se ha asociado como un factor clave en la hepatotoxicidad del etanol (Lu & Cederbaum, 2008) (Figura 8). De igual manera, disminuyendo los niveles del CYP2E1 con inhibidores como el dialil sulfuro, fenetil isotiocianato, clormetiazol y un anticuerpo contra CYP2E1 se puede reducir el daño por etanol (Ekstrom & Ingelman-Sundberg, 1989; Morimoto *et al.*, 1993; Morimoto *et al.*, 1995a; Morimoto *et al.*, 1995b; Gouillon *et al.*, 2000). Además, un trabajo previo mostró que un ratón transgénico que sobreexpresa el CYP2E1 presenta mayores niveles de transaminasas y daños histológicos del hígado cuando son tratadas con etanol, en comparación con un ratón control (Morgan *et al.*, 2002). En ratones deficientes (knockout, KO) de la enzima hay una disminución significativa de daño hepático después de la ingestión crónica de etanol (Lu & Cederbaum, 2008) y una protección ante la oxidación de proteínas y del DNA (Bardag-Gorce *et al.*, 2000; Bradford *et al.*, 2005).

Una gran cantidad de estudios evidencian el papel de CYP2E1 en la hepatotoxicidad del etanol (Cederbaum, 1991), en la patogénesis de las enfermedades alcohol hepáticas (ALD) y en la esteatohepatitis no alcohólica (Leung & Nieto, 2013).

Además, el consumo crónico del etanol se ha reconocido como el mayor factor de riesgo de cáncer hepático y esofágico probablemente debido a los efectos genotóxicos y carcinogénicos del acetaldehído, el estrés oxidante y a la inducción del CYP2E1 que activa a carcinógenos ambientales (Wang *et al.*, 2009b; Chavez *et al.*, 2011; Millonig *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2012). Recientemente se presentó un trabajo donde el tratamiento crónico de 70 semanas con etanol en ratas deriva en carcinoma sin usar ningún otro tipo de carcinógeno (Tsuchishima *et al.*, 2013). El trabajo demuestra que una inducción del CYP2E1 y una subsecuente producción de ROS juegan un rol significativo en la patogénesis de carcinoma hepatocelular durante la ingesta crónica de alcohol.

Finalmente, en estudios farmacogenéticos se ha demostrado una asociación entre el consumo de alcohol y la susceptibilidad a desarrollar ALD y cirrosis alcohólica en individuos con el polimorfismo del CYP2E1 que permite metabolizar el etanol a una tasa mayor (Pirmohamed *et al.*, 1995; Grove *et al.*, 1998; Iwahashi *et al.*, 1998). Varios de los acarreadores de este polimorfismo pertenecen a las poblaciones mestizas del oeste de México (García-Banuelos *et al.*, 2012).

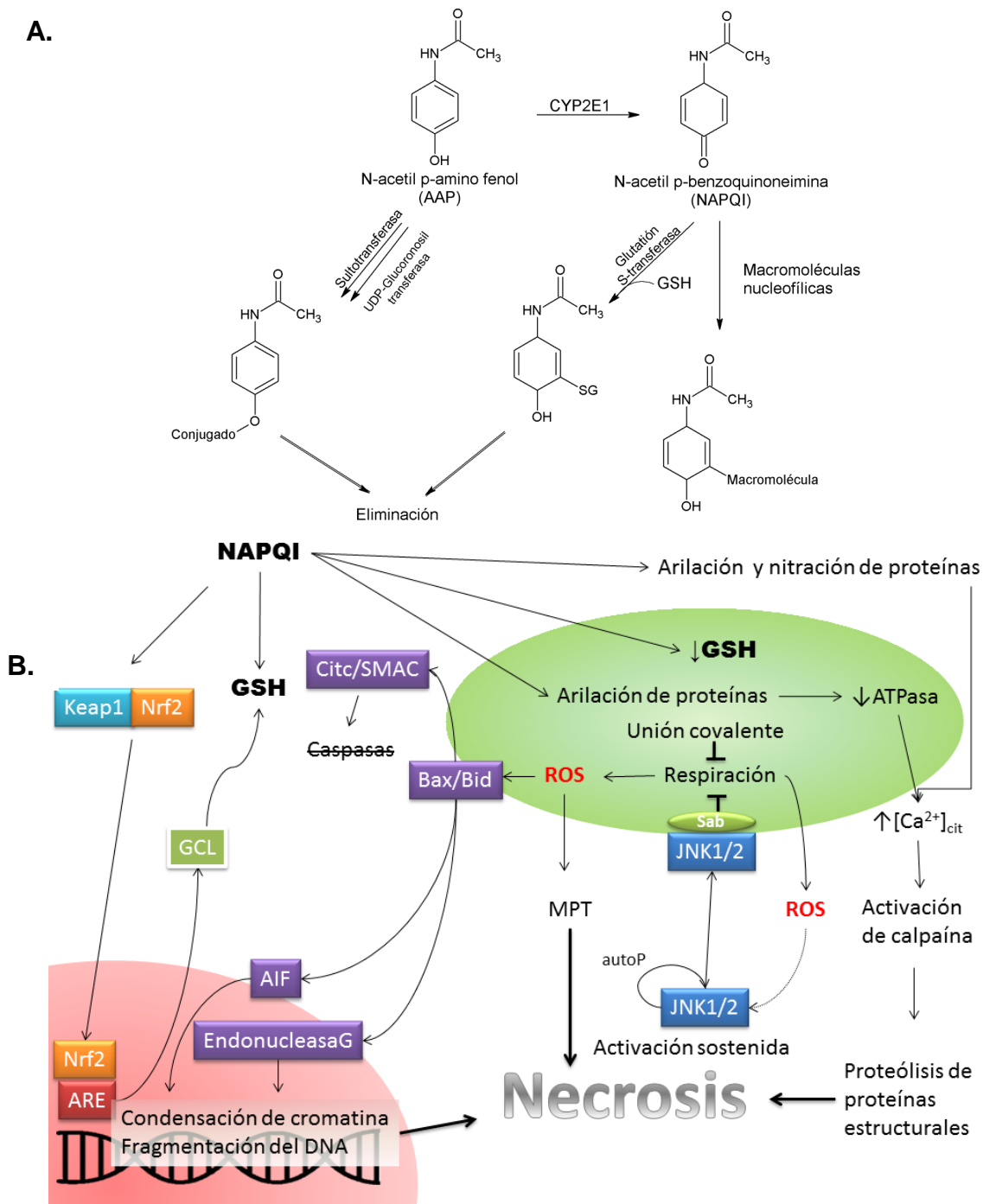
1.4.3.3 Inducción y citotoxicidad de CYP2E1 por acetaminofén

El acetaminofén (AAP) o paracetamol, es uno de los analgésicos y antipiréticos más populares usado en todo el mundo. El acetaminofén es un fármaco relativamente seguro, sin embargo, tiene un índice terapéutico ajustado, es decir, el máximo de la dosis normal es cercano a la sobredosis (4 gramos al día en adultos). La sobredosis del AAP es una causa común de hepatotoxicidad inducida por fármacos y actualmente es la principal causa de daño agudo en hígado por fármacos de los Estados Unidos y Gran Bretaña (Ostapowicz *et al.*, 2002; Lee, 2004). En México, los efectos no son tan pronunciados, el acetaminofén es el segundo xenobiótico involucrado en el proceso de intoxicación (Florencia Fernández-Barocio, 2013) y en algunos casos es mayor la intoxicación por ácido acetil salicílico (Olguin *et al.*, 2011).

La toxicidad aguda de hígado inducida por AAP es un modelo importante de daño inducido por fármacos (DILI) (Capítulo 1.3.1). El acetaminofén es principalmente metabolizado por las vías de glucuronidación y sulfatación; sin embargo, una pequeña proporción del fármaco es metabolizado por CYP3A4, CYP2E1, y CYP1A2 a su metabolito reactivo *N*-acetil-*p*-benzoquinoneimina (NAPQI) (Figura 10A). El CYP2E1 juega un papel principal en la activación del AAP a NAPQI (McClain *et al.*, 1980; Morgan *et al.*, 1983; Raucy *et al.*, 1989). Por ejemplo, ratones KO de CYP2E1 son notablemente más resistentes a una dosis letal del AAP (Lee *et al.*, 1996; Zaher *et al.*, 1998). Además, el CYP2E1 puede inducirse por acetaminofén, aunque se desconoce el mecanismo de la inducción (Kim *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2010).

El NAPQI tiene una gran afinidad por los grupos tiol o sulfhidrilo, por lo que reacciona directamente con el glutatión (GSH) de manera espontánea o catalizado por la glutatión *S*-transferasa para formar un aducto, el cual es rápidamente detoxificado a través de la bilis

(Chen *et al.*, 2003). La sobredosis aguda o acumulativa de acetaminofén, da como resultado el agotamiento del GSH celular y la acumulación del NAPQI. Debido a su gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas celulares y mitocondriales (Jollow *et al.*, 1973), el NAPQI se une de manera covalente a las proteínas. Este evento es el iniciador, el cual se amplifica y propaga, resultando en muerte celular (Jaeschke *et al.*, 2003). El mecanismo se puede resumir en dos fases (figura 10B): 1) la fase iniciadora, que incluye la activación metabólica del AAP, la unión covalente del metabolito a las proteínas y la alquilación de las proteínas de la mitocondria; y 2) la fase amplificadora, donde la disfunción mitocondrial debido a los enlaces covalentes, genera la producción de ROS los cuales activan varias proteínas quinasas activadas por mitógeno o MAP cinasas que convergen en la fosforilación de la cinasa terminal c-Jun N-terminal (P-JNK) la cual se trasloca a la mitocondria y se une a la proteína que se une al dominio SH3 (Sab) amplificando el estrés oxidante (Hinson *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Hanawa *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2010; Jaeschke *et al.*, 2012). El estrés oxidante resulta la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT) vía la translocación de proteínas de la familia Bcl-2 (Bax y Bad) (Bajt *et al.*, 2008) liberando así proteínas del espacio intermembranal como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. Las últimas dos translocan al núcleo e inician la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA respectivamente (Jaeschke *et al.*, 2012). Por otro lado, se disminuye la capacidad de sintetizar ATP (Tirmenstein & Nelson, 1990) y se promueve la desorganización de la homeostasis de calcio, el cual también activa las proteasas intracelulares como las calpaínas (Limaye *et al.*, 2003) (Figura 10B). Así, múltiples eventos que incluyen disfunción masiva de la mitocondria, disminución del ATP, fragmentación masiva del DNA y modificación de las proteínas intracelulares, contribuyen al desarrollo de la muerte. La muerte inducida por AAP se ha descrito como de tipo necrótica ya que ocurre hinchamiento celular y no existe activación de caspasas, sin embargo, la muerte se sobrelapa en algunas características apoptóticas tales como la translocación del bax mitocondrial, la liberación del citocromo c y la fragmentación del DNA (Gujral *et al.*, 2002). Recientemente se ha propuesto que participan proteínas importantes de los procesos de necrosis programada o necroptosis (Ramachandran *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014)



1.5 Citocromo P450 2E1 en cerebro

Varios estudios se han realizado para detectar la presencia de CYP2E1 en el cerebro de varios organismos. La tabla 5 resume las investigaciones realizadas desde 1990 donde se detecta al CYP2E1 en el cerebro *in vivo*. La enzima se encuentra distribuida heterogéneamente en los diferentes tipos de células cerebrales, encontrándose en mayor proporción en las neuronas (Kapoor *et al.*, 2006). El bulbo olfatorio exhibe la mayor expresión y actividad catalítica del CYP2E1 en ratas control seguido del cerebelo y el hipocampo (Yadav *et al.*, 2006). En el cerebro humano, los niveles de CYP2E1 se encuentran mayoritariamente en las neuronas piramidales de la corteza frontal, en las neuronas piramidales del hipocampo, en las células granulares del giro dentado y en las células Purkinje del cerebelo (Howard *et al.*, 2003b). El CYP2E1 se puede encontrar en varios compartimento como la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la mitocondria (Bhagwat *et al.*, 1995; Montoliu *et al.*, 1995; Seliskar & Rozman, 2007)

A la fecha, no se conoce la función endógena del CYP2E1 en el cerebro. Sin embargo, se conoce que durante el desarrollo, la enzima presenta diferentes patrones de expresión en tejido nervioso (Boutelet-Bochan *et al.*, 1997; Brzezinski *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha descrito que se encuentra altamente expresada en neuronas de la sustancia negra que expresan también la tirosina hidroxilasa (Watts *et al.*, 1998), por lo que se ha propuesto que el CYP2E1 puede participar en el metabolismo de la dopamina (Nissbrandt *et al.*, 2001; Shahabi *et al.*, 2008).

Se ha logrado inducir al CYP2E1 en el cerebro con etanol, la estreptozotocina, el pirazol, la acetona, la nicotina y el aspartame. Además, se ha medido su actividad mediante diferentes técnicas y en diferentes tejidos y detectar la proteína por inmunoensayos (Ver Tabla 7). La inducción puede ser exclusiva para tejido cerebral en el caso de la nicotina (Anandatheerthavarada *et al.*, 1993a), el fenobarbital (Lee *et al.*, 2006b) y el aspartame (Vences-Mejia *et al.*, 2006). Además, la inducción del CYP2E1 puede variar según la región del cerebro. Por ejemplo, en el caso del etanol, se puede observar un incremento considerable de la expresión del mRNA y la actividad de la enzima en el cerebelo e hipocampo, y un pequeño incremento en el bulbo olfatorio o ningún cambio en otras regiones (Yadav *et al.*, 2006). El mecanismo de inducción de la enzima en cerebro es aparentemente por eventos postranscripcionales. Por ejemplo, en el

caso de la nicotina se demostró que, transcurrido un tiempo después de la exposición a ella, los valores de CYP2E1 regresan a sus niveles normales y no se encuentran altos niveles de mRNA (Joshi & Tyndale, 2006a).

Tabla 5. Evidencias sobre la presencia e inducción del CYP2E1 en cerebro de diferentes organismos.

Organismo	Localización Antes / Después de inducir	Inducción con...	Técnica utilizada	Referencia
Rata	BO VS CZ T CB SN MB BS Cerebro completo GB BS	Sin inducir	IHQ WB PCR SB NB NDMA CZN	(Hansson <i>et al.</i> , 1990; Hodgson <i>et al.</i> , 1993; Yoo <i>et al.</i> , 1997; Tirumalai <i>et al.</i> , 1998; Wu <i>et al.</i> , 2011)
	/ GB CB SN H / BO / H / CZ H / BO CF H CB VTA	Etanol	IHQ PNP NDMA WB CZN NB FISH RT-PCR	(Anandatheerthavarada <i>et al.</i> , 1993a; Sohda <i>et al.</i> , 1993; Montoliu <i>et al.</i> , 1994; Warner & Gustafsson, 1994; Bhagwat <i>et al.</i> , 1995; Tindberg & Ingelman-Sundberg, 1996; Upadhy <i>et al.</i> , 2000; Howard <i>et al.</i> , 2003b; Sanchez-Catalan <i>et al.</i> , 2008; Zhong <i>et al.</i> , 2012)
	/ CZ T CB BS H / BO CZ OB CB BS / CZ H CB	Nicotina	WB NDMA e IHQ NB	(Anandatheerthavarada <i>et al.</i> , 1993b; Howard <i>et al.</i> , 2003b; Joshi & Tyndale, 2006a)
	/ CB	Aspartame	WB PNP	(Vences-Mejia <i>et al.</i> , 2006)
	/ SN	Isoniazida	IHQ	(Watts <i>et al.</i> , 1998)
	MitCC CC	STZ-diab	WB	(Raza <i>et al.</i> , 2004)
	H CB BO Hi / H CB Hi BO	Pirazol	NDMA WB RT-PCR	(Yadav <i>et al.</i> , 2006)
	H CB BO Hi / H CB Hi BO NAc	Acetona	NDMA WB RT-PCR	(Yadav <i>et al.</i> , 2006)
	Cerebro completo	Lindano	NDMA WB RT-PCR	(Johri <i>et al.</i> , 2007)
Ratón	CC GB	Sin inducir	IHQ WB RT-PCR	(Vaglini <i>et al.</i> , 2004)
Primate (mono verde africano)	CC H CZ T BS CB P	Sin inducir	WB IHQ	(Joshi & Tyndale, 2006b)
	/ CZ CB	Nicotina	WB IHQ	(Joshi & Tyndale, 2006b; Ferguson <i>et al.</i> , 2013)
	/ CZ P CB H	Fenobarbital	CZN WB IHQ	(Lee <i>et al.</i> , 2006a)
	CZ P	Etanol	WB	(Ferguson <i>et al.</i> , 2013)
Humano	CZ CB T H MB CZ Cerebro Completo	Sin inducir	His CZN WB NB IHQ PCR PCR- RT FISH	(Farin & Omiecinski, 1993; Bhagwat <i>et al.</i> , 1995; McFayden <i>et al.</i> , 1998; Upadhy <i>et al.</i> , 2000)
	CZ H C MB CB H	Alc/Fum	IHQ	(Howard <i>et al.</i> , 2003b)
	CZ	Pxs con PD	RT-PCR	(Kaut <i>et al.</i> , 2012)
HumPre	Cerebro completo	Gestación	WB CZN RT-PCR NB	(Boutelet-Bochan <i>et al.</i> , 1997; Brzezinski <i>et al.</i> , 1999)

La primera columna indica el tipo de organismo, en la segunda columna se indica el tejido analizado, si la detección fue antes o después de inducir y en el caso de haber inducción, la tercera columna indica el nombre del inductor. HumPre-Humano Prenato, BO-Bulbo olfatorio, VS-Vasos sanguíneos, CZ-Corteza, T-Tálamo, CB-Cerebelo, SN-Sustancia negra, MB-Materia blanca, CC-Cerebro completo, GB-Ganglia basal, H-Hipocampo, BS-Tallo cerebral, NT-Núcleo talámico, Hi-Hipotálamo, P-Putamen, Pir- Pirazol EtOH- Etanol LPS-Lipopolisacárido Px con PD- Pacientes con enfermedad de Parkinson IHQ- Inmunohistoquímica WB-Western blot NDMA- Actividad con n-nitrosodimetilamina PNP- Actividad con p-nitrofenol CZN- Actividad con cloroxazona Alc/Fum -

Alcohólicos fumadores, PCR-reacción en cadena de la DNAPolimerasa RT-PCR Transcriptasa reversa acoplada a PCR NB- “Northernblot”, FISH- Hibridación *in situ*

Adicionalmente a la inducción por xenobióticos, el CYP2E1 en el cerebro es regulado de manera diferencial por condiciones inflamatorias (Abdulla *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2010) la cual sí involucra un incremento en el mRNA en astrocitos (Tindberg *et al.*, 1996).

La mayoría de las investigaciones sobre el CYP2E1 en el cerebro están enfocadas a su interacción con el etanol. El CYP2E1 tiene un papel más importante que la alcohol deshidrogenasa en la oxidación del etanol en el cerebro (aunque no más que la catalasa) (Zimatkin *et al.*, 2006) (Figura 11). Se ha descrito que el acetaldehído es el responsable de los cambios en el comportamiento por la ingesta de etanol. Es por esto que el metabolismo *in situ* del etanol en el cerebro puede participar de alguna manera en el comportamiento generado por la ingesta de etanol. Al manipular al CYP2E1 tanto farmacológica como genéticamente, se pueden tener cambios en el comportamiento asociado al consumo de etanol (Vasiliou *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2009) (Figura 11). En este mismo sentido, se ha descrito la expresión e inducción del CYP2E1 en el sistema mesolímbico (relacionado con comportamientos de reforzamiento) (Sanchez-Catalan *et al.*, 2008). La inducción del CYP2E1 por acetona aumenta la concentración de dopamina en la región “core” del núcleo acumbens (Hipolito *et al.*, 2008).

Finalmente, se ha logrado asociar un polimorfismo del CYP2E1 con la dependencia al alcohol y la nicotina (Howard *et al.*, 2003a).

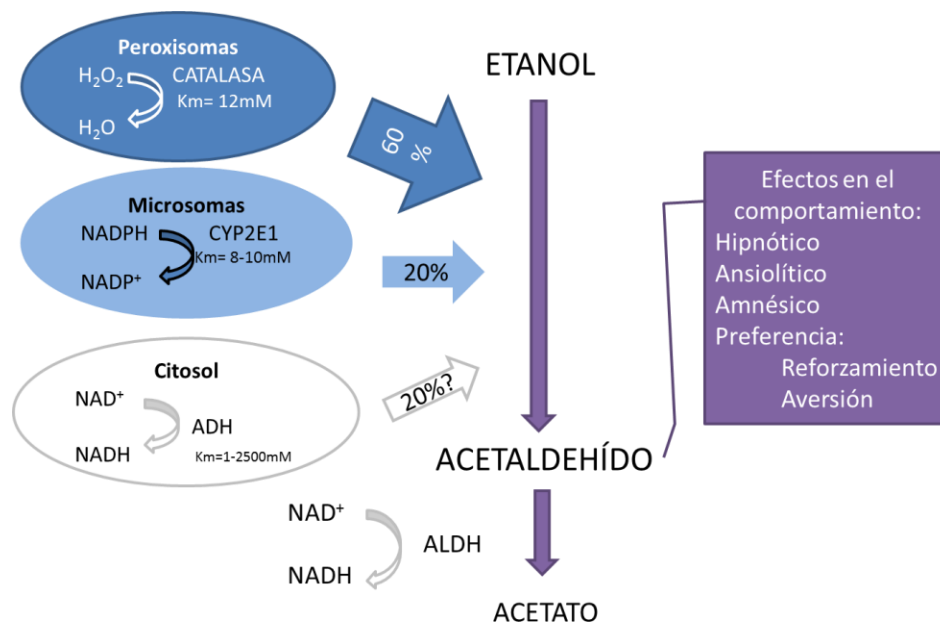


Figura 11. **Metabolismo del etanol en el SNC.** En las flechas de lado izquierdo se muestra la contribución de cada enzima en la oxidación total del etanol en el SNC. ADH, Alcohol deshidrogenasa; ALDH, acetaldehído deshidrogenasa. Modificado de (Heit *et al.*, 2013)

II. ANTECEDENTES

En estudios previos en el laboratorio, se demostró que el tratamiento con 200mg/Kg de INH por 5 días en rata incrementa la proteína y actividad del CYP2E1 en hígado (Figura 12). En cerebro, se analizó el bulbo olfatorio (BO), el hipocampo (HIP), el tallo cerebral (BS), la corteza (CX) y el cerebelo (CBO). En todas las regiones analizadas el CYP2E1 se encuentra activo de manera basal. En el caso del BO, la actividad basal es mucho mayor que en todas las regiones. El tratamiento con INH únicamente incrementa la actividad en CBO (Figura 12). La inducción del CYP2E1 no se ve acompañada de un incremento en la lipoperoxidación estimada con la concentración de malon-dialdehído (MDA) (Valencia-Olvera, 2007)

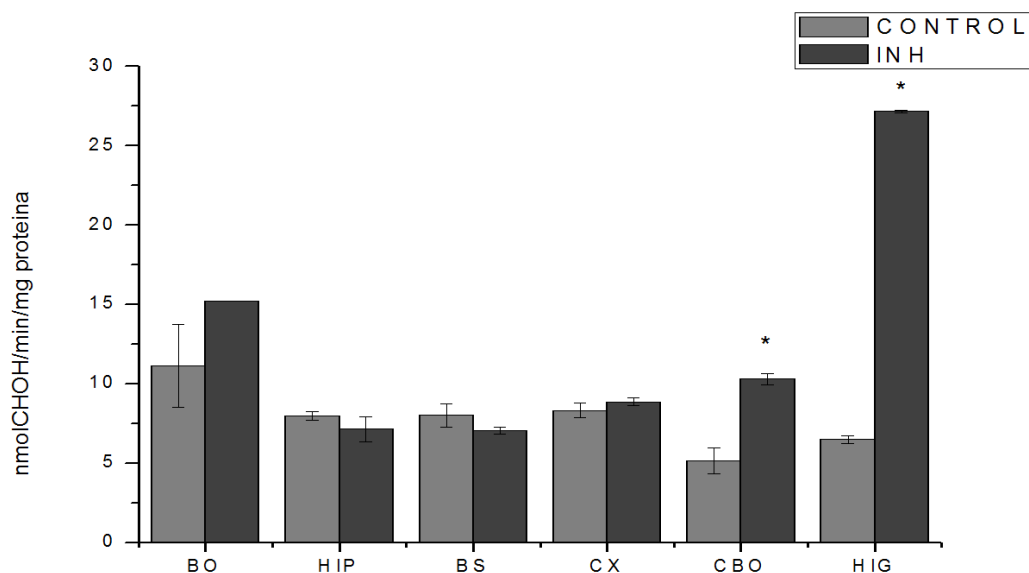


Figura 12. Actividad del CYP2E1 *in vivo*, en hígado (HIG), bulbo olfatorio (BO), hipocampo (HIP), tallo cerebral (BS), la corteza (CX) y cerebelo (CBO). Antes y después del tratamiento con isoniazida (INH). (Valencia-Olvera, 2007)

2.1 CYP2E1 y neurotoxicidad

En años recientes se han obtenido algunas evidencias de la participación del CYP2E1 en la neurotoxicidad. Los trabajos se pueden agrupar en los que buscan asociaciones farmacogenéticas y los trabajos que involucran al CYP2E1 y la neurotoxicidad por compuestos. En el caso de farmacogenética, se ha encontrado una relación entre un polimorfismo de la enzima y una ligera susceptibilidad a la generación de tumores cerebrales como glioma y neuroma acústico (De Roos *et al.*, 2003; Agundez, 2004), el desarrollo de enfermedad de la moto-neurona (MND) (Skvortsova *et al.*, 2006) y en la enfermedad del parkinson (PD) (Pezzoli *et al.*, 1995; Riedl *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 1998) (Jenner, 1998; Patel *et al.*, 2006)(Riedl *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2008; Shahabi *et al.*, 2009), sin embargo, en el caso del PD sólo los últimos dos estudios reportan una asociación, aunque no se conoce el efecto de los polimorfismos en la actividad del CYP2E1.

El CYP2E1 se expresa y se induce en la sustancia negra, principalmente en las células dopaminérgicas (Riedl *et al.*, 1996; Watts *et al.*, 1998). La PD se caracteriza por la pérdida de por lo menos el 60% de las neuronas dopaminérgicas localizadas en esta zona

por la combinación de factores genéticos y ambientales. Se ha reportado que la isoniazida es capaz de inducir al CYP2E1 en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (Watts *et al.*, 1998). Además, en general, el CYP2E1 puede oxidar compuestos neurotóxicos como el n-hexano (Pezzoli *et al.*, 1995; Jenner, 1998) o al alcohol a acetaldehído el cual puede condensarse con dopamina o serotonina formando isoquinolonas neurotóxicas (Han y col., 1996). Esto podría explicar la asociación de algunos polimorfismos del CYP2E1 con la incidencia de PD y la hipometilación del gen del CYP2E1 y un aumento en la expresión del mensajero en cerebro de pacientes con PD (Kaut *et al.*, 2012). El aumento en la formación de ROS por la inducción del CYP2E1 por xenobióticos puede contribuir al estrés oxidativo que degenera la sustancia negra en la patogénesis del PD (Patel *et al.*, 2006).

La toxicidad del acetaminofén en el cerebro por acción del CYP2E1 se ha demostrado en gliomas, donde también se describe la participación del JNK y la proteína tumoral p53 (Bae *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2006c) en la señalización celular.

Las regiones que más sufren daño por el abuso del alcohol en humanos correlacionan específicamente con las zonas de expresión del CYP2E1 (Fadda & Rossetti, 1998; Howard *et al.*, 2003b). La inhibición del CYP2E1 reduce la lipoperoxidación y generación de especies reactivas producidas por la exposición a etanol *in vivo* (en sinaptosomas obtenidos del cerebro completo) e *in vitro* (en cultivos primarios de astrocitos) (Montoliu *et al.*, 1994; Montoliu *et al.*, 1995). Sin embargo, en otros estudios *in vitro*, la lipoperoxidación y muerte celular por exposición a etanol en neuronas no es dependiente del metabolismo oxidativo de éste (Huentelman *et al.*, 1999) y en neuronas corticales, el mecanismo de generación de ROS por etanol es debido a la inducción de la NADPH oxidasa por el acetaldehído y no a la inducción del CYP2E1 (Haorah *et al.*, 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CYP2E1 participa de manera importante en la bioactivación de fármacos y generación de estrés oxidante en el hígado (Gonzalez, 2007). Estos procesos pueden resultar en genotoxicidad y muerte celular dependiendo del modelo, el sustrato y las condiciones celulares (Caro & Cederbaum, 2004). La participación fisiológica y/o toxicológica del CYP2E1 en otros tejidos está muy poco explorada. Recientemente, se ha demostrado que el CYP2E1 se expresa en cerebro y que en el cerebelo se presenta una respuesta pronunciada a la inducción por xenobióticos en comparación con otras estructuras cerebrales (Joshi & Tyndale, 2006a; Yadav *et al.*, 2006; Valencia-Olvera, 2007; Zhong *et al.*, 2012). La participación del CYP2E1 en el cerebro en la toxicidad de compuestos o en la etiología de enfermedades neurodegenerativas resulta controversial ya que los pocos resultados que se tienen son aparentemente contradictorios (Montoliu *et al.*, 1994; Montoliu *et al.*, 1995; Huentelman *et al.*, 1999; Haorah *et al.*, 2008).

En este trabajo se plantea la posibilidad de que la actividad del CYP2E1 en el cerebelo participe en eventos de neurotoxicidad. Para ello se utilizarán cultivos de células granulares de cerebelo como modelo de estudio de muerte celular neuronal (Contestabile, 2002).

IV. HIPÓTESIS

La inducción del CYP2E1 por xenobióticos en las células granulares de cerebelo conlleva la generación de ROS y/o metabolitos activos que pueden resultar en muerte neuronal.

V. OBJETIVOS

General

- Explorar si el CYP2E1 en el cerebelo puede inducirse y evaluar si la inducción conlleva daño celular

Particulares

- Explorar la presencia de CYP2E1 en cultivos primarios de células granulares de cerebelo (CGC).

- Explorar si el CYP2E1 en CGC es capaz de incrementar su expresión por tres inductores hepáticos: etanol, isoniazida y acetaminofén.
- Evaluar si la inducción del CYP2E1 conlleva a una sobreproducción de ROS.
- Evaluar si la sobreproducción de ROS desencadena procesos de muerte celular y/o genotoxicidad dependiente de CYP2E1.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Materiales

El Suero fetal de bovino y la penicilina/estreptomicina fueron adquiridos de GIBCO (Grand Island, NY, USA). La dihidroetidina y la calceína AM fueron adquiridos de Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). La poli-L-lisina (peso molecular > 300,000), tripsina, DNAsa, MTT, ioduro de propidio (PI), citosina-D-arabino-furoanosida, NADPH, glutatión reductasa, GSH, GSSG, ácido sulfosalicílico, ácido ditiobis-2-nitrobenzoico (DNB), vinil piridina, el kaempferol, isoniazida, acetaminofén y butionin sulfoximida (BSO) fueron de Sigma (St Louis, MO, USA). Los reactivos usados para geles de poliacrilamida (PAGE) así como Bradford, fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), membranas para electroforesis (PVDF) fueron de Millipore (Bredford, MA, USA). Los antioxidantes Mn-TMPyP y Eukarion 134 fueron adquiridos de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Los anticuerpos contra CYP2E1, IgG acoplada a fluoresceína y GAPDH fueron adquiridos de Chemicon y los anticuerpos contra 8-oxo-desoxiguanosina fueron adquiridos en TREVIGEN. El medio de montaje para la inmunocitoquímica y el anticuerpo contra IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina fue adquirido en Vectashield, Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, US). El kit para revelar el western blot fue adquirido de CDP-Star, BioLabs, Inc. El inhibidor de proteasas es marca Roche. Todos los demás reactivos fueron del mayor grado de pureza disponible en el mercado.

6.2 Cultivo de neuronas granulares de cerebelo

Se emplearon cultivos de neuronas granulares de cerebelo (CGC) de ratas Wistar de 8 días (Moran & Patel, 1989). Se disectaron los cerebelos y las células se disociaron con tripsina y DNAsa. Las células se suspendieron y se sembraron a una densidad de 265×10^3 células/ml en cajas de plástico o sobre cubreobjetos, previamente cubiertas con poli-L-lisina (5µg/ml). El medio de cultivo contiene medio basal de Eagle suplementado con 10%

(v/v) de suero fetal de bovino inactivado por calor, 2mM de glutamina, 25 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomina. Las células sembradas en estas cajas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera saturada con vapor de agua, con una presión parcial de CO₂ de 5% (95% aire). Para evitar la proliferación de células no neuronales, se añadió citosina arabinosa 10 µM 24 h después de sembrar. Los cultivos de CGC así obtenidos contenían normalmente aproximadamente 95-97% neuronas. Las células fueron mantenidas por 7-8 días *in vitro* (DIV).

6.2.1 Tratamiento con inductores

Después de los 8 días *in vitro* (DIV) a 37° C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂, las células se sometieron por el tiempo y las concentraciones indicadas de etanol, isoniazida y acetaminofén. Para los tratamientos con etanol, se sellaron las cajas con parafilm para evitar la evaporación de éste (Eysseric *et al.*, 1997). El tratamiento con los inhibidores se realizó 30 minutos antes del tratamiento con los inductores.

6.3 Evaluación de la expresión e inducción de CYP2E1

6.3.1 Inmunocitoquímica

Las células se fijaron con una solución al 4% de formaldehído por 10 min para después ser permeabilizadas con una solución de PBS con 10% suero normal de caballo (NHS) y 0,3% de Tritón X-100 por 3 horas. Posteriormente, se incubaron las neuronas con el anticuerpo específico para CYP2E1 por 18 horas a 4° C (dilución 1:100). Para el revelado, se incubó con un anticuerpo conjugado con fluoresceína por 45 min a 37° C y se montó con un medio para fluorescencia con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos.

6.3.2 Western blot

Las células se lavaron con PBS y fueron homogeneizadas con buffer de lisis (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2%, dodecil sulfato sódico (SDS) 0,2% e inhibidor de proteasas, pH 7.4). Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Los lisados fueron separados mediante una

electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida dodecil sulfato (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Se manejaron concentraciones de 4% de acrilamida para el gel concentrador y 10% de acrilamida para el gel separador. En los carriles se cargaron 50 μg de proteína total para microsomas de cerebro (a excepción de la determinación del rango dinámico donde se utilizaron diferentes concentraciones, como se explicará más adelante), 5 μg de proteína para hígado como testigo positivo y los μg indicados de supersoma para determinar el rango dinámico del “inmunoblot”. La electroforesis se realizó a 100 volts por cuatro horas y la electrotransferencia de proteína a la membrana de nitrocelulosa por toda la noche. Luego de esto, las membranas se bloquearon por tres horas con una solución de leche CARNATION al 6% w/v en amortiguador salino de Tris con Tween al 0,1% (TTBS), y después se lavaron las membranas con TBS-Tween20 al 1%. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo contra CYP2E1 diluido 1:300 con TTBS-leche al 2.5% por dos a tres días en refrigeración. Luego de un segundo lavado con TTBS, se incubó con un segundo anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa alcalina (dilución 1:30000 en TTBS-leche 2.5%). Las membranas se revelaron con el kit de quimioluminiscencia exponiéndolas a placas de Kodak®. La densitometría se realizó con el software GelQuant.NET bajado de la página biochemlabsolutions.com

6.4 Medición de la generación de ROS

6.4.1 Oxidación del Dihidro etidio

Las células se incubaron durante 20 min con 3.2 μM de dihidroetidina (DHR-123) en el medio de cultivo a 37°C. Después de remover el medio se lavaron con PBS 1X y se fijaron con formaldehído (4%) durante 7 min, después se lavaron con PBS y finalmente se tomaron fotografías en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Japan) utilizando el objetivo de fluorescencia 20x y un filtro Nikon de rodamina (excitación 546 y emisión 590 nm). Se analizó por lo menos duplicados de dos pozos de cada condición analizada para cada experimento independiente. Los resultados están expresados como el porcentaje de células positivas a la dihidroetidina (DHEt) con respecto al total en cada campo. La oxidación del DHEt es un marcador de incremento de concentraciones de ROS, principalmente el anión superóxido (Owusu-Ansah *et al.*, 2008).

6.4.2 Medición del glutatión y glutatión oxidado

El glutatión (GSH) citosólico se estimó mediante el método de reciclaje enzimático. Este método consiste en la oxidación del GSH por el reactivo ácido 2,2-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB), y la subsecuente reducción por la glutatión reductasa en presencia de NADPH (Tietze, 1969; Rahman *et al.*, 2006). Las células se lavan con PBS y se sonicán con ácido sulfosalicílico para posteriormente mezclarse con el DTNB, la enzima glutatión reductasa y el NADPH. Posteriormente, se determinan los cambios en la absorbancia a 405 nm por 10 minutos. Para el glutatión oxidado, se pre-incuba con vinil piridina por una hora y después se realiza el mismo procedimiento. La cinética de la curva de reducción es proporcional a la concentración de glutatión total y glutatión oxidado.

6.4.3 Inmunocitoquímica para 8-oxo-desoxi-guanosina

Se realizó una inmunocitoquímica contra el principal aducto formado por la oxidación del DNA. Las células se fijaron con metanol en hielo por 20 minutos para después tratarlas con 0,05N de HCl por 5 minutos. Posteriormente se incubó con 500ng/ml de RNAsa por una hora a 37° C. Después se lavaron a las células con 35, 50 y 75% Etanol/PBS. El DNA se desnaturaliza *in situ* con 0,15 N de NaOH en 70% de etanol por 4 minutos. Posteriormente se vuelven a lavar las células con las diluciones de etanol y se les trata con 5 µg/ml de proteinasa K. Finalmente se procedió con el experimento normal para inmunocitoquímica. El anticuerpo primario se incubó por 24-72 horas y se reveló con un anticuerpo secundario fluorescente FITC. Se consideró como resultado positivo en aquellas donde la fluorescencia FITC se localiza en el núcleo teñido con DAPI, lo cual significa que hay oxidación en el DNA.

6.5 Viabilidad por tinción con calceína-AM y yoduro de propidio

La viabilidad celular se estimó mediante la co-tinción de calceína AM y yoduro de propidio (PI). La calceína-AM entra a las células viables y cuando es cortada por esterasas emite fluorescencia verde. Aunado a esto, la calceína cortada se vuelve impermeable, lo cual refleja la integridad de la membrana celular. El yoduro de propidio no puede entrar a la célula a menos que la membrana celular esté dañada. Los cultivos se incubaron con 2.5 µM calceína-AM y 2 µM PI por 10 min a 37°C. Posteriormente se

tomaron fotografías de los cultivos en un microscopio de fluorescencia invertido a las longitudes de onda de 495/515 nm para calceína y 535/617 nm para PI. Se analizaron por lo menos duplicados de dos pozos de cada condición analizada de cada experimento. Los resultados están expresados como el porcentaje de células viables o muertas con respecto al total en cada campo.

6.6 Análisis Estadístico

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar (SE). Se realizó un análisis de varianzas ANOVA de una vía, evaluando significancia con una prueba de Tukey considerando una $p < 0,05$. En el caso de las figuras 30 y 32 se utilizó una prueba de Fisher con la misma significancia.

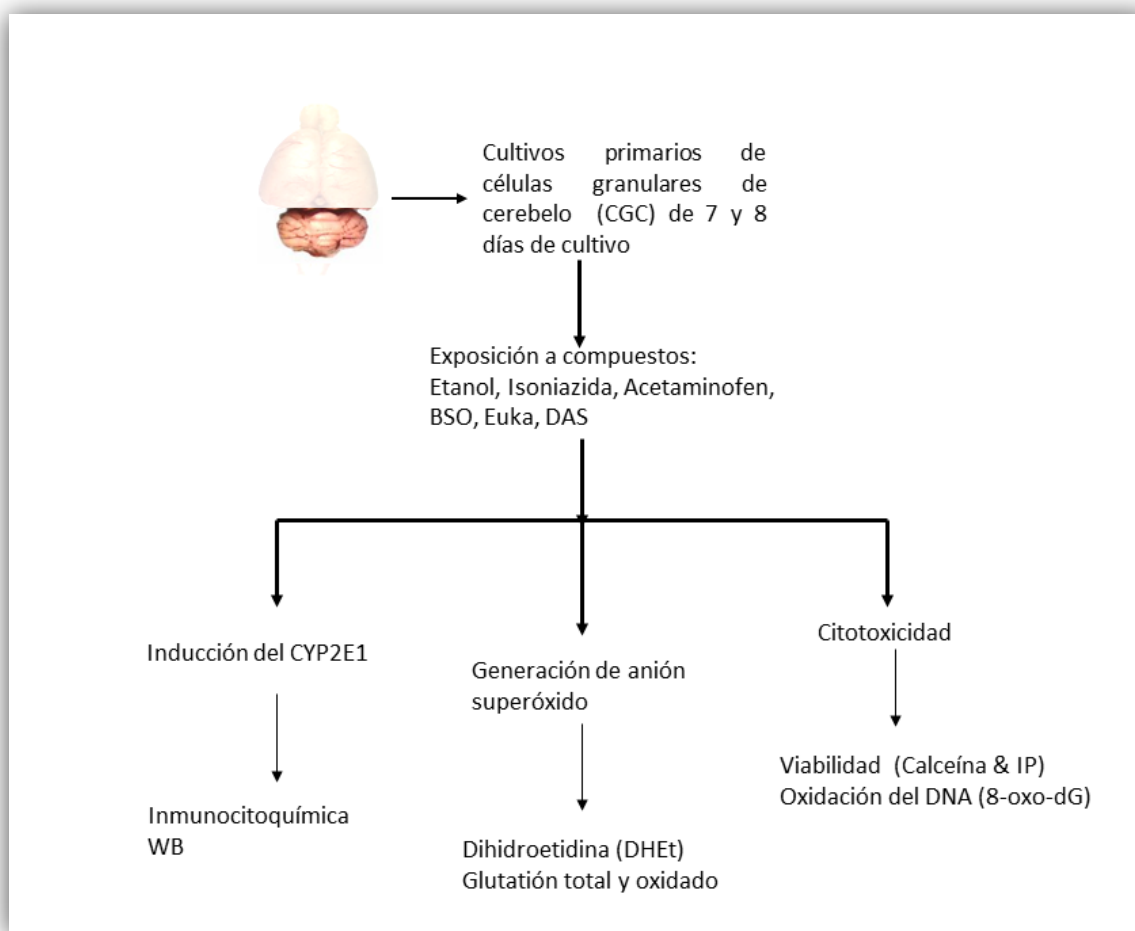


Figura 13 Diagrama de flujo de los experimentos realizados

VII. RESULTADOS

7.1 Expresión del CYP2E1 en células granulares de cerebelo

Lo primero que se realizó fue explorar si el CYP2E1 se expresa en células granulares de cerebelo en cultivo con ensayos de inmunocitoquímica y “western blot”.

En la figura 14 se observan fotografías de microscopía confocal y de epifluorescencia de la inmunodetección en células sin tratamiento a los 8 días de cultivo (Figura 14A). Se utilizaron preparaciones con únicamente el anticuerpo secundario (Figura 14B) o con anticuerpo inespecífico IgG (Figura 14C) como control negativo.

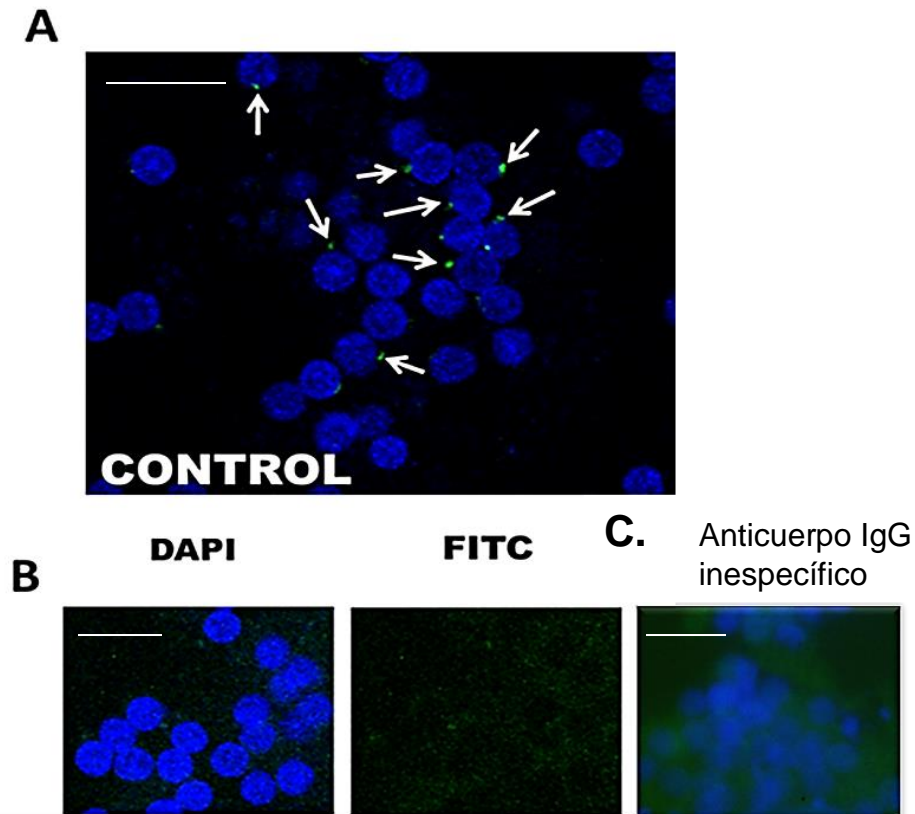


Figura 14. Inmunocitoquímica para CYP2E1 en CGC. En azul se pueden observar los núcleos teñidos con DAPI y en verde al CYP2E1. Imagen de microscopía confocal para CGC sin tratamiento, las flechas indican la señal positiva para CYP2E1 (**A**), Control de la inmunocitoquímica utilizando sólo el anticuerpo secundario (**B**) o un anticuerpo IgG inespecífico (**C**). Las barras corresponden a 30 μ m.

Con el objetivo de conocer la cantidad aproximada de la proteína de CYP2E1 en células granulares de cerebelo, se realizó una prueba semicuantitativa por “western blot” (Mann & Tyndale, 2010). Para esto, se valoró la linealidad y la sensibilidad del ensayo realizando una curva estándar con diferentes concentraciones de CYP2E1 en supersomas ® de concentración conocida (Figura 15A). Con esto se obtuvo una correlación entre la concentración del CYP2E1 y la densidad óptica del ensayo. La figura 15A del lado derecho indica el rango lineal de la curva y su fórmula.

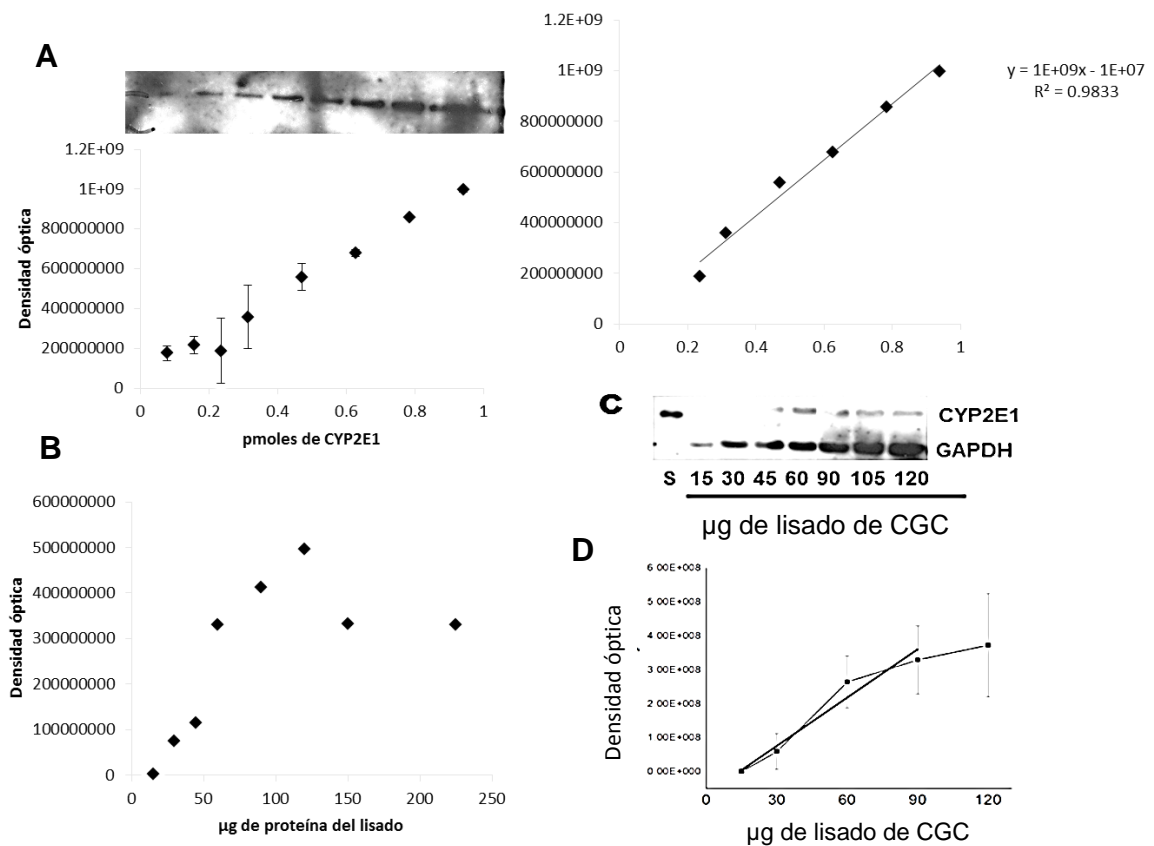


Figura 15. Cuantificación del CYP2E1 en CGC por western blot. **A**, Izquierda, curva de concentración de supersomas contra densidad óptica, derecha, valores que se ajustan a una ecuación lineal (la ecuación se presenta en un recuadro del lado superior derecho). **B**, datos de concentración de lisado de proteína graficados contra densidad óptica. **C**, Imagen representativa de la curva de proteína para CYP2E1 en los lisados de CGC. **D**, Gráfica que incluye únicamente los valores que se ajustan a la ecuación lineal.

Posteriormente se realizó una curva con diferentes concentraciones de lisado de las CGC (15 B-D). Al sustituir los valores de densidad óptica en la fórmula obtenida en la figura 15A y dividiendo por las concentraciones de proteína de los lisados, se puede determinar que las CGC expresan aproximadamente $0,0043 \pm 0,0006$ pmol de CYP2E1/ por miligramo de proteína total de CGC. Este ensayo sirvió para conocer el rango dinámico del ensayo de “western blot”, ya que, como se puede observar en la figura 15B, el comportamiento no es lineal para concentraciones superiores a los 90 μg o menores a los 30 μg (Figura 15D). Con esta aproximación se fijó el contenido de proteína a 50 μg por carril para los siguientes ensayos de “western blot”.

7.2 Inducción y citotoxicidad del CYP2E1 por isoniazida en células granulares de cerebelo

7.2.1 Inducción del CYP2E1 por isoniazida en CGC.

El tratamiento con isoniazida induce la expresión de CYP2E1a las 12 horas en CGC, como se puede observar mediante inmunocitoquímica y “western blot” (Figura 16). En la inmunocitoquímica se puede apreciar que el número de células que expresan el CYP2E1 es mayor que el control y que además, la región perinuclear de la tinción aumenta en las células tratadas (flechas rojas). En los experimentos de western blot, se logra apreciar que existe una inducción a partir de las 12 horas de tratamiento y se mantiene hasta las 24 horas.

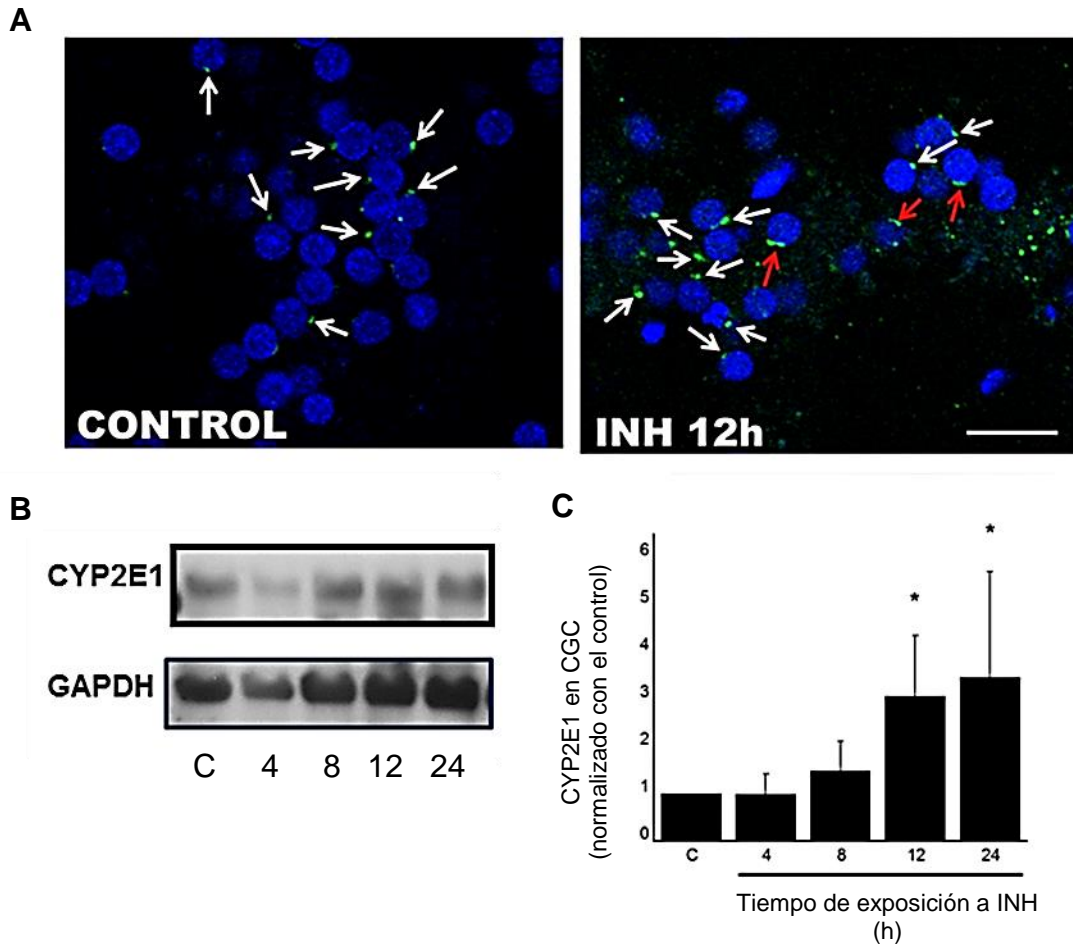


Figura 16. Inducción del CYP2E1 por isoniazida en CGC. A. Imágenes de microscopía confocal de la inmunocitoquímica para células control (izquierda) y células tratadas (derecha). Las flechas rojas indican una tinción mayor en la región perinuclear. B. Inmunoblots representativos de los niveles de CYP2E1 y GAPDH a diferentes tiempos de tratamiento con isoniazida. C. Análisis densitométrico de los inmunoblots. Los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces independientes y las barras indican las medias \pm SE de la relación CYP2E1/GAPDH de unidades densitométricas arbitrarias normalizadas con el GAPDH (* $p < 0,05$ diferentes estadísticamente del control). La barra corresponde a 30 μ m.

7.2.2 La inducción del CYP2E1 con isoniazida a varias concentraciones y tiempos no genera un daño significativo en células granulares de cerebelo

Se exploró si la inducción del CYP2E1 se ve acompañada de la generación de ROS y citotoxicidad. Mediante la determinación de la oxidación de DHEt no se observó evidencia de ROS con el tratamiento de 24, 48 y 72 horas de INH 0,1 Mm (Figura 17A y B). Se utilizaron altas concentraciones de peróxido de hidrógeno como control positivo (Budd *et al.*, 1997; Scanlon *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 2007; Viola *et al.*, 2007) (Figura 17A, izquierda). Además, no existe un desequilibrio en los niveles de glutatión oxidado y reducido a las 24 horas (Figura 18A). De igual manera la viabilidad no se ve afectada hasta las 72 horas de tratamiento (Figura 17C)

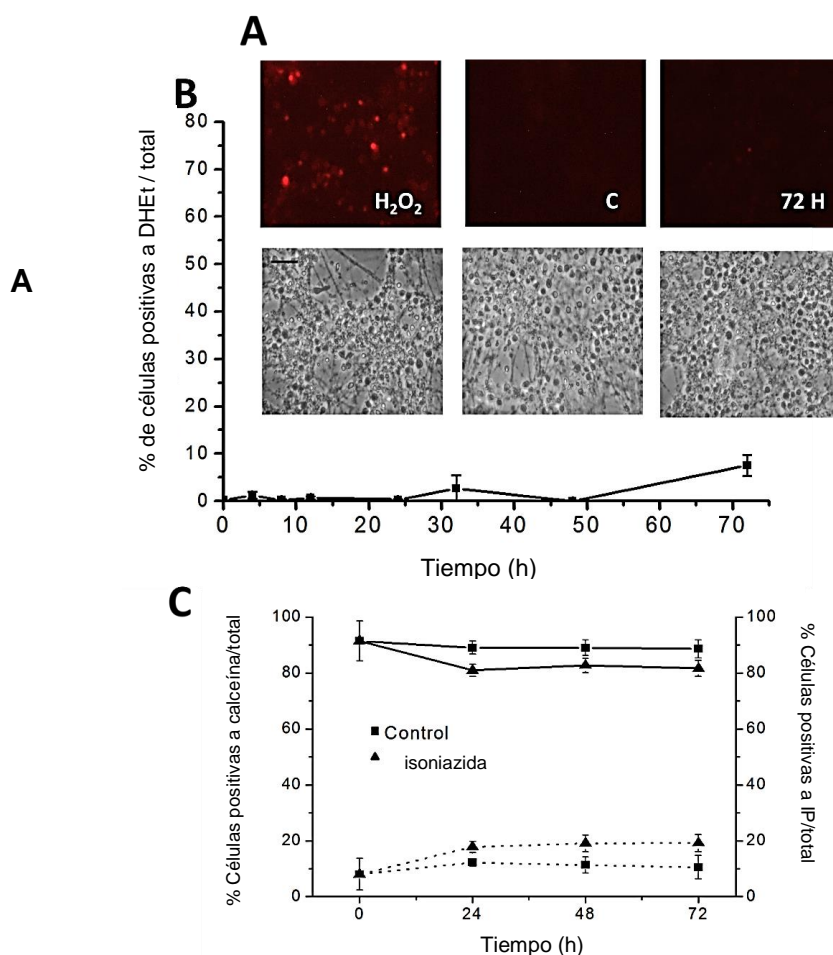


Figura 17. Producción de ROS y citotoxicidad por el tratamiento con isoniazida A. Imágenes de la oxidación de DHEt (arriba) y en contraste de fases (abajo). Las células fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 100 μ M por una hora (izquierda), se dejaron sin tratamiento (en medio) o fueron tratadas con isoniazida 0,1 mM por 72 horas (derecha). La barra corresponde a 30 μ m. **B.** Cuantificación de los ROS que resultan del

tratamiento con isoniazida. **C.** Viabilidad celular después del tratamiento con isoniazida por 24 a 72 horas (■, control; y ▲, tratadas con isoniazida). Las células viables tiñen positivas para calceína (líneas sólidas) y las células muertas se tiñen con yoduro de propidio (líneas punteadas). Los datos están expresados como el promedio \pm SE del porcentaje de células positivas por campo de 6 experimentos independientes.

7.2.3 El tratamiento con isoniazida induce ROS en presencia de BSO en CGC

Para confirmar los resultados previos, se determinaron las concentraciones de glutatión (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) para evaluar el estado redox de la célula y verificar que no haya un desequilibrio entre los compuestos oxidantes y antioxidantes. En la Figura 18A se puede observar que no hay diferencias significativas de la relación GSSG/GSH. Sin embargo, se destaca que existe un aparente incremento a las 12 horas de tratamiento. Por ello, se planteó que quizá la respuesta antioxidante de las CGC es suficiente para contener los ROS que pueda generar la inducción del CYP2E1. Para evaluar esta hipótesis, se inhibió la síntesis de glutatión con el compuesto L-butionin sulfoximina (BSO). El BSO bloquea de manera irreversible la γ -glutamin-cisteín sintasa la cual es la enzima limitante en la síntesis del glutatión. En la Figura 18 C se logra observar que una exposición de 12 horas a 25 y 50 μ M de BSO, inhibe en 80% los niveles del glutatión citoplasmático. La exposición a 100 μ M de BSO por 24 h resulta en la muerte celular de aproximadamente el 30% de las células (Figura 18B). Tomando en cuenta estos datos, en todos los experimentos posteriores las células fueron tratadas con 50 μ M de BSO por 12 horas previo al tratamiento con isoniazida. A esta concentración de BSO, se están agotando las concentraciones de glutatión pero no se compromete la viabilidad celular. El tratamiento con BSO e isoniazida por separado no genera ROS (Figura 18D); sin embargo, cuando se ponen los dos compuestos juntos, se ve una generación de ROS a las 8 y 12 horas de tratamiento con isoniazida. (Figura 18D).

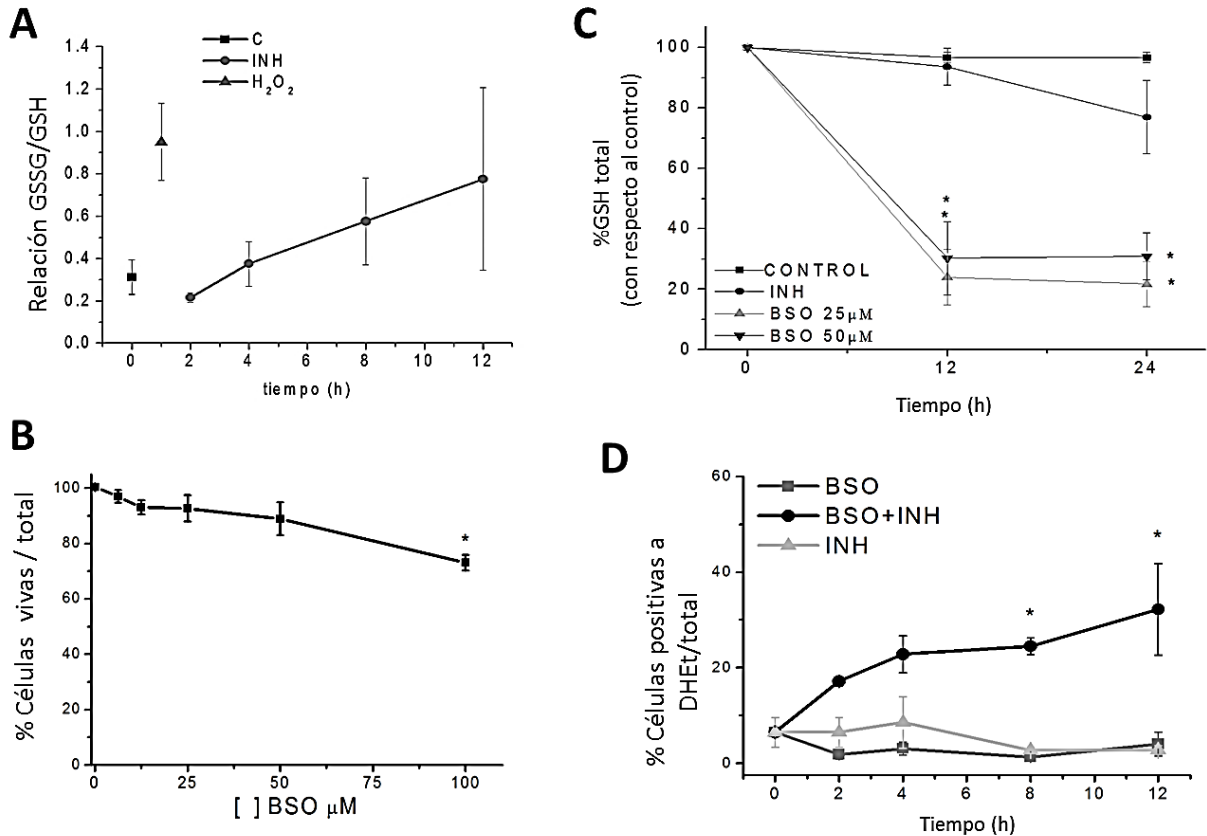


Figura 18. Producción de ROS después del tratamiento con BSO e INH en CGC. Las células se trataron con BSO y/o isoniazida (INH) 0,1mM como se indica **A**. Relación GSSG/GSH de células tratadas con isoniazida hasta las 12 horas de tratamiento. ■, control; ●, isoniazida; ▲, Peróxido de hidrógeno 100μM por 1 hora **B**. Citotoxicidad de BSO en CGC después de 24 horas de tratamiento (5 a 100 μM). **C**. Concentraciones totales de glutatión citoplasmático después del tratamiento con BSO 25 y 50 μM. Los símbolos corresponden a las siguientes condiciones de tratamiento: ■, control; ●, isoniazida; ▲, 25 μM BSO y ◆, 50 μM BSO. Los datos están expresados como % del control (**p* < 0,05). **D**. Tratamiento con BSO (50 μM) e INH genera producción de ROS después de 8 horas del tratamiento con INH. Los símbolos corresponden a las siguientes condiciones de tratamiento: ■, 50 μM BSO; ▲, isoniazida; y ●, BSO con isoniazida. Los datos están expresados como el promedio ± SE de al menos 3 experimentos independientes.

7.2.4 El CYP2E1 es el responsable de la generación de ROS por el tratamiento con isoniazida y BSO

El DHEt detecta preferentemente al anión superóxido (Peshavariya *et al.*, 2007), la especie reactiva de oxígeno que principalmente se genera por la actividad del CYP2E1 (Bell & Guengerich, 1997). Para evaluar si la generación de ROS es debido a la inducción del CYP2E1, se utilizó dialil sulfuro (DAS) como inhibidor específico del CYP2E1 (Brady *et al.*, 1991). El tratamiento con DAS inhibe la generación de ROS por isoniazida y BSO hasta los niveles del control (Figura 19). Estos resultados sugieren que el CYP2E1 es el responsable de la generación de ROS por isoniazida en CGC. Para confirmar que la generación del anión superóxido es el responsable de la oxidación del DHEt, se utilizó el antioxidante Eukarion-134 (EUKA) que actúa como la superóxido dismutasa y catalasa. El tratamiento con EUKA inhibe por completo la generación de ROS (Figura 19)

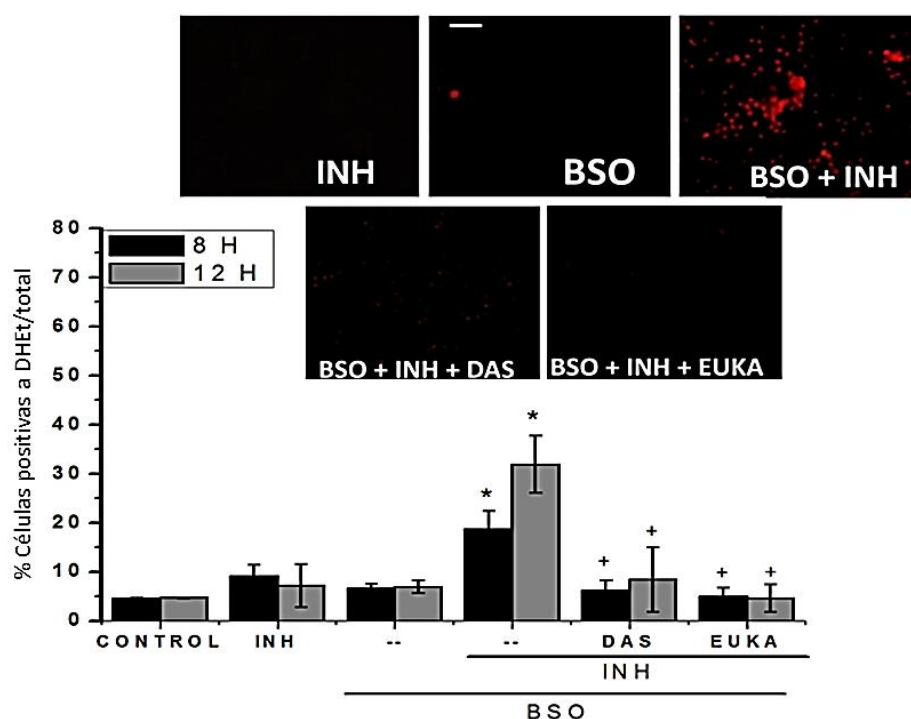


Figura 19. Participación del CYP2E1 en la generación de ROS por tratamiento con BSO e INH. Después del tratamiento por 12 horas con BSO, se agregó 0,1 mM de isoniazida (INH), 100 μ M de dialil sulfuro (DAS) y 10 μ M de Eukarion-134 (EUKA) según se indica. **Arriba** Imágenes representativas de la oxidación de DHEt, la barra corresponde a 50 μ m. **Abajo** Cuantificación de la oxidación del DHEt por 8 y 12 horas de tratamiento con isoniazida. Los datos están expresados como los promedios \pm SE del porcentaje de las células positivas a DHEt con respecto al número de células totales por campo de 6 experimentos independientes (* $p < 0,05$ comparado con el grupo tratado con BSO; + $p < 0,05$ comparado con el grupo de BSO + INH).

7.2.5 El incremento de ROS da como resultado la oxidación del DNA y puede prevenirse con la inhibición del CYP2E1 o el tratamiento con un antioxidante.

Una producción sostenida de ROS puede llevar a la oxidación de lípidos, proteínas y DNA. La inducción del CYP2E1 se ha asociado a la oxidación de todas estas biomoléculas (Cederbaum *et al.*, 2001), particularmente del DNA (Bradford *et al.*, 2005). Para evaluar si la generación de ROS por la inducción del CYP2E1 con isoniazida puede resultar en oxidación del DNA, se realizó una inmunocitoquímica contra 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-oxo-dG), el mayor producto de la oxidación del DNA. Las células tratadas con INH o BSO no presentaron oxidación del DNA (Figura 20). Sin embargo, las células tratadas con BSO e INH presentan un incremento en la oxidación del DNA en aproximadamente el 50% de las células. Este incremento se inhibe con la adición de DAS o EUKA.

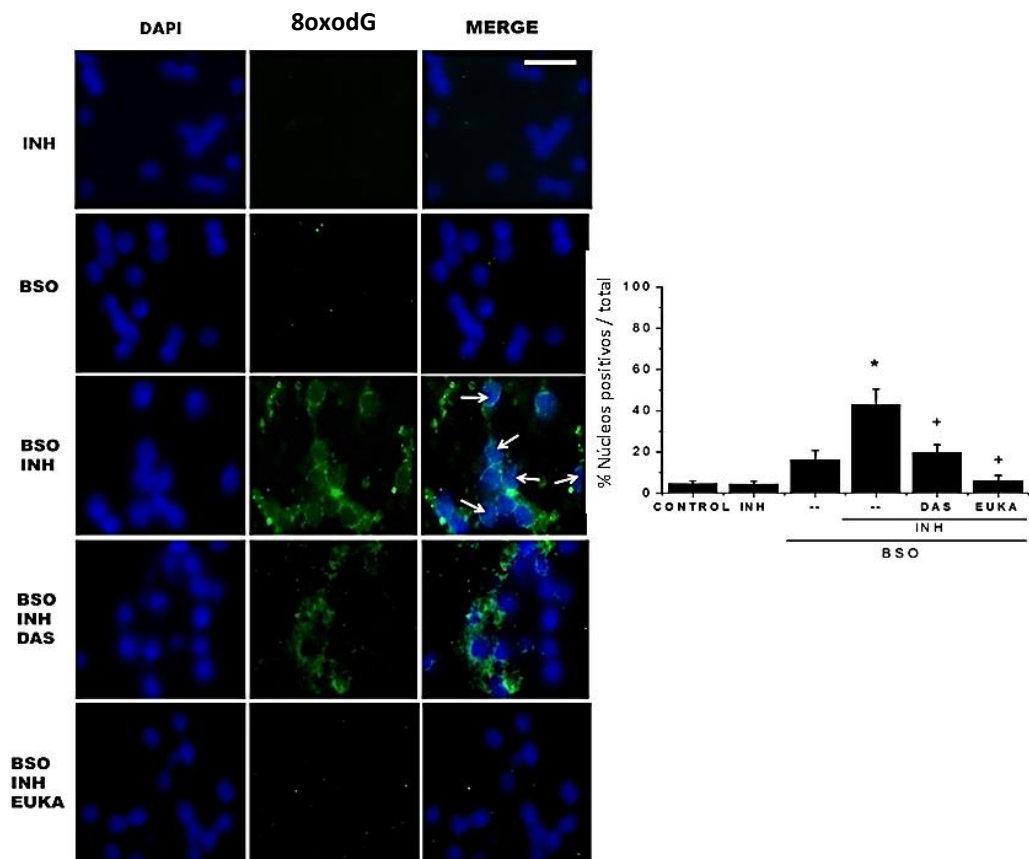


Figura 20. La oxidación del DNA por el tratamiento con BSO e INH depende del CYP2E1 y ROS. Las células se trataron con BSO por 12 horas y posteriormente se agregó isoniazida (INH) 0,1 mM, dialil sulfuro (DAS) 100 μ M o Eukarion-134 (EUKA) 10 μ M por 12 horas según se indica. Izquierda. Imágenes representativas de la inmunocitoquímica contra 8-oxi-desoxiguanosina (8-oxo-dG), las flechas representan los núcleos positivos para 8-oxo-dG. La barra corresponde a 30 μ m. Derecha; cuantificación de la oxidación del DNA. Los datos están expresados como los promedios \pm SE de 11 experimentos independientes. (* p < 0,05 comparado con el grupo con BSO; + p < 0,05 comparado con el grupo BSO+INH).

7.2.6 El tratamiento con BSO e INH genera muerte celular y esto se puede prevenir inhibiendo al CYP2E1 o las ROS generadas

El tratamiento con INH y BSO reduce aproximadamente un 30% del número de células vivas. Estos efectos se pueden inhibir al agregar DAS y EUKA (Figura 21). Adicionalmente, se confirmó la participación de los ROS en la muerte por BSO e INH incluyendo otros antioxidantes, como Tetraquis (1-metil-4-piridil) porfirina de manganeso (III) o MnTMPyP (Mn) y kaempferol (Figura 21).

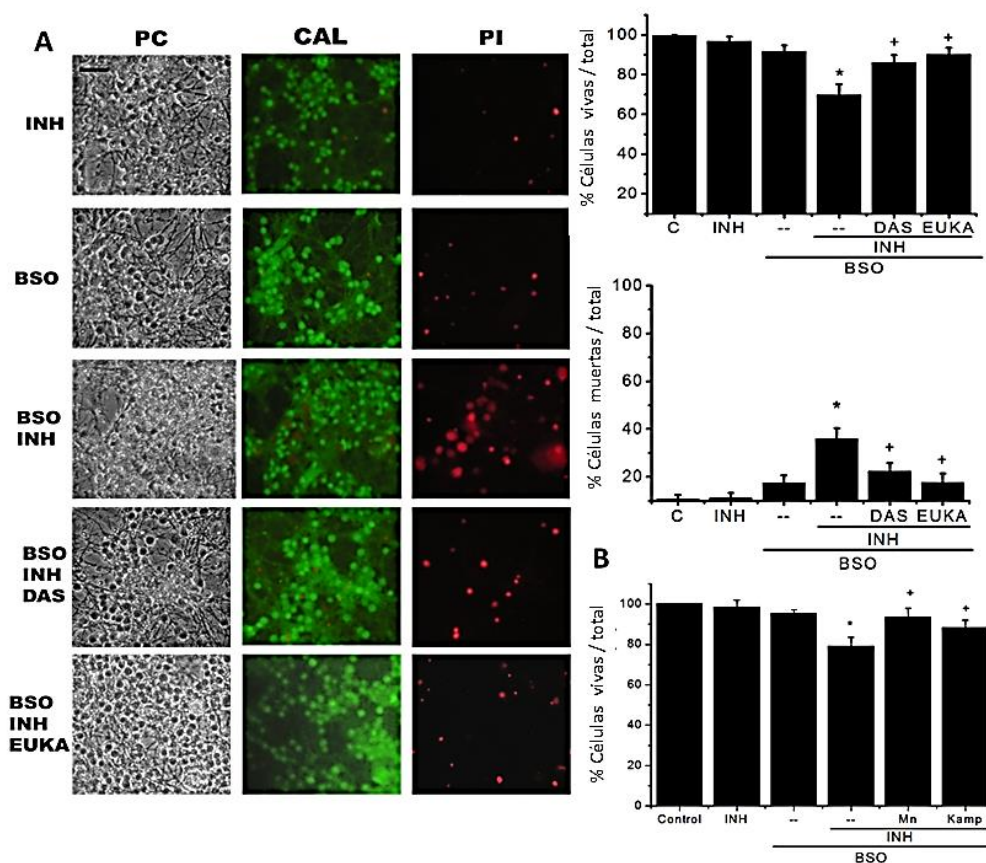


Figura 21. Viabilidad celular. Las células se trataron con BSO por 12 horas y posteriormente se les agregó isoniazida (INH) 0,1 mM, dialil sulfuro (DAS) 100 μ M, Eukarion-134 (EUKA) 10 μ M, MnTMPyP (Mn) 50 μ M, y kaempferol (Kamp) 20 μ M por doce horas según se indica. **A Izquierda;** imágenes representativas de la co-tinción con calceína y yoduro de propidio en las CGC (PC, contraste de fases: CAL, calceína; PI, yoduro de propidio). La escala representa 50 μ m. **Arriba Derecha;** células vivas expresadas como porcentaje de células positivas a calceína, considerando las células sin tratamiento como el 100% **Derecha en medio;** células muertas expresadas como el porcentaje de células positivas a yoduro de propidio. **B.** Células vivas después del tratamiento con antioxidantes. Los datos están expresados como el promedio \pm SE de 4 a 10 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con BSO; + $p < 0,05$ comparado con el grupo de BSO+INH).

7.2.7 CYP2E1 no participa en el daño generado por isoniazida en células granulares de cerebelo con niveles bajos de glutatión a 24 horas de tratamiento.

Se decidió explorar si se podía amplificar el efecto realizando los previos experimentos por mayor tiempo de tratamiento. Al tratar las células durante 24 horas con isoniazida y 36 horas con BSO, se observó que, en efecto, la generación de ROS es mucho mayor. Sin embargo, el tratamiento con DAS no inhibe la generación de ROS, pero sí se inhibe con el tratamiento con el antioxidante EUKA (Figura 22)

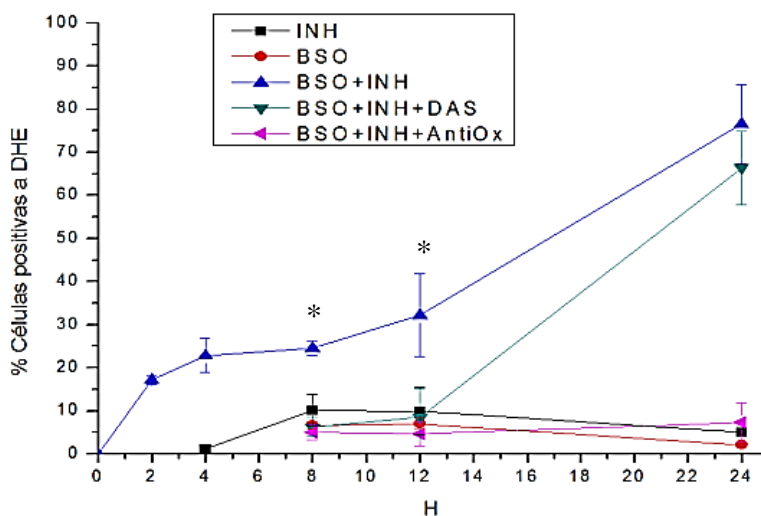


Figura 22. Curso temporal de la generación de ROS a las 24 horas de tratamiento Después de tratar a las células por 12 horas con BSO, se agregó el inductor del CYP (INH), el inhibidor (DAS), y el antioxidante Euka (AntiOx). La generación de especies se inhibe al administrar un antioxidante en todos los tiempos. El inhibidor del CYP2E1 sólo impide la liberación de especies a las 8 y 12 horas. Los datos están expresados como el

promedio \pm SE de 4 a 10 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con BSO).

De igual forma, la viabilidad de las células tratadas con BSO e INH después de 24 horas de tratamiento se reduce casi al 90%. Esta muerte no se puede inhibir con la incorporación de DAS, aún poniendo el inhibidor al doble concentración o agregando DAS en lapsos de 12 horas (Figura 23).

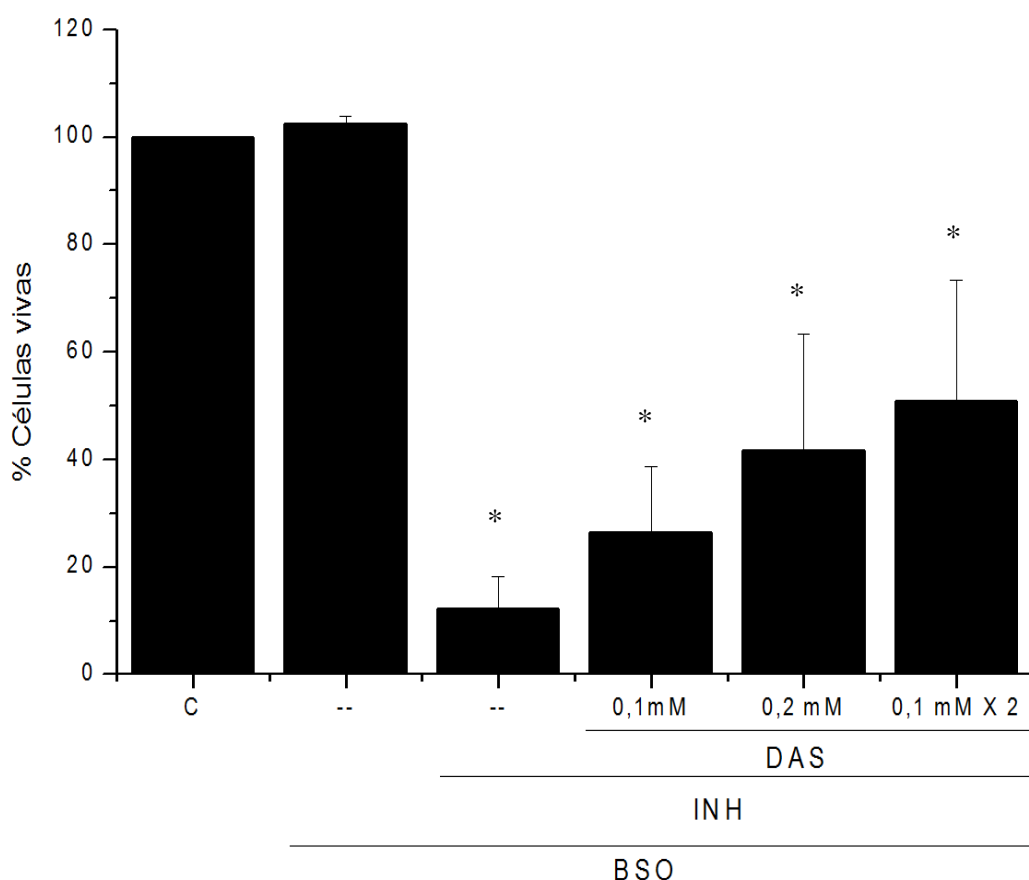


Figura 23. Viabilidad celular después del tratamiento de 24 horas por isoniazida. Las células se trataron con BSO por 12 horas y posteriormente se les agregó 0,1 mM isoniazida (INH) y 100 μ M dialil sulfuro (DAS) por 24 horas según se indica. La última barra corresponde al tratamiento con DAS 0,1 mM al inicio del tratamiento y una segunda administración transcurridas 12 horas de tratamiento con INH. Los datos están expresados como el promedio \pm SE de 4 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con BSO).

Con el objetivo de evaluar si existe un tiempo crítico de generación de ROS que sean responsables de la muerte por el tratamiento con BSO+INH a las 24 horas, se incluyó el antioxidante al mismo tiempo o después de 2, 4, 8, 12, 14, 16 y 20 horas del tratamiento con isoniazida. En la figura 24 se observa que las ROS participan únicamente en las últimas horas del tratamiento.

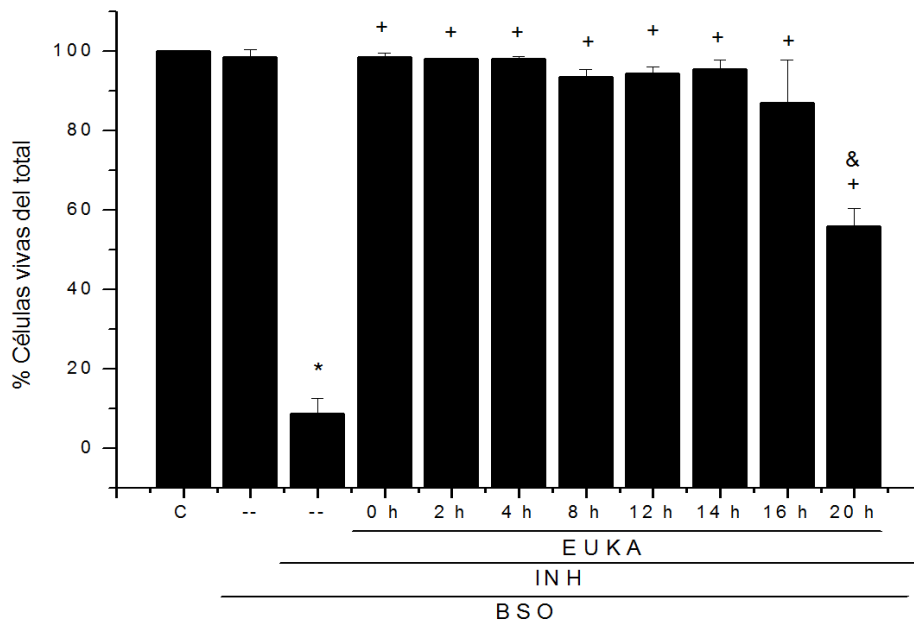


Figura 24. Evaluación de la muerte por co-tinción con calceína/IP incorporando el antioxidante EUKA a diferentes tiempos de tratamiento en un lapso de 24 horas. La muerte por BSO+INH a las 24 horas es inhibida en todos los tratamientos excepto a las 20 horas. Los datos están expresados como el promedio \pm SE de 4 a 8 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con BSO; + $p < 0,05$ comparado con el grupo con BSO+INH, & $p < 0,05$ comparado con los grupos BSO+INH+EUKA de las 0 a las 20 horas).

Aparentemente, existe una fuente de ROS distinta al CYP2E1 que es la responsable de la muerte de las CGC cuando son tratadas con BSO e INH por 24 horas.

Las familia de las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas que participan en la muerte de varios tipos de células, incluyendo las CGC (Coyoy *et al.*, 2008). Estas enzimas generan el anión superóxido como único producto, utilizando oxígeno molecular como sustrato y NADPH como co-factor. Para evaluar si estas enzimas pueden estar participando en la muerte por INH y BSO, se trató con dos inhibidores generales de las NOX, apocinina (APO) y 4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato (AEBSF) (Figura 25). Aparentemente las NOX participan en la muerte de las CGC cuando son tratadas con BSO e INH por 24 horas de tratamiento. Se utilizó concentraciones bajas de potasio (5 mM, K5) como control positivo de muerte dependiente de las NOX en CGC para evaluar la eficiencia de los inhibidores de la NOX.

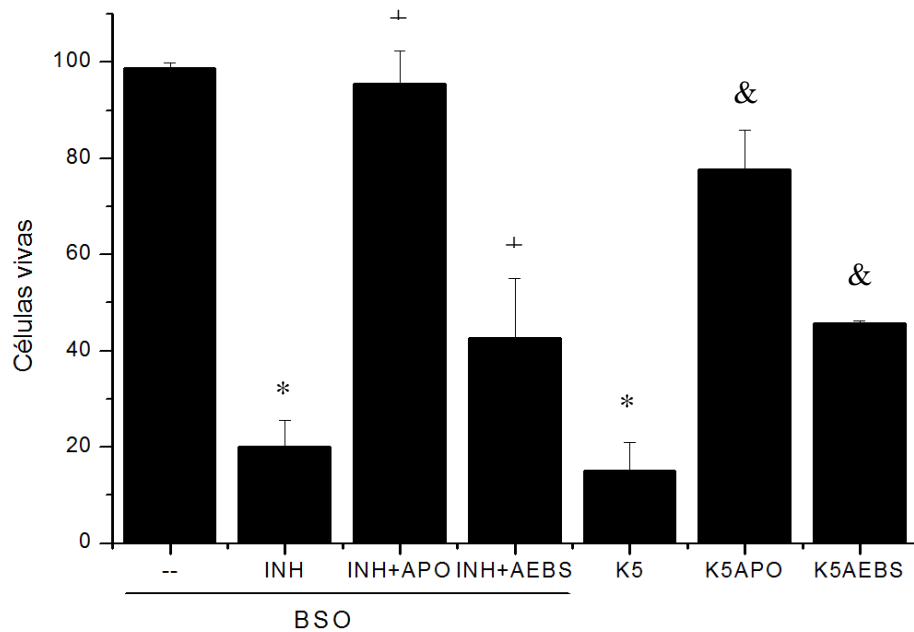


Figura 25. Cuantificación de células vivas por campo de células tratadas con BSO, INH por 24 horas y dos inhibidores de la NOX. Abreviaturas: BSO, butionin sulfoximina; INH, isoniazida; APO, apocinina; AEBS, 4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato; K5, células tratadas con 5mM de potasio por 24 horas. Los datos representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm SE. *, el tratamiento es diferente a BSO $p < 0,05$; +, el tratamiento es diferente a BSO+INH $p < 0,05$; &, el tratamiento es diferente a K5 $P < 0,05$.

7.3 Inducción del CYP2E1 y sus consecuencias toxicológicas por el tratamiento con etanol en células granulares de cerebelo.

7.3.1 Inducción CYP2E1 por etanol

El tratamiento de las CGC con etanol 100mM por 24 horas, induce significativamente el contenido del CYP2E1 evaluado por inmunocitoquímica y western blot (Figura 26)

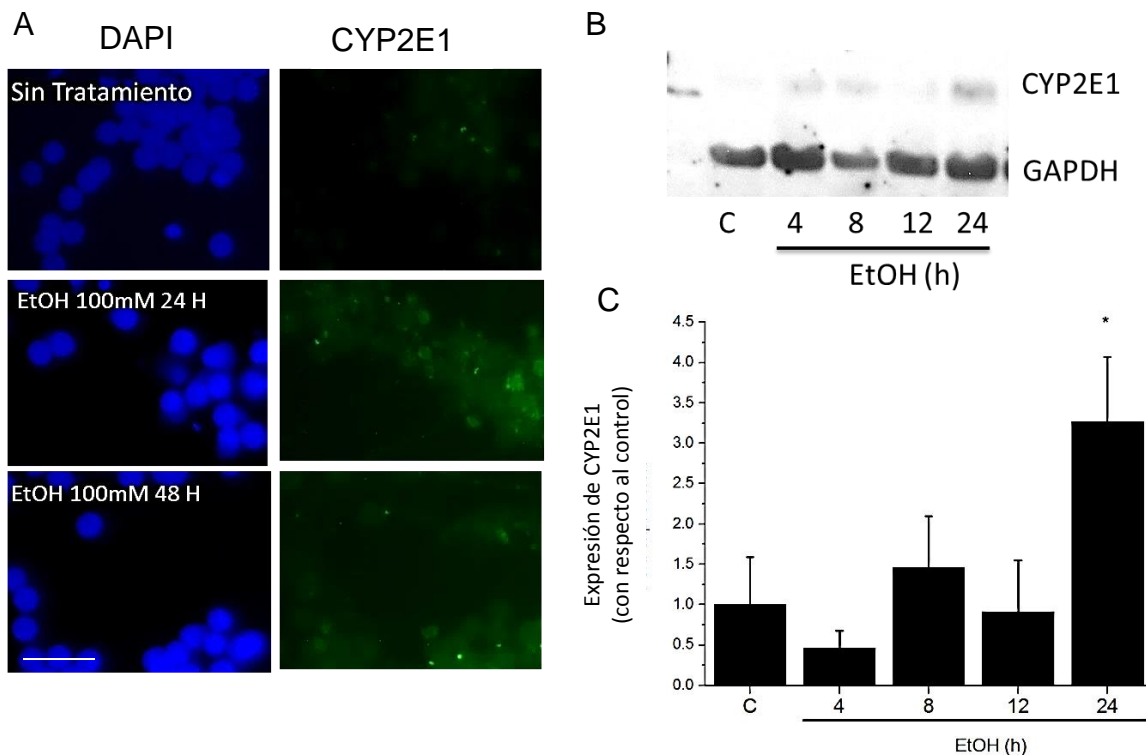


Figura 26. Inducción del CYP2E1 por etanol en CGC. **A.** Imágenes de la inmunocitoquímica para células control (arriba) y células tratadas con etanol (abajo). **B.** Inmunoblots representativos de los niveles de CYP2E1 y GAPDH a diferentes tiempos de tratamiento con etanol. **C.** Cuantificación de los inmunoblots. Los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces independientes y las barras indican las medias \pm SE de la relación CYP2E1/GAPDH de unidades densitométricas arbitrarias (* $p < 0,05$ diferentes estadísticamente del control). La barra corresponde a 30 μ m.

7.3.2 El tratamiento con etanol no incrementa los niveles de ROS generados en las CGC ni compromete la viabilidad celular

Para evaluar si la inducción de CYP2E1 por etanol a las 24 horas genera un tipo de daño a las CGC, se evaluó la oxidación del DHEt y la viabilidad celular. Al no tener resultados a las 24 horas, se incrementó la concentración de etanol hasta 400 mM y el tiempo de exposición hasta las 72 horas. Ninguno de los tratamientos con etanol generó un cambio significativo en la producción de ROS o en la viabilidad celular (Figura 27)

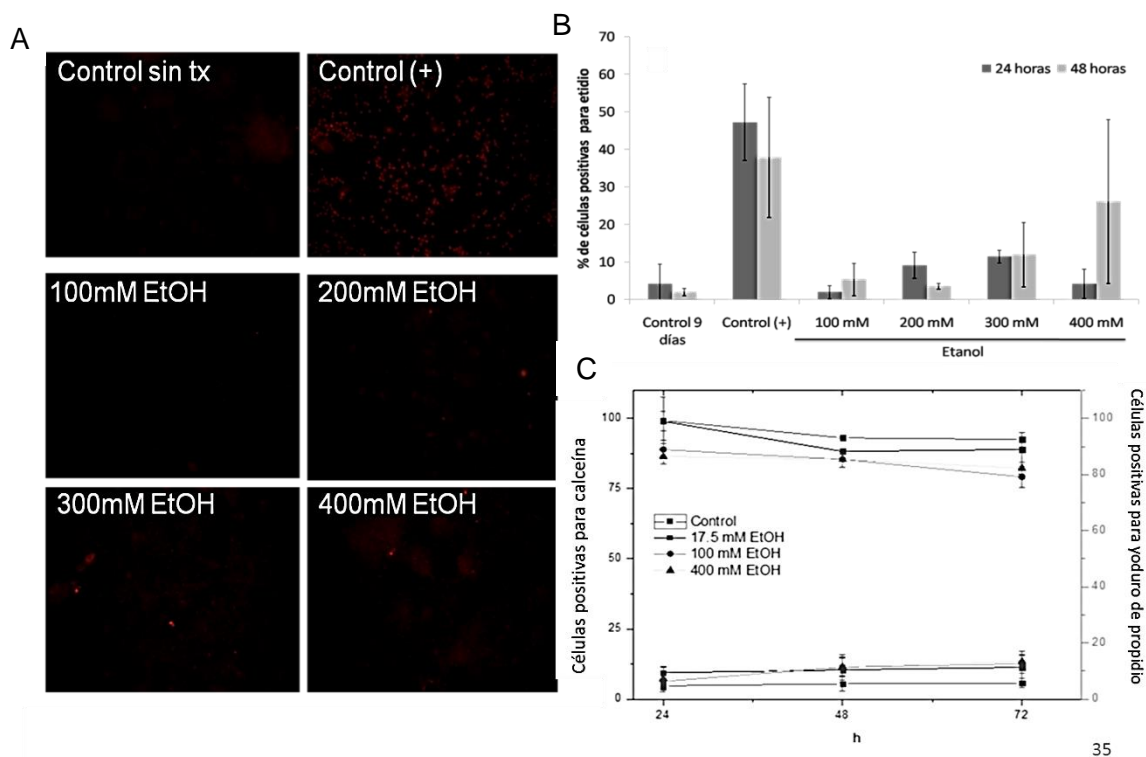


Figura 27. Generación de ROS y viabilidad celular por el tratamiento con etanol en CGC. **A.** Imágenes epifluorescentes de la oxidación de DHEt en células tratadas con etanol por 24 horas. **B.** Cuantificación de los ROS que resultan del tratamiento con etanol a diferentes concentraciones por 24 y 48 horas. Como control positivo se utilizaron células a las que se les cambió el medio a bajas concentraciones de potasio por 5 horas. **C.** Viabilidad celular después del tratamiento con etanol de 24 a 72 horas. Los datos están expresados como el promedio \pm SE del porcentaje de células positivas por campo de 6 experimentos independientes.

7.3.3 El tratamiento con BSO y etanol incrementa los niveles de ROS y compromete la viabilidad celular en las CGC

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con isoniazida, se incluyó el BSO a los tratamientos para agotar los niveles de glutatión. Las células tratadas previamente con BSO por 12 horas, presentan un ligero incremento en la producción de ROS y una muerte del 30% de las células por el tratamiento con etanol a las 24 horas (Figura 28). Los ROS y la muerte celular se ven inhibidos cuando se incluye el inhibidor del CYP2E1, DAS y el antioxidante EUKA.

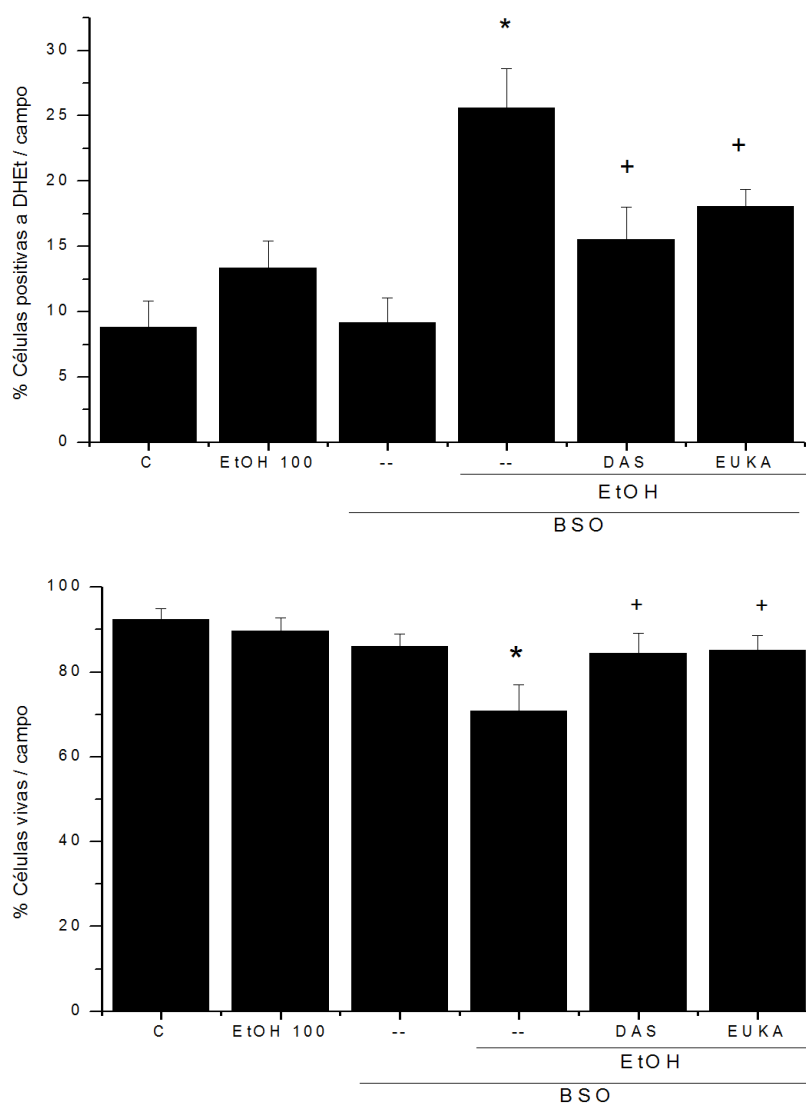


Figura 28. Participación del CYP2E1 en la generación de ROS y muerte celular por tratamiento con BSO y etanol. Después del tratamiento por 12 horas con BSO, se agregó 100 mM de etanol (EtOH), 100 μ M dialil sulfuro (DAS) y 10 μ M Eukarion-134

(EUKA) según se indica. **A.** Evaluación de la generación de ROS por la oxidación de DHEt **B.** Células vivas evaluadas por la tinción con calceína. Los datos representan el promedio de 4 experimentos independientes \pm SE. *, el tratamiento es diferente a BSO $p < 0,05$; +, el tratamiento es diferente a BSO+INH $p < 0,05$

7.4 Inducción del CYP2E1 y sus consecuencias toxicológicas por el tratamiento con acetaminofén en células granulares de cerebelo.

Los estudios con acetaminofén se realizaron con una secuencia distinta a la que se ejecutó para isoniazida y etanol. En este caso se comenzó con la determinación de la neurotoxicidad del acetaminofén para investigar la concentración efectiva, posteriormente se evaluó la participación del CYP2E1 en estos efectos.

7.4.1 Neurotoxicidad por acetaminofén

Se evaluó la neurotoxicidad por acetaminofén en las CGC por 24 horas a las concentraciones de 0,5 a 20 mM. El acetaminofén compromete la viabilidad celular de las CGC a partir de una concentración de 10 mM a las 24 horas de tratamiento (Figura 29)

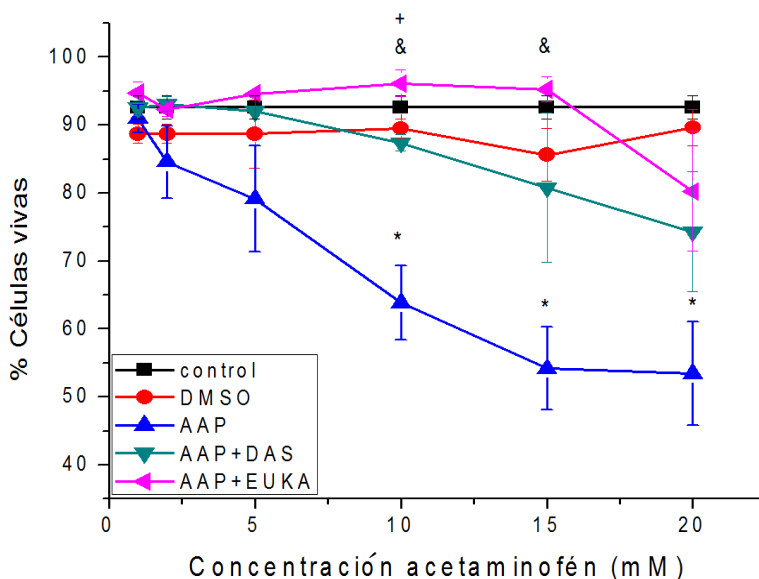


Figura 29. Neurotoxicidad de acetaminofén a las 24 horas de tratamiento en las CGC. Las células se trataron con acetaminofén (AAP) por 24 horas. La gráfica indica células vivas expresadas como porcentaje de células positivas a calceína considerando las células sin tratamiento como el 100%. Los datos están expresados como el promedio \pm SE de 6 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el mismo volumen de

DMSO; +, $p < 0,05$ comparando AAP vs AAP+DAS a la misma concentración; &, $p < 0,05$ comparando AAP vs AAP+EUKA). Las concentraciones de DMSO ascienden a partir de 7mM para la concentración más baja de AAP (1mM) hasta 84 mM para la concentración más alta de AAP (20m). A estas concentraciones el DMSO no presenta toxicidad.

7.4.2 Las ROS y el CYP2E1 participan en la muerte de las CGC por acetaminofén.

Con el objetivo de evaluar si el CYP2E1 y las ROS participan en la muerte de las CGC por acetaminofén (AAP), se incluyeron dos inhibidores del CYP2E1, el DAS y el 4-metil pirazol (4MP); y tres diferentes antioxidantes, el EUKA, la N-acetil cisteína (NAC) y el MnTMPyP (MN). El tratamiento con el AAP compromete la viabilidad celular en aproximadamente el 40% de las células. El tratamiento con los inhibidores del CYP2E1 y los antioxidantes, inhiben esta muerte (Figuras 29 y 30).

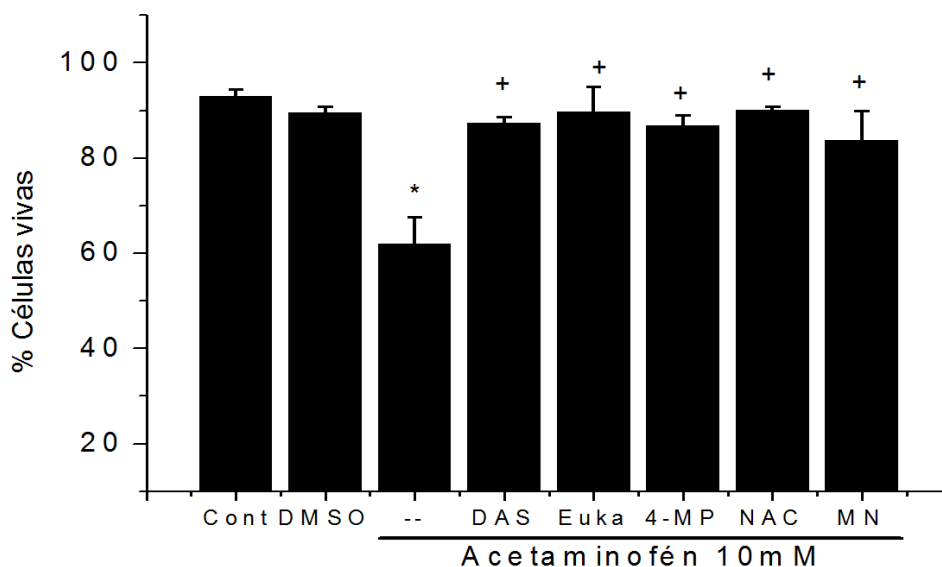


Figura 30. Viabilidad celular de CGC tratadas con acetaminofén 10mM e inhibidores del CYP2E1 y antioxidantes. Las células se trataron con 10 mM acetaminofén (AAP), 100 μ M dialil sulfuro (DAS), 2mM 4-metil pirazol (4MP), 10 μ M Eukarion-134 (EUKA), 50 μ M MnTMPyP (Mn), y 20 μ M N-acetil cisteína (NAC) por 24 horas según se indica. La gráfica representa el porcentaje de células vivas con respecto al total de células por campo. Los datos están expresados como el promedio \pm SE de 6 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con DMSO; + $p < 0,05$ comparado con el grupo con acetaminofén).

7.4.3 Generación de ROS por el tratamiento con acetaminofén en las CGC.

Con la información de que las ROS participan en la muerte por acetaminofén a las 24 horas, se realizó un curso temporal de la generación de ROS con acetaminofén. Existe un incremento en la producción de ROS desde las 2 horas que se mantiene hasta las 4 horas de tratamiento, aparentemente ocurre un decremento de las ROS a las 6 y 8 horas de tratamiento para después elevarse a partir de las 12 horas y mantenerse hasta las 24 horas (Figura 31A). El CYP2E1 participa en la generación de ROS a las 24 horas por acetaminofén, ya que al incluir un inhibidor del CYP2E1 (DAS) se inhibe la inducción de ROS (Figura 31B)

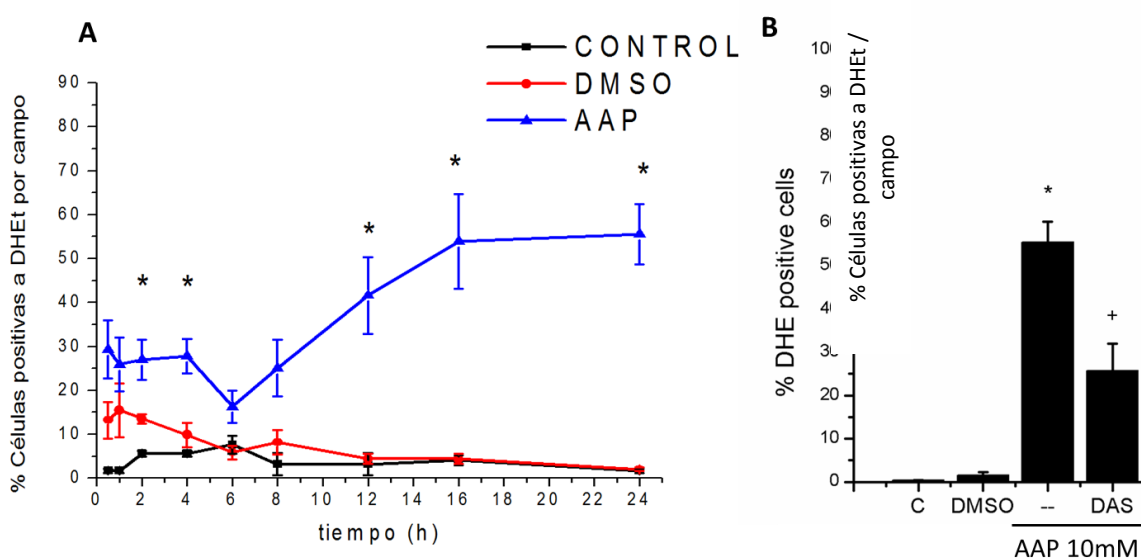


Figura 31. Generación de ROS por 10 mM acetaminofén (AAP) en CGC. A. Curso temporal de la generación de ROS por acetaminofén en CGC. Los símbolos corresponden a las siguientes condiciones de tratamiento: ■, Células control (sin tratamiento); ●, células tratadas con DMSO 42mM. ▲, células tratadas con AAP. B. Generación de ROS a las 24 horas de tratamiento con AAP y AAP+DAS según se indica. Los datos están expresados como los promedios \pm SE de 10 experimentos independientes. (* $p < 0,05$ comparado con el grupo con DMSO; + $p < 0,05$ comparado con el grupo con acetaminofén).

7.4.4 Inducción del CYP2E1 por acetaminofén.

Cuando se evaluó la inducción del CYP2E1 por acetaminofén, primero se evaluó a diferentes concentraciones de acetaminofén por 24 horas, a estas condiciones no se aprecia ningún incremento en la expresión del CYP2E1 (Figura 32A); sin embargo, al

realizar un curso temporal de la expresión del CYP2E1 con el tratamiento con 10 mM acetaminofén se logra apreciar un incremento a las 4 horas de tratamiento (Figura 32B)

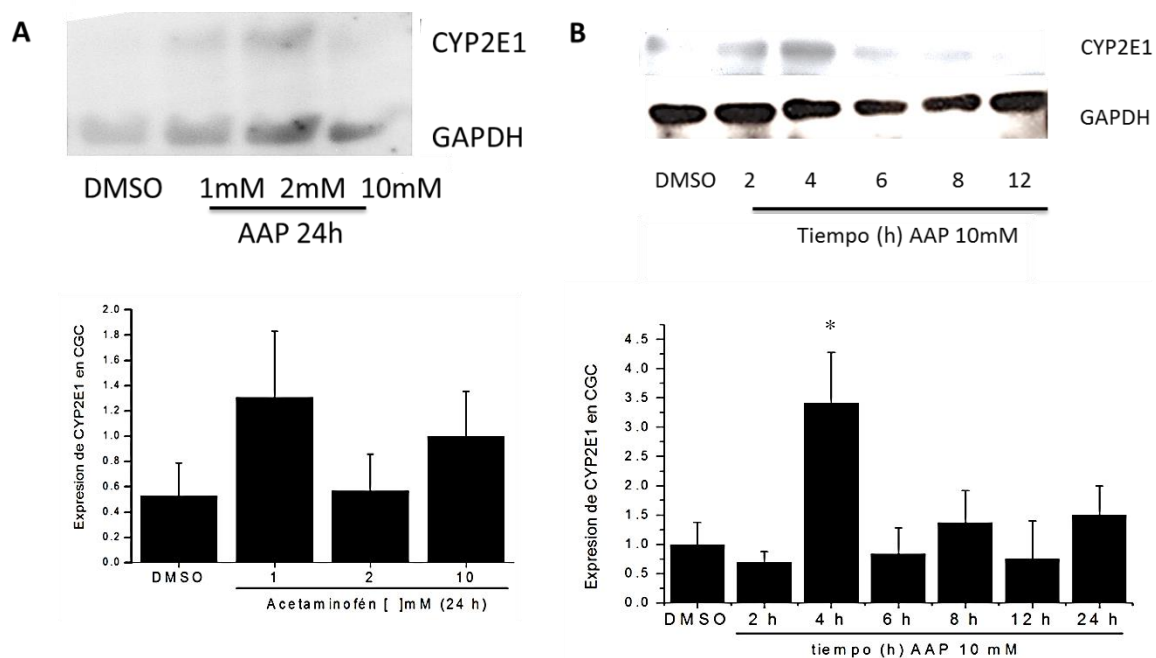


Figura 32. Inducción del CYP2E1 en CGC por el tratamiento con acetaminofén. Curso temporal de la expresión de CYP2E1 después del tratamiento con 10 mM de acetaminofén. Arriba, inmunoblots representativos de los niveles de CYP2E1 y GAPDH. Abajo, cuantificación del CYP2E1 expresado como el cociente de CYP2E1/GAPDH. Los experimentos se realizaron por lo menos 4 veces independientes y las barras indican las medias \pm SE de la relación CYP2E1/GAPDH de unidades densitométricas arbitrarias (* $p < 0,05$ diferentes estadísticamente del control).

VIII. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Recientemente se ha puesto mucha atención en el metabolismo de xenobióticos dentro del SNC. A pesar de que estos compuestos pueden encontrarse en bajas concentraciones en el cerebro, el metabolismo *in situ* de los xenobióticos puede producir metabolitos reactivos o tóxicos que ocasionen daños irreversibles en el tejido nervioso. La identificación de sustratos e inductores de los CYP en el cerebro permitirá un mejor entendimiento del potencial de estas enzimas en los mecanismos de neurotoxicidad y en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas.

El CYP2E1 es una de las isoformas de los CYP más importantes en relación con la activación metabólica de fármacos y toxinas ambientales, así como en la generación de estrés oxidativo. Reportes recientes sugieren que los CYP pueden ser importantes en el metabolismo de xenobióticos en las neuronas granulares del cerebelo (Sanchez-Martin *et al.*, 2011). En este estudio se analizaron las consecuencias toxicológicas de la inducción del CYP2E1 en cultivos primarios de células granulares de cerebelo, ya que éstas células presentan una respuesta pronunciada a la inducción del CYP2E1 por xenobióticos (Joshi & Tyndale, 2006a; Yadav *et al.*, 2006; Valencia-Olvera, 2007; Zhong *et al.*, 2012).

En el presente estudio se confirma que el CYP2E1 se expresa en condiciones basales en las células granulares de cerebelo (CGC) de rata. Este hallazgo es novedoso ya que, a pesar de que se conocía que las CGC expresan al CYP2E1 en adultos en estudios *in vivo* (Upadhyay *et al.*, 2000), no se conocía si las ratas a los 8 días de nacidas expresan y conservan la proteína en condiciones *in-vitro*. Los niveles basales del CYP2E1 en CGC sugieren que además del metabolismo de xenobióticos esta isoforma podría participar en funciones reguladoras de manera endógena.

Adicionalmente, se observa que la expresión está localizada en una región específica en la célula alrededor del núcleo. Los CYP en el cerebro tienen una localización subcelular diferente de la hepática ya que se pueden encontrar en grandes cantidades en la mitocondria y en fracciones de la membrana plasmática, así como en otros compartimentos celulares (Walther *et al.*, 1986). Sin embargo se deberá realizar una co-tinción con marcadores de organelos o fragmentación celular acompañada de

“western blot” para evaluar de una manera más puntual su expresión compartimentalizada.

Por otro lado, en el presente estudio se demuestra que el CYP2E1 se puede inducir después de la exposición a tres inductores hepáticos: etanol, isoniazida y acetaminofén, lo cual sugiere que el CYP2E1 presente en el cultivo es funcional y capaz de reaccionar a condiciones ambientales. Se ha demostrado que la inducción de los CYP en cerebro se lleva a cabo de manera distinta a la del hígado (Miksys *et al.*, 2000; Schoedel *et al.*, 2003), por lo que con base en estos resultados obtenidos, no se puede concluir qué tipo de regulación positiva presenta el CYP2E1 en las CGC.

Se conoce que el CYP2E1 puede actuar como una hidroxilasa de ácidos grasos, y participar en el metabolismo del ácido araquidónico (Laethem *et al.*, 1993). El efecto inductor del etanol, la isoniazida y el acetaminofén en la expresión del CYP2E1 posiblemente pueda influenciar en la ω -hidroxilación del ácido araquidónico y así pudiera alterar su función fisiológica.

El tratamiento con la isoniazida y el etanol no es capaz de generar ROS lo cual indica que a pesar de que se tienen niveles mayores de la enzima en todas las células, la sola presencia no implica algún desbalance en el estado redox. Sin embargo, en el caso del acetaminofén la generación de ROS es dependiente del CYP2E1 a las 24 horas.

La inducción del CYP2E1 presenta una regulación positiva de enzimas antioxidantes como la catalasa, la hemo-oxigenasa y la glutatión transferasa en hepatocitos (Cederbaum, 2006), por lo que no se puede descartar que estos mismos fenómenos estén ocurriendo en las células granulares de cerebelo y puedan contender las ROS generadas por una mayor concentración y actividad del CYP2E1. Para explorar esto, decidimos incorporar un inhibidor de la síntesis del glutatión; el BSO (L-butionin sulfoximina), una herramienta previamente utilizada para evaluar el potencial oxidativo del CYP2E1 en hepatocitos (Wu & Cederbaum, 2001a).

El glutatión (GSH) es la molécula antioxidante más abundante en las neuronas y juega un importante papel en la defensa contra daño celular inducido por estrés oxidativo (Hall, 1999). El BSO inhibe la síntesis del GSH en un 70% desde las primeras 12 horas de

tratamiento. El tratamiento con BSO y etanol o isoniazida incrementa la generación de ROS con respecto al control, a partir de las 8 horas y hasta las 24 horas en el caso de isoniazida, y sólo a las 24 horas en el caso del etanol. En ambos casos, existe una muerte de aproximadamente el 30% de las células debida al estrés oxidante inducido por el CYP2E1. El hecho de que coincidan los porcentajes podría sugerir una posible subpoblación de neuronas susceptibles al daño.

Por otro lado, es importante destacar que la neurotoxicidad de la isoniazida y el etanol sólo se observa cuando se agota el GSH. El agotamiento del GSH puede aumentar el estrés oxidativo, así como los niveles de moléculas excitotóxicas. El SNC está particularmente más expuesto a daño oxidativo debido a la alta tasa de consumo de oxígeno, la gran cantidad de ácidos grasos fácilmente peroxidables, y la baja concentración relativa de defensas antioxidantes (Andersen, 2004; Emerit *et al.*, 2004; Sayre *et al.*, 2008).

Existen evidencias de estrés oxidativo y GSH reducido en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la PD y la AD (Bains & Shaw, 1997). Por esto, es relevante considerar el potencial riesgo de los inductores y sustratos farmacológicos del CYP2E1 cerebral en pacientes vulnerables que tienen reducidas las defensas antioxidantes.

Las células que permanecieron durante 7 días en cultivo con todos los factores tróficos pueden asemejar a las neuronas ya maduras del cerebelo, por lo que resulta sumamente interesante evaluar si en estas condiciones la posible cantidad de ROS generada por la inducción del CYP2E1 es capaz de dañar alguna macromolécula como proteínas o DNA y con esto alterar su funcionalidad. Una población considerable (aproximadamente del 50% de las células del cultivo) de neuronas tratadas con BSO e INH presenta daño oxidativo al DNA, lo cual indica que a pesar de que sólo un 30% muere, un porcentaje de las células que permanecen, sobrevive a la oxidación del DNA, quizá por mecanismos de reparación (Weissman *et al.*, 2007).

En estudios previos, se ha demostrado la participación de las enzimas de la familia de las NADPH oxidasas (NOX) en conjunto de los CYP, con diferentes estímulos como la neurotoxicidad por etanol (Haorah *et al.*, 2008) o metanfetamina (Shah *et al.*, 2013) o el

tratamiento con angiotensina II (Malik *et al.*, 2012) o concentraciones altas de glucosa (Eid *et al.*, 2009). En todos estos casos, los productos de los CYP pueden activar a las NOX y así potenciar la generación de estrés y aumentar el efecto. Esto podría explicar porqué cuando las células son tratadas por 24 horas con INH y BSO, se observa que hay una muerte dependiente de ROS pero no dependiente de CYP2E1, y que estos ROS se generan en las últimas horas del tratamiento. En el caso del etanol, la metanfetamina, y la alta glucosa, la NOX participa en la potenciación de la toxicidad y en el caso de la angiotensina II, la NOX participa en la hipertensión en vasos sanguíneos. En los cuatro estudios mencionados, es necesaria la actividad de un CYP para que se genere el producto que activará a la NOX. En estudios posteriores se tratará de evaluar si la inducción del CYP2E1 por isoniazida es necesaria para la activación de la NOX y así generar las ROS en las últimas horas del tratamiento responsables de la muerte celular.

A pesar de que la hepatotoxicidad se ha presentado desde que se usa la INH, existe controversia acerca del mecanismo involucrado principalmente por la falta de un modelo validado que pueda reflejar lo que sucede en pacientes (Shen *et al.*, 2008; Metushi *et al.*, 2012; Metushi & Uetrecht, 2014). La concentración de INH utilizada para este estudio es casi tres veces la concentración encontrada en plasma después de las dosis terapéuticas (0,04 mM) (Agrawal *et al.*, 2004). Sin embargo, sí se pueden alcanzar estas concentraciones plasmáticas en algunos pacientes acetiladores lentos (Gurumurthy *et al.*, 1990)

Además de las contraindicaciones hepáticas, en varios pacientes también se presenta neuropatía periférica y neurotoxicidad en casos de sobredosis de INH (McLay *et al.*, 2005; Kass & Shandera, 2010). El mecanismo de la neuropatía históricamente se ha descrito como una alteración en el metabolismo de la piridoxina (vitamina B6), por lo que el antídoto o tratamiento es la administración de la vitamina durante el tratamiento con INH (Carlson *et al.*, 1956; Snider, 1980). Sin embargo, el mecanismo no se tiene completamente dilucidado. Por ejemplo, la piridoxina no inhibe la neurotoxicidad por tratamientos con metabolitos de la INH en cultivos neuronales, por lo que se ha propuesto una posible participación de ROS y/o metabolismo de INH por el CYP2E1 (Sanfeliu *et al.*, 1999). Los resultados del presente estudio apoyan esta hipótesis.

Es importante destacar que en el caso de la isoniazida, no existía ninguna evidencia previa que relacionara al CYP2E1 con neurotoxicidad. Sin embargo, sí existen cuadros clínicos de neurotoxicidad en cerebelo por tratamientos con fármacos antituberculosos sin que se sepa su origen o mecanismo (Blumberg & Gil, 1990; Lewin & McGreal, 1993).

A pesar de que se tienen muchas evidencias de la participación del CYP2E1 en el metabolismo de etanol en el cerebro, como se mencionó en el capítulo 1.5, son pocas las evidencias de la participación del CYP2E1 en la toxicidad por etanol. En un estudio previo, se mostró una correlación con la inducción del CYP2E1 y la generación de ROS por etanol con degeneración neuronal en ratas y en neuroblastomas IMR-32 (Zhong *et al.*, 2012) sin embargo, no se utilizaron inhibidores que muestren la participación directa del CYP2E1 en la neurotoxicidad por etanol. De hecho, los autores realizaron un experimento *in vitro* donde utilizan altas concentraciones de etanol para probar la hipótesis (800mM). Las concentraciones probadas en el presente estudio son mucho menores.

Los resultados con acetaminofén difieren un poco con los obtenidos con INH y EtOH. Primero, no es necesario que se agoten los niveles de GSH previamente para poder observar la citotoxicidad. Sin embargo, considerando que el mecanismo de toxicidad del acetaminofén siempre comienza con un agotamiento del GSH, podemos concluir que el GSH es el principal contendiente contra el estrés oxidativo generado por CYP2E1 en la CGC (Figura 33). El tratamiento con acetaminofén genera ROS casi desde el comienzo de la exposición, lo cual hablaría de que, al igual que en el hígado, el metabolismo y la reducción del GSH ocurre con gran rapidez. Aparentemente, ocurren dos picos de inducción de ROS, uno temprano de las 2 a las 4 horas y uno tardío a partir de las 12 horas. Esto posiblemente correlacione con las dos diferentes fases de la hepatotoxicidad de AAP donde primero ocurre el metabolismo y la formación de aductos y después la propagación de la señal de toxicidad. Probablemente el pico de las 4 horas se debe a la inducción del CYP2E1 y la generación de ROS por el agotamiento de glutatión, y las ROS de a partir de las 12 horas correlacionan a las señales de propagación (Figura 13). En estudios posteriores se tiene planeado evaluar la fuente de ROS de las 2, 4 y las 12 horas, así como los tiempos de agotamiento del GSH y la activación del JNK.

Previamente se había demostrado la neurotoxicidad de AAP en cultivos primarios de neuronas corticales, donde se describe una coexistencia de la inducción de la proteína y la actividad del CYP2E1, la generación de ROS y la muerte celular de tipo apoptótica. Sin embargo, en este estudio no se utilizaron inhibidores para confirmar la participación directa del CYP2E1 en la neurotoxicidad por acetaminofén. Tampoco existe una descripción detallada de los sucesos previos a la muerte y el tipo de muerte difiere sustancialmente del tipo de muerte necrótica reportado en células hepáticas (Posadas *et al.*, 2010).

Las concentraciones encontradas en plasma por el tratamiento con AAP en humanos (1 y 2 mM) no generan ningún tipo de daño en las CGC, a diferencia del trabajo previo con neuronas corticales (Posadas *et al.*, 2010). Aparentemente, las neuronas granulares de cerebelo son mucho más resistentes que las corticales a la concentración de AAP. Este fenómeno de resistencia ocurre en cultivos primarios de hepatocitos donde sólo se observa toxicidad a la concentración utilizada en este estudio (10mM) (Ramachandran *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014). Posiblemente ocurre lo mismo que con INH, donde no se cuenta con un modelo *in vitro* que refleje las condiciones *in vivo* (Shen *et al.*, 2006a). Esto probablemente se deba a la participación de otras células del sistema inmune que no se encuentran en los cultivos primarios purificados (Marques *et al.*, 2012).

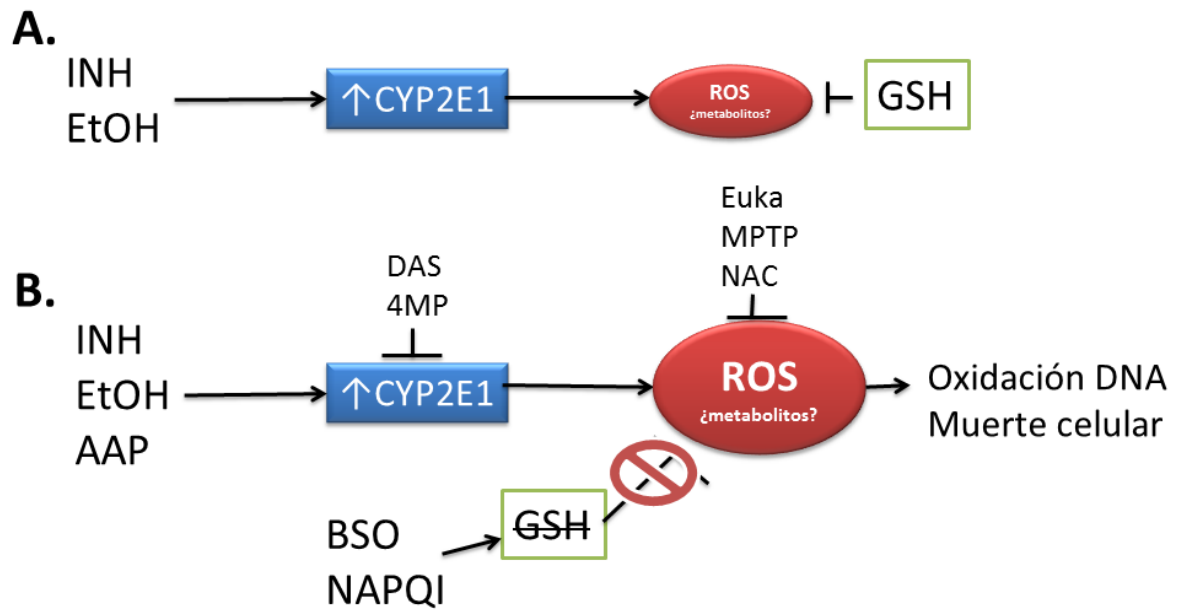


Figura 33. Esquema propuesto de las consecuencias toxicológicas de la inducción del CYP2E1 en CGC. En los cultivos primarios de neuronas de cerebelo (CGC), el CYP2E1 puede inducirse por isoniazida (INH), etanol (EtOH) y acetaminofén (AAP). En el caso de la inducción con INH y EtOH, el glutatión (GSH) de las CGC es suficiente para contener la posible generación de ROS (y/o metabolitos) por el CYP2E1 (A); sin embargo, si se agotan los niveles de GSH ya sea por la inclusión del BSO (inhibidor de la síntesis del GSH) o por la formación del metabolito NAPQI a partir de AAP, los ROS (y/o metabolitos) generados por el CYP2E1 puede resultar en oxidación del DNA celular y muerte neuronal.

La inducción del CYP2E1 por acetaminofén se ha estudiado muy poco y en realidad son pocos los trabajos que reportan este fenómeno (Kim *et al.*, 2007), por lo que no se sabe si es vía estabilización de la proteína o transcripcional. De manera interesante, existe una generación de ROS previo a la inducción del CYP; de manera especulativa, los ROS generados por el agotamiento del GSH son los que puedan inducir a la proteína del CYP2E1, como anteriormente se ha reportado con el tratamiento con etanol (Jin *et al.*, 2013).

Previamente sólo se había sugerido el mecanismo de activación de fármacos en el cerebro en el caso de la clozapina (a la que se le ha asociado la activación metabólica y toxicidad en hígado), que induce el CYP2D4 de cerebro (Hedlund *et al.*, 1996) o la formación de norcocaína identificada en cerebro (Kloss *et al.*, 1984; Valente *et al.*, 2012). En este estudio se comprueba que los fármacos que pueden ser activados y generar daño en el hígado también pueden generar daño en el cerebro. En experimentos posteriores se planea evaluar los metabolitos de INH, EtOH y AAP para confirmar que se están formando y en parte son los responsables de la toxicidad.

En todos los casos, el tratamiento previo con dialil sulfuro (DAS) previene el daño generado por la inducción o actividad del CYP2E1. El DAS es un inhibidor suicida, el cual al ser oxidado a dialil sulfona (DASO₂) se une de manera covalente a la enzima (Brady *et al.*, 1991). Por otro lado, existen evidencias de que el DAS puede promover la respuesta antioxidante vía la inducción de la hemo oxigenasa-1 (Gong *et al.*, 2004), la glutatión S-transferasa (Hu & Singh, 1997), la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (Maurya & Singh, 1991). Sin embargo, la inducción de estas enzimas antioxidantes es lenta y puede ser en baja magnitud (Maurya and Singh 1991, Sparnins *et al.* 1988). En este estudio se analizaron los niveles totales de glutatión con el tratamiento con DAS, sin observar ninguna alteración (datos sin mostrar). Además, en este estudio, se utilizó una concentración previamente reportada de DAS en la cual se inhibe la actividad del CYP2E1 (Yadav *et al.*, 2006), pero no induce las enzimas antioxidantes (Gong *et al.*, 2004). Es importante señalar que el DAS es uno de los principales componentes del ajo (*allium sativum*). De hecho, se puede encontrar en altas concentraciones en el aceite esencial de ajo (Amagase *et al.*, 2001). El aceite esencial se puede encontrar comercialmente en varias tiendas naturistas por lo que en base a los resultados de este estudio se puede sugerir su uso como preventivo de enfermedades neurodegenerativas.

Este trabajo aporta información novedosa sobre el papel potencial del CYP2E1 como generador de daño oxidativo en las células granulares del cerebelo.

IX. CONCLUSIONES

- El CYP2E1 se expresa en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (CGC)
- El CYP2E1 es inducible por isoniazida, etanol y acetaminofén en CGC
- La inducción del CYP2E1 implica generación de ROS y muerte celular en células con niveles bajos de glutatión
- El glutatión participa de manera importante en la defensa antioxidante de las neuronas granulares de cerebelo ante la actividad del CYP2E1
- La generación de ROS por CYP2E1 en células con niveles bajos de glutatión puede derivar en oxidación del DNA
- El CYP2E1 puede actuar de manera conjunta con otras enzimas oxidantes como la NOX en el proceso de muerte celular
- El acetaminofén puede ser neurotóxico por la actividad del CYP2E1 en CGC
- El CYP2E1 en cerebelo participa en la neurotoxicidad de fármacos

X REFERENCIAS

- Abdelmegeed, M.A., Moon, K.H., Chen, C., Gonzalez, F.J. & Song, B.J. (2010) Role of cytochrome P450 2E1 in protein nitration and ubiquitin-mediated degradation during acetaminophen toxicity. *Biochemical pharmacology*, **79**, 57-66.
- Abdulla, D., Goralski, K.B. & Renton, K.W. (2006) The regulation of cytochrome P450 2E1 during LPS-induced inflammation in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, **216**, 1-10.
- Agrawal, S., Singh, I., Kaur, K.J., Bhade, S.R., Kaul, C.L. & Panchagnula, R. (2004) Comparative bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide from a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. *International journal of pharmaceuticals*, **276**, 41-49.
- Agundez, J.A. (2004) Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Current drug metabolism*, **5**, 211-224.
- Albano, E., Comoglio, A., Clot, P., Iannone, A., Tomasi, A. & Ingelman-Sundberg, M. (1995) Activation of alkylhydrazines to free radical intermediates by ethanol-inducible cytochrome P-4502E1 (CYP2E1). *Biochimica et biophysica acta*, **1243**, 414-420.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S. & Itakura, Y. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, **131**, 955S-962S.
- An, H.R., Wu, X.Q., Wang, Z.Y., Zhang, J.X. & Liang, Y. (2012) NAT2 and CYP2E1 polymorphisms associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese patients. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **39**, 535-543.
- Anandatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K., Bhamre, S., Boyd, M.R., Song, B.J. & Ravindranath, V. (1993a) Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain research*, **601**, 279-285.
- Anandatheerthavarada, H.K., Williams, J.F. & Wecker, L. (1993b) Differential effect of chronic nicotine administration on brain cytochrome P4501A1/2 and P4502E1. *Biochemical and biophysical research communications*, **194**, 312-318.
- Andersen, J.K. (2004) Iron dysregulation and Parkinson's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **6**, S47-52.
- Arinc, E., Arslan, S., Bozcaarmutlu, A. & Adali, O. (2007) Effects of diabetes on rabbit kidney and lung CYP2E1 and CYP2B4 expression and drug metabolism and potentiation of carcinogenic activity of N-nitrosodimethylamine in kidney and lung. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **45**, 107-118.
- Atkinson, A., Singleton, A.B., Steward, A., Ince, P.G., Perry, R.H., McKeith, I.G., Fairbairn, A.F., Edwardson, J.A., Daly, A.K. & Morris, C.M. (1999) CYP2D6 is associated with Parkinson's disease but not with dementia with Lewy Bodies or Alzheimer's disease. *Pharmacogenetics*, **9**, 31-35.
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N. & Garcia-Segura, L.M. (2001) Brain aromatase is neuroprotective. *Journal of neurobiology*, **47**, 318-329.
- Backman, J.T., Olkkola, K.T., Ojala, M., Laaksovirta, H. & Neuvonen, P.J. (1996) Concentrations and effects of oral midazolam are greatly reduced in patients treated with carbamazepine or phenytoin. *Epilepsia*, **37**, 253-257.
- Bae, M.A., Pie, J.E. & Song, B.J. (2001) Acetaminophen induces apoptosis of C6 glioma cells by activating the c-Jun NH(2)-terminal protein kinase-related cell death pathway. *Molecular pharmacology*, **60**, 847-856.
- Bagdas, D., Muldoon, P.P., Zhu, A.Z., Tyndale, R.F. & Damaj, M.I. (2014) Effects of methoxsalen, a CYP2A5/6 inhibitor, on nicotine dependence behaviors in mice. *Neuropharmacology*, **85**, 67-72.
- Bai, J. & Cederbaum, A.I. (2001) Adenovirus-mediated overexpression of catalase in the cytosolic or mitochondrial compartment protects against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity in HepG2 cells. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 4315-4321.
- Bai, J. & Cederbaum, A.I. (2004) Adenovirus mediated overexpression of CYP2E1 increases sensitivity of HepG2 cells to acetaminophen induced cytotoxicity. *Molecular and cellular biochemistry*, **262**, 165-176.
- Bai, J. & Cederbaum, A.I. (2006) Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cells to the toxicity caused by depletion of glutathione. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 5128-5136.
- Baillie, T.A. & Rettie, A.E. (2011) Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, **26**, 15-29.
- Bains, J.S. & Shaw, C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain research. Brain research reviews*, **25**, 335-358.
- Bajt, M.L., Farhood, A., Lemasters, J.J. & Jaeschke, H. (2008) Mitochondrial bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **324**, 8-14.

- Banerjee, A., Kocarek, T.A. & Novak, R.F. (2000) Identification of a ubiquitination-Target/Substrate-interaction domain of cytochrome P-450 (CYP) 2E1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **28**, 118-124.
- Bardag-Gorce, F., Li, J., French, B.A. & French, S.W. (2002) Ethanol withdrawal induced CYP2E1 degradation in vivo, blocked by proteasomal inhibitor PS-341. *Free radical biology & medicine*, **32**, 17-21.
- Bardag-Gorce, F., Yuan, Q.X., Li, J., French, B.A., Fang, C., Ingelman-Sundberg, M. & French, S.W. (2000) The effect of ethanol-induced cytochrome p4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol. *Biochemical and biophysical research communications*, **279**, 23-29.
- Bechtold, M.M., Gee, D.L., Bruenner, U. & Tappel, A.L. (1982) Carbon tetrachloride-mediated expiration of pentane and chloroform by the intact rat: the effects of pretreatment with diethyl maleate, SKF-525A and phenobarbital. *Toxicology letters*, **11**, 165-171.
- Bell, L.C. & Guengerich, F.P. (1997) Oxidation kinetics of ethanol by human cytochrome P450 2E1. Rate-limiting product release accounts for effects of isotopic hydrogen substitution and cytochrome b5 on steady-state kinetics. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 29643-29651.
- Bhagwat, S.V., Boyd, M.R. & Ravindranath, V. (1995) Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Archives of biochemistry and biophysics*, **320**, 73-83.
- Bhamre, S., Anandatheerthavarada, H.K., Shankar, S.K. & Ravindranath, V. (1992) Microsomal Cytochrome P450 in Human Brain-Regions. *Biochemical pharmacology*, **44**, 1223-1225.
- Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Stahle, L., Ahlborg, G. & Wahren, J. (1998) Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *Journal of lipid research*, **39**, 1594-1600.
- Black, M., Mitchell, J.R., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G. & Epler, G.R. (1975) Isoniazid-associated hepatitis in 114 patients. *Gastroenterology*, **69**, 289-302.
- Blanck, J., Ristau, O., Zhukov, A.A., Archakov, A.I., Rein, H. & Ruckpaul, K. (1991) Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **21**, 121-135.
- Blumberg, E.A. & Gil, R.A. (1990) Cerebellar syndrome caused by isoniazid. *DICP : the annals of pharmacotherapy*, **24**, 829-831.
- Bolt, H.M., Roos, P.H. & Thier, R. (2003) The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine. *International archives of occupational and environmental health*, **76**, 174-185.
- Bon, M.A., Jansen Steur, E.N., de Vos, R.A. & Vermes, I. (1999) Neurogenetic correlates of Parkinson's disease: apolipoprotein-E and cytochrome P450 2D6 genetic polymorphism. *Neuroscience letters*, **266**, 149-151.
- Borroni, B., Archetti, S., Agosti, C., Akkawi, N., Brambilla, C., Caimi, L., Caltagirone, C., Di Luca, M. & Padovani, A. (2004) Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer Disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiology of aging*, **25**, 747-751.
- Bose, P.D., Sama, M.P., Medhi, S., Das, B.C., Husain, S.A. & Kar, P. (2011) Role of polymorphic N-acetyl transferase2 and cytochrome P4502E1 gene in antituberculosis treatment-induced hepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **26**, 312-318.
- Boutelet-Bochan, H., Huang, Y. & Juchau, M.R. (1997) Expression of CYP2E1 during embryogenesis and fetogenesis in human cephalic tissues: implications for the fetal alcohol syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*, **238**, 443-447.
- Bradford, B.U., Kono, H., Isayama, F., Kosyk, O., Wheeler, M.D., Akiyama, T.E., Bleye, L., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., Koop, D.R. & Rusyn, I. (2005) Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology*, **41**, 336-344.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brady, J.F., Ishizaki, H., Fukuto, J.M., Lin, M.C., Fadel, A., Gapac, J.M. & Yang, C.S. (1991) Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chemical research in toxicology*, **4**, 642-647.
- Bromek, E., Haduch, A., Golembiowska, K. & Daniel, W.A. (2011) Cytochrome P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *Journal of neurochemistry*, **118**, 806-815.
- Brust, J.C. (2010) Ethanol and cognition: indirect effects, neurotoxicity and neuroprotection: a review. *International journal of environmental research and public health*, **7**, 1540-1557.
- Brzezinski, M.R., Boutelet-Bochan, H., Person, R.E., Fantel, A.G. & Juchau, M.R. (1999) Catalytic activity and quantitation of cytochrome P-450 2E1 in prenatal human brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **289**, 1648-1653.
- Budd, S.L., Castilho, R.F. & Nicholls, D.G. (1997) Mitochondrial membrane potential and hydroethidine-monitored superoxide generation in cultured cerebellar granule cells. *FEBS letters*, **415**, 21-24.
- Cannady, E.A., Dyer, C.A., Christian, P.J., Sipes, I.G. & Hoyer, P.B. (2003) Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **73**, 423-430.

- Carlson, H.B., Anthony, E.M., Russell, W.F., Jr. & Middlebrook, G. (1956) Prophylaxis of isoniazid neuropathy with pyridoxine. *The New England journal of medicine*, **255**, 119-122.
- Carmo, H., Brulport, M., Hermes, M., Oesch, F., Silva, R., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Boer, D., Remiao, F., Carvalho, F., Schon, M.R., Krebsfaenger, N., Doehmer, J., Bastos Mde, L. & Hengstler, J.G. (2006) Influence of CYP2D6 polymorphism on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') cytotoxicity. *Pharmacogenetics and genomics*, **16**, 789-799.
- Caro, A.A. & Cederbaum, A.I. (2001) Synergistic toxicity of iron and arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Molecular pharmacology*, **60**, 742-752.
- Caro, A.A. & Cederbaum, A.I. (2004) Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **44**, 27-42.
- Carpenter, S.P., Lasker, J.M. & Raucy, J.L. (1996) Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Molecular pharmacology*, **49**, 260-268.
- Carroll, M.A., Balazy, M., Margiotta, P., Huang, D.D., Falck, J.R. & McGiff, J.C. (1996) Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. *The American journal of physiology*, **271**, R863-869.
- Cederbaum, A.I. (1991) Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol Suppl*, **1**, 291-296.
- Cederbaum, A.I. (2006) Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **21 Suppl 3**, S22-25.
- Cederbaum, A.I., Wu, D., Mari, M. & Bai, J. (2001) CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free radical biology & medicine*, **31**, 1539-1543.
- Cohn, J.A., Alvares, A.P. & Kappas, A. (1977) On the occurrence of cytochrome P-450 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat brain. *J Exp Med*, **145**, 1607-1611.
- Contestabile, A. (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *Cerebellum*, **1**, 41-55.
- Correa, M., Viaggi, C., Escrig, M.A., Pascual, M., Guerri, C., Vaglini, F., Aragon, C.M. & Corsini, G.U. (2009) Ethanol intake and ethanol-induced locomotion and locomotor sensitization in Cyp2e1 knockout mice. *Pharmacogenetics and genomics*, **19**, 217-225.
- Cowpland, C., Su, G.M., Murray, M., Puddey, I.B. & Croft, K.D. (2006) Effect of alcohol on cytochrome p450 arachidonic acid metabolism and blood pressure in rats and its modulation by red wine polyphenolics. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **33**, 183-188.
- Coyoy, A., Valencia, A., Gumez-Gamboa, A. & Moran, J. (2008) Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free radical biology & medicine*, **45**, 1056-1064.
- Cropp, J.S. & Bussey, H.I. (1997) A review of enzyme induction of warfarin metabolism with recommendations for patient management. *Pharmacotherapy*, **17**, 917-928.
- Cummings, B.S., Parker, J.C. & Lash, L.H. (2001) Cytochrome p450-dependent metabolism of trichloroethylene in rat kidney. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **60**, 11-19.
- Chan, D.K., Mellick, G.D., Buchanan, D.D., Hung, W.T., Ng, P.W., Woo, J. & Kay, R. (2002) Lack of association between CYP1A1 polymorphism and Parkinson's disease in a Chinese population. *Journal of neural transmission*, **109**, 35-39.
- Chavez, P.R., Lian, F., Chung, J., Liu, C., Paiva, S.A., Seitz, H.K. & Wang, X.D. (2011) Long-term ethanol consumption promotes hepatic tumorigenesis but impairs normal hepatocyte proliferation in rats. *The Journal of nutrition*, **141**, 1049-1055.
- Chen, C., Hennig, G.E. & Manautou, J.E. (2003) Hepatobiliary excretion of acetaminophen glutathione conjugate and its derivatives in transport-deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **31**, 798-804.
- Chen, C., Krausz, K.W., Idle, J.R. & Gonzalez, F.J. (2008) Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 4543-4559.
- Chen, L., Lee, M., Hong, J.Y., Huang, W., Wang, E. & Yang, C.S. (1994) Relationship between cytochrome P450 2E1 and acetone catabolism in rats as studied with diallyl sulfide as an inhibitor. *Biochemical pharmacology*, **48**, 2199-2205.
- Chen, Q. & Cederbaum, A.I. (1998) Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Molecular pharmacology*, **53**, 638-648.
- Chen, Q., Galleano, M. & Cederbaum, A.I. (1998) Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing human cytochrome P-4502E1. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **22**, 782-784.

- Chen, X., Sun, C.K., Han, G.Z., Peng, J.Y., Li, Y., Liu, Y.X., Lv, Y.Y., Liu, K.X., Zhou, Q. & Sun, H.J. (2009) Protective effect of tea polyphenols against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice is significantly correlated with cytochrome P450 suppression. *World journal of gastroenterology : WJG*, **15**, 1829-1835.
- Chien, J.Y., Peter, R.M., Nolan, C.M., Wartell, C., Slattery, J.T., Nelson, S.D., Carithers, R.L., Jr. & Thummel, K.E. (1997) Influence of polymorphic N-acetyltransferase phenotype on the inhibition and induction of acetaminophen bioactivation with long-term isoniazid. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **61**, 24-34.
- Chilakapati, J., Korrapati, M.C., Shankar, K., Hill, R.A., Warbritton, A., Latendresse, J.R. & Mehendale, H.M. (2007) Role of CYP2E1 and saturation kinetics in the bioactivation of thioacetamide: Effects of diet restriction and phenobarbital. *Toxicology and applied pharmacology*, **219**, 72-84.
- Chowdhury, A., Santra, A., Bhattacharjee, K., Ghatak, S., Saha, D.R. & Dhali, G.K. (2006) Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. *Journal of hepatology*, **45**, 117-126.
- Dai, Y. & Cederbaum, A.I. (1995) Cytotoxicity of acetaminophen in human cytochrome P450E1-transfected HepG2 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **273**, 1497-1505.
- Dai, Y., Rashba-Step, J. & Cederbaum, A.I. (1993) Stable expression of human cytochrome P450E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry*, **32**, 6928-6937.
- Danko, I.M. & Chaschin, N.A. (2005) Association of CYP2E1 gene polymorphism with predisposition to cancer development. *Experimental oncology*, **27**, 248-256.
- Das, A., Grinkova, Y.V. & Sligar, S.G. (2007) Redox potential control by drug binding to cytochrome P450 3A4. *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 13778-13779.
- Das, J., Ghosh, J., Manna, P. & Sil, P.C. (2010) Taurine protects acetaminophen-induced oxidative damage in mice kidney through APAP urinary excretion and CYP2E1 inactivation. *Toxicology*, **269**, 24-34.
- De Roos, A.J., Rothman, N., Inskip, P.D., Linet, M.S., Shapiro, W.R., Selker, R.G., Fine, H.A., Black, P.M., Pittman, G.S. & Bell, D.A. (2003) Genetic polymorphisms in GSTM1, -P1, -T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, **12**, 14-22.
- Dey, A., Kessova, I.G. & Cederbaum, A.I. (2006) Decreased protein and mRNA expression of ER stress proteins GRP78 and GRP94 in HepG2 cells over-expressing CYP2E1. *Archives of biochemistry and biophysics*, **447**, 155-166.
- Dey, A., Parmar, D., Dhawan, A., Dash, D. & Seth, P.K. (2002) Cytochrome P450 2E1 dependent catalytic activity and lipid peroxidation in rat blood lymphocytes. *Life sciences*, **71**, 2509-2519.
- Ding, X. & Kaminsky, L.S. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 149-173.
- Donato, M.T. (2004) Qué es el Citocromo P-450 y cómo funciona. Realigraf Madrid, Spain, Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia.
- Dorado, P., Penas-Lledo, E.M. & Llerena, A. (2007) CYP2D6 polymorphism: implications for antipsychotic drug response, schizophrenia and personality traits. *Pharmacogenomics*, **8**, 1597-1608.
- Druesne-Pecollo, N., Tehard, B., Mallet, Y., Gerber, M., Norat, T., Hercberg, S. & Latino-Martel, P. (2009) Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *The lancet oncology*, **10**, 173-180.
- Dutheil, F., Beaune, P. & Lorient, M.A. (2008) Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie*, **90**, 426-436.
- Eid, A.A., Gorin, Y., Fagg, B.M., Maalouf, R., Barnes, J.L., Block, K. & Abboud, H.E. (2009) Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. *Diabetes*, **58**, 1201-1211.
- Ekstrom, G. & Ingelman-Sundberg, M. (1989) Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochemical pharmacology*, **38**, 1313-1319.
- Elbaz, A., Leveque, C., Clavel, J., Vidal, J.S., Richard, F., Amouyel, P., Alperovitch, A., Chartier-Harlin, M.C. & Tzourio, C. (2004) CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Annals of neurology*, **55**, 430-434.
- Eliasson, E., Johansson, I. & Ingelman-Sundberg, M. (1988) Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochemical and biophysical research communications*, **150**, 436-443.
- Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **58**, 39-46.
- Epstein, M.M., Nelson, S.D., Slattery, J.T., Kalhorn, T.F., Wall, R.A. & Wright, J.M. (1991) Inhibition of the metabolism of paracetamol by isoniazid. *British journal of clinical pharmacology*, **31**, 139-142.

- Eysseric, H., Gonthier, B., Soubeyran, A., Bessard, G., Saxod, R. & Barret, L. (1997) There is not simple method to maintain a constant ethanol concentration in long-term cell culture: keys to a solution applied to the survey of astrocytic ethanol absorption. *Alcohol*, **14**, 111-115.
- Fadda, F. & Rossetti, Z.L. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in neurobiology*, **56**, 385-431.
- Farin, F.M. & Omiecinski, C.J. (1993) Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *Journal of toxicology and environmental health*, **40**, 317-335.
- Ferguson, C.S., Miksys, S., Palmour, R.M. & Tyndale, R.F. (2013) Ethanol self-administration and nicotine treatment induce brain levels of CYP2B6 and CYP2E1 in African green monkeys. *Neuropharmacology*, **72**, 74-81.
- Ferguson, C.S. & Tyndale, R.F. (2011) Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends in pharmacological sciences*, **32**, 708-714.
- Florencia Fernández-Barocio, M.d.C.S.S.-V. (2013) Epidemiología de las intoxicaciones en el Servicio de Urgencias Pediátricas de un Hospital de Tercer Nivel. Reporte de cinco años. *Archivos de Medicina de Urgencia de México*, **5**, 18-24.
- Fradette, C., Yamaguchi, N. & Du Souich, P. (2004) 5-Hydroxytryptamine is biotransformed by CYP2C9, 2C19 and 2B6 to hydroxylamine, which is converted into nitric oxide. *British journal of pharmacology*, **141**, 407-414.
- French, S.W., Mayer, R.J., Bardag-Gorce, F., Ingelman-Sundberg, M., Rouach, H., Neve & Higashitsuji, H. (2001) The ubiquitin-proteasome 26S pathway in liver cell protein turnover: effect of ethanol and drugs. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **25**, 225S-229S.
- Funk, C., Ponelle, C., Scheuermann, G. & Pantze, M. (2001) Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: in vivo and in vitro interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Molecular pharmacology*, **59**, 627-635.
- Furge, L.L. & Guengerich, F.P. (2006) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochem Mol Biol Educ*, **34**, 66-74.
- Gallelli, L., Colosimo, M., Tolotta, G.A., Falcone, D., Luberto, L., Curto, L.S., Rende, P., Mazzei, F., Marigliano, N.M., De Sarro, G. & Cucchiara, S. (2010) Prospective randomized double-blind trial of racecadotril compared with loperamide in elderly people with gastroenteritis living in nursing homes. *European journal of clinical pharmacology*, **66**, 137-144.
- García-Banuelos, J., Panduro, A., Gordillo-Bastidas, D., Gordillo-Bastidas, E., Muñoz-Valle, J.F., Gurrola-Díaz, C.M., Sánchez-Enríquez, S., Ruiz-Madrigal, B. & Bastidas-Ramírez, B.E. (2012) Genetic polymorphisms of genes coding to alcohol-metabolizing enzymes in western Mexicans: association of CYP2E1*2/CYP2E1*5B allele with cirrhosis and liver function. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **36**, 425-431.
- Garner, C.E., Sloan, C., Sumner, S.C., Burgess, J., Davis, J., Etheridge, A., Parham, A. & Ghanayem, B.I. (2007) CYP2E1-catalyzed oxidation contributes to the sperm toxicity of 1-bromopropane in mice. *Biology of reproduction*, **76**, 496-505.
- Garro, A.J., Seitz, H.K. & Lieber, C.S. (1981) Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer research*, **41**, 120-124.
- Gebremedhin, D., Lange, A.R., Lowry, T.F., Taheri, M.R., Birks, E.K., Hudetz, A.G., Narayanan, J., Falck, J.R., Okamoto, H., Roman, R.J., Nithipatikom, K., Campbell, W.B. & Harder, D.R. (2000) Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circulation research*, **87**, 60-65.
- Ghanayem, B.I. & Hoffer, U. (2007) Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1(-/-) mice. *Current drug metabolism*, **8**, 728-749.
- Ghanayem, B.I., Witt, K.L., Kissling, G.E., Tice, R.R. & Recio, L. (2005) Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutation research*, **578**, 284-297.
- Ginter, E. & Simko, V. (2009) Alcoholism: recent advances in epidemiology, biochemistry and genetics. *Bratislavské lekárske listy*, **110**, 307-311.
- Glew, R.H. (2010) You can get there from here: acetone, anionic ketones and even-carbon fatty acids can provide substrates for gluconeogenesis. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*, **25**, 2-4.
- Goasduff, T. & Cederbaum, A.I. (2000) CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of the molecular chaperone hsp90. *Archives of biochemistry and biophysics*, **379**, 321-330.
- Gong, P., Hu, B. & Cederbaum, A.I. (2004) Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*, **432**, 252-260.
- Gonzalez, F.J. (2007) The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **35**, 1-8.
- Gorsky, L.D., Koop, D.R. & Coon, M.J. (1984) On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *The Journal of biological chemistry*, **259**, 6812-6817.

- Gouillon, Z., Lucas, D., Li, J., Hagbjork, A.L., French, B.A., Fu, P., Fang, C., Ingelman-Sundberg, M., Donohue, T.M., Jr. & French, S.W. (2000) Inhibition of ethanol-induced liver disease in the intragastric feeding rat model by chlormethiazole. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*, **224**, 302-308.
- Grange, J.M., Winstanley, P.A. & Davies, P.D. (1994) Clinically significant drug interactions with antituberculosis agents. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*, **11**, 242-251.
- Grove, J., Brown, A.S., Daly, A.K., Bassendine, M.F., James, O.F. & Day, C.P. (1998) The Rsa1 polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype. *Pharmacogenetics*, **8**, 335-342.
- Guengerich, F.P. (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical research in toxicology*, **21**, 70-83.
- Guengerich, F.P. & Johnson, W.W. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. *Biochemistry*, **36**, 14741-14750.
- Gujral, J.S., Knight, T.R., Farhood, A., Bajit, M.L. & Jaeschke, H. (2002) Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **67**, 322-328.
- Gurumurthy, P., Rahman, F., Narayana, A.S. & Sarma, G.R. (1990) Salivary levels of isoniazid and rifampicin in tuberculous patients. *Tubercle*, **71**, 29-33.
- Haining, R.L. & Nichols-Haining, M. (2007) Cytochrome P450-catalyzed pathways in human brain: metabolism meets pharmacology or old drugs with new mechanism of action? *Pharmacology & therapeutics*, **113**, 537-545.
- Hall, A.G. (1999) Glutathione and the regulation of cell death. *Adv Exp Med Biol*, **457**, 199-203.
- Han, D., Dara, L., Win, S., Than, T.A., Yuan, L., Abbasi, S.Q., Liu, Z.X. & Kaplowitz, N. (2013) Regulation of drug-induced liver injury by signal transduction pathways: critical role of mitochondria. *Trends in pharmacological sciences*, **34**, 243-253.
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberli, B., Gaarde, W.A., Han, D. & Kaplowitz, N. (2008) Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 13565-13577.
- Hansson, T., Tindberg, N., Ingelman-Sundberg, M. & Kohler, C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **34**, 451-463.
- Hao, C., Liu, W., Luan, X., Li, Y., Gui, H., Peng, Y., Shen, J., Hu, G. & Yang, J. (2010) Aquaporin-4 knockout enhances astrocyte toxicity induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and lipopolysaccharide via increasing the expression of cytochrome P4502E1. *Toxicology letters*, **198**, 225-231.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Floreani, N., Gorantla, S., Morsey, B. & Persidsky, Y. (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free radical biology & medicine*, **45**, 1542-1550.
- Hase, I., Imaoka, S., Oda, Y., Hiroi, T., Nakamoto, T., Asada, A. & Funae, Y. (2000) Area under the plasma concentration-time curve of inorganic fluoride following sevoflurane anesthesia correlates with CYP2E1 mRNA level in mononuclear cells. *Anesthesiology*, **92**, 1661-1666.
- Hedlund, E., Wyss, A., Kainu, T., Backlund, M., Kohler, C., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J.A. & Warner, M. (1996) Cytochrome P4502D4 in the brain: specific neuronal regulation by clozapine and toluene. *Molecular pharmacology*, **50**, 342-350.
- Heit, C., Dong, H., Chen, Y., Thompson, D.C., Deitrich, R.A. & Vasiliou, V.K. (2013) The role of CYP2E1 in alcohol metabolism and sensitivity in the central nervous system. *Sub-cellular biochemistry*, **67**, 235-247.
- Hinson, J.A., Reid, A.B., McCullough, S.S. & James, L.P. (2004) Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug metabolism reviews*, **36**, 805-822.
- Hipolito, L., Sanchez-Catalan, M.J., Zanolini, I., Polache, A. & Granero, L. (2008) Shell/core differences in mu- and delta-opioid receptor modulation of dopamine efflux in nucleus accumbens. *Neuropharmacology*, **55**, 183-189.
- Hiroi, T., Kishimoto, W., Chow, T., Imaoka, S., Igarashi, T. & Funae, Y. (2001) Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology*, **142**, 3901-3908.
- Hitchon, C.A. & El-Gabalawy, H.S. (2004) Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, **6**, 265-278.
- Hodgson, A.V., White, T.B., White, J.W. & Strobel, H.W. (1993) Expression analysis of the mixed function oxidase system in rat brain by the polymerase chain reaction. *Molecular and cellular biochemistry*, **120**, 171-179.
- Hoffler, U., Dixon, D., Peddada, S. & Ghanayem, B.I. (2005) Inhibition of urethane-induced genotoxicity and cell proliferation in CYP2E1-null mice. *Mutation research*, **572**, 58-72.
- Hoffler, U., El-Masri, H.A. & Ghanayem, B.I. (2003) Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is the principal enzyme responsible for urethane metabolism: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **305**, 557-564.

- Howard, L.A., Ahluwalia, J.S., Lin, S.K., Sellers, E.M. & Tyndale, R.F. (2003a) CYP2E1*1D regulatory polymorphism: association with alcohol and nicotine dependence. *Pharmacogenetics*, **13**, 321-328.
- Howard, L.A., Miksys, S., Hoffmann, E., Mash, D. & Tyndale, R.F. (2003b) Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *British journal of pharmacology*, **138**, 1376-1386.
- Hu, X. & Singh, S.V. (1997) Glutathione S-transferases of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic. *Archives of biochemistry and biophysics*, **340**, 279-286.
- Huan, J.Y., Streicher, J.M., Bleye, L.A. & Koop, D.R. (2004) Proteasome-dependent degradation of cytochromes P450 2E1 and 2B1 expressed in tetracycline-regulated HeLa cells. *Toxicology and applied pharmacology*, **199**, 332-343.
- Huang, P., Rannug, A., Ahlbom, E., Hakansson, H. & Ceccatelli, S. (2000) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of cytochrome P450 1A1, the aryl hydrocarbon receptor, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in rat brain and pituitary. *Toxicology and applied pharmacology*, **169**, 159-167.
- Huang, Y.S. (2007) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **3**, 1-8.
- Huang, Y.S., Chern, H.D., Su, W.J., Wu, J.C., Chang, S.C., Chiang, C.H., Chang, F.Y. & Lee, S.D. (2003) Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. *Hepatology*, **37**, 924-930.
- Huentelman, M.J., Peters, C.M., Ervine, W.E., Polutnik, S.M. & Johnson, P. (1999) Ethanol has differential effects on rat neuron and thymocyte reactive oxygen species levels and cell viability. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **124**, 83-89.
- INEGI (2014) Causas de defunción, Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México.
- Ioannides, C. (1996) *Cytochromes P450 : metabolic and toxicological aspects*. CRC Press, Boca Raton.
- Iwahashi, K., Ameno, S., Ameno, K., Okada, N., Kinoshita, H., Sakae, Y., Nakamura, K., Watanabe, M., Ijiri, I. & Harada, S. (1998) Relationship between alcoholism and CYP2E1 C/D polymorphism. *Neuropsychobiology*, **38**, 218-221.
- Jaeschke, H. & Bajt, M.L. (2006) Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **89**, 31-41.
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D. & Lemasters, J.J. (2002) Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **65**, 166-176.
- Jaeschke, H., Knight, T.R. & Bajt, M.L. (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology letters*, **144**, 279-288.
- Jaeschke, H., McGill, M.R. & Ramachandran, A. (2012) Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, **44**, 88-106.
- James, L.P., Mayeux, P.R. & Hinson, J.A. (2003) Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **31**, 1499-1506.
- Jenner, P. (1998) Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **13 Suppl 1**, 24-34.
- Jewell, H., Maggs, J.L., Harrison, A.C., O'Neill, P.M., Ruscoe, J.E. & Park, B.K. (1995) Role of hepatic metabolism in the bioactivation and detoxication of amodiaquine. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **25**, 199-217.
- Jin, M., Ande, A., Kumar, A. & Kumar, S. (2013) Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated pkc/jnk/sp1 pathway. *Cell death & disease*, **4**, e554.
- Johnell, K. & Klarin, I. (2007) The relationship between number of drugs and potential drug-drug interactions in the elderly: a study of over 600,000 elderly patients from the Swedish Prescribed Drug Register. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*, **30**, 911-918.
- Johnson, E.F. & Stout, C.D. (2013) Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome p450s. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 17082-17090.
- Johri, A., Yadav, S., Dhawan, A. & Parmar, D. (2007) Overexpression of cerebral and hepatic cytochrome P450s alters behavioral activity of rat offspring following prenatal exposure to lindane. *Toxicology and applied pharmacology*, **225**, 278-292.
- Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R. & Brodie, B.B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **187**, 195-202.

- Joshi, M. & Tyndale, R.F. (2006a) Induction and recovery time course of rat brain CYP2E1 after nicotine treatment. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **34**, 647-652.
- Joshi, M. & Tyndale, R.F. (2006b) Regional and cellular distribution of CYP2E1 in monkey brain and its induction by chronic nicotine. *Neuropharmacology*, **50**, 568-575.
- Kalgutkar, A.S., Henne, K.R., Lame, M.E., Vaz, A.D., Collin, C., Soglia, J.R., Zhao, S.X. & Hop, C.E. (2005a) Metabolic activation of the nontricyclic antidepressant trazodone to electrophilic quinone-imine and epoxide intermediates in human liver microsomes and recombinant P4503A4. *Chemico-biological interactions*, **155**, 10-20.
- Kalgutkar, A.S., Vaz, A.D., Lame, M.E., Henne, K.R., Soglia, J., Zhao, S.X., Abramov, Y.A., Lombardo, F., Collin, C., Hendsch, Z.S. & Hop, C.E. (2005b) Bioactivation of the nontricyclic antidepressant nefazodone to a reactive quinone-imine species in human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 3A4. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **33**, 243-253.
- Kapoor, N., Pant, A.B., Dhawan, A., Dwivedi, U.N., Gupta, Y.K., Seth, P.K. & Parmar, D. (2006) Differences in sensitivity of cultured rat brain neuronal and glial cytochrome P450 2E1 to ethanol. *Life sciences*, **79**, 1514-1522.
- Kapoor, N., Pant, A.B., Dhawan, A., Dwivedi, U.N., Seth, P.K. & Parmar, D. (2007) Differences in the expression and inducibility of cytochrome P450 2B isoenzymes in cultured rat brain neuronal and glial cells. *Molecular and cellular biochemistry*, **305**, 199-207.
- Kass, J.S. & Shandera, W.X. (2010) Nervous system effects of antituberculosis therapy. *CNS drugs*, **24**, 655-667.
- Kattner, E., Dubbels, R. & Schloot, W. (1981) Acetylation of procainamide and isoniazid by a rat liver-N-acetyl-transferase. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, **6**, 81-84.
- Kaut, O., Schmitt, I. & Wullner, U. (2012) Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics*, **13**, 87-91.
- Kawashima, H. & Strobel, H.W. (1995) cDNA cloning of a novel rat brain cytochrome P450 belonging to the CYP2D subfamily. *Biochemical and biophysical research communications*, **209**, 535-540.
- Kessova, I. & Cederbaum, A.I. (2003) CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Current molecular medicine*, **3**, 509-518.
- Khemawoot, P., Nishino, K., Ishizaki, J., Yokogawa, K. & Miyamoto, K. (2007) Circadian rhythm of cytochrome P4502E1 and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in rats. *European journal of pharmacology*, **574**, 71-76.
- Khokhar, J.Y., Ferguson, C.S., Zhu, A.Z. & Tyndale, R.F. (2010a) Pharmacogenetics of drug dependence: role of gene variations in susceptibility and treatment. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **50**, 39-61.
- Khokhar, J.Y., Miksys, S.L. & Tyndale, R.F. (2010b) Rat brain CYP2B induction by nicotine is persistent and does not involve nicotinic acetylcholine receptors. *Brain research*, **1348**, 1-9.
- Khokhar, J.Y. & Tyndale, R.F. (2011) Drug metabolism within the brain changes drug response: selective manipulation of brain CYP2B alters propofol effects. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, **36**, 692-700.
- Khokhar, J.Y. & Tyndale, R.F. (2012) Rat brain CYP2B-enzymatic activation of chlorpyrifos to the oxon mediates cholinergic neurotoxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, **126**, 325-335.
- Kim, R.B., Yamazaki, H., Chiba, K., O'Shea, D., Mimura, M., Guengerich, F.P., Ishizaki, T., Shimada, T. & Wilkinson, G.R. (1996) In vivo and in vitro characterization of CYP2E1 activity in Japanese and Caucasians. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **279**, 4-11.
- Kim, S.G. & Novak, R.F. (1990) Induction of rat hepatic P450IIE1 (CYP 2E1) by pyridine: evidence for a role of protein synthesis in the absence of transcriptional activation. *Biochemical and biophysical research communications*, **166**, 1072-1079.
- Kim, S.N., Seo, J.Y., Jung da, W., Lee, M.Y., Jung, Y.S. & Kim, Y.C. (2007) Induction of hepatic CYP2E1 by a subtoxic dose of acetaminophen in rats: increase in dichloromethane metabolism and carboxyhemoglobin elevation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **35**, 1754-1758.
- Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, **75**, 376-386.
- Kloss, M.W., Rosen, G.M. & Rauckman, E.J. (1984) Biotransformation of norcocaine to norcocaine nitroside by rat brain microsomes. *Psychopharmacology*, **84**, 221-224.
- Knockaert, L., Descatoire, V., Vadrot, N., Fromenty, B. & Robin, M.A. (2011) Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, **25**, 475-484.
- Kocarek, T.A., Zangar, R.C. & Novak, R.F. (2000) Post-transcriptional regulation of rat CYP2E1 expression: role of CYP2E1 mRNA untranslated regions in control of translational efficiency and message stability. *Archives of biochemistry and biophysics*, **376**, 180-190.

- Kolsch, H., Lutjohann, D., Ludwig, M., Schulte, A., Ptok, U., Jessen, F., von Bergmann, K., Rao, M.L., Maier, W. & Heun, R. (2002) Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, **7**, 899-902.
- Komori, M. (1993) A novel P450 expressed at the high level in rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*, **196**, 721-728.
- Koop, D.R., Morgan, E.T., Tarr, G.E. & Coon, M.J. (1982) Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 8472-8480.
- Kottli, T.J., Ramirez, D.M., Pfeiffer, B.E., Huber, K.M. & Russell, D.W. (2006) Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 3869-3874.
- Kraner, J.C., Lasker, J.M., Corcoran, G.B., Ray, S.D. & Raucy, J.L. (1993) Induction of P4502E1 by acetone in isolated rabbit hepatocytes. Role of increased protein and mRNA synthesis. *Biochemical pharmacology*, **45**, 1483-1492.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M. & Rune, G.M. (2004) Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 5913-5921.
- Kubota, S., Lasker, J.M. & Lieber, C.S. (1988) Molecular regulation of ethanol-inducible cytochrome P450-IIIE1 in hamsters. *Biochemical and biophysical research communications*, **150**, 304-310.
- Kuthan, H., Tsuji, H., Graf, H. & Ullrich, V. (1978) Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide in a reconstituted monooxygenase system. *FEBS letters*, **91**, 343-345.
- Laethem, R.M., Balazy, M., Falck, J.R., Laethem, C.L. & Koop, D.R. (1993) Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 12912-12918.
- Lash, L.H., Putt, D.A., Huang, P., Hueni, S.E. & Parker, J.C. (2007) Modulation of hepatic and renal metabolism and toxicity of trichloroethylene and perchloroethylene by alterations in status of cytochrome P450 and glutathione. *Toxicology*, **235**, 11-26.
- Lauterburg, B.H., Smith, C.V., Todd, E.L. & Mitchell, J.R. (1985) Oxidation of hydrazine metabolites formed from isoniazid. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **38**, 566-571.
- Lee, A.M., Jepson, C., Hoffmann, E., Epstein, L., Hawk, L.W., Lerman, C. & Tyndale, R.F. (2007) CYP2B6 genotype alters abstinence rates in a bupropion smoking cessation trial. *Biological psychiatry*, **62**, 635-641.
- Lee, A.M., Joshi, M., Yue, J. & Tyndale, R.F. (2006a) Phenobarbital induces monkey brain CYP2E1 protein but not hepatic CYP2E1, in vitro or in vivo chlorzoxazone metabolism. *European journal of pharmacology*, **552**, 151-158.
- Lee, A.M., Miksys, S. & Tyndale, R.F. (2006b) Phenobarbital increases monkey in vivo nicotine disposition and induces liver and brain CYP2B6 protein. *British journal of pharmacology*, **148**, 786-794.
- Lee, S.S., Buters, J.T., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P. & Gonzalez, F.J. (1996) Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 12063-12067.
- Lee, S.W., Chung, L.S., Huang, H.H., Chuang, T.Y., Liou, Y.H. & Wu, L.S. (2010) NAT2 and CYP2E1 polymorphisms and susceptibility to first-line anti-tuberculosis drug-induced hepatitis. *Int J Tuberc Lung Dis*, **14**, 622-626.
- Lee, W.M. (2003) Acute liver failure in the United States. *Seminars in liver disease*, **23**, 217-226.
- Lee, W.M. (2004) Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology*, **40**, 6-9.
- Lee, Y.S., Wan, J., Kim, B.J., Bae, M.A. & Song, B.J. (2006c) Ubiquitin-dependent degradation of p53 protein despite phosphorylation at its N terminus by acetaminophen. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **317**, 202-208.
- Letteron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., Delaforge, M., Larrey, D. & Pessayre, D. (1990) Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. *Biochemical pharmacology*, **39**, 2027-2034.
- Leung, T.M. & Nieto, N. (2013) CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, **58**, 395-398.
- Lewin, P.K. & McGreal, D. (1993) Isoniazid toxicity with cerebellar ataxia in a child. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, **148**, 49-50.
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.G. & Ghanbari, H.A. (2013) Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International journal of molecular sciences*, **14**, 24438-24475.
- Li, J.X., Feng, J.M., Wang, Y., Li, X.H., Chen, X.X., Su, Y., Shen, Y.Y., Chen, Y., Xiong, B., Yang, C.H., Ding, J. & Miao, Z.H. (2014) The B-Raf(V600E) inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell death & disease*, **5**, e1278.
- Lieber, C.S. (1979) Ethanol and the liver: a decreasing "threshold" of toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, **32**, 1177-1180.

- Lieber, C.S. (1997) Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiological reviews*, **77**, 517-544.
- Liederman, P.C. & Boldus, R.A. (1967) Psychic side effects of a chlorzoxazone and acetaminophen mixture; a case report. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, **202**, 158-160.
- Limaye, P.B., Apte, U.M., Shankar, K., Bucci, T.J., Warbritton, A. & Mehendale, H.M. (2003) Calpain released from dying hepatocytes mediates progression of acute liver injury induced by model hepatotoxicants. *Toxicology and applied pharmacology*, **191**, 211-226.
- Lin, H.L., Parsels, L.A., Maybaum, J. & Hollenberg, P.F. (1999) N-Nitrosodimethylamine-mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: evidence for apoptotic cell death. *Toxicology and applied pharmacology*, **157**, 117-124.
- Loida, P.J. & Sligar, S.G. (1993) Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions. *Biochemistry*, **32**, 11530-11538.
- Lourdes, G. (2010) Interacciones Farmacológicas, Descripción y mecanismos. Hospital Universitari Vall d'Hebron.
- Lu, Y. & Cederbaum, A. (2007) The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1-overexpressing HepG2 cells: modulation by ERK, ROS, glutathione, and thioredoxin. *Free radical biology & medicine*, **43**, 1061-1075.
- Lu, Y. & Cederbaum, A.I. (2008) CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology & medicine*, **44**, 723-738.
- Lutjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U. & Bjorkhem, I. (1996) Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 9799-9804.
- Llerena, A., Edman, G., Cobaleta, J., Benitez, J., Schalling, D. & Bertilsson, L. (1993) Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6. *Acta psychiatrica Scandinavica*, **87**, 23-28.
- MacLusky, N.J., Walters, M.J., Clark, A.S. & Toran-Allerand, C.D. (1994) Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Molecular and cellular neurosciences*, **5**, 691-698.
- Madden, S., Spaldin, V., Hayes, R.N., Woolf, T.F., Pool, W.F. & Park, B.K. (1995) Species variation in the bioactivation of tacrine by hepatic microsomes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **25**, 103-116.
- Malik, K.U., Jennings, B.L., Yaghini, F.A., Sahan-Firat, S., Song, C.Y., Estes, A.M. & Fang, X.R. (2012) Contribution of cytochrome P450 1B1 to hypertension and associated pathophysiology: a novel target for antihypertensive agents. *Prostaglandins & other lipid mediators*, **98**, 69-74.
- Manibusan, M.K., Odin, M. & Eastmond, D.A. (2007) Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, **25**, 185-209.
- Mann, A., Miksys, S., Lee, A., Mash, D.C. & Tyndale, R.F. (2008) Induction of the drug metabolizing enzyme CYP2D in monkey brain by chronic nicotine treatment. *Neuropharmacology*, **55**, 1147-1155.
- Mann, A., Miksys, S.L., Gaedigk, A., Kish, S.J., Mash, D.C. & Tyndale, R.F. (2012) The neuroprotective enzyme CYP2D6 increases in the brain with age and is lower in Parkinson's disease patients. *Neurobiology of aging*, **33**, 2160-2171.
- Mann, A. & Tyndale, R.F. (2010) Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *The European journal of neuroscience*, **31**, 1185-1193.
- Mari, M., Bai, J. & Cederbaum, A.I. (2002) Adenovirus-mediated overexpression of catalase in the cytosolic or mitochondrial compartment protects against toxicity caused by glutathione depletion in HepG2 cells expressing CYP2E1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **301**, 111-118.
- Mari, M. & Cederbaum, A.I. (2000) CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 15563-15571.
- Marques, P.E., Amaral, S.S., Pires, D.A., Nogueira, L.L., Soriani, F.M., Lima, B.H., Lopes, G.A., Russo, R.C., Avila, T.V., Melgaco, J.G., Oliveira, A.G., Pinto, M.A., Lima, C.X., De Paula, A.M., Cara, D.C., Leite, M.F., Teixeira, M.M. & Menezes, G.B. (2012) Chemokines and mitochondrial products activate neutrophils to amplify organ injury during mouse acute liver failure. *Hepatology*, **56**, 1971-1982.
- Martin, I. & Grotewiel, M.S. (2006) Oxidative damage and age-related functional declines. *Mechanisms of ageing and development*, **127**, 411-423.
- Martin, M.G., Perga, S., Trovo, L., Rasola, A., Holm, P., Rantamaki, T., Harkany, T., Castren, E., Chiara, F. & Dotti, C.G. (2008) Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. *Molecular biology of the cell*, **19**, 2101-2112.
- Martinez, M., Mourelle, M. & Muriel, P. (1995) Protective effect of colchicine on acute liver damage induced by CCl4. Role of cytochrome P-450. *Journal of applied toxicology : JAT*, **15**, 49-52.
- Matsunaga, N., Ikeda, M., Takiguchi, T., Koyanagi, S. & Ohdo, S. (2008) The molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of CYP2E1 expression in the mouse liver. *Hepatology*, **48**, 240-251.

- Maurya, A.K. & Singh, S.V. (1991) Differential induction of glutathione transferase isoenzymes of mice stomach by diallyl sulfide, a naturally occurring anticarcinogen. *Cancer Lett*, **57**, 121-129.
- Mazze, R.I., Woodruff, R.E. & Heerd, M.E. (1982) Isoniazid-induced enflurane defluorination in humans. *Anesthesiology*, **57**, 5-8.
- McCann, S.J., Pond, S.M., James, K.M. & Le Couteur, D.G. (1997) The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *Journal of the neurological sciences*, **153**, 50-53.
- McCarthy, M.M. (2009) The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, **15**, 599-610.
- McClain, C.J., Kromhout, J.P., Peterson, F.J. & Holtzman, J.L. (1980) Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by alcohol. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, **244**, 251-253.
- McFayden, M.C., Melvin, W.T. & Murray, G.I. (1998) Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain. *Biochemical pharmacology*, **55**, 825-830.
- McGiff, J.C. & Quilley, J. (1999) 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *The American journal of physiology*, **277**, R607-623.
- McLay, R.N., Drake, A. & Rayner, T. (2005) Persisting dementia after isoniazid overdose. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, **17**, 256-257.
- Metushi, I.G., Cai, P., Zhu, X., Nakagawa, T. & Uetrecht, J.P. (2011) A fresh look at the mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **89**, 911-914.
- Metushi, I.G., Nakagawa, T. & Uetrecht, J. (2012) Direct oxidation and covalent binding of isoniazid to rodent liver and human hepatic microsomes: humans are more like mice than rats. *Chemical research in toxicology*, **25**, 2567-2576.
- Metushi, I.G., Sanders, C., Acute Liver Study, G., Lee, W.M. & Uetrecht, J. (2014) Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology*, **59**, 1084-1093.
- Metushi, I.G. & Uetrecht, J. (2013) Isoniazid-induced liver injury and immune response in mice. *Journal of immunotoxicology*.
- Metushi, I.G. & Uetrecht, J. (2014) Lack of liver injury in Wistar rats treated with the combination of isoniazid and rifampicin. *Molecular and cellular biochemistry*, **387**, 9-17.
- Michaud, V., Frappier, M., Dumas, M.C. & Turgeon, J. (2010) Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism. *PloS one*, **5**, e15666.
- Miksys, S., Hoffmann, E. & Tyndale, R.F. (2000) Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochemical pharmacology*, **59**, 1501-1511.
- Miksys, S. & Tyndale, R.F. (2013) Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, **38**, 152-163.
- Miller, E.C. & Miller, J.A. (1966) Mechanisms of chemical carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules. *Pharmacological reviews*, **18**, 805-838.
- Miller, K.J., Anderholm, D.C. & Ames, M.M. (1986) Metabolic activation of the serotonergic neurotoxin para-chloroamphetamine to chemically reactive intermediates by hepatic and brain microsomal preparations. *Biochemical pharmacology*, **35**, 1737-1742.
- Millonig, G., Wang, Y., Homann, N., Bernhardt, F., Qin, H., Mueller, S., Bartsch, H. & Seitz, H.K. (2011) Ethanol-mediated carcinogenesis in the human esophagus implicates CYP2E1 induction and the generation of carcinogenic DNA-lesions. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **128**, 533-540.
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gillette, J.R. & Brodie, B.B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **187**, 185-194.
- Mitchell, J.R., Zimmerman, H.J., Ishak, K.G., Thorgeirsson, U.P., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R. & Nelson, S.D. (1976) Isoniazid liver injury: clinical spectrum, pathology, and probable pathogenesis. *Annals of internal medicine*, **84**, 181-192.
- Mohri, T., Nakajima, M., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y. & Yokoi, T. (2010) Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochemical pharmacology*, **79**, 1045-1052.
- Mokdad, A.H., Marks, J.S., Stroup, D.F. & Gerberding, J.L. (2004) Actual causes of death in the United States, 2000. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, **291**, 1238-1245.
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Valles, S., Renau-Piqueras, J. & Guerri, C. (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, **65**, 2561-2570.

- Montoliu, C., Valles, S., Renau-Piqueras, J. & Guerri, C. (1994) Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Journal of neurochemistry*, **63**, 1855-1862.
- Montoya, E.R., Terburg, D., Bos, P.A. & van Honk, J. (2012) Testosterone, cortisol, and serotonin as key regulators of social aggression: A review and theoretical perspective. *Motivation and emotion*, **36**, 65-73.
- Moran, J. & Patel, A.J. (1989) Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain research. Developmental brain research*, **46**, 97-105.
- Moran, J.H., Mitchell, L.A., Bradbury, J.A., Qu, W., Zeldin, D.C., Schnellmann, R.G. & Grant, D.F. (2000) Analysis of the cytotoxic properties of linoleic acid metabolites produced by renal and hepatic P450s. *Toxicology and applied pharmacology*, **168**, 268-279.
- Morgan, E.T., Koop, D.R. & Coon, M.J. (1982) Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. Oxidation of alcohols. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 13951-13957.
- Morgan, E.T., Koop, D.R. & Coon, M.J. (1983) Comparison of six rabbit liver cytochrome P-450 isozymes in formation of a reactive metabolite of acetaminophen. *Biochemical and biophysical research communications*, **112**, 8-13.
- Morgan, K., French, S.W. & Morgan, T.R. (2002) Production of a cytochrome P450 2E1 transgenic mouse and initial evaluation of alcoholic liver damage. *Hepatology*, **36**, 122-134.
- Morimoto, M., Hagbjork, A.L., Nanji, A.A., Ingelman-Sundberg, M., Lindros, K.O., Fu, P.C., Albano, E. & French, S.W. (1993) Role of cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol*, **10**, 459-464.
- Morimoto, M., Hagbjork, A.L., Wan, Y.J., Fu, P.C., Clot, P., Albano, E., Ingelman-Sundberg, M. & French, S.W. (1995a) Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology*, **21**, 1610-1617.
- Morimoto, M., Reitz, R.C., Morin, R.J., Nguyen, K., Ingelman-Sundberg, M. & French, S.W. (1995b) CYP-2E1 inhibitors partially ameliorate the changes in hepatic fatty acid composition induced in rats by chronic administration of ethanol and a high fat diet. *The Journal of nutrition*, **125**, 2953-2964.
- Murray, M. (1997) Drug-mediated inactivation of cytochrome P450. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **24**, 465-470.
- Nebert, D.W. & Russell, D.W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, **360**, 1155-1162.
- Nelson, D.R. (2009) The Cytochrome Homepage. Human Genomics, pp. 50-65.
- Nelson, S.D., Mitchell, J.R., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R. & Corcoran, G.B., 3rd (1976) Isoniazid and iproniazid: activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science*, **193**, 901-903.
- Nieto, N., Friedman, S.L. & Cederbaum, A.I. (2002a) Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 9853-9864.
- Nieto, N., Friedman, S.L. & Cederbaum, A.I. (2002b) Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*, **35**, 62-73.
- Nieto, N., Mari, M. & Cederbaum, A.I. (2003) Cytochrome P450 2E1 responsiveness in the promoter of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Hepatology*, **37**, 96-106.
- Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S. & Satoh, T. (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, **123**, 369-375.
- Nissbrandt, H., Bergquist, F., Jonason, J. & Engberg, G. (2001) Inhibition of cytochrome P450 2E1 induces an increase in extracellular dopamine in rat substantia nigra: a new metabolic pathway? *Synapse*, **40**, 294-301.
- Njie-Mbye, Y.F., Kulkarni-Chitnis, M., Opere, C.A., Barrett, A. & Ohia, S.E. (2013) Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. *Frontiers in physiology*, **4**, 366.
- Noda, A., Hsu, K.Y., Aso, Y., Matsuyama, K., Iguchi, S. & Hirata, M. (1982) Studies of isoniazid metabolism in isolated rat hepatocytes by mass fragmentography. *Journal of chromatography*, **230**, 345-352.
- Novak, R.F. & Woodcroft, K.J. (2000) The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP 2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Archives of pharmaceutical research*, **23**, 267-282.
- O'Shea, D., Kim, R.B. & Wilkinson, G.R. (1997) Modulation of CYP2E1 activity by isoniazid in rapid and slow N-acetylators. *British journal of clinical pharmacology*, **43**, 99-103.
- Ohtsuki, S., Schaefer, O., Kawakami, H., Inoue, T., Liehner, S., Saito, A., Ishiguro, N., Kishimoto, W., Ludwig-Schwellinger, E., Ebner, T. & Terasaki, T. (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **40**, 83-92.

- Olguin, H.J., Garduno, L.B., Perez, J.F. & Perez, C.F. (2011) Unintentional poisoning with drugs in a Mexican pediatric population. *Journal of population therapeutics and clinical pharmacology = Journal de la therapeutique des populations et de la pharmacologie clinique*, **18**, e156-160.
- Omura, T. & Sato, R. (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *The Journal of biological chemistry*, **239**, 2370-2378.
- Organization, W.H. (2011) Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). Global Health Observatory (GHO).
- Orman, E.S., Odena, G. & Batailler, R. (2013) Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **28 Suppl 1**, 77-84.
- Ortiz de Montellano, P.R. (2005) *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Ostapowicz, G., Fontana, R.J., Schiodt, F.V., Larson, A., Davern, T.J., Han, S.H., McCashland, T.M., Shakil, A.O., Hay, J.E., Hynan, L., Crippin, J.S., Blei, A.T., Samuel, G., Reisch, J., Lee, W.M. & Group, U.S.A.L.F.S. (2002) Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Annals of internal medicine*, **137**, 947-954.
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A. & Banerjee, U. (2008) A protocol for *in vivo* detection of reactive oxygen species.
- Palakodety, R.B., Clejan, L.A., Krikun, G., Feierman, D.E. & Cederbaum, A.I. (1988) Characterization and identification of a pyrazole-inducible form of cytochrome P-450. *The Journal of biological chemistry*, **263**, 878-884.
- Palleria, C., Di Paolo, A., Giofre, C., Caglioti, C., Leuzzi, G., Siniscalchi, A., De Sarro, G. & Gallelli, L. (2013) Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, **18**, 601-610.
- Papassotiropoulos, A., Streffer, J.R., Tsolaki, M., Schmid, S., Thal, D., Nicosia, F., Iakovidou, V., Maddalena, A., Lutjohann, D., Ghebremedhin, E., Hegi, T., Pasch, T., Traxler, M., Bruhl, A., Benussi, L., Binetti, G., Braak, H., Nitsch, R.M. & Hock, C. (2003) Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Archives of neurology*, **60**, 29-35.
- Park, B.K., Pirmohamed, M. & Kitteringham, N.R. (1998) Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chemical research in toxicology*, **11**, 969-988.
- Park, K.S., Sohn, D.H., Veech, R.L. & Song, B.J. (1993) Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *European journal of pharmacology*, **248**, 7-14.
- Patel, S., Singh, V., Kumar, A., Gupta, Y.K. & Singh, M.P. (2006) Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: mechanism of neurodegeneration. *Brain research*, **1081**, 9-18.
- Perfetti, X., O'Mathuna, B., Pizarro, N., Cuyas, E., Khymenets, O., Almeida, B., Pellegrini, M., Pichini, S., Lau, S.S., Monks, T.J., Farre, M., Pascual, J.A., Joglar, J. & de la Torre, R. (2009) Neurotoxic thioether adducts of 3,4-methylenedioxymethamphetamine identified in human urine after ecstasy ingestion. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **37**, 1448-1455.
- Peshavariya, H.M., Dusing, G.J. & Selemidis, S. (2007) Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free radical research*, **41**, 699-712.
- Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. & Yang, C.S. (1990) Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical research in toxicology*, **3**, 566-573.
- Pezzoli, G., Antonini, A., Barbieri, S., Canesi, M., Perbellini, L., Zecchinelli, A., Mariani, C.B., Bonetti, A. & Leenders, K.L. (1995) n-Hexane-induced parkinsonism: pathogenetic hypotheses. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **10**, 279-282.
- Pirmohamed, M., Kitteringham, N.R., Quest, L.J., Allott, R.L., Green, V.J., Gilmore, I.T. & Park, B.K. (1995) Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics*, **5**, 351-357.
- Plaa, G.L. (2000) Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **40**, 42-65.
- Polonikov, A.V., Ivanov, V.P. & Solodilova, M.A. (2013) CYP2E1 gene promoter polymorphism -1293G>C increases the risk of essential hypertension in men with alcohol abuse. *Bulletin of experimental biology and medicine*, **155**, 734-737.
- Popat, R.A., Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., Kamel, F., Umbach, D.M., Marder, K., Mayeux, R., Ritz, B., Ross, G.W., Petrovitch, H., Topol, E., McGuire, V., Costello, S., Manthripragada, A.D., Southwick, A., Myers, R.M. & Nelson, L.M. (2011) Coffee, ADORA2A, and CYP1A2: the caffeine connection in Parkinson's disease. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **18**, 756-765.
- Porter, T.D. (2002) The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **16**, 311-316.
- Porubsky, P.R., Battaile, K.P. & Scott, E.E. (2010) Human cytochrome P450 2E1 structures with fatty acid analogs reveal a previously unobserved binding mode. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 22282-22290.

- Porubsky, P.R., Meneely, K.M. & Scott, E.E. (2008) Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 33698-33707.
- Posadas, I., Santos, P., Blanco, A., Munoz-Fernandez, M. & Cena, V. (2010) Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. *PLoS one*, **5**, e15360.
- Powers, B.J., Cattau, E.L., Jr. & Zimmerman, H.J. (1986) Chlorzoxazone hepatotoxic reactions. An analysis of 21 identified or presumed cases. *Archives of internal medicine*, **146**, 1183-1186.
- Prange-Kiel, J., Fester, L., Zhou, L., Lauke, H., Carretero, J. & Rune, G.M. (2006) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis causes region-specific downregulation of synaptic protein expression in hippocampal neurons. *Hippocampus*, **16**, 464-471.
- Preziosi, P. (2007) Isoniazid: metabolic aspects and toxicological correlates. *Current drug metabolism*, **8**, 839-851.
- Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S.K. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, **1**, 3159-3165.
- Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.M., Ding, W.X. & Jaeschke, H. (2013) Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology*, **58**, 2099-2108.
- Ramaiah, S.K., Apte, U. & Mehendale, H.M. (2001) Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **29**, 1088-1095.
- Rambeck, B., Specht, U. & Wolf, P. (1996) Pharmacokinetic interactions of the new antiepileptic drugs. *Clinical pharmacokinetics*, **31**, 309-324.
- Raucy, J.L., Lasker, J., Ozaki, K. & Zoleta, V. (2004) Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, **79**, 233-241.
- Raucy, J.L., Lasker, J.M., Lieber, C.S. & Black, M. (1989) Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2. *Archives of biochemistry and biophysics*, **271**, 270-283.
- Rawat, R., Whitty, A. & Tonge, P.J. (2003) The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 13881-13886.
- Ray, R., Tyndale, R.F. & Lerman, C. (2009) Nicotine dependence pharmacogenetics: role of genetic variation in nicotine-metabolizing enzymes. *Journal of neurogenetics*, **23**, 252-261.
- Raza, H., Prabu, S.K., Robin, M.A. & Avadhani, N.G. (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4-4 in streptozotocin-induced diabetic rats: tissue-specific variations and roles in oxidative stress. *Diabetes*, **53**, 185-194.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Jr., Dolak, J.A. & Waller, R.L. (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, **43**, 139-154.
- Recknagel, R.O. & Glende, E.A., Jr. (1973) Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC critical reviews in toxicology*, **2**, 263-297.
- Reid, A.B., Kurten, R.C., McCullough, S.S., Brock, R.W. & Hinson, J.A. (2005) Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **312**, 509-516.
- Rendic, S. & Guengerich, F.P. (2012) Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chemical research in toxicology*, **25**, 1316-1383.
- Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R.L. & Gendelman, H.E. (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *International review of neurobiology*, **82**, 297-325.
- Riedl, A.G., Watts, P.M., Edwards, R.J., Boobis, A.R. & Jenner, P. (1996) Brain cytochrome P450 in the rat. *Biochem Soc Trans*, **24**, 52S.
- Riedl, A.G., Watts, P.M., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1998) P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, **13**, 212-220.
- Roberts, B.J., Shoaf, S.E., Jeong, K.S. & Song, B.J. (1994) Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochemical and biophysical research communications*, **205**, 1064-1071.
- Roberts, B.J., Song, B.J., Soh, Y., Park, S.S. & Shoaf, S.E. (1995) Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 29632-29635.
- Roberts, R.L., Luty, S.E., Mulder, R.T., Joyce, P.R. & Kennedy, M.A. (2004) Association between cytochrome P450 2D6 genotype and harm avoidance. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, **127B**, 90-93.

- Ronis, M.J., Huang, J., Crouch, J., Mercado, C., Irby, D., Valentine, C.R., Lumpkin, C.K., Ingelman-Sundberg, M. & Badger, T.M. (1993) Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **264**, 944-950.
- Ronis, M.J., Huang, J., Longo, V., Tindberg, N., Ingelman-Sundberg, M. & Badger, T.M. (1998) Expression and distribution of cytochrome P450 enzymes in male rat kidney: effects of ethanol, acetone and dietary conditions. *Biochemical pharmacology*, **55**, 123-129.
- Roy, P.D., Majumder, M. & Roy, B. (2008) Pharmacogenomics of anti-TB drugs-related hepatotoxicity. *Pharmacogenomics*, **9**, 311-321.
- Roy, U., Joshua, R., Stark, R.L. & Balazy, M. (2005) Cytochrome P450/NADPH-dependent biosynthesis of 5,6-trans-epoxyeicosatrienoic acid from 5,6-trans-arachidonic acid. *The Biochemical journal*, **390**, 719-727.
- Rozwarski, D.A., Grant, G.A., Barton, D.H., Jacobs, W.R., Jr. & Sacchetti, J.C. (1998) Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **279**, 98-102.
- Runge-Morris, M., Feng, Y., Zangar, R.C. & Novak, R.F. (1996) Effects of hydrazine, phenelzine, and hydralazine treatment on rat hepatic and renal drug-metabolizing enzyme expression. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **24**, 734-737.
- Ryan, D.E., Koop, D.R., Thomas, P.E., Coon, M.J. & Levin, W. (1986) Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 in rat liver, an isozyme homologous to rabbit liver cytochrome P-450 isozyme 3a. *Archives of biochemistry and biophysics*, **246**, 633-644.
- Ryan, D.E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P.E., Haniu, M., Shively, J.E., Lieber, C.S. & Levin, W. (1985) Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. *The Journal of biological chemistry*, **260**, 6385-6393.
- Sabbagh, N., Brice, A., Marez, D., Durr, A., Legrand, M., Lo Guidice, J.M., Destee, A., Agid, Y. & Broly, F. (1999) CYP2D6 polymorphism and Parkinson's disease susceptibility. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, **14**, 230-236.
- Saito, C., Lemasters, J.J. & Jaeschke, H. (2010) c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, **246**, 8-17.
- Sakurai, K. & Cederbaum, A.I. (1998) Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosyltriacetate in HepG2 cells that express cytochrome P450 2E1. *Molecular pharmacology*, **54**, 1024-1035.
- Saldanha, C.J., Duncan, K.A. & Walters, B.J. (2009) Neuroprotective actions of brain aromatase. *Frontiers in neuroendocrinology*, **30**, 106-118.
- Sanchez-Catalan, M.J., Hipolito, L., Guerri, C., Granero, L. & Polache, A. (2008) Distribution and differential induction of CYP2E1 by ethanol and acetone in the mesocorticolimbic system of rat. *Alcohol and alcoholism*, **43**, 401-407.
- Sanchez-Martin, F.J., Fernandez-Salguero, P.M. & Merino, J.M. (2011) Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *Journal of neurochemistry*, **118**, 153-162.
- Sanfeliu, C., Wright, J.M. & Kim, S.U. (1999) Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line. *Neurotoxicology*, **20**, 935-944.
- Sarich, T.C., Adams, S.P., Petricca, G. & Wright, J.M. (1999) Inhibition of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits by pretreatment with an amidase inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **289**, 695-702.
- Sarich, T.C., Youssefi, M., Zhou, T., Adams, S.P., Wall, R.A. & Wright, J.M. (1996) Role of hydrazine in the mechanism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits. *Archives of toxicology*, **70**, 835-840.
- Sarich, T.C., Zhou, T., Adams, S.P., Bain, A.I., Wall, R.A. & Wright, J.M. (1995) A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, **34**, 109-116.
- Sasame, H.A., Ames, M.M. & Nelson, S.D. (1977) Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites. *Biochemical and biophysical research communications*, **78**, 919-926.
- Sayre, L.M., Perry, G. & Smith, M.A. (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical research in toxicology*, **21**, 172-188.
- Scanlon, J.M., Aizenman, E. & Reynolds, I.J. (1997) Effects of pyrroloquinoline quinone on glutamate-induced production of reactive oxygen species in neurons. *European journal of pharmacology*, **326**, 67-74.
- Scordo, M.G., Dahl, M.L., Spina, E., Cordici, F. & Arena, M.G. (2006) No association between CYP2D6 polymorphism and Alzheimer's disease in an Italian population. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **53**, 162-165.
- Schafer, A., Galuppo, P., Fraccarollo, D., Vogt, C., Widder, J.D., Pfrang, J., Tas, P., Barbosa-Sicard, E., Ruetten, H., Ertl, G., Fleming, I. & Bauersachs, J. (2010) Increased cytochrome P4502E1 expression and altered hydroxyeicosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction: rescue by guanylyl-cyclase activation. *Diabetes*, **59**, 2001-2009.
- Schoedel, K.A., Sellers, E.M., Palmour, R. & Tyndale, R.F. (2003) Down-regulation of hepatic nicotine metabolism and a CYP2A6-like enzyme in African green monkeys after long-term nicotine administration. *Molecular pharmacology*, **63**, 96-104.

- Seitz, H.K., Garro, A.J. & Lieber, C.S. (1978) Effect of chronic ethanol ingestion on intestinal metabolism and mutagenicity of benzo(alpha)pyrene. *Biochemical and biophysical research communications*, **85**, 1061-1066.
- Seitz, H.K., Garro, A.J. & Lieber, C.S. (1981) Enhanced pulmonary and intestinal activation of procarcinogens and mutagens after chronic ethanol consumption in the rat. *European journal of clinical investigation*, **11**, 33-38.
- Seliskar, M. & Rozman, D. (2007) Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochimica et biophysica acta*, **1770**, 458-466.
- Shah, A., Kumar, S., Simon, S.D., Singh, D.P. & Kumar, A. (2013) HIV gp120- and methamphetamine-mediated oxidative stress induces astrocyte apoptosis via cytochrome P450 2E1. *Cell death & disease*, **4**, e850.
- Shahabi, H.N., Andersson, D.R. & Nissbrandt, H. (2008) Cytochrome P450 2E1 in the substantia nigra: relevance for dopaminergic neurotransmission and free radical production. *Synapse*, **62**, 379-388.
- Shahabi, H.N., Westberg, L., Melke, J., Hakansson, A., Belin, A.C., Sydow, O., Olson, L., Holmberg, B. & Nissbrandt, H. (2009) Cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms/haplotypes and Parkinson's disease in a Swedish population. *Journal of neural transmission*, **116**, 567-573.
- Sharma, A., Saurabh, K., Yadav, S., Jain, S.K. & Parmar, D. (2012) Ethanol induced induction of cytochrome P450 2E1 and activation of mitogen activated protein kinases in peripheral blood lymphocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **42**, 317-326.
- Shayakhmetova, G.M., Bondarenko, L.B., Kovalenko, V.M. & Ruschak, V.V. (2013) CYP2E1 testis expression and alcohol-mediated changes of rat spermatogenesis indices and type I collagen. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **64**, 51-60.
- Shen, C., Meng, Q., Zhang, G. & Hu, W. (2008) Rifampicin exacerbates isoniazid-induced toxicity in human but not in rat hepatocytes in tissue-like cultures. *British journal of pharmacology*, **153**, 784-791.
- Shen, C., Zhang, G., Qiu, H. & Meng, Q. (2006a) Acetaminophen-induced hepatotoxicity of gel entrapped rat hepatocytes in hollow fibers. *Chemico-biological interactions*, **162**, 53-61.
- Shen, C., Zhang, H., Zhang, G. & Meng, Q. (2006b) Isoniazid-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes of gel entrapment culture. *Toxicology letters*, **167**, 66-74.
- Shukla, U., Tamma, N., Gratsch, T., Dombkowski, A. & Novak, R.F. (2013) Insights into insulin-mediated regulation of CYP2E1: miR-132/-212 targeting of CYP2E1 and role of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt (protein kinase B), mammalian target of rapamycin signaling in regulating miR-132/-212 and miR-122/-181a expression in primary cultured rat hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **41**, 1769-1777.
- Singh, M., Khan, A.J., Shah, P.P., Shukla, R., Khanna, V.K. & Parmar, D. (2008) Polymorphism in environment responsive genes and association with Parkinson disease. *Molecular and cellular biochemistry*, **312**, 131-138.
- Singh, M., Khanna, V.K., Shukla, R. & Parmar, D. (2010) Association of polymorphism in cytochrome P450 2D6 and N-acetyltransferase-2 with Parkinson's disease. *Disease markers*, **28**, 87-93.
- Skvortsova, V.I., Slominskii, P.A., Shadrina, M.I., Levitskii, G.N., Levitskaia, N.I., Alekhin, A.V., Zhrebtsova, A.L., Serdiuk, A.V. & Limborskaia, S.A. (2006) [Detoxication gene polymorphism and susceptibility to sporadic motor neuron disease in Russian population]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova / Ministerstvo zdravookhraneniia i meditsinskoj promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii, Vserossiiskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossiiskoe obshchestvo psikiat*, **106**, 4-13.
- Smith, D.A. & Obach, R.S. (2009) Metabolites in safety testing (MIST): considerations of mechanisms of toxicity with dose, abundance, and duration of treatment. *Chemical research in toxicology*, **22**, 267-279.
- Snider, D.E., Jr. (1980) Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy. *Tubercle*, **61**, 191-196.
- Snider, N.T., Sikora, M.J., Sridar, C., Feuerstein, T.J., Rae, J.M. & Hollenberg, P.F. (2008) The endocannabinoid anandamide is a substrate for the human polymorphic cytochrome P450 2D6. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **327**, 538-545.
- Sodero, A.O., Trovo, L., Iannilli, F., Van Veldhoven, P., Dotti, C.G. & Martin, M.G. (2011a) Regulation of tyrosine kinase B activity by the Cyp46/cholesterol loss pathway in mature hippocampal neurons: relevance for neuronal survival under stress and in aging. *Journal of neurochemistry*, **116**, 747-755.
- Sodero, A.O., Weissmann, C., Ledesma, M.D. & Dotti, C.G. (2011b) Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiology of aging*, **32**, 1043-1053.
- Sodhi, C.P., Rana, S.V., Mehta, S.K., Vaiphei, K., Attari, S. & Mehta, S. (1997) Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. *Drug and chemical toxicology*, **20**, 255-269.
- Sohda, T., Shimizu, M., Kamimura, S. & Okumura, M. (1993) Immunohistochemical demonstration of ethanol-inducible P450 2E1 in rat brain. *Alcohol Alcohol Suppl*, **1B**, 69-75.
- Song, B.J., Veech, R.L., Park, S.S., Gelboin, H.V. & Gonzalez, F.J. (1989) Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *The Journal of biological chemistry*, **264**, 3568-3572.

- Srivastava, A., Maggs, J.L., Antoine, D.J., Williams, D.P., Smith, D.A. & Park, B.K. (2010) Role of reactive metabolites in drug-induced hepatotoxicity. *Handbook of experimental pharmacology*, 165-194.
- Takahashi, S., Takahashi, T., Mizobuchi, S., Matsumi, M., Morita, K., Miyazaki, M., Namba, M., Akagi, R. & Hirakawa, M. (2002) Increased cytotoxicity of carbon tetrachloride in a human hepatoma cell line overexpressing cytochrome P450 2E1. *The Journal of international medical research*, **30**, 400-405.
- Tanaka, E., Terada, M. & Misawa, S. (2000) Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, **25**, 165-175.
- Tang, W. (2003) The metabolism of diclofenac—enzymology and toxicology perspectives. *Current drug metabolism*, **4**, 319-329.
- Tao, R., Karliner, J.S., Simonis, U., Zheng, J., Zhang, J., Honbo, N. & Alano, C.C. (2007) Pyrroloquinoline quinone preserves mitochondrial function and prevents oxidative injury in adult rat cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, **363**, 257-262.
- Teng, W.C., Oh, J.W., New, L.S., Wahlin, M.D., Nelson, S.D., Ho, H.K. & Chan, E.C. (2010) Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by lapatinib. *Molecular pharmacology*, **78**, 693-703.
- Thelen, K. & Dressman, J.B. (2009) Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **61**, 541-558.
- Thurman, R.G., Ley, H.G. & Scholz, R. (1972) Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *European journal of biochemistry / FEBS*, **25**, 420-430.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, **27**, 502-522.
- Timbrell, J.A. (1979) Studies on the role of acetylhydrazine in isoniazid hepatotoxicity. *Archives of toxicology. Supplement. = Archiv fur Toxikologie. Supplement*, 1-8.
- Tindberg, N., Baldwin, H.A., Cross, A.J. & Ingelman-Sundberg, M. (1996) Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Molecular pharmacology*, **50**, 1065-1072.
- Tindberg, N. & Ingelman-Sundberg, M. (1996) Expression, catalytic activity, and inducibility of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in the rat central nervous system. *Journal of neurochemistry*, **67**, 2066-2073.
- Timenstein, M.A. & Nelson, S.D. (1990) Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 3059-3065.
- Tirumalai, P.S., Bhamre, S., Upadhy, S.C., Boyd, M.R. & Ravindranath, V. (1998) Expression of multiple forms of cytochrome P450 and associated mono-oxygenase activities in rat brain regions. *Biochemical pharmacology*, **56**, 371-375.
- Toyokuni, S. (2008) Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics. *IUBMB life*, **60**, 441-447.
- Trafalis, D.T., Panteli, E.S., Grivas, A., Tsigris, C. & Karamanakos, P.N. (2010) CYP2E1 and risk of chemically mediated cancers. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, **6**, 307-319.
- Tsuchishima, M., George, J., Shiroeda, H., Arisawa, T., Takegami, T. & Tsutsumi, M. (2013) Chronic ingestion of ethanol induces hepatocellular carcinoma in mice without additional hepatic insult. *Digestive diseases and sciences*, **58**, 1923-1933.
- Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. (2008) Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, **72 Suppl A**, A31-37.
- Tsutsumi, M., Lasker, J.M., Takahashi, T. & Lieber, C.S. (1993) In vivo induction of hepatic P4502E1 by ethanol: role of increased enzyme synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, **304**, 209-218.
- Tyndale, R.F. & Sellers, E.M. (2001) Variable CYP2A6-mediated nicotine metabolism alters smoking behavior and risk. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **29**, 548-552.
- Utrecht, J. (2009) Immunoallergic drug-induced liver injury in humans. *Seminars in liver disease*, **29**, 383-392.
- Upadhy, S.C., Boyd, M.R. & Ravindranath, V. (2001) Characterization and localization of cytochrome P450 mediated metabolism of MPTP to nor-MPTP in mouse brain: relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, **3**, 369-380.
- Upadhy, S.C., Tirumalai, P.S., Boyd, M.R., Mori, T. & Ravindranath, V. (2000) Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Archives of biochemistry and biophysics*, **373**, 23-34.
- Vaglini, F., Pardini, C., Viaggi, C., Bartoli, C., Dinucci, D. & Corsini, G.U. (2004) Involvement of cytochrome P450 2E1 in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, **91**, 285-298.

- Valencia-Olvera, A.C. (2007) Efecto de la isoniazida sobre la concentracion de CYP2E1 en cerebro de rata *Medicina Genómica y Toxicología Ambiental*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 57.
- Valente, M.J., Carvalho, F., Bastos, M., de Pinho, P.G. & Carvalho, M. (2012) Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage. *Current medicinal chemistry*, **19**, 5601-5606.
- Vasilioi, V., Ziegler, T.L., Bludeau, P., Petersen, D.R., Gonzalez, F.J. & Deitrich, R.A. (2006) CYP2E1 and catalase influence ethanol sensitivity in the central nervous system. *Pharmacogenetics and genomics*, **16**, 51-58.
- Vences-Mejia, A., Labra-Ruiz, N., Hernandez-Martinez, N., Dorado-Gonzalez, V., Gomez-Garduno, J., Perez-Lopez, I., Nosti-Palacios, R., Camacho Carranza, R. & Espinosa-Aguirre, J.J. (2006) The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. *Human & experimental toxicology*, **25**, 453-459.
- Vieira, I., Sonnier, M. & Cresteil, T. (1996) Developmental expression of CYP2E1 in the human liver. Hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *European journal of biochemistry / FEBS*, **238**, 476-483.
- Viola, H.M., Arthur, P.G. & Hool, L.C. (2007) Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type Ca²⁺ channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circulation research*, **100**, 1036-1044.
- Vuilleumier, N., Rossier, M.F., Chiappe, A., Degoumois, F., Dayer, P., Mermillod, B., Nicod, L., Desmeules, J. & Hochstrasser, D. (2006) CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. *European journal of clinical pharmacology*, **62**, 423-429.
- Walther, B., Ghersi-Egea, J.F., Minn, A. & Siest, G. (1986) Subcellular distribution of cytochrome P-450 in the brain. *Brain research*, **375**, 338-344.
- Wang, B., Yang, L.P., Zhang, X.Z., Huang, S.Q., Bartlam, M. & Zhou, S.F. (2009a) New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. *Drug metabolism reviews*, **41**, 573-643.
- Wang, J., Liu, Z. & Chan, P. (2000) Lack of association between cytochrome P450 2E1 gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Chinese population. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, **15**, 1267-1269.
- Wang, T., Yu, H.T., Wang, W., Pan, Y.Y., He, L.X. & Wang, Z.Y. (2010a) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 and glutathione S-transferase associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Chinese tuberculosis patients. *The Journal of international medical research*, **38**, 977-986.
- Wang, Y., Guan, S., Acharya, P., Koop, D.R., Liu, Y., Liao, M., Burlingame, A.L. & Correia, M.A. (2011) Ubiquitin-dependent proteasomal degradation of human liver cytochrome P450 2E1: identification of sites targeted for phosphorylation and ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 9443-9456.
- Wang, Y., Millonig, G., Nair, J., Patsenker, E., Stickel, F., Mueller, S., Bartsch, H. & Seitz, H.K. (2009b) Ethanol-induced cytochrome P4502E1 causes carcinogenic etheno-DNA lesions in alcoholic liver disease. *Hepatology*, **50**, 453-461.
- Wang, Y., Yang, H., Li, L., Wang, H., Zhang, C., Yin, G. & Zhu, B. (2010b) Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *European journal of cancer*, **46**, 758-764.
- Warner, M. & Gustafsson, J.A. (1994) Effect of ethanol on cytochrome P450 in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 1019-1023.
- Warrington, R.J., McPhillips-Feener, S. & Rutherford, W.J. (1982) The predictive value of the lymphocyte transformation test in isoniazid-associated hepatitis. *Clinical allergy*, **12**, 217-222.
- Warrington, R.J., Tse, K.S., Gorski, B.A., Schwenk, R. & Sehon, A.H. (1978) Evaluation of isoniazid-associated hepatitis by immunological tests. *Clinical and experimental immunology*, **32**, 97-104.
- Watts, P.M., Riedl, A.G., Douek, D.C., Edwards, R.J., Boobis, A.R., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1998) Co-localization of P450 enzymes in the rat substantia nigra with tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*, **86**, 511-519.
- Webb, C. & Twedt, D. (2008) Oxidative stress and liver disease. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, **38**, 125-135, v.
- Weber, L.W., Boll, M. & Stampfl, A. (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, **33**, 105-136.
- Weddle, C.C., Hornbrook, K.R. & McCay, P.B. (1976) Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *The Journal of biological chemistry*, **251**, 4973-4978.
- Weissman, L., de Souza-Pinto, N.C., Stevensner, T. & Bohr, V.A. (2007) DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience*, **145**, 1318-1329.
- Wong, F.W., Chan, W.Y. & Lee, S.S. (1998) Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicology and applied pharmacology*, **153**, 109-118.

- Woo, S.I., Kim, J.W., Seo, H.G., Park, C.H., Han, S.H., Kim, S.H., Kim, K.W., Jhoo, J.H. & Woo, J.I. (2001) CYP2D6*4 polymorphism is not associated with Parkinson's disease and has no protective role against Alzheimer's disease in the Korean population. *Psychiatry and clinical neurosciences*, **55**, 373-377.
- Woodcroft, K.J., Hafner, M.S. & Novak, R.F. (2002) Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology*, **35**, 263-273.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (1996) Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P4502E1. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 23914-23919.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (1999) Ethanol-induced apoptosis to stable HepG2 cell lines expressing human cytochrome P-4502E1. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **23**, 67-76.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (2001a) Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **25**, 619-628.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (2001b) Sodium salicylate increases CYP2E1 levels and enhances arachidonic acid toxicity in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Molecular pharmacology*, **59**, 795-805.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (2002) Cyclosporine A protects against arachidonic acid toxicity in rat hepatocytes: role of CYP2E1 and mitochondria. *Hepatology*, **35**, 1420-1430.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (2005) Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicology and applied pharmacology*, **207**, 70-76.
- Wu, D. & Cederbaum, A.I. (2013) Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. *Redox biology*, **1**, 552-565.
- Wu, D., Zhai, Q. & Shi, X. (2006) Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **21 Suppl 3**, S26-29.
- Wu, J.Y., Yue, J. & Feng, Y.Q. (2011) Determination of brain cytochrome P450 2E1 activity in rat with the probe of chlorzoxazone by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **879**, 260-266.
- Wu, R.M., Cheng, C.W., Chen, K.H., Shan, D.E., Kuo, J.W., Ho, Y.F. & Chern, H.D. (2002) Genetic polymorphism of the CYP2E1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Taiwanese. *Journal of neural transmission*, **109**, 1403-1414.
- Xie, Y., McGill, M.R., Dorko, K., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J. & Jaeschke, H. (2014) Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*.
- Yadav, S., Dhawan, A., Singh, R.L., Seth, P.K. & Parmar, D. (2006) Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Molecular and cellular biochemistry*, **286**, 171-180.
- Yang, M.X. & Cederbaum, A.I. (1997) Characterization of cytochrome P4502E1 turnover in transfected HepG2 cells expressing human CYP2E1. *Archives of biochemistry and biophysics*, **341**, 25-33.
- Yano, H., Tsutsumi, M., Fukura, M., Chen, W.B., Shimanaka, K., Tsuchishima, M., Takase, S., Imaoka, S. & Funae, Y. (2001) Study of cytochrome P4502E1 mRNA level of mononuclear cells in patients with alcoholic liver disease. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **25**, 2S-6S.
- Ye, Q., Lian, F., Chavez, P.R., Chung, J., Ling, W., Qin, H., Seitz, H.K. & Wang, X.D. (2012) Cytochrome P450 2E1 inhibition prevents hepatic carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in alcohol-fed rats. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, **1**, 5-18.
- Yoo, M., Ryu, H.M., Shin, S.W., Yun, C.H., Lee, S.C., Ji, Y.M. & You, K.H. (1997) Identification of cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Biochemical and biophysical research communications*, **231**, 254-256.
- Yu, A.M., Idle, J.R., Byrd, L.G., Krausz, K.W., Kupfer, A. & Gonzalez, F.J. (2003) Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics*, **13**, 173-181.
- Yue, J., Miksys, S., Hoffmann, E. & Tyndale, R.F. (2008) Chronic nicotine treatment induces rat CYP2D in the brain but not in the liver: an investigation of induction and time course. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, **33**, 54-63.
- Yue, J., Peng, R., Chen, J., Liu, Y. & Dong, G. (2009) Effects of rifampin on CYP2E1-dependent hepatotoxicity of isoniazid in rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, **59**, 112-119.
- Yue, J., Peng, R.X., Yang, J., Kong, R. & Liu, J. (2004) CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta pharmacologica Sinica*, **25**, 699-704.
- Zaher, H., Buters, J.T., Ward, J.M., Bruno, M.K., Lucas, A.M., Stern, S.T., Cohen, S.D. & Gonzalez, F.J. (1998) Protection against acetaminophen toxicity in CYP1A2 and CYP2E1 double-null mice. *Toxicology and applied pharmacology*, **152**, 193-199.
- Zaluzny, L., Farrell, G.C. & Murray, M. (1990) Effect of genetic obesity and experimental diabetes on hepatic microsomal mixed function oxidase activities. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **5**, 256-263.

- Zand, R., Nelson, S.D., Slattery, J.T., Thummel, K.E., Kalhorn, T.F., Adams, S.P. & Wright, J.M. (1993) Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **54**, 142-149.
- Zangar, R.C., Davydov, D.R. & Verma, S. (2004) Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, **199**, 316-331.
- Zangar, R.C., Woodcroft, K.J., Kocarek, T.A. & Novak, R.F. (1995) Xenobiotic-enhanced expression of cytochrome P450 2E1 and 2B1/2B2 in primary cultured rat hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, **23**, 681-687.
- Zanger, U.M., Raimundo, S. & Eichelbaum, M. (2004) Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **369**, 23-37.
- Zhang, F., Deng, H., Kemp, R., Singh, H., Gopal, V.R., Falck, J.R., Laniado-Schwartzman, M. & Nasjletti, A. (2005) Decreased levels of cytochrome P450 2E1-derived eicosanoids sensitize renal arteries to constrictor agonists in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **45**, 103-108.
- Zhang, Y.F., He, W., Zhang, C., Liu, X.J., Lu, Y., Wang, H., Zhang, Z.H., Chen, X. & Xu, D.X. (2014) Role of receptor interacting protein (RIP)1 on apoptosis-inducing factor-mediated necroptosis during acetaminophen-evoked acute liver failure in mice. *Toxicology letters*, **225**, 445-453.
- Zhong, Y., Dong, G., Luo, H., Cao, J., Wang, C., Wu, J., Feng, Y.Q. & Yue, J. (2012) Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology*, **302**, 275-284.
- Zhou, K., Khokhar, J.Y., Zhao, B. & Tyndale, R.F. (2013) First demonstration that brain CYP2D-mediated opiate metabolic activation alters analgesia in vivo. *Biochemical pharmacology*, **85**, 1848-1855.
- Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M. & Chen, Y.Z. (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug metabolism reviews*, **37**, 41-213.
- Zhukov, A. & Ingelman-Sundberg, M. (1999) Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase. *The Biochemical journal*, **340** (Pt 2), 453-458.
- Zhukov, A.A. & Archakov, A.I. (1982) Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*, **109**, 813-818.
- Zimatkin, S.M., Pronko, S.P., Vasiliou, V., Gonzalez, F.J. & Deitrich, R.A. (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcoholism, clinical and experimental research*, **30**, 1500-1505.
- Zimmerman, H.J. & Ishak, K.G. (1995) General aspects of drug-induced liver disease. *Gastroenterology clinics of North America*, **24**, 739-757.

XI APÉNDICE, ARTÍCULO PUBLICADO



CYP2E1 induction leads to oxidative stress and cytotoxicity in glutathione-depleted cerebellar granule neurons



Valencia-Olvera Ana Carolina^a, Morán Julio^b, Camacho-Carranza Rafael^a, Prospéro-García Oscar^c, Espinosa-Aguirre Jesús Javier^{d,*}

^a Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^b División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

^c Grupo de Neurociencias, Laboratorio de Canabinoides, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 January 2014
Accepted 30 May 2014
Available online 11 June 2014

Keywords:
Brain cytochrome P450 2E1
Isoniazid
BSO
Cerebellar granule cells
8-oxo-dG
Oxidative stress

ABSTRACT

Increasing evidence suggests that brain cytochrome P450 (CYP) can contribute to the *in situ* metabolism of xenobiotics. In the liver, some xenobiotics can be metabolized by CYPs into more reactive products that can damage hepatocytes and induce cell death. In addition, normal CYP activity may produce reactive oxygen species (ROS) that contribute to cell damage through oxidative mechanisms. CYP2E1 is a CYP isoform that can generate ROS leading to cytotoxicity in multiple tissue types. The aim of this study was to determine whether CYP2E1 induction may lead to significant brain cell impairment. Immunological analysis revealed that exposure of primary cerebellar granule neuronal cultures to the CYP inducer isoniazid, increased CYP2E1 expression. In the presence of buthionine sulfoximine, an agent that reduces glutathione levels, isoniazid treatment also resulted in reactive oxygen species (ROS) production, DNA oxidation and cell death. These effects were attenuated by simultaneous exposure to diallyl sulfide, a CYP2E1 inhibitor, or to a mimetic of superoxide dismutase/catalase, (Euka). These results suggest that in cases of reduced antioxidant levels, the induction of brain CYP2E1 could represent a risk of *in situ* neuronal damage.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The cytochrome P450 (CYP) enzyme family is responsible for the oxidative metabolism of a vast array of endogenous and exogenous compounds. CYPs metabolize cholesterol, bile acid, steroids, arachidonic acid, eicosanoids, dietary constituents, clinical drugs, drugs of abuse and environmental toxins. Xenobiotics are often metabolized to polar hydrophilic molecules which facilitates their elimination from an organism; however, in some cases, CYP electrophilic products may produce cell toxicity through their

interaction with macromolecules (Guengerich and MacDonald, 2007). Xenobiotic metabolism occurs predominantly in the liver, but it has also been demonstrated that functional CYPs are present in extra-hepatic sites, such as the gut, lung (Ding and Kaminsky, 2003) and brain (Ferguson and Tyndale, 2011).

CYP expression varies among specific brain regions and cell types, suggesting that the metabolism of xenobiotics capable of crossing the blood–brain barrier could occur in specific microenvironments (Dutheil et al., 2008). Since the discovery of CYP in the brain, several publications have demonstrated that these enzymes are inducible (Das et al., 1981) and that brain microsomes can metabolize environmental neurotoxins (Anandatheerthavarada et al., 1993; Cohn et al., 1977; Miller et al., 1986; Upadhyaya et al., 2001). Considering the well-known role of environmental toxins and the etiopathogenesis of certain neurodegenerative processes, it is crucial to determine whether CYP induction and neurotoxin metabolism can occur in various model systems, such as animal models or primary cell cultures. Notably, it has been reported that brain CYP2B and CYP2D can participate in the local metabolism and pharmacological effect of some drugs and neurotoxins in

Abbreviations. CGNs, cerebellar granule neurons; CYP2E1, cytochrome P450 2E1; ROS, reactive oxygen species; GSH, glutathione; DIV, days *in vitro*; INH, isoniazid; BSO, L-buthionine sulfoximine; DAS, diallyl sulfide; EUKA, Eukarion-194; 8-oxo-dG, 8-oxo-2',3'-dihydro-2H-pyrimidin-2-one cytosine.

* Corresponding author. Address: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-228, México 04510, D.F., México. Tel.: +52 55 56 22 80 04.

E-mail address: jjae@servidor.unam.mx (J.J. Espinosa-Aguirre).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.05.014>
0887-2333/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

rodent models (Khokhar and Tyndale, 2011, 2012; Zhou et al., 2013).

One of the important CYP isoform involved in xenobiotic metabolism leading to chemical toxicities is CYP2E1 (Gonzalez, 2007). This isoform has been implicated in the bioactivation of many low-molecular-weight procarcinogens including nitrosamines and benzenes (Trafalis et al., 2010). Furthermore, CYP2E1 is partially responsible for the hepatotoxicity of ethanol (Lu and Cederbaum, 2008), acetaminophen (Lee et al., 1996) and isoniazid (Shen et al., 2006). CYP2E1 is able to generate reactive oxygen species (ROS) mostly superoxide anion and hydrogen peroxide in the absence of a substrate (Bell and Guengerich, 1997; Dai et al., 1993; Morgan et al., 1982), and its overexpression may cause oxidative stress and lipid peroxidation in hepatocytes (Chen and Cederbaum, 1998). The removal of glutathione (GSH) in human hepatoma cell line HepG2 overexpressing CYP2E1 resulted in apoptosis and necrosis (Wu and Cederbaum, 2001).

Although the hepatotoxic effect resulted from CYP2E1 overexpression has been demonstrated, the possibility of irreversible damage and loss of neurons through in situ generation of reactive oxygen species by CYP2E1 in the nervous system requires to be deeply explored. Moreover all the information generated in xenobiotic bioactivation in neurons is valuable as the metabolites and reactive oxygen species generated by CYP2E1 activity could differ depending on the xenobiotic and cell type exposed, as well as the cellular environment conditions.

The aim of this study was to determine whether CYP2E1 induction may lead to brain cell impairment. We used cerebellar granule neurons (CGNs) because of their pronounced response among other brain structures toward CYP2E1 induction by xenobiotics (Joshi and Tyndale, 2006a; Yadav et al., 2006; Zhong et al., 2012) and to the abundance of this cell type in the cerebellum. CYP2E1 was induced by isoniazid and evaluated by immunocytochemistry and western blot. Consequences of this induction including the production of reactive oxygen species, DNA oxidation and cell viability were evaluated in the absence or presence of an inhibitor of GSH synthesis.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Fetal calf serum, penicillin and streptomycin were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Dihydroethidine and calcein AM were purchased from Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Poly-L-lysine (mol. wt. > 300,000), trypsin, DNase, cytosine arabinoside, DMSO, glutathione reductase, propidium iodide, GSH, GSSG, sulfosalicylic acid, dithiobis-2-nitrobenzoic acid, vinylpyridine, isoniazid (INH) and buthionine sulfoximine (BSO) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Complete protease inhibitors were purchased from Roche (Mannheim, DE). Chemiluminescence system CD1-Star were purchased from New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, USA). Eukarion-134 (Euka) was from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). PVDF membranes and antibodies against CYP2E1 and GAPDH were obtained from Chemicon (Millipore, Billerica, MA, USA), and antibodies against 8-oxo-dG were obtained from TREVIGEN (Gaithersburg, MD, USA). CYP2E1 superomes[®] were purchased from RD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA). All other chemicals used were of the purest grade available from regular commercial sources.

2.2. Cerebellar granule neuronal cultures

All animals used were treated in accordance with the accepted standards of animal care and the procedures approved by the local

Committee of Research and Ethics of the Instituto de Investigaciones Biomédicas and the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Cerebellar granule neuronal cultures were prepared as previously described (Moran and Patel, 1989). Briefly, cell suspensions dissociated from 8-day-old rat cerebellum were plated at a density of 265×10^3 cells/cm² in plastic dishes or coverslips coated with poly-L-lysine (5 µg/mL). The culture medium contained basal Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM glutamine, 25 mM KCl, 50 U/mL penicillin and 50 mg/mL streptomycin. The culture dishes were incubated at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ atmosphere. Cells were maintained under these conditions for 7–8 days *in vitro* (DIV). To induce CYP2E1, the cells were treated with 0.1 mM isoniazid (INH) for 12 h (Madan et al., 2003). In some experiments, 100 µM diallyl sulfide (DA5) and 10 µM Eukarion-134 (Euka) were added to the culture medium concurrently with isoniazid. Some cells were preincubated with BSO for 12 h.

2.3. Immunofluorescence

To visualize CYP2E1 in cultured neurons, cells were grown on glass coverslips. After treatment, cells were rinsed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature and then washed 3 times with PBS. Cells were permeabilized and blocked with 0.3% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS for 3 h before exposure to a rabbit polyclonal antibody against CYP2E1 (1:100 dilution) overnight at 4 °C. Cells incubated without primary antibody and unspecific IgG were used as negative controls. Cells were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit antibody (1:250 dilution). Next, the stained cells were mounted with medium for fluorescence and the nuclei were stained with DAPI (1.5 mg/ml). Fluorescence was examined with a confocal laser-scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000).

2.4. Western blot

Cells were washed with PBS and homogenized with lysis buffer (Tris 25 mM, NaCl 50 mM, Igepal 2X, SDS 0.2% and Complete protease inhibitors, pH 7.4). Protein concentration was quantified by the method of Bradford (Bradford, 1976). 60 µg of protein homogenate were separated in SDS-PAGE gels (8%) and transferred to a PVDF membrane. Blots were blocked with Tris-buffered saline and incubated two days at 4 °C with the primary antibody raised against CYP2E1 (1:300 dilution) or 1 h for GAPDH (1:3000 dilution). After washing, blots were incubated with a secondary antibody coupled to alkaline phosphatase (anti-rabbit: 1:20,000 dilution; anti-mouse: 1:20,000) for 1 h at room temperature. Blots were processed for visualization using an enhanced chemiluminescence system according to the manufacturer's recommendations and exposed to Kodak film. Densitometric analysis was done using GelQuant.NET software.

2.5. Measurement of ROS generation

After treatment, neurons were incubated with DHE in the culture medium at 37 °C for 20 min. Following incubation, neurons were washed with PBS and then fixed in 4% fresh paraformaldehyde for 7 min. Neurons were examined with an epifluorescence Nikon Diaphot microscope using a rhodamine filter (546 nm excitation and 590 nm emission wavelengths). The results are expressed as the percentage of DHE-positive cells with respect to the total number of cells per field.

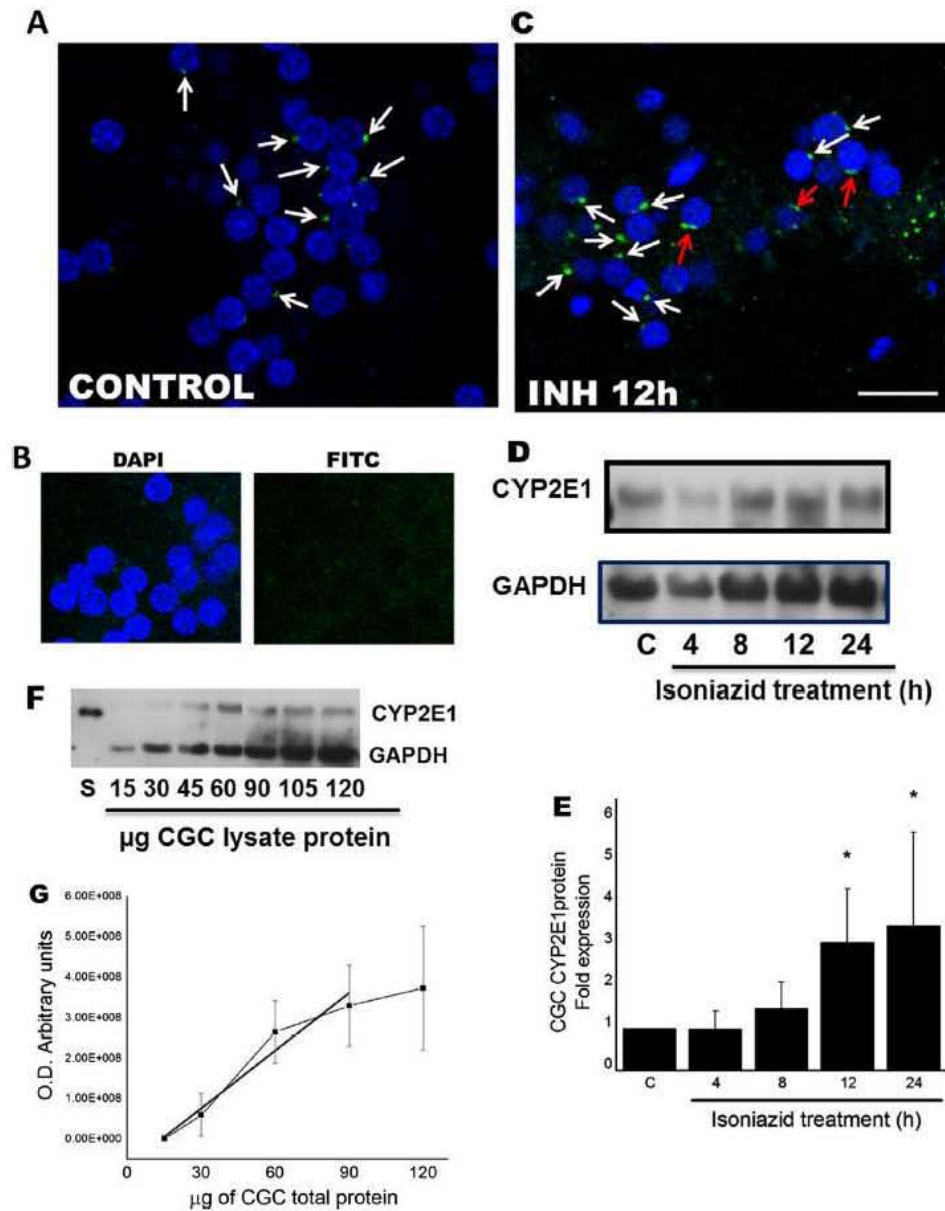


Fig. 1. CYP2E1 expression in primary cultures of cerebellar granule neurons.

2.6. Measurement of glutathione content

Glutathione was assayed according to a method described elsewhere (Rahman et al., 2006; Tietze, 1969). After treatment, cells were washed in PBS and sonicated in 0.1% Triton X-100 and 0.6% sulfosalicylic acid in KPE (0.1 M potassium phosphate buffer with 5 mM EDTA disodium salt, pH 7.5). Next, samples were mixed with equal volumes of dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), β -NADPH and glutathione reductase. Immediately, kinetic measurements of the absorbance changes at 412 nm were recorded for 10 min. To determine GSSG levels, the samples were pre-incubated with 2.5% vinylpyridine for 60 min and neutralized with triethanolamine prior to kinetic measurement. GSH and GSSG standard curves were prepared to calculate the actual GSH concentration in the sample. Total glutathione was assayed as the sum of the reduced

and oxidized forms. The results are expressed as a percentage of control GSH.

2.7. Detection of DNA oxidation

Cells plated on coverslips were rinsed twice with PBS, fixed with methanol on ice for 20 min and washed 3 times with PBS. Cells were treated with 0.05 N HCl for 5 min, washed 3 times with PBS and incubated with 500 ng/mL RNAse in 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate, for 1 h at 37 °C. Cells were sequentially washed in PBS and 35%, 50% and 75% ethanol (v/v with PBS), for 3 min each. The DNA was denatured in situ with 0.15 N NaOH in 70% ethanol for 4 min and sequentially washed with 70% ethanol containing 4% formaldehyde, 50% and 35% ethanol and PBS for 2 min each. Cells were incubated with 5 µg/ml proteinase K in

20 mM Tris and 1 mM EDTA at pH 7.5 for 10 min at 37 °C and washed with PBS. Cells were permeabilized and blocked with 0.3% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS for 1 h before exposure to a polyclonal antibody against 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (1:100 dilution) overnight at 4 °C. Cells were incubated for 1 h at room temperature with a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit antibody (1:500 dilution). Cells were rinsed with PBS, mounted with DAPI mounting media and observed using an epifluorescence microscope (Zeiss). The results are expressed as the percentage of 8-oxodG positive nuclei with respect to the total number of nuclei per field.

2.8. Cell viability

CGN cultures were incubated with 2.5 μ M calcein AM and 2 μ M PI for 10 min at 37 °C. Next, cultures were photographed under a fluorescence microscope using an excitation wavelength of 495/515 nm for calcein and 535/617 nm for PI. Triplicates of at least three different images for each condition were analyzed. The results are expressed as the percentage of viable cells (calcein-positive cells) with respect to the total number of cells (calcein-positive cells + PI-positive cells) per field.

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SE, as indicated in the figure captions. Statistical significance of the results was determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey's test except from western blot analysis where Kruskal-Wallis One way and Dunn's test was used. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. CYP2E1 is endogenously expressed in primary cultures of cerebellar granule neurons and can be induced by treatment with isoniazid

Confocal images show that cerebellar granule neurons express CYP2E1 (Fig. 1A, arrows). There was no positive signal in negative control cells incubated without primary antibody (Fig. 1B). Isoniazid increased CYP2E1 expression as the signal increases in the area around the nucleus (Fig. 1C, red¹ arrows). Western blot analysis confirms CYP2E1 induction by isoniazid after 12 h of treatment (Fig. 1D and E). Densitometric analysis is adjusted with GAPDH as a loading control.

In order to approximate the levels of CYP2E1 in CGN, a dilution curve was generated using CGC whole-cell lysates (Mann and Tyndale, 2010). CYP2E1 protein detection was evident starting with 30 μ g and linear up to 90 μ g of CGC whole-cell lysate protein (Fig. 1D and E). Using a standard curve of CYP2E1 supersome[®], it was calculated that CGN cells express nearly 0.0044 ± 0.0007 pmol of CYP2E1/ μ g of whole-cell lysate protein.

After 8 DIV, CGN cultures were treated with 0.1 mM of isoniazid for 12 h. A. Confocal microscopy images of CYP2E1 following immunocytochemical staining in cerebellar granule neurons without treatment. Arrows indicate a positive signal of CYP2E1 expression. B. Negative control of CYP2E1 immunocytochemical analysis. No staining is shown in the absence of primary antibody. C. Confocal microscopy images of CYP2E1 following immunocytochemical staining, in cerebellar granule neurons after 12 h of isoniazid treatment. Red arrows indicate a longer perinuclear region of staining.

¹ For interpretation of color in Fig. 1, the reader is referred to the web version of this article.

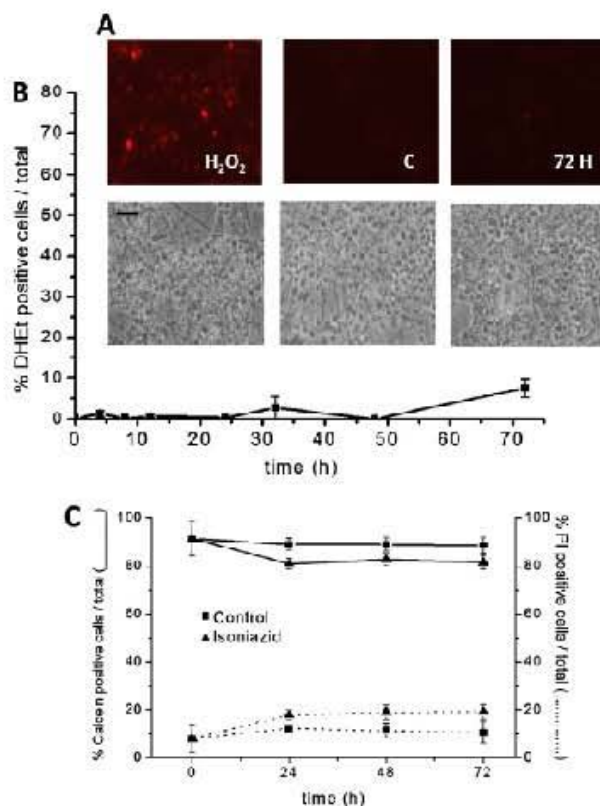


Fig. 2. ROS production and cell viability after isoniazid treatment.

D. Representative immunoblots of CYP2E1 and GAPDH protein levels at different times of isoniazid treatment. E. Densitometric analysis of immunoblots in F. Blots were performed from four independent experiments and bars are the mean \pm SE of the ratio of CYP2E1/GAPDH arbitrary densitometric units normalized with control. ($p < 0.05$ statistically different from control). The scale bar corresponds to 30 μ m. F. A representative immunoblot of CYP2E1 detection in increasing amounts of whole-cell lysate protein. G. A standard curve of CYP2E1 expression (Arbitrary optical density units) in CGN showing linear detection.

3.2. Isoniazid treatment does not induce ROS production or compromise cell viability

There was no evidence of DHEt oxidation after up to 72 h of isoniazid (0.1 mM) treatment (Fig. 2A and B). Exposure to 100 μ M hydrogen peroxide for 1 h was used as a positive control (Fig. 2A, left). The cell viability in isoniazid-treated cultures was not significantly affected compared with the untreated control group (Fig. 2C). These data were confirmed by the calculated percentage of dying cells.

Cells were cultured for 7 or 8 DIV and then treated with 0.1 mM isoniazid for multiple time periods. A. Epifluorescent images of DHEt oxidation in cells treated with 100 μ M hydrogen peroxide for 1 h (left panel), untreated cells (middle panel), and cells treated with 0.1 mM isoniazid for 72 h (right panel). The scale bar corresponds to 50 μ m. B. Quantification of ROS resulting from DHEt oxidation after isoniazid treatment. C. Cell viability after 24–72 h of isoniazid treatment. (■, control; and ▲, isoniazid treated). Viable cells stain positive for calcein (solid lines) and dying cells stain positive for propidium iodide (dashed lines). The data are

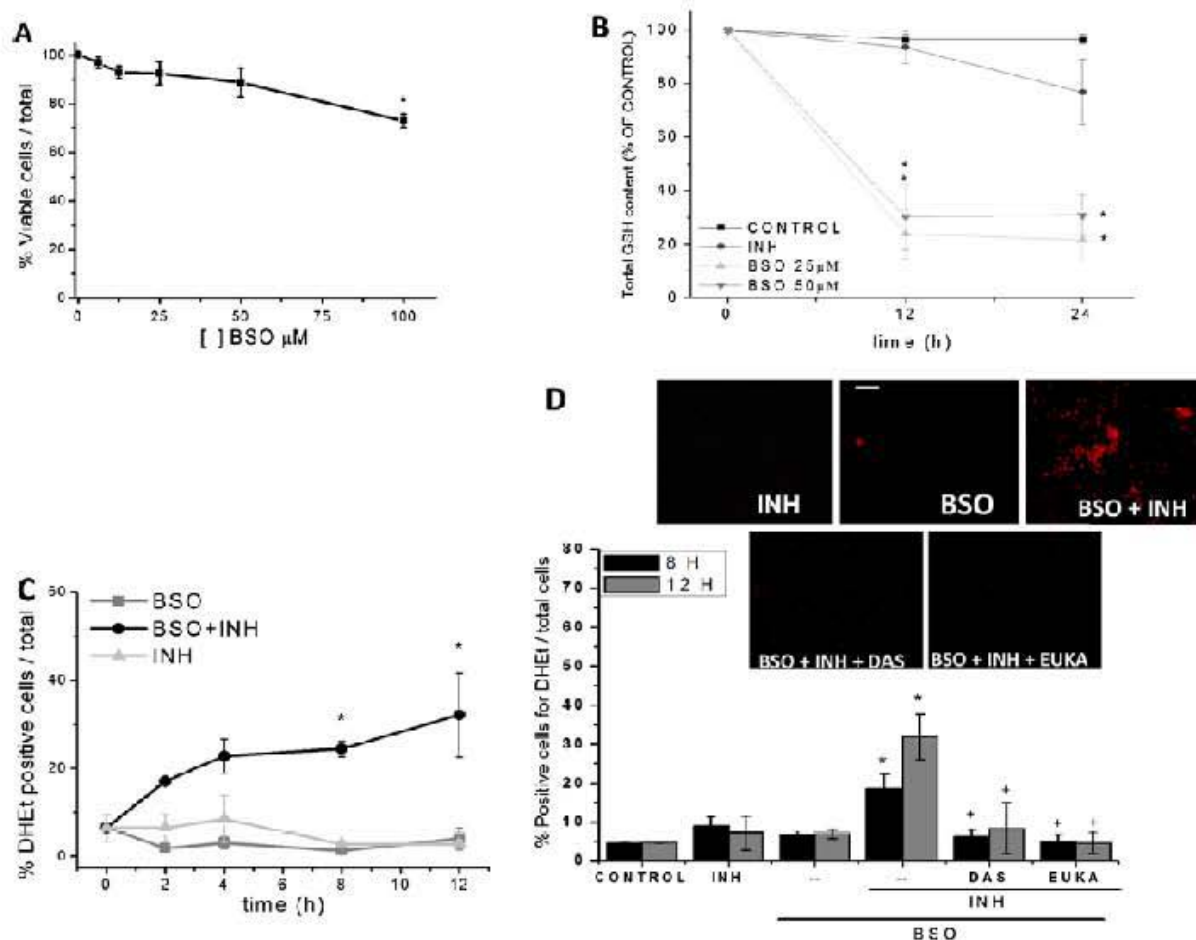


Fig. 3. ROS production after BSO and INH treatment on CGN cultures.

expressed as the mean \pm SE of four independent experiments percent of positive cells with respect to the total number of cells in each random field taken.

3.3. ROS induced by isoniazid treatment in the presence of BSO

Fig. 3B shows that a 12-h exposure to 25 and 50 μM BSO, but not isoniazid, depleted 80% of the total cytoplasmic glutathione. Exposure to 100 μM BSO for 24 h resulted in death in approximately 30% of cells (Fig. 3A). In all subsequent experiments, cells were pretreated with 50 μM of BSO for 12 h prior to isoniazid treatment. This BSO treatment depletes glutathione but it does not compromise cell viability. BSO or INH treatment alone did not generate reactive oxygen species as measured by DHEt oxidation (Fig. 3C). A significant increase in ROS production was found only in BSO-treated cells after isoniazid exposure for eight or twelve hours (Fig. 3C).

Cells were cultured at 8 DIV and then treated with L-buthionine sulfoximine (BSO), 0.1 mM isoniazid (INH) or both, as indicated. **A.** Cytotoxicity levels after 24 h of BSO (6–100 μM) treatment. **B.** Total glutathione content after 25 and 50 μM BSO treatment. The symbols used correspond to the following treatment conditions: ■, control; ●, isoniazid; ▲, 25 μM BSO and ◆ 50 μM BSO. The data are expressed as the % of the control value ($p < 0.05$). **C.** Sequential treatment with BSO (50 μM) and INH generates ROS production 8 h after isoniazid addition. The symbols used correspond to the

following treatment conditions: ■, 50 μM BSO; ▲, isoniazid; and ●, BSO plus isoniazid. **D.** Next to 12 h of BSO treatment, 0.1 mM isoniazid (INH), 100 μM diallyl sulfide (DAS) or 10 μM Eukarion-134 (EUKA) was added to the culture medium for 12 h as indicated. **Top** Representative epifluorescent images of DHEt oxidation. The scale bar corresponds to 50 μm . **Bottom.** Quantification of DHEt oxidation. The data are expressed as means \pm SE of the % of positive cells with respect to the total number of cells in each random field taken from six independent experiments. ($p < 0.05$ compared with the BSO group; $^{\dagger}p < 0.05$ compared with the BSO+INH group).

3.4. CYP2E1 induction is responsible for isoniazid-induced ROS production

Treatment with the CYP2E1 inhibitor diallyl sulfide normalized ROS to control levels in BSO and isoniazid exposed cultures (Fig. 3D). Additionally, co-treatment with EUKA, a complex that exhibits superoxide dismutase and catalase activity (Baudry et al., 1993), completely inhibited DHEt oxidation and ROS production (Fig. 3D).

3.5. Increased ROS results in DNA oxidation that can be prevented by CYP2E1 inhibition or antioxidant treatment

Cells treated with isoniazid did not exhibit DNA oxidation; however, cells treated with BSO did exhibit slightly DNA oxidation

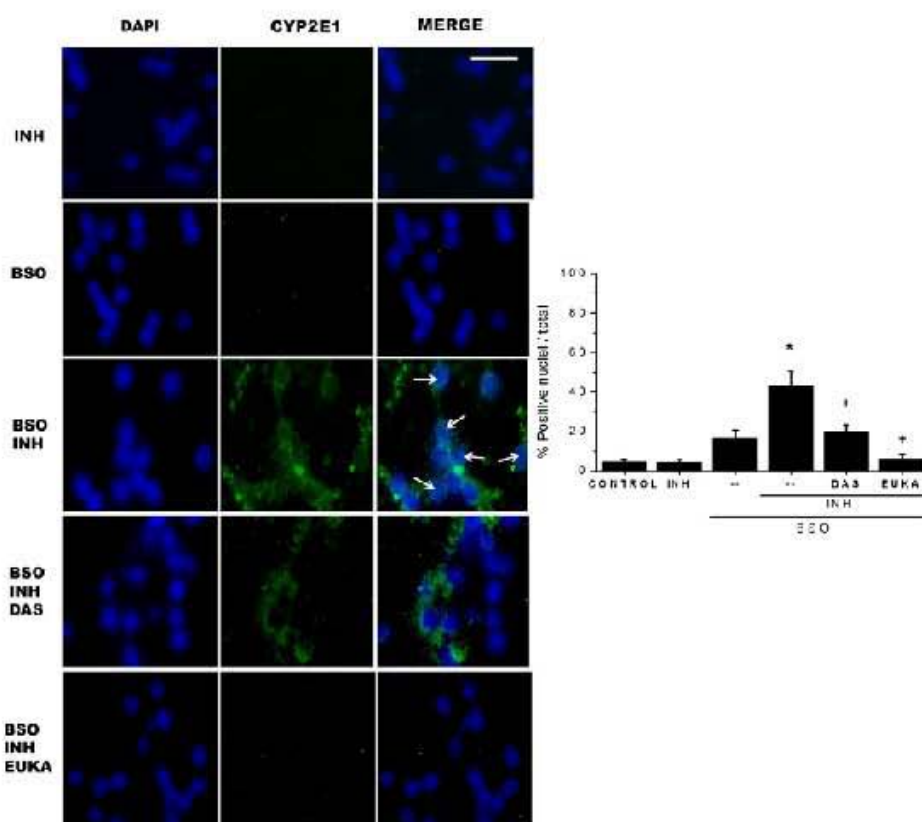


Fig. 4. Effect of CYP2E1 induction on DNA oxidation in glutathione-depleted CGN cultures.

(Fig. 4 top). Sequential treatment with BSO and isoniazid resulted in an approximate 50% increase in DNA oxidation of cells. This increase was inhibited by the addition of diallyl sulfide (Fig. 4, middle). Additionally, treatment with the antioxidant EUKA completely inhibits DNA oxidation.

Cells were cultured for 8 DIV and then treated with L-buthionine sulfoximine (BSO) for 12 h. Next 0.1 mM isoniazid (INH), 100 μ M diallyl sulfide (DAS) or 10 μ M Eukarion-134 (EUKA) was added to the culture medium for 12 h as indicated. Representative epifluorescent images of CGN cultures are shown on the left. The arrows represent nuclei positive for anti-8-hydroxy-2-deoxyguanosine. The quantified DNA oxidation is shown on the right. The scale bar corresponds to 30 μ m. The data are expressed as the means \pm SE of eight independent experiments. (* $p < 0.05$ compared with the BSO group; † $p < 0.05$ compared with the BSO+INH group).

3.6. The BSO/isoniazid-induced decrease in cell viability can be prevented by CYP2E1 inhibition or antioxidant treatment

Fig. 5 shows that treatment with isoniazid in glutathione-depleted CGN cultures led to a 30% decrease in calcein-positive cells (Fig. 5A) and a 30% increase in propidium iodide-positive cells (Fig. 5B). These effects can be inhibited by the addition of the CYP2E1 inhibitor diallyl sulfide and the antioxidant EUKA.

Cells were cultured for 8 DIV and then treated with L-buthionine sulfoximine (BSO) for 12 h. Next 0.1 mM isoniazid (INH), 100 μ M diallyl sulfide (DAS) or 10 μ M Eukarion-134 (EUKA) was added to the culture medium for 12 h as indicated. Representative images of calcein/PI staining of CGN cultures are shown (PI: phase contrast; CAL: calcein; PI: propidium iodide). The scale bar

corresponds to 50 μ m. A. Viable cells are expressed as the percent of calcein-positive cells considering with the untreated control cells defined as being 100% calcein positive. B. Dead cells are expressed as the percentage of PI-positive cells. Data are expressed as the mean \pm SE of six independent experiments. (* $p < 0.05$ compared with the BSO group; † $p < 0.05$ compared with the BSO + INH group).

4. Discussion

Xenobiotic metabolism within the brain constitutes a field of recent intensive research. Although low concentrations of these compounds could reach brain tissue, in situ xenobiotic metabolism could produce reactive, toxic metabolites that may cause irreversible neuronal damage. The identification of brain CYP substrates and inducers will enable a better understanding of their potential role in neurotoxicology and disease. Recent data suggest that CYPs could be an important factor in xenobiotic metabolism in cerebellar granule neurons (Sanchez-Martin et al., 2011). In this study we analyzed the toxicological consequences of the induction of CYP2E1 which is one of the important CYP isoform related to substrate metabolic activation and cell toxicity.

We confirmed that CYP2E1 is expressed in rat cerebellar granule neurons (Howard et al., 2003; Upadhyaya et al., 2000); furthermore, we showed that CYP2E1 expression is present in 8 DIV primary CGN culture of 8-day-old rat (Fig. 1A). Brain CYPs are present in many different subcellular membrane compartments including plasma membrane, endoplasmic reticulum, golgi and mitochondria (Bhagwat et al., 1995; Monroliu et al., 1995; Seliskar and Rozman, 2007). Our data suggest that CYP2E1 can be

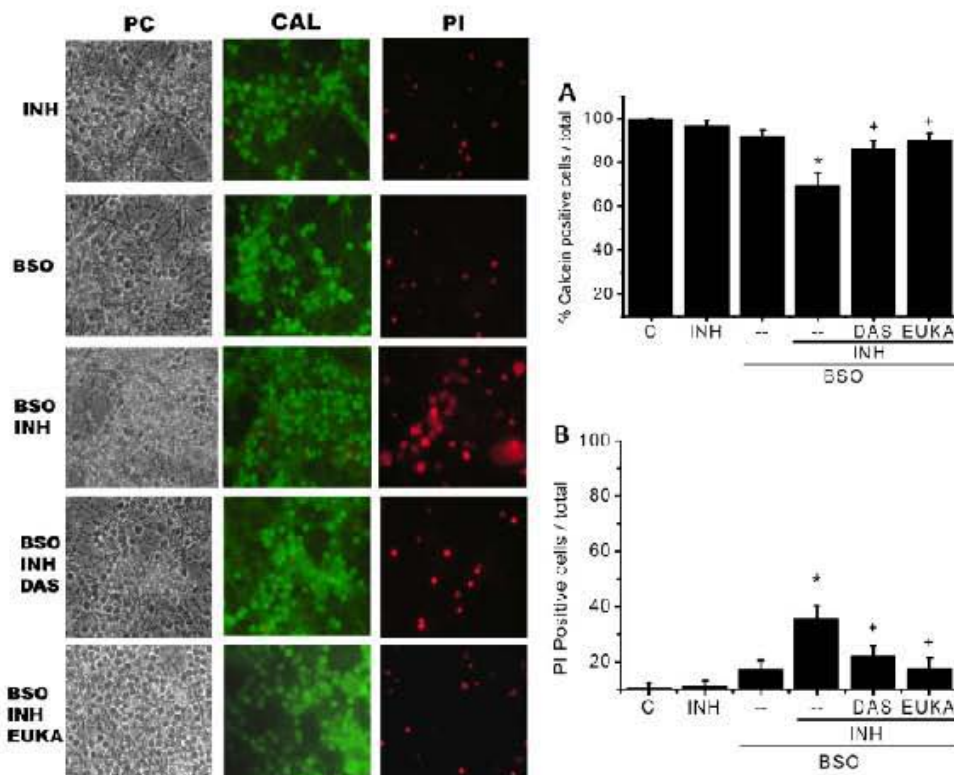


Fig. 5. Cell viability.

sub-localized to a specific region because it is located at a consistent distance from the nucleus as a punctuate staining (Fig. 1A). After treatment, this signal increases in fluorescence intensity and area around the nucleus (Fig. 1I, red arrows) but does not misplace its punctuate profile. Future experiments are needed to elucidate the specific cellular compartment associated with CGN-CYP2E1 expression. Our results also indicate that CYP2E1 is induced by a typical hepatic inducer, suggesting that the CYP2E1 present in CGNs is functional and responds to chemical stimuli (Fig. 1E–G). The induction is appreciable after 12 h of isoniazid treatment (Fig. 1D and E). The concentration of the inducer used in these experiments is similar to that reported by Gurumurthy et al. (1990) (0.11 mM) in slow acetylators patients suffering from intestinal tuberculosis, suggesting that it is possible to reach this plasma concentration under specific clinical treatments. This study demonstrates for the first time that isoniazid can induce cerebellar CYP2E1. Hepatic CYP2E1 can be induced through multiple mechanisms, and in the case of isoniazid, it is induced through protein stabilization (Zand et al., 1993) or translational activation (Park et al., 1993).

CYP2E1 produces ROS, mostly superoxide anion (Bell and Guengerich, 1997) elicited by endogenous and exogenous substrates that also act as inducers. In some cases, the induction of CYP2E1 alone leads to oxidative stress; however we found that the induction and possible metabolism of isoniazid did not generate ROS or cell toxicity (Fig. 2).

GSH is the most abundant antioxidant molecule in cells and plays a major role in defense against oxidative stress-induced cell injury (Hall, 1999). Moreover, previous studies have shown that GSH contributes significantly to the antioxidant response elicited against CYP2E1-generated oxidative stress (Wu and Cederbaum, 2001). Although we did not identify any changes in the glutathione

level after isoniazid treatment (Fig. 3A, circles), the incorporation of *l*-buthionin sulfoximine an inhibitor of glutathione synthesis, produces reactive oxygen species after eight hours of treatment (Fig. 3C). The concentration of BSO used in our experiments, significantly reduced the total GSH levels in CGNs (Fig. 3B) but failed to generate reactive oxygen species (Fig. 3C) or compromise cell viability (Fig. 3A). CGN resistance to BSO treatment was also detected by Wüllner et al. (1999) who demonstrated that treatment with 100 μ M BSO minimally compromise cell viability after 24 h of treatment. Furthermore, treatment with a CYP2E1 inhibitor completely inhibited the ROS generated (Fig. 3D). Additionally, in order to decompose the superoxide anion and hydrogen peroxide generated by CYP2E1 induction, we included a mimetic of superoxide dismutase/catalase compound (Euka). Incorporation of Euka completely inhibited the superoxide anion detected by DHE. These results suggest that GSH is required for protection against CYP2E1-generated superoxide anion induced by isoniazid exposure in cerebellar granule neurons. Since GSH depletion leads to the generation of ROS by CYP2E1-induction treatment, GSH appears to be important in protecting CGN against CYP2E1-induced toxicity.

A sustained production of high levels of ROS can lead to lipid, protein and DNA oxidation and CYP2E1 induction has been implicated in the oxidation of these biomolecules (Cederbaum et al., 2001). DNA oxidation can result in irreversible cell damage; therefore it is crucial to explore whether the ROS generated by isoniazid-induced CYP2E1 could oxidize DNA. One of the major products resulting from DNA oxidation is 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG). In this study, we evaluated the levels of DNA oxidation in CGNs treated with BSO, INH, DAS and EUKA by immunocytochemistry. Approximately 50% CGN exhibited DNA oxidative damage when treated with BSO and isoniazid (Fig. 4).

Moreover, the results show that there is a higher percentage of cells with DNA oxidation than ROS generation (Figs. 4 and 3D) or cell death (Fig. 5). These data suggest that there is a portion of cells that can survive DNA oxidation, presumably by a repair process (Weisman et al., 2007). DNA oxidation could occur due to the direct attack of DNA by ROS or to the production of mutagenic lipid peroxidation products. Co-treatment with BSO, INH and DAS, yielded a clear, positive signal of 8-oxo-dG immunoreactivity outside of the nucleus, which could correspond to mitochondrial DNA. This staining is not included in the quantification shown in Fig. 4. Additional experiments will be performed to investigate whether lipid peroxidation and mitochondrial DNA oxidation are present in cells treated with BSO, INH and DAS. Our data are corroborated by the findings that hepatocyte DNA oxidation by isoniazid treatment was inhibited by thiopronin, an inhibitor of CYP2E1 (Yue et al., 2009). Finally, only 30% of cells died under the treatment conditions by a mechanism that probably involves CYP2E1 and oxidative stress (Fig. 5).

Diallyl sulfide (DAS) is oxidized by CYP2E1 to diallyl sulfoxide (DASO) and diallyl sulfone (DASO₂), the last has been reported as a suicide inhibitor of CYP2E1 (Brady et al., 1991). DAS prevented the toxic effects of isoniazid and BSO, involving CYP2E1 as a possible key player in the toxicity of isoniazid.

We also showed that isoniazid-induced CYP2E1 could lead to neurotoxicity only when GSH is depleted. GSH depletion can enhance oxidative stress and may also increase the levels of excitotoxic molecules. Evidence for a role of oxidative stress and diminished GSH cellular status has been presented for neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease (Bains and Shaw, 1997). Thus, it is relevant to consider the potential risk of pharmacological inducers or substrates of brain CYP2E1 in vulnerable patients depleted of antioxidant defenses.

We conclude that cerebellar CYP2E1 induction by isoniazid could lead to the production of ROS, DNA oxidative damage and cerebellar granule death, although the possible role of isoniazid metabolites could not be discarded. It is well established that the contents of lipids and unsaturated fatty acids, known to be substrates of CYP2E1, are higher in the brain than in other tissues, so neuronal CYP2E1 may also be associated with the physiological events leading to cytotoxicity and neuronal degeneration.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Transparency Document

The Transparency document associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgements

The authors are grateful to Guadalupe Dominguez and Sandra Luz Hernandez for their excellent technical assistance. This work was supported by DGAPA-UNAM (IN214008). This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree in Biomedical Sciences of Ana Carolina Valencia-Olvera (Universidad Nacional Autónoma de México), who was supported by a CONACYT fellowship.

References

- Anandatheerthavarada, H.K., Gunton, S.K., Bhargava, S., Nayak, M.P., Greg, T.J., Ravindranath, V., 1993. Induction of brain cytochrome P-4502E1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.* 601, 279–285.

- Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25, 335–358.
- Beady, M., Edenne, S., Bruce, A., Palucki, M., Jacobsen, E., Maffroy, B., 1993. Selenomanganese complexes are superoxide dismutase-mimics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 964–968.
- Bel, L.L., Guengerich, F.P., 1997. Oxidation kinetics of ethanol by human cytochrome P450 2E1. Rate-limiting product release accounts for effects of isotopic hydrogen substitution and cytochrome 1b on steady-state kinetics. *J. Biol. Chem.* 272, 29641–29651.
- Bhagwat, S.V., Boyd, M.R., Ravindranath, V., 1995. Brain mitochondrial cytochromes P450: xenobiotic metabolism, presence of multiple forms and their selective inducibility. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 73–83.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brady, J.F., Ishizaki, H., Fukuto, J.M., Lin, M.C., Fadel, A., Gapac, J.M., Yang, C.S., 1991. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 542–547.
- Cederbaum, A.I., Wu, D., Mori, M., Bai, J., 2001. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radical Biol. Med.* 31, 1539–1543.
- Cohn, J.A., Alvarez, A.P., Kappas, A., 1977. On the occurrence of cytochrome P-450 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity in rat brain. *J. Exp. Med.* 145, 1049–1053.
- Chen, C., Cederbaum, A.I., 1995. Cytotoxicity and apoptosis induced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Mol. Pharmacol.* 53, 638–648.
- Dai, Y., Rastha-Step, J., Cederbaum, A.I., 1995. Stable expression of human cytochrome P4502E1 in HepG2 cells: characterization of catalytic activities and production of reactive oxygen intermediates. *Biochemistry* 32, 6928–6937.
- Das, M., Seth, P.K., Mukherjee, H., 1981. Characterization of microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase of rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 216, 156–161.
- Ding, X., Kaminsky, L.S., 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 149–173.
- Duthel, F., Beaune, P., Loriot, M.A., 2008. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. *Biochimie* 90, 425–436.
- Ferguson, L.S., Byndak, R.F., 2011. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 708–714.
- Gonzalez, F.J., 2007. The 2006 Bernard B. Brodie Award lecture: Cyp2e1. *Drug Metab. Dispos.: Biol. Fate Chem.* 35, 1–8.
- Guengerich, F.P., MacDonald, J.S., 2007. Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 344–369.
- Gunaratne, P., Ramachandran, R., Balasubramanian, K., Rahman, F., Victor, L., Narayana, A.S., Sarma, G.R., 1996. Gastro-intestinal absorption of isoniazid and rifampicin in patients with intestinal tuberculosis. *Indian J. Tuberc.* 37, 5–10.
- Hall, A.C., 1999. Glutathione and the regulation of cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477, 199–203.
- Howard, L.A., Mikoy, S., Hoffmann, E., Mash, D., Tyndale, R.F., 2003. Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1376–1386.
- Joshi, M., Tyndale, R.F., 2006a. Induction and recovery time course of rat brain CYP2E1 after nicotine treatment. *Drug Metab. Dispos.: Biol. Fate Chem.* 34, 647–652.
- Khekhar, J.V., Tyndale, R.F., 2011. Drug metabolism within the brain changes drug response: selective manipulation of brain CYP2B alters propofol effects. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36, 692–700.
- Khekhar, J.V., Tyndale, R.F., 2012. Rat brain CYP2B enzymatic activation of chlorpyrifos to the toxic mediates cholinergic neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* 126, 315–319.
- Lee, S.S., Bitero, J.J., Pineda, V., Fernandez-Salgado, P., Gonzalez, F.J., 1996. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J. Biol. Chem.* 271, 12667–12671.
- Lu, Y., Cederbaum, A.I., 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biol. Med.* 44, 723–738.
- Madan, A., Graham, R.A., Carroll, K.M., Mudra, D.R., Burton, L.A., Krueger, L.A., Downey, A.D., Uzerwinski, M., Forster, J., Ebedencio, M.D., Cao, L.S., Lettice, E.L., Zech, E., Robertson, J., P., Koch, P., Antonica, L., Wagner, C., Yu, L., Parkinson, A., 2003. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 31, 421–431.
- Mant, A., Tyndale, R.F., 2010. Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1185–1193.
- Miller, K.J., Anderholm, D.C., Ames, M.M., 1956. Metabolic activation of the serotonergic neurotoxin para-chloroamphetamine to chemically reactive intermediates by hepatic and brain microsomal preparations. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1737–1742.
- Montoli, C., Sanchez-Tello, M., Azmit, I., Burgal, M., Valles, S., Benito-Piqueras, J., Guerci, C., 1995. Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J. Neurochem.* 65, 2561–2570.
- Moran, J., Patel, A.J., 1989. Effect of potassium depolarization on phosphate-activated glutaminase activity in primary cultures of cerebellar granule neurons and astroglial cells during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 46, 97–105.

- Morgan, E.J., Koop, D.R., Coon, M.J., 1982. Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. Oxidation of alcohols. *J. Biol. Chem.* 257, 13951–13957.
- Park, K.S., Sohn, D.H., Veech, R.L., Song, R.J., 1993. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Eur. J. Pharmacol.* 248, 7–14.
- Rahman, I., Kudo, A., Bhowmik, S.K., 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1, 3159–3165.
- Sanchez-Martín, F.J., Fernández-Salguero, P.M., Merino, J.M., 2011. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse. *J. Neurochem.* 118, 153–162.
- Seliskar, M., Rozman, D., 2007. Mammalian cytochromes P450: importance of tissue specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 458–466.
- Shen, C., Zhang, H., Zhang, G., Meng, Q., 2006. Isoniazid-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes of gel entrapment culture. *Toxicol. Lett.* 167, 66–74.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Trafalis, D.T., Pantell, E.S., Gilvas, A., Tsigris, C., Karamanikos, F.N., 2010. CYP2E1 and risk of chemically mediated cancers. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5, 307–319.
- Upadhyay, S.C., Boyd, M.R., Ravindranath, V., 2001. Characterization and localization of cytochrome P450 mediated metabolism of MPTP to nor-MPTP in mouse brain: relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicity Res.* 3, 369–380.
- Upadhyay, S.C., Hirumala, P.S., Boyd, M.R., Mori, T., Ravindranath, V., 2009. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 23–34.
- Velasco, I., de Souza-Pinto, N.C., Steynsrup, T., Rehn, V.A., 2007. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience* 145, 1315–1329.
- Wu, D., Cederbaum, A.L., 2001. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25, 519–528.
- Wöllner, H., Seyfried, J., Groscurth, P., Reinhardt, S., Winter, S., Gleichmann, M., Hunkler, M., Loschmann, P., Schulz, J.B., Weller, M., Klockgether, T., 1999. Glutathione depletion and neuronal cell death: the role of reactive oxygen intermediates and mitochondrial function. *Brain Res.* 825, 51–62.
- Yadav, S., Bhawan, A., Singh, R.L., Sethi, P.K., Datta, D., 2008. Expression of constitutive and inducible cytochrome P450 2E1 in rat brain. *Mol. Cell Biochem.* 286, 171–180.
- Yue, J., Dong, G., He, C., Chen, J., Liu, Y., Peng, R., 2009. Protective effects of thiopronin against isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 264, 185–191.
- Zand, R., Nelson, S.D., Slattery, J.T., Thummel, K.E., Kallhorn, L.F., Adams, S.P., Wright, J.M., 1993. Inhibition and induction of cytochrome P4502E1-catalyzed oxidation by isoniazid in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 54, 142–149.
- Zhong, Y., Dong, G., Luo, H., Cao, J., Wang, C., Wu, J., Peng, Y.Q., Yue, J., 2012. Induction of brain CYP2E1 by chronic ethanol treatment and related oxidative stress in hippocampus, cerebellum, and brainstem. *Toxicology* 302, 275–284.
- Zhou, K., Khokhar, J.Y., Zhan, B., Tyndale, R.F., 2013. First demonstration that brain CYP2D-mediated opiate metabolic activation alters analgesia in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 85, 1848–1855.