

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA.

METABOLISMO MICROSOMAL HEPATICO EN  
RATAS CON ARTRITIS EXPERIMENTAL

Tesina presentada por Juan José  
Moreno Aznárez para optar al  
Grado de Licenciado.

Este trabajo ha sido dirigido  
por los Drs. Dña M. Cristina  
Castellote Bargalló y D. José  
Queralt Regué.

Barcelona, Febrero de 1983.



Mi más cariñoso agradecimiento a los Drs. Dña. M. Cristina Castellote Bargalló y D. José Queralt Regué, directores de esta tesina, por su constante interes y orientación que ha hecho posible este trabajo. Asimismo, agradezco al Prof. Dr. D. Antonio Torralba Rodríguez, Catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia, la magnifica oportunidad que me ha ofrecido al poder realizar esta Tesina en su Departamento.

Me gustaría agradecer la eficaz colaboración de Dña Margarita Castell Escuer y Dña. Montserrat Rosich Carreras , así como, a los Departamentos de Bioquímica y Microbiología que cedieron amablemente parte de sus instalaciones, que resultaban imprescindibles para el desarrollo de este trabajo, y a todas aquellas personas que tanto cariño y apoyo me han ofrecido.

"No cesaremos de explorar y el  
final de toda nuestra exploración  
será llegar de donde arrancamos y  
conocer el lugar por primera vez."

(T.S. Eliot)

## OBJETO

## 1.-PARTE TEORICA

1.1.- <u>CICLO GENERAL DE LOS FARMACOS EN EL ORGANISMO.</u>	4
1.2.- <u>METABOLISMO HEPATICO.</u>	9
1.3.- <u>SISTEMA ENZIMATICO MICROSOMAL HEPATICO.</u>	11
1.4.- <u>COMPOSICION DEL SISTEMA MICROSOMAL.</u>	17
1.4.1.- CITOCROMO P-450.	20
1.4.1.1.- <u>Multiplicidad.</u>	20
1.4.1.2.- <u>Composición química y peso molecular.</u>	25
1.4.1.3.- <u>Secuencia de aminoácidos.</u>	27
1.4.1.4.- <u>Grupo hemo.</u>	30
1.4.1.5.- <u>Ligandos del grupo hemo.</u>	31
1.4.1.6.- <u>Propiedades ópticas.</u>	34
1.4.2.- CITOCROMO b <sub>5</sub> .	35
1.4.3.- NADPH CITOCROMO P-450 REDUCTASA.	38
1.4.4.- CITOCROMO b <sub>5</sub> REDUCTASA.	39
1.4.5.- LA MEMBRANA MICROSOMAL.	40
1.5.- <u>INTERACCIONES DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA.</u>	45
1.5.1.- ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION.	46
1.5.2.- UNION DEL SUSTRATO AL CITOCROMO P-450	46
1.5.3.- REDUCCION DEL FERRICITOCROMO P-450.	46
1.5.4.- OXIGENACION DEL COMPLEJO SUSTRATO-FERRI_ CITOCROMO P-450.	48
1.5.5.- REDUCCION DEL COMPLEJO SUSTRATO-OXIANION_ FERRICITOCROMO P-450 Y FORMACION DEL PRO_ DUCTO.	52

1.5.6.- SINERGISMO DEL SISTEMA NADH.	53
1.5.7.- FUENTE DE ELECTRONES PARA EL SISTEMA DEL CITOCROMO P-450.	54
1.5.8.- TERMODINAMICA DEL PROCESO.	55
1.5.9.- PASOS LIMITANTES DEL SISTEMA.	57
1.6.- <u>REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS MICROSOMALES</u> <u>HEPATICOS.</u>	58
1.6.1.- EPOXIDACION.	58
1.6.2.- HIDROXILACION AROMATICA.	59
1.6.3.- HIDROXILACION DE ANILLOS ALQUILICOS.	61
1.6.4.- HIDROXILACION ARILICA.	61
1.6.5.- OXIDACION DE ALCOHOLES.	63
1.6.6.- N-HIDROXILACION.	63
1.6.7.- N-OXIDACION.	64
1.6.8.- O-DEALQUILACION.	64
1.6.9.- N-DEALQUILACION.	67
1.6.10.- DESAMINACION.	67
1.6.11.- SULFOXIDACION.	67
1.6.12.- S-DEALQUILACION.	68
1.6.13.- DESHALOGENACION.	68
1.6.14.- REDUCCION CATALIZADA POR ENZIMAS MICROSOMALES.	69
1.6.14.1.- <u>Azoreducción.</u>	70
1.6.14.2.- <u>Nitroreducción.</u>	70

## 2.-PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1.- MATERIAL.

2.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.	72
-----------------------------	----

2.1.2.- FARMACOS.	73
2.1.2.1.- <u>Indometacina.</u>	73
2.2.- <u>METODOS BIOLOGICOS.</u>	77
2.2.1.- INDUCCION DE LA ARTRITIS.	77
2.2.2.- VALORACION DEL GRADO DE INFLAMACION.	77
2.2.3.- SELECCION DE LOS ANIMALES ARTRITICOS.	77
2.2.4.- TOMA DE MUESTRAS.	79
2.2.5.- EVOLUCION CLINICA.	79
2.2.5.1. <u>Curva ponderal.</u>	80
2.2.5.2.- <u>Inflamación local y sistémica.</u>	80
2.2.5.3.- <u>Peso de órganos.</u>	80
2.3.- <u>METODOS BIOQUIMICOS.</u>	80
2.3.1.- DETERMINACION DE PROTEINAS SERICAS TOTALES.	81
2.3.2.- DETERMINACION DEL PROTEINOGRAMA.	81
2.3.3.- AISLAMIENTO DE LA FRACCION MICROSOMAL.	83
2.3.3.1.- <u>Centrifugación.</u>	83
2.3.3.2.- <u>Ultracentrifugación.</u>	84
2.3.3.3.- <u>Precipitación con cloruro cálcico.</u>	84
2.3.4.- DETERMINACIÓN DE PROTEINAS EN LA FRACCION MICROSOMAL.	88
2.3.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMINOPIRINA N-DEMETILASA.	91
2.3.6.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANILINA p-HIDROXILASA.	96
2.4.- <u>PAUTAS EXPERIMENTALES.</u>	100
2.4.1.- PAUTA EXPERIMENTAL A.	100
2.4.2.- PAUTA EXPERIMENTAL B.	103

2.5.-	<u>CRITERIOS ESTADISTICOS APLICADOS.</u>	105
2.5.1.-	INDICES DEL GRADO DE DISPERSION.	105
2.5.2.-	CORRELACION Y REGRESION.	105
2.5.3.-	PRUEBAS DE COMPARACION DE DOS GRUPOS.	106
2.5.4.-	CALCULO ESTADISTICO.	106
2.6.-	<u>RESULTADOS.</u>	108
2.6.1.-	SERIE EXPERIMENTAL A.	108
2.6.1.1.-	<u>Curva ponderal.</u>	108
2.6.1.2.-	<u>Inflamación local y sistémica.</u>	109
2.6.1.3.-	<u>Evolución del peso del hígado.</u>	110
2.6.1.4.-	<u>Proteínas totales.</u>	111
2.6.1.5.-	<u>Resultados del proteinograma.</u>	111
2.6.1.5.1.-	Albúmina.	111
2.6.1.5.2.-	Alfa-globulinas	112
2.6.1.5.3.-	Alfa <sub>1</sub> -globulinas.	111
2.6.1.5.4.-	Alfa <sub>2</sub> -globulinas.	111
2.6.1.5.5.-	Beta-globulinas.	112
2.6.1.5.6.-	Gama-globulinas.	113
2.6.1.5.7.-	Cociente albúmina/globulina	114
2.6.1.6.-	<u>Resultados del estudio comparativo entre las tres técnicas de aislamien- to microsomal utilizadas.</u>	118
2.6.1.7.-	<u>Resultados de las puestas a punto de las determinaciones enzimáticas.</u>	118
2.6.1.8.-	<u>Actividad aminopirina N-demetilasa.</u>	119
2.6.1.9.-	<u>Actividad anilina p-hidroxilasa.</u>	120
2.6.1.10.-	<u>Correlaciones.</u>	145

3.- DISCUSION	149
4.- CONCLUSIONES	157
5.- BIBLIOGRAFIA	159

INDICES DE FIGURAS.-

Pág.

Figura 1:	Papel del citocromo P-450 en la excreción de los fármacos.	7
Figura 2:	Principales vías de eliminación de los xenobiontes	8
Figura 3:	Tipos de reacciones de oxidación de fármacos	11
Figura 4:	Proceso de homogenización	13
Figura 5:	Morfología y localización del retículo endoplasmático	15
Figura 6:	Esquema de las cadenas de transporte electrónico hacia el citocromo P 450	18
Figura 7:	Entrada de electrones al ciclo del citocromo P 450	19
Figura 8:	Secuencia de aminoácidos de los citocromos P 450	28
Figura 9:	Estructura secundaria de los citocromos P 450	29
Figura 10:	Estructura del grupo hemo del citocromo P 450	30
Figura 11:	Ligandos del grupo hemo del citocromo P450	32
Figura 12:	Unión de los dos tipos de sustrato al citocromo 450	32
Figura 13:	Estructura del citocromo $b_5$	37
Figura 14:	Situación del citocromo P 450 y NADPH-reductasa en la membrana	42

Figura 15:	Interacción entre el citocromo P 450 y la NADPH reductasa	43
Figura 16:	Papel de los fosfolípidos en la membrana microsomal	44
Figura 17:	Interacción de la reductasa con el complejo sustrato-citocromo P 450	49
Figura 18:	Ciclo general del citocromo P 450	50
Figura 19:	Pasos con intercambio de energía en el ciclo del citocromo P 450	56
Figura 20:	Estructura molecular de la indometacina	73
Figura 21:	Puntos de acción de la indometacina en la cascada del ácido araquidónico	75
Figura 22:	Comparación entre el método de ultracentrifugación y precipitación con cloruro de calcio	86
Figura 23:	Esquema seguido en el aislamiento microsomal	87
Figura 24:	Curva de calibración en la determinación de proteínas microsomales	90
Figura 25:	Curva de calibración externa en la determinación de la actividad aminopirina N-demetilasa	95
Figura 26:	Curva de calibración interna en la determinación de aminopirina N-demetilasa	95
Figura 27:	Curva de calibración externa en la determinación de la actividad anilina p-hidroxilasa	100

Figura 28:	Curva de calibración interno en la determi- nación de la actividad anilina p-hidroxilasa	100
Figura 29:	Diseño de la pauta experimental A	101
Figura 30:	Diseño de la pauta experimental A	102
Figura 31:	Diseño de la pauta experimental B	104
Figura 32:	Histogramas representando la evolución del peso corporal en EXP-A	122
Figura 33:	Evolución del incremento de la pata ipsi- lateral del EXP-A	124
Figura 34	Evolución del incremento de volumen de la pata contralateral del EXP-A	125
Figura 35:	Evolución del peso del hígado	127
Figura 36	Evolución del cociente albúmina/globulinas	139
Figura 37:	Evolución de la fracción albúmina	130
Figura 38:	Evolución de la fracción alfa <sub>2</sub> -globulinas	134
Figura 39:	Evolución de la fracción beta-globulinas	136
Figura 40:	Evolución de la actividad aminopirina N- de- metilasa	142
Figura 41:	Evolución de la actividad anilina p-hidro- xilasa	144
Figura 42:	Correlación entre el incremento de volumen de la pata contralateral y la actividad aminopirina N-demetilasa	145
Figura 43:	Correlación entre el incremento de volumen de la pata contralateral y los niveles de alfa <sub>2</sub> -globulinas	146

Figura 44: Correlación entre la actividad aminopirina  
N-demetilasa y los niveles de alfa<sub>2</sub>-globu-  
linas

147

INDICES DE TABLAS

Pág.

Tabla I:	Estudio comparativo entre el REL y RER	12
Tabla II:	Enzimas asociados al reticulo endoplasm.	
Tabla III:	Tipos de inductores del citocromo P- 450	21
Tabla IV:	Inductores del sistema microsomal hepático	24
Tabla V:	Pesos moleculares de diferentes isoenzimas del citocromo P-450	26
Tabla VI:	Tipos de sustratos	33
Tabla VII:	Variaciones del espectro por el sustrato	
Tabla VIII:	Valores medios e índices del grado de dispersión del peso corporal del EXP-A	121
Tabla IX:	Valores medios e índices del grado de dispersión del peso corporal del EXP-B	121
Tabla X:	Valores medios e índices del grado de dispersión en el incremento de volumen de la pata ipsilateral del EXP-A	123
Tabla XI:	Valores medios e índices de dispersión de el incremento de volumen de la pata contralateral del EXP-A	123
Tabla XII:	Valores medios e índices del grado de dispersión del peso de hígado del EXP-A	126
Tabla XIII:	Valores medios e índices del grado de dispersión del peso de hígado del EXP-B	126
Tabla XIV:	Valores medios e índices de dispersión de las proteínas séricas del EXP-A	128

Tabla XV:	Valores medios e índices de dispersión de las proteínas séricas del EXP-B	128
Tabla XVI:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción albúmina del EXP-A	129
Tabla XVII:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción albúmina del EXP-B	129
Tabla XVIII:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción alfa-globulina en EXP-A	131
Tabla XIX:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción alfa-globulina en EXP-B	131
Tabla XX:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción alfa <sub>1</sub> -globulina en EXP-A	132
Tabla XXI:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción alfa <sub>1</sub> -globulina en EXP-B	132
Tabla XXII:	Valores medios e índices del grado de dispersión de la fracción alfa <sub>2</sub> -globulina en el EXP-A	133
Tabla XXIII:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción alfa <sub>2</sub> -globulina en EXP-B	133
Tabla XXIV:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción beta-globulina en EXP-A	135
Tabla XXV:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción beta-globulina en EXP-B	135
Tabla XXVI:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción gama-globulina en EXP-A	137

Tabla XXVII:	Valores medios e índices de dispersión de la fracción gama-globulina en EXP-B	137
Tabla XXVIII:	Valores medios e índices del grado de dispersión del cociente albúmina/globulina en el EXP-A	138
Tabla XXIX:	Valores medios e índices del grado de dispersión del cociente albúmina/globulina en el EXP-B	138
Tabla XXX:	Valores individuales, medios e índices del grado de dispersión de los resultados obtenidos con los tres métodos de aislamiento microsomal	140
Tabla XXX':	Resultados detallados de parte de la Tabla XXX	140'
Tabla XXXI	Valores medios e índices del grado de dispersión de los valores de actividad aminopirina N-demetilasa	141
Tabla XXXII:	Valores medios e índices de dispersión de la actividad aminop. N-demetilasa	141
Tabla XXXIII:	Valores medios e índices de dispersión de la actividad anilina p-hidroxilasa	143
Tabla XXXIV:	Valores medios e índices de dispersión del tanto por ciento de inhibición producido por la indometacina sobre los parámetros estudiados.	148

ABREVIATURAS USADAS EN LA INTRODUCCION

RE	Reticulo endoplasmático
RER	Reticulo endoplasmático rugoso.
REL	Reticulo endoplasmático liso.
AFME	Actividad enzimática metabolizadora de fármacos.
NADP	Adenina dinucleotido trifosfato.
NAD	Adenina dinucleotido difosfato.
Cit.P-450	Citocromo P-450.
Cit b <sub>5</sub>	Citocromo b <sub>5</sub>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
FAD	Flavín adenin dinucleotido.
FMN	Flavín adenin mononucleotido.
SOD	superóxido dismutasa.
CATAL	Catalasa.

-OBJETO-

En 1954 la "American Medical Association" inició el control etiológico de las discrasias sanguíneas, comprobándose que existía un paralelismo entre éstas y la administración de algunos medicamentos. Desde entonces en numerosos países se han creado comisiones estatales, coordinadas por la Organización Mundial de la Salud, encargadas de la Farmacovigilancia. Las estadísticas indican que del 2.9 al 3.7 % de los ingresos hospitalarios son atribuibles a reacciones adversas de los medicamentos (CARANASOS y col., 1974), que del 18 al 30 % de los pacientes hospitalizados sufren reacciones medicamentosas indeseables y lo que es aún más grave, un 3 % de las defunciones hospitalarias pueden atribuirse a fármacos.

Sólo el 30 % de las reacciones indeseables, las debidas a la idiosincrasia del individuo y las reacciones de hipersensibilidad, son difíciles de evitar. El 70 % restante se produce en grupos reducidos como neonatos, durante el embarazo, tercera edad y en pacientes con insuficiencia renal y hepática (ERILL, 1980). En este sentido, en nuestro trabajo nos hemos centrado en el estudio de la influencia de una determinada enfermedad, sobre los sistemas enzimáticos metabolizadores de fármacos.

En el hígado se encuentran numerosos sistemas responsables de la biotransformación de sustancias exógenas, la mayor parte de ellos se basan en reacciones microsomales y un elemento clave para su desarrollo lo constituye una hemoproteína denominada citocromo P-450.

Se ha observado que en la hepatitis y cirrosis, la vida media de numerosas sustancias se halla aumentada (paracetamol, diacepán, hidrocortisona, isoniácida, mepiramina, lidocaína, cloramfenicol, etc.) (CREASY, 1979). Los escasos estudios bioquímicos realizados en este aspecto indican que la reducción de la vida media de eliminación, en muchos fármacos, es consecuencia de una reducción en la actividad de las enzimas microsomales hepáticas. Así, en hepatitis y cirrosis, el nivel de citocromo P-450 está reducido (GORESKY y col., 1974), observándose una disminución en la actividad enzimática del hígado (MAKINO y TAKAMURA, 1978).

Nuestro equipo se halla actualmente dedicado a completar la definición del modelo de artritis experimental conocido como "artritis adyuvante de Freund", similar a la artritis reumatoide humana. En ambas patologías se presenta disfunción hepática, de ahí que el objeto perseguido en este trabajo ha sido el estudio de la capacidad metabolizadora de fármacos, centrada en las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa hepáticas, así como observar las modificaciones inducidas por un antiinflamatorio clásico, como la indometacina a dosis terapéuticas.

1.-PARTE TEORICA.-

## 1.1.- CICLO GENERAL DE LOS FÁRMACOS EN EL ORGANISMO.

La actividad terapéutica de los fármacos será función de los factores que regulan la concentración de estos compuestos en el compartimiento en que se encuentran los puntos de acción, (la biofase). La concentración de un fármaco en la biofase viene determinada fundamentalmente por la relación entre la absorción, la distribución y la eliminación.

La velocidad con que la mayoría de los fármacos son eliminados del organismo depende de la velocidad con que son metabolizados y excretados. El metabolismo puede convertir a un compuesto, sin actividad, llamado "profármaco", en su metabolito activo, aunque en la mayoría de los casos, transforma a los fármacos en sustancias menos activas o inactivas. Esta pérdida de actividad puede deberse a la pérdida de su actividad intrínseca para estimular al receptor o a la disminución de su liposolubilidad, con la consiguiente reducción de su capacidad para atravesar las membranas biológicas y alcanzar la biofase correspondiente.

Una característica general del metabolismo de fármacos en los vertebrados es su conversión a sustancias más polares. En consecuencia, la distribución de éstas sustancias se limitará más al líquido extracélular, que sus precursores. De este modo, las sustancias extrañas al organismo se pone a disposición de los mecanismos de excreción. Además, esta hidrofilia puede producir una disminución de la proporción y firmeza con que los fármacos se fijan a las pro-

teínas o a otros constituyentes orgánicos, o bien, siendo almacenados en el tejido adiposo.

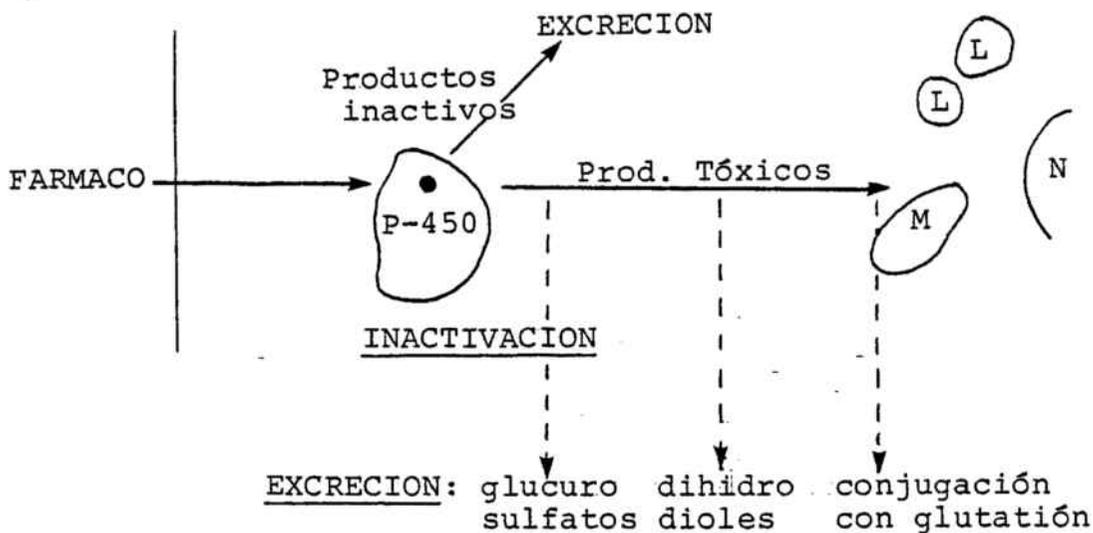
La disminución en la lipofilia de las sustancias extrañas al organismo por las reacciones metabólicas, da lugar a una reducción en la reabsorción tubular en los túbulos renales y, por consiguiente, a una mejor excreción urinaria.

El metabolismo de los fármacos no equivale exactamente a su detoxificación en todos los casos. Algunos compuestos son transformados en sustancias sin actividad farmacológica pero con actividad tóxica.

Así, en la fig.1 se observa un esquema básico del papel del sistema metabolizador del citocromo P-450 en la transformación de los fármacos.

Las biotransformaciones de los compuestos extraños al organismo se lleva a cabo fundamentalmente en el hígado, aunque la mayor parte de los tejidos del organismo tienen actividad metabólica. Las enzimas responsables se hallan presentes en gran variedad de especies, como en el hígado de peces, anfibios, reptiles y aves (GARFINKEL, 1963 y STRITTMATER y UMBERGER, 1969). También se han hallado en numerosas plantas (MURPHY y WEST, 1969), así como, en levaduras, hongos y bacterias (BERG y col., 1976). En los insectos, desempeñan un papel destacado en la metabolización de insecticidas y plagicidas

En mamíferos, se han encontrado en el intestino (TAKESUE y SATO, 1968), pulmón (ESTABROOK, 1963), piel (POLAND y col., 1974), testículos (BETZ y col., 1976), placenta (MEIGS y col., 1968), sistema nervioso (COHN y col.,



- (M) - mitocondrias
- (L) - lisosomas
- (N) - nucleo celular

Fig.1: esquema del papel del cit.P-450 en la excreción de las sustancias extrañas al organismo.

1977) y en las glándulas suprarrenales e hígado donde se encuentra en mayor proporción (ELLIN y col., 1972).

Generalmente el metabolismo de fármacos disminuye su carácter liposoluble, haciendolos más polares y por tanto, más hidrofílicos lo que facilita su excreción. Los fármacos solubles en agua son normalmente eliminados, sin sufrir cambios, por vía urinaria y tienen un corto periodo de permanencia en el organismo.

En la fig.2 se observan las principales vías metabólicas de los fármacos, de vital importancia, puesto que proporcionan al organismo los medios necesarios para su eliminación. Estas vías, en ocasiones, constituyen

rutas metabólicas de detoxificación para otros agentes extraños que ingresan en el organismo.

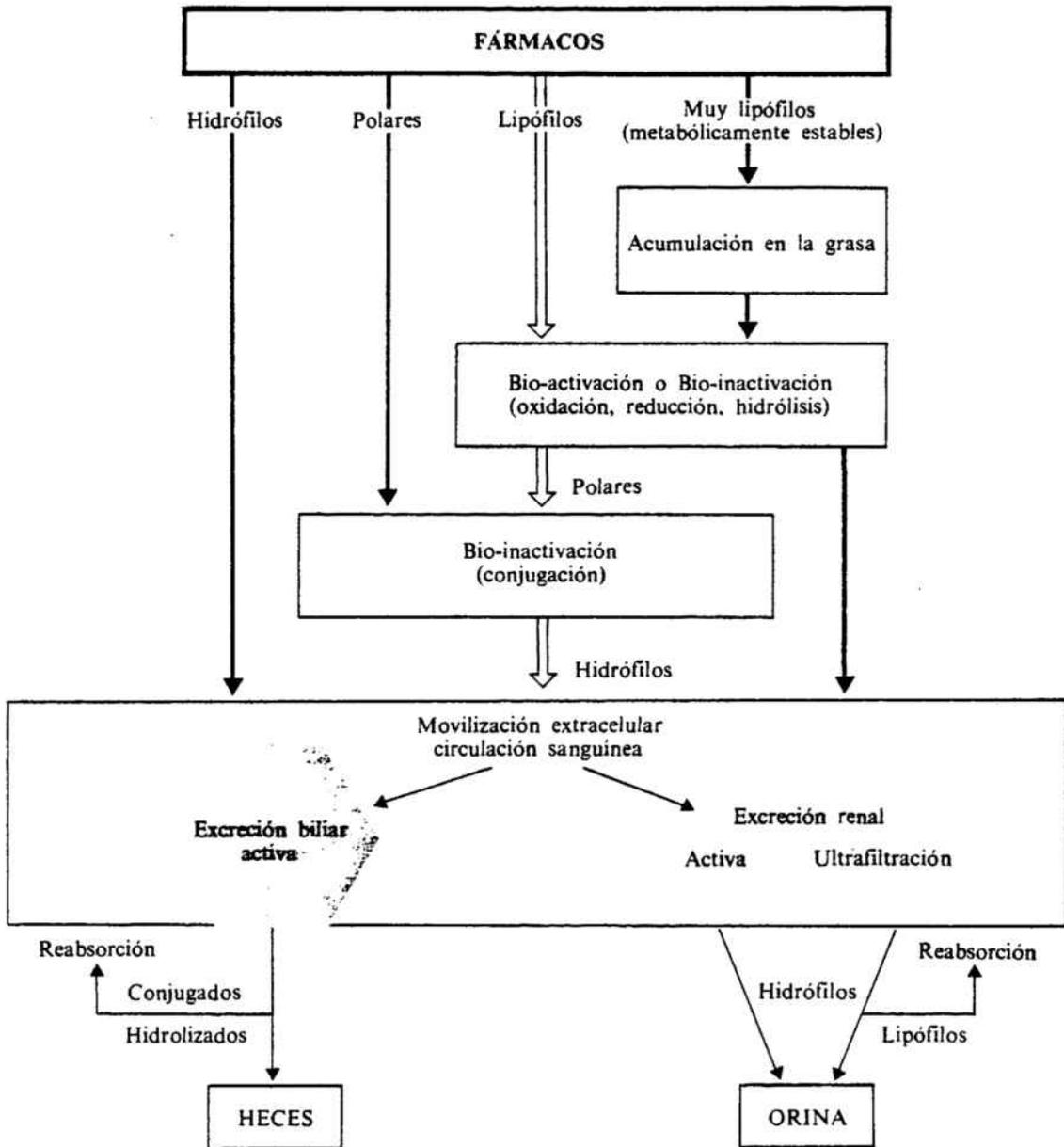


fig.2: Principales vías de eliminación de las sustancias extrañas al organismo.

## 1.2.- METABOLISMO HEPATICO.-

En el hígado, al igual que en otros tejidos, existen una serie de sistemas enzimáticos, encargados de gobernar el metabolismo general de la célula. En su origen, estos sistemas se hallaban dirigidos a metabolizar sustancias endógenas, como esteroides, bilirrubina y ácidos grasos, sin embargo, en ocasiones, su capacidad enzimática se destina al metabolismo de sustancias extrañas, entre las que se incluyen los fármacos, ULLRICH y KREMERS (1977) han conferido un carácter evolutivo a este cambio de sustratos.

Estos sistemas enzimáticos hepáticos, se hallan, aparentemente, menos desarrollados en los vertebrados inferiores tales como los peces y pueden haber evolucionado en los vertebrados terrestres, frente a las necesidades de eliminar del organismo tóxicas y sustancias extrañas.

Entre las funciones fisiológicas del sistema enzimático microsomal hepático, podemos destacar: diversas etapas en la conversión del colesterol a ácidos biliares (HAUGEN, 1976 y HANSSON y WILVALL, 1979), el metabolismo de hormonas esteroideas como la testosterona (HANSSON y WILVALL, 1982 y WAXMAN y col., 1982), la hidroxilación de las prostaglandinas (VATSIS y col., 1982) y recientemente, se ha encontrado que la prostaciclín-sintetasa y la tromboxano-sintetasa de las plaquetas pertenecen al sistema metabolizador microsomal de fármacos (GRAF y col., 1983 y ULLRICH y HAURAND, 1982), asimismo,

el sistema microsomal tiene un papel importante en el metabolismo de sustancias carcinogénicas, así GELBOIN (1980) y WATTENBERG (1982) estudiaron su acción metabolizadora sobre los productos producidos por la flora intestinal. Además este sistema en el tejido renal participa en la transformación del calciferol a su forma activa fisiológica, la vitamina D<sub>3</sub> (BHATTACHARYA y DE LUCA, 1974). Por otra parte sus análogos en el reino vegetal intervienen en la síntesis de giberrelinas (MURPHY y WEST, 1969), en la formación de ligninas, taninos y flavonoides en el sorgo (POTTS y col., 1974) y en la síntesis de alcaloides y la hidroxilación del geraniol en el género Roseu.

Apesar de la múltiple funcionalidad del sistema microsomal hepático y extrahepático, la capacidad metabolizadora de xenobiontes en el hígado es una de sus funciones más importantes, y se ejerce a través de dos tipos de reacciones: reacciones de tipo I en las que se produce un cambio en la molécula del fármaco (oxidación, reducción, etc.) y reacciones de tipo II que implican la formación de un conjugado con el xenobionte transformado previamente por la reacción tipo I. En la fig.3 se muestra un esquema de ambos tipos de reacciones.

Las reacciones del tipo I constituidas, principalmente, por oxidaciones, las podemos dividir, a su vez, en catalizadas por el sistema enzimático microsomal y en oxidaciones no microsomales.

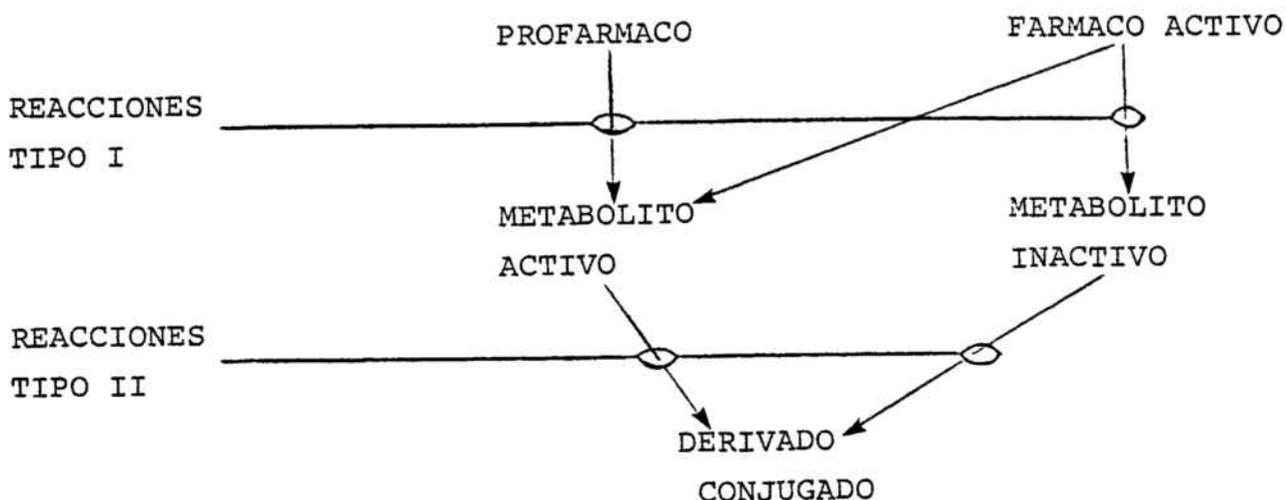


fig.3: Esquema de los dos tipos de reacciones através de las cuales son biotransformadas y eliminadas las sustancias extrañas al organismo.

### 1.3.- SISTEMA ENZIMATICO MICROSOMAL HEPATICO.-

Cuando el tejido hepático es homogeneizado, centrifugado a 10.000 g durante 15 min y el sobrenadante centrifugado de nuevo durante 60 min a 105.000 g, este último sedimento constituye la fracción microsomal en la cual se encuentran la mayoría de las enzimas metabolizadoras de fármacos.

Los microsomas son vesículas formadas por fragmentos del retículo endoplasmático roto durante la homogeneización, como se representa en la fig.4 .

Este retículo se halla formado por una trama de túbulos de lipoproteínas, unidos tanto a la membrana nuclear como a la celular, que se encuentran por todo el citoplasma en dos formas, el retículo liso y el rugoso, este último contiene los ribosomas. La fig.5 representa el sistema de túbulos y su situación en la membrana.

Las enzimas metabolizadoras de fármacos están asociadas, principalmente, con el retículo endoplasmático liso. En efecto, con la excepción de la glucuroniltransferasa, implicada en la formación de glucurónidos, estas enzimas se hallan firmemente sujetas a la estructura reticular.

TABLA I: COMPARACION ENTRE EL RETICULO ENDOPLASMATICO LISO Y EL RUGOSO.

RER	REL
Posee ribosomas.	No presenta ribosomas.
En él tiene lugar la síntesis de proteínas.	No hay síntesis de proteínas, pero contiene proteínas recién sintetizadas por el RER.
No presenta actividad glucosiltransferasa apreciable.	Presenta actividad glucosiltransferasa. En él se sintetizan glucoproteínas.
En él se sintetiza el sistema monooxigenasa. pero apenas posee actividad	En él, la actividad del sistema monooxigenasa es muy elevada.

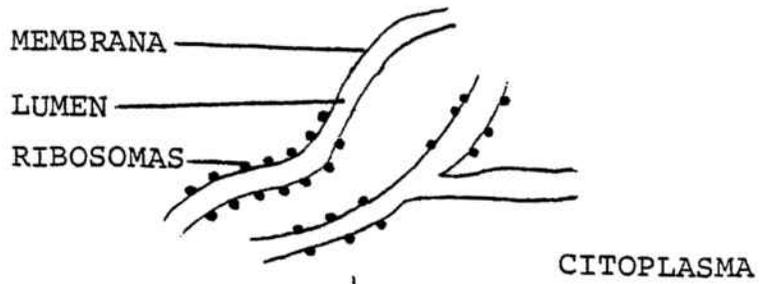
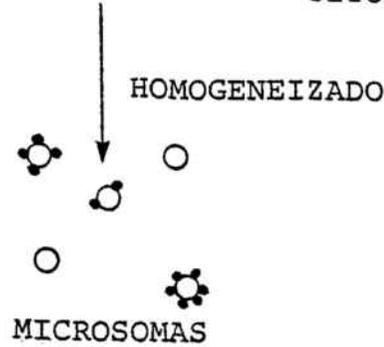


Fig.4: esquema representativo de la formación de los microsomas con la homogeneización.



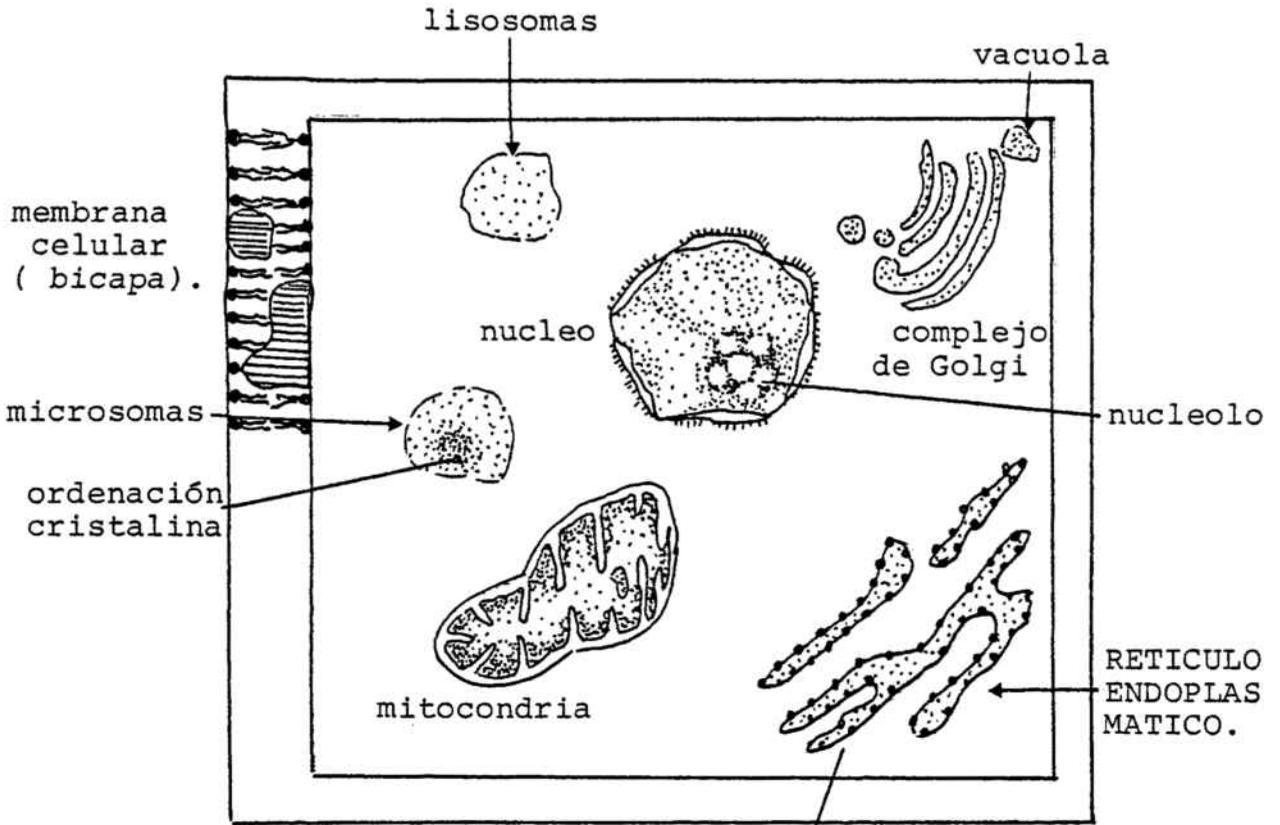
La asociación con el entramado de lipoproteínas puede ser el factor que confiere al sistema microsomal hepático, su especificidad para los compuestos extraños, que son, frecuentemente, más liposolubles que los metabolitos endógenos. Así, por ejemplo, mientras que la anfetamina es desaminada por el sistema microsomal hepático, a tiramina, sustancia más hidrosoluble, no es sustrato para el sistema microsomal.

En la tabla I, se indican las características diferenciales entre el REL y el RER.

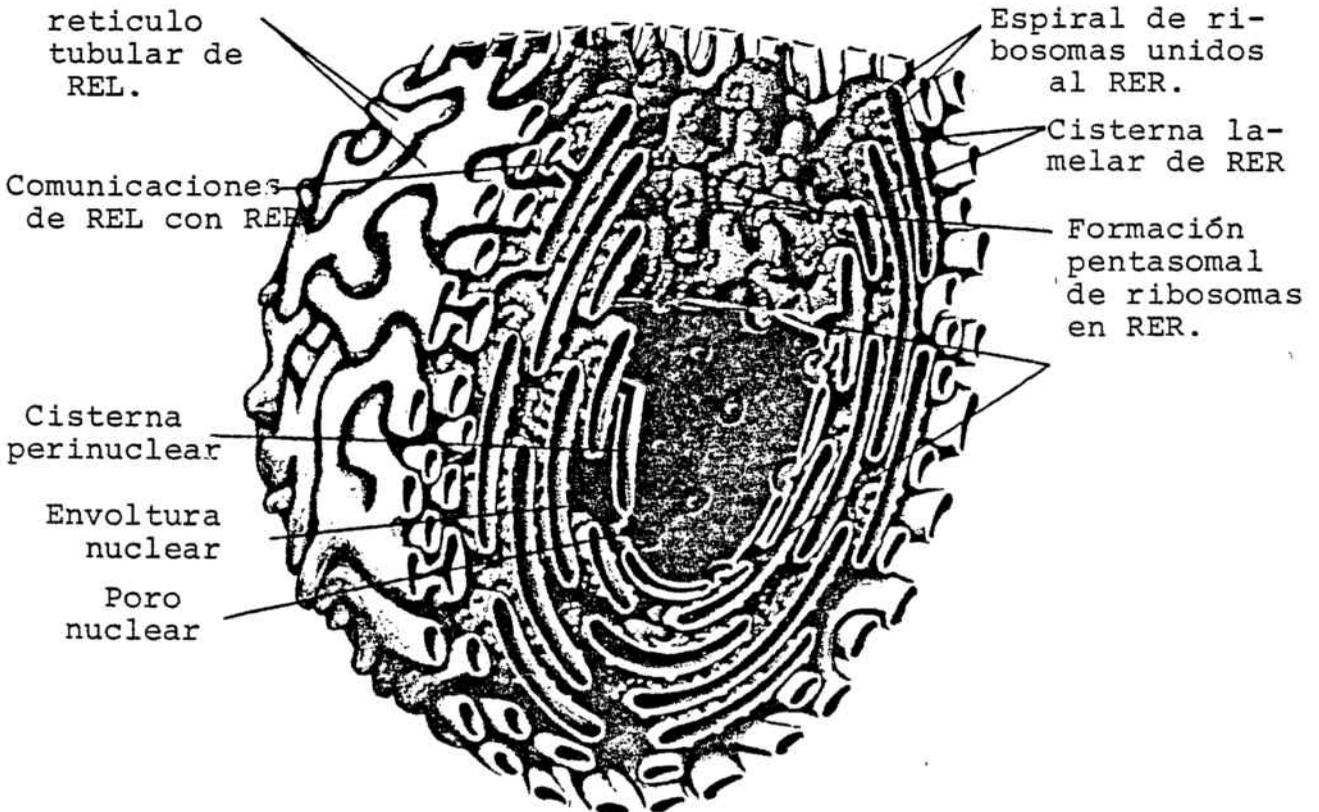
Es en los microsomas del retículo endoplasmático liso (REL) donde se localiza, principalmente, la actividad metabolizadora de fármacos. Y así de la misma forma que el hígado es el órgano detoxificador del organismo, los microsomas del REL son los orgánulos detoxificadores a nivel celular.

La certeza en la localización mayoritaria del sistema microsomal metabolizador de fármacos en los microsomas de los hepatocitos es relativamente reciente, fue

Fig.5: Representación del sistema de túbulos que forman el retículo endoplasmático liso y su localización en la célula.

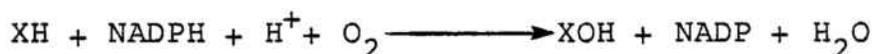


RETICULO ENDOPLASMATICO



HOLTZMAN, en 1972 quien lo apoyo firmemente, por vez primera, aunque simultáneamente otros autores, como CANTRELL y DRESNICK, (1972) señalaban la posibilidad de que las células estromales, células del tejido conjuntivo, también tuvieran actividad enzimática metabolizadora de fármacos (AFME). Los trabajos recientes de SATO y KATO, (1982) y de ISHIZUKI y col., (1983), con aminopirina marcada, demuestran, de modo concluyente, que son los microsomas del retículo endoplasmático (RE), localizado en las células parenquimales (hepatocitos), las que poseen AFME y sólo, raramente, demuestran una actividad débil las células no parenquimales.

HAYAISHI, (1962) denominó al sistema enzimático microsomal "monooxigenasa" ya que al estudiar su mecanismo, comprobó que transfería un átomo de la molécula de oxígeno al sustrato, fármaco, (XH) para formar productos hidroxilados (XOH), mientras que el otro átomo, junto con el agente reductor, se convertían en agua, según la reacción:



En 1955 WILLIAMS observó una variación del espectro con un máximo de absorción a 450 nm al adicionar monóxido de carbono a microsomas hepáticos de rata. Posteriormente en 1962, OMURA y SATO demostraron que el pigmento, con absorción a 450 nm, era un citocromo. La observación de las características bandas alfa y beta y de las bandas internas en la región de Soret del espectro de microsomas reducidos con etilisocianida, reveló la naturaleza he-

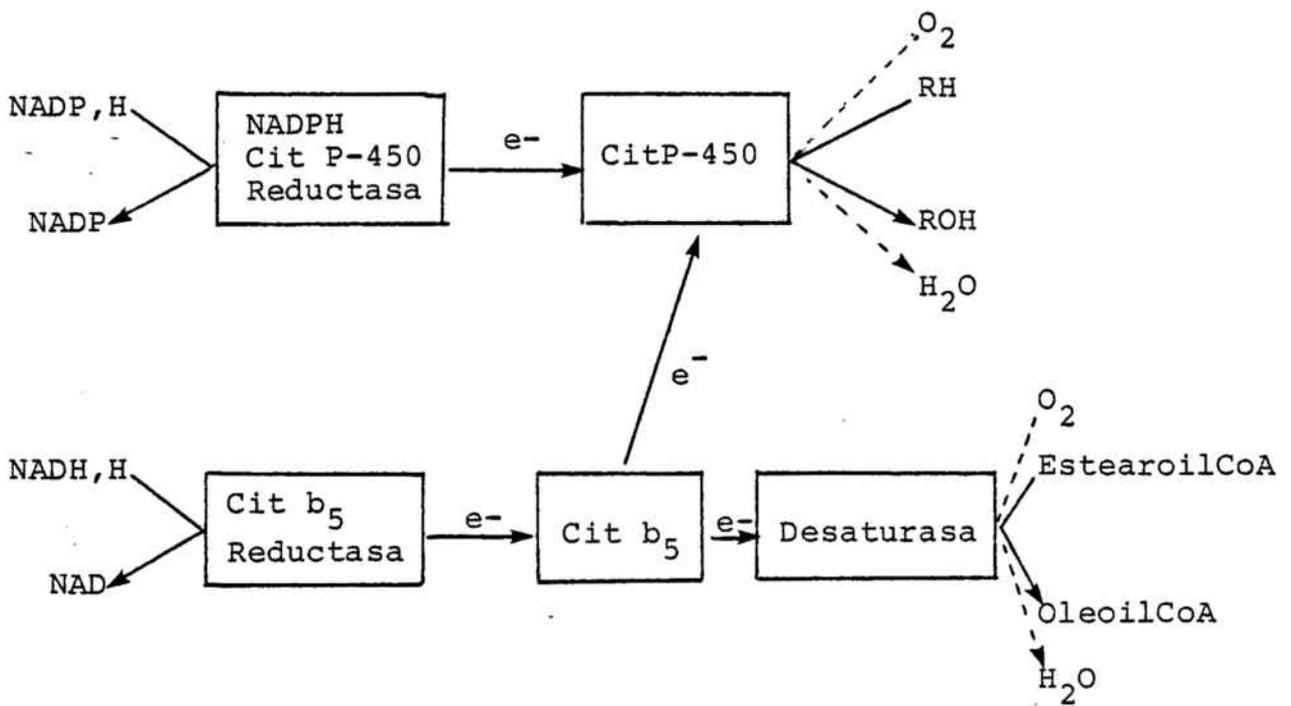
moproteica del pigmento. Dichos autores denominaron al pigmento citocromo P-450, "P" debido a su naturaleza de pigmento y 450 dada su absorción característica a esa longitud de onda, nombre genérico con el que se conoce, actualmente, al complejo sistema encargado de la metabolización enzimática de los fármacos.

#### 1.4.- COMPOSICION DEL SISTEMA MICROSOMAL.-

En los microsomas hepáticos existen dos cadenas de transporte de electrones unidas al citocromo P-450 (cit.P-450) (fig.6 y fig.7)

El primer sistema esta constituido por dos proteínas, la NADPH reductasa y alguno de las isoenzimas del cit.P-450, (ver sección 4.1.1.), implicadas en el metabolismo de los fármacos. La reductasa es llamada NADPH cit.P-450 reductasa, cuando transfiere electrones al cit.P-450 que es el aceptor y recibe el nombre de NADPH cit.c reductasa, cuando experimentalmente el aceptor de electrones es el citocromo c . Un gran número de fármacos, otros xenobiontes y algunas sustancias endógenas, son sustrato para el sistema. La membrana microsomal también puede considerarse un componente del sistema.

La segunda cadena de transporte electrónico está formada por tres proteínas: la NADH cit.P-450 reductasa, el citocromo  $b_5$  (cit. $b_5$ ) y el cit.P-450. Aunque este sistema es capaz de producir la monooxigenación de los



**FIGURA 6:** Esquema representativo de las dos cadenas de transporte de electrones hacia el cit.P-450 y las proteínas que las forman.

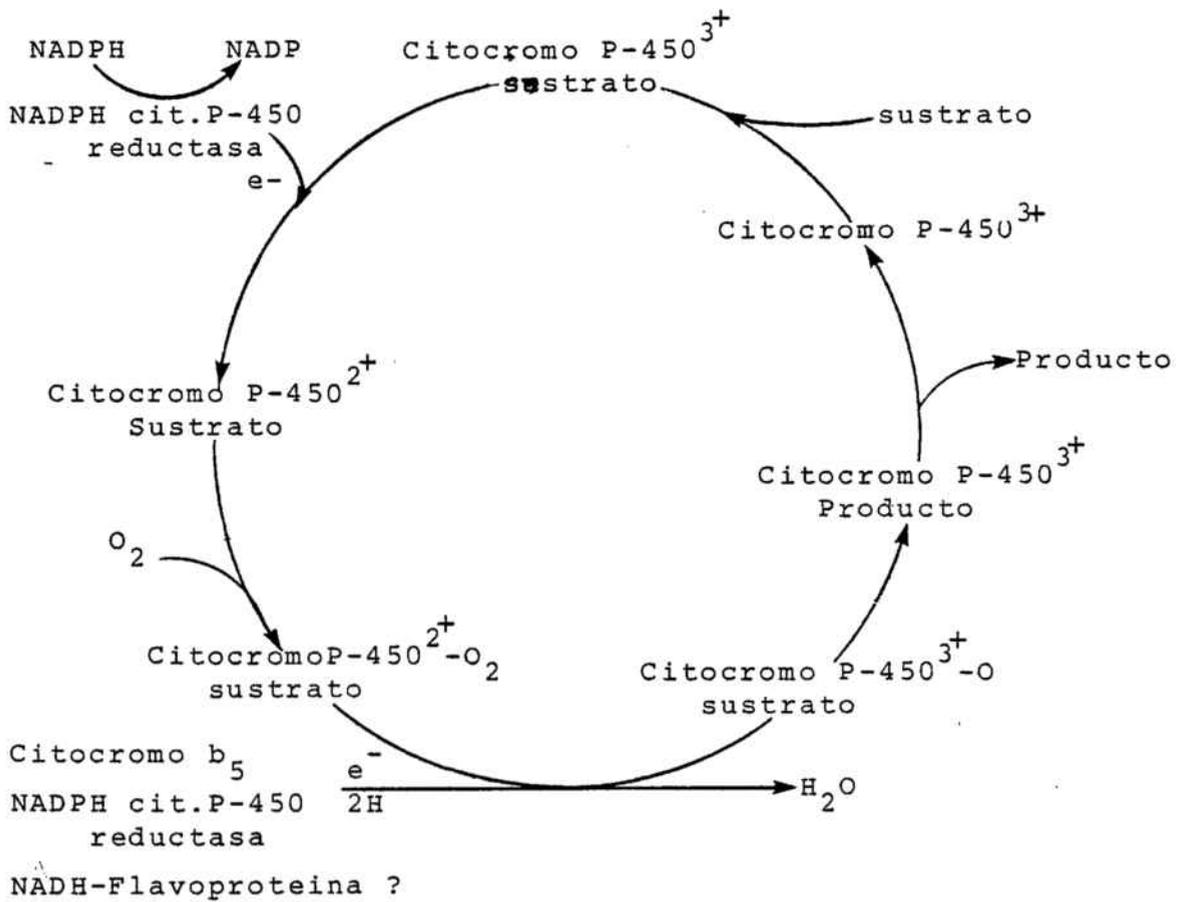
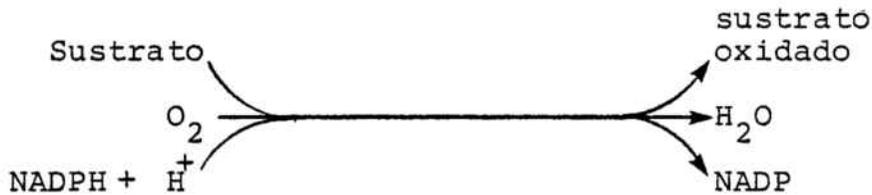


FIGURA 7: Localización de las dos cadenas transportadoras de electrones en el sistema del cit.P-450.

xenobiontes sin la participación del primer sistema, su papel más importante en el metabolismo de fármacos es su actuación sinérgica con el sistema NADPH, lo que conduce a una óptima actividad metabolizadora.

#### 1.4.1.- CITOCROMO P-450.-

El citocromo P-450 de los microsomas hepáticos es una cadena de transporte de electrones, al igual que la cadena respiratoria mitocondrial, pero en vez de producir energía su papel consiste en la oxidación tanto de sustancias propias como extrañas al organismo.



Las características que definen al cit. P-450 son: su multiplicidad, composición química y peso molecular, secuencia de aminoácidos, grupo hemo, uniones del hierro del hemo al citocromo y sus propiedades ópticas.

##### 1.4.1.1.- Multiplicidad.-

El cit.P-450 no es una simple molécula, ni siquiera una única proteína, sino que es un sistema de ellas; tampoco podemos hablar de un único cit.P-450 ya que como han enunciado JOHNSON (1979), LU y WEST (1980)

y AOYAMA y col., (1982) el sistema del cit.P-450 es una familia de isoenzimas. Y esta gran multiplicidad se observa, tanto, entre diferentes animales (TAKEMOSI y MANNERING, 1958 y CONNEY y col., 1959) como dentro de una misma especie, hay diferencias en el contenido de las isoénzimas de cit.P-450 entre diferentes sexo (MATHUR y col., 1977) y edades (FUJITA y col., 1983), lo que conlleva una gran variabilidad en la actividad cit.P-450.

Tabla III: Comparaciones entre los dos grandes grupos de inductores.

	tipo fenobarbital	tipo 3-metilcolantreno
Espectro	similar al normal	más estrecho que el espectro normal
Cinética del enzima inducido	aumenta Vmax pero no Km	aumenta Vmax y Km
Tipos de sustrato que se unen al enzima inducido	de tipo I y II	sólo del tipo II
Peso del hígado	aumenta	ligero aumento
Secreción biliar	aumenta	no varia
Area del REL	aumenta	no varia
Proteína microsomal/g hígado	suele duplicarse	ligero aumento
Tipo de citocromo inducido	cit.P-450	cit.P-448
Efecto del inhibidor SKF 525 A	marcada inhibición	inhibición sólo a altas concentraciones
Máximo efecto a	varios días	en 24 h ó menos
NADPH y reductasa	aumentado	no varia
Aumenta la inducción junto con con el otro tipo de inductor	no aumenta	aumenta

Por otro lado, la inducción química de una modificación de la estructura de la membrana podrá alterar el sistema monooxigenasa. Además como observaron SCHULZE y col., (1971) y MAILMAN y col., (1977), el cit.P-450 no se halla uniformemente distribuido a lo largo de la membrana microsomal. Así cada isoenzima se puede localizar en varios lugares de la membrana y el grado de especificidad, frente a un sustrato u otro, dependerá de las peculiaridades de cada lugar.

Quizás las diversas especificidades de sustrato entre especies animales, sea debida a las diferente peroxidación que sufren los lípidos de la membrana microsomal, ya que la actividad lipidoperoxidasa varía significativamente entre especies.

La actividad lipidoperoxidasa puede afectar a la actividad monooxigenasa por: modificación del medio que rodea al cit.P-450, ya que los fosfolípidos son sustrato de la lipidoperoxidación. También se puede producir una desnaturalización del cit.P-450 por los hidropéroxidos formados en la peroxidación de los lípidos (BISELL y HAMMAKER, 1976). Otra posibilidad es que ciertas formas de cit.P-450 unidas a la membrana, son más resistentes a la lipidoperoxidación (JEFFERY y col., 1976). Por último, los lípidos peroxidados y el sistema del cit.P-450 competirán por la NADPH-cit.P-450 reductasa, lo que se puede evitar incluyendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en el medio de cultivo microsomal, compuesto quelante del hierro necesario para la peroxidación (DE MATTEIS y

Los diferentes isoenzimas del cit.P-450 poseen cinéticas de metabolización frente al sustrato distintas, unos de otros (ALVARES y MANNERING, 1970 y ZIENGLER, 1982). La multiplicidad de formas del sistema cit.P-450 también ha sido demostrada: por variaciones en la estereoselectividad de las reacciones (CHIU y col., 1983), por el estudio del espectro de unión a etiliscianida y monóxido de carbono (GRAY, 1983), por las diferentes vidas medias del grupo hemo de los distintos isoenzimas, por la destrucción del cit.P-450 por lipido-hidroperóxidos mercuriales, fosfolipasas C y detergentes, por el estudio con alilisopropilacetanida, fluoxeno y otros inhibidores de las diferentes formas del cit.P-450 (ORTIZ DE MONTELLANO y CORREIA, 1983), y por diferencias en la unión al oxígeno, en el espectro óptico y en el de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta multiplicidad también se ha demostrado en los estudios de aislamiento y reconstitución de los componentes del sistema monooxigenasa (LU y COON, 1968).

La diversidad en la dotación de las diferentes isoenzimas del cit.P-450 entre diferentes especies, sexo y edades, comporta una variación en las propiedades catalíticas, ya que cada isoenzima tiene distinta afinidad por los sustratos. Las propiedades catalíticas del sistema monooxigenasa están relacionadas con la membrana a la que se une y la composición de ésta, varía entre especies, sexo y con la edad, en consecuencia, se modifica la afinidad frente al sustrato.

SPARKS, 1973).

La multiplicidad también se manifiesta al tratar a los animales con inductores e inhibidores del metabolismo de fármacos (ROBERTSON y col., 1983; PHILLIPS, 1983 y WAXMANyWALHS, 1982).

Tabla IV: Inductores del sistema enzimático microsomal del hígado.

Agentes antifúngicos	Clotrimazol, Griseofulvina*.
Alcaloides	Cotina, Nicotina.
Anestésicos	Eter, Metoxofluorano*, Uretano, Óxido nitroso.
Anticoagulantes	derivados de la Cumarina.
Anticonvulsivantes	Carbamacepina*, Fenitofina*, Primidona.
Antiinflamatorios	Amidopirina, Benzidamida, Fenazona, Fenilbutazona**.
Antihistamínicos	Clorciclizina*, Ciclizina, Difenhidramina.
Diuréticos	Espironolactona*.
Esteroides	Andrógenos, Colestanol, Progestágenos, Glucocorticoides.
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	3-Metilcolantreno, 3,4 benzo-pireno*.
Hipoglucemiantes	Carbutamida, Tolbutamida*.
Hipo lipemiantes	Halofenato*.
Hipnóticos no barbitúricos	Carbromal, Clordiacepoxido**, Glucetimida**, Meprobramato**, Nitracepam.
Insecticidas	Aldrin, Hexaclorobenceno, DDT**, Dieldrin.
Narcóticos	Petidina.
Productos quím. indust.	Benceno, Cedrol, Hexaclorobenceno.
Relajantes musculares centrales	Carisoprolol, Mefenesina, Orfenadrina, Fenaglicodol.
Sedantes e hipnóticos	Amilobarbital*, Barbital*, Clorfenobarbital, Ciclobarbital*, Hexobarbital**, Pentobarbital*, Fenobarbital**.
Varios	Humo de cigarrillos*, deficiencias en la dieta*, etanol*.

\* señala los activos en el hombre. (\*) indica los que inducen su propio metabolismo.

1.4.1.2.- Composición química y peso molecular.-

IMAI y SATO (1974) y VAN DER HOEVEN y col., (1974) fueron los primeros en purificar el cit.P- 450 por electroforesis. Posteriormente, estudios inmunológicos revelaron que preparaciones altamente purificadas de cit. P-450 no son siempre homogéneas, ya que contienen dos o más isoenzimas. La adecuada purificación del cit.P- 450 de ratas tratadas con fenobarbital y del cit.P-448 de ratas tratadas con 3-metilcolantreno, (ver tabla III), contiene cuatro y dos formas de cit.P-450, hemoproteínas diferenciables mediante técnicas inmunológicas (THOMAS y col., 1976 y DEAN y COON, 1977).

DEAN y COON (1977) purificaron, a partir de ratas tratadas con fenobarbital, el cit.P-450LM<sub>2</sub> y el cit. P-450LM<sub>4</sub>. Ambos citocromos contiene una molécula de hemo y tres residuos de carbohidratos: glucosamina 0.7 y 0.8, manosa 1.7 y 2.0 y glucosa 0.2 y 0.9 nmol/nmol de proteína, en LM<sub>2</sub> y LM<sub>4</sub>, respectivamente.

Las diferentes isozimas del cit.P-450 han sido agrupadas, según su peso molecular, en dos grandes grupos de 54.000 y 48.000 daltons respectivamente.

Tabla V: Pesos moleculares de los isoenzimas inducidos en microsomas hepáticos de rata.

	nombre propuesto	inductor	PM(x 10 <sup>3</sup> )	referencia
P-450s Endógenos	(control P-450)		52.2	AGOSIN Y col., (1979)
	(control P-451)		52.4	" "
	P-450a		48.0	RYAN Y col., (1979)
	(control P-450)		50.0	NEGISHI Y col., (1978)
	P-450 control		55.0	TSUJI Y col., (1980)
P-450s Inducidos	P-450b	fenobarbital	52.0	RYAN Y col., (1979)
	P-450c	3-metilcolantreno	56.0	" "
	P-450-PB	fenobarbital	48.5	KAMATAKI Y col., (1976)
	P-450B	fenobarbital	53.1	GUENGERICH (1978)
	P-450D	fenobarbital	54.3	" "
	P-450B(MC)	3-metilcolantreno	55.9	" "
	P-450d	isosafrol	52.0	RYAN Y col., (1980)
	50 mM fosfato eluato	colestiramina	50.0	HANSSON Y WILVALL (1980)
	80 nM fosfato eluato	colestiramina	50.0	" "
	(inducido P-450)	pregnenolona 16 $\alpha$ - carbonitrilo	51.0	ELSHEORBAGY Y col., (1980)

#### 1.4.1.3.- Secuencia de aminoácidos.-

Al estudiar un gran número de citocromos de diferentes especies, se ha observado que su secuencia de aminoácidos es muy similar. Todos, generalmente, contienen seis o siete residuos de cisteína. Los contenidos en leucina y fenilalanina son relativamente elevados y, alrededor del 55 % de los aminoácidos del cit.P-450 de conejo, son apolares (IMAI, 1978), lo que podría explicar su fuerte unión a la membrana del retículo endoplasmático y su tendencia a agregarse en presencia de detergentes.

Los aminoácidos unidos al grupo hemo son de especial interés. Estudios de hidrólisis y posterior purificación de los polipéptidos, habían propuesto que una histidina era el nexo de unión entre el hierro y la proteína del cit.P-450 a través de su grupo tiol, siembargo, estudios recientes de GOTOH y col., (1982) proponen que es la cisteína la que se une al grupo hemo.

Las figuras 8 y 9 representan la secuencia de aminoácidos y la estructura secundaria de dos cits.P-450 distintos, respectivamente.

```

2      10      20      30      40
EPTILL1LL2LL3LL4LV5GF6LL7LL8LV9RGH10PK11S12RGN13F14PP15GP16RP17LP18LL19G20
TTETIQSNAN1L2AP3LP4PH5V6PEHLV7DF8DF9DM10Y11N12P13S14NLS15AG16V17Q18E19
1      10      20      30      40

      50      60      70      80
NLLQLDRGGL1LN2S3FM4QL5RE6KY7GD8V9FT10TV11HL12GP13RP14V15VM16LC17GT18
AWAVL1-QES2N3V4PD5L6--V7RCN8-GGH9W10---I11ATR12G13QL14I15REAY16
      50      60      70

      90      100      110      120
DTIKEALV1GQA2ED3FS4GR5GT6IA7VI8EPI9F10KEY11GV12IF13ANGER14W15
EDYRH1--FS2SE3CP4FI5PREA6---GEAY7DFI8PTS9MD10PE11EQ12-
      80      90      100

      130      140      150      160
KALRR1FP2SL3AT4MR5DF6GM7GK8RS9VE10E11RI12Q13EE14A15Q16CL17VE18E19EL20R21KS22Q23
RQFR1ALA2-N3Q4V5V6GM7P8V9VD10K11-LEN12RI13Q14E15L16AC17SL18IES19LR20-P21Q22
      110      120      130      140      150      160
HRI

      170      180      190      200
GAPLDPTFL1FQ2CITANI3ICS4IV5FGER6FD7Y8TD9RQ10FL11R12LL13EL14
G-----QC1N2FT3E-----DY4AE5--PF6PI7RI8IF9M10-LL11A12-
      150      160

      210      220      230      240
FYRTFSL1LS2S3FS4SQ5VF6EP7FS8G9FL10KY11FP12GA13HR14QI15SK16N17L18Q19E20I21
-----GL1PE2E--DIP3HL4K5Y6LT7DQ8MT9-RP10D11GS12MT13FA14E15A16KE17AL18
      170      180      190      200

-----250-----260      270      280
LDYIGHIVE1KH2RAT3LD4PS5AP6PR7DF8ID9TY10LL11RME12KE13KE14KS15N16HH17T18
* * * * *
YDYLIPIIE1QR2RQ3--K4PG5T--DA6ISI7---V8ANG9Q10V11NG12RP13
-200-----210-----220      230

      290      300      310      320
EFHHENLM1IS2LL3SL4FP5FAG6TETS7ST8TL9RY10GF11LL12ML13KY14PH15VA16
ITSDEAK1RM2CGL3-LL4V5GGL6DT7VV8N9FL10S11FS12---ME13F14---
      240      250      260

      330      340      350      360
EKVQKEID1QV2IG3SH4RL5PT6LD7DR8SK9MP10Y11TD12AV13IHE14I15QR16FS17D18
--LAKS1-----PE2HR3QEL4I5QR6PER7IP8--AA9CE10EL11LR12RF13-S14
      270      280      290

      370      380      390      400
LVPIGV1PH2RV3TK4DT5M6FR7GY8LL9PK10N11TE12V13Y14P15IL16SS17AL18HD19P20Q21Y22
* * * * *
LVADG1--RI2LT3SD4Y5EF6H7GV8QL9KK10GD11Q12I13--LL14P15Q16ML17SG18---
      300      310      320

      410      420      430      440
FDHPDS1FN2PE3HF4LD5ANG6ALK7KK8SE9AF10MP11FS12T13G14K15RIC16LG17E18GI19
LDEREN1AC2PM3H4-V5DFS6---R7Q8K9V10S11HT12TF13GH14GS15HL16CL17GL18Q19SL20
      330      340      350      360
HR2

      450      460      470      480
ARNEL1FL2FF3TT4IL5QN6FS7V8SS9HL10AP11K12D13ID14-L15TP16K17ES18G19IG20K21I22
* * * * *
ARREI1IV2TL3KE4WL5TR6IP7DF8SI9AP10GA11Q12I13Q14H15KS16G17IV18SG19V20Q21AL22
      370      380      390      400

      491
PPTYQICFSAR
* * * * *
PLVWN1PAT2TKAV3
      412

```

Fig.8: Secuencia de aminoácidos de el cit.P-450PB, inducido por el fenobarbital y del P-450cam, hidroxilador del camfor (GOTOH y col., 1983).

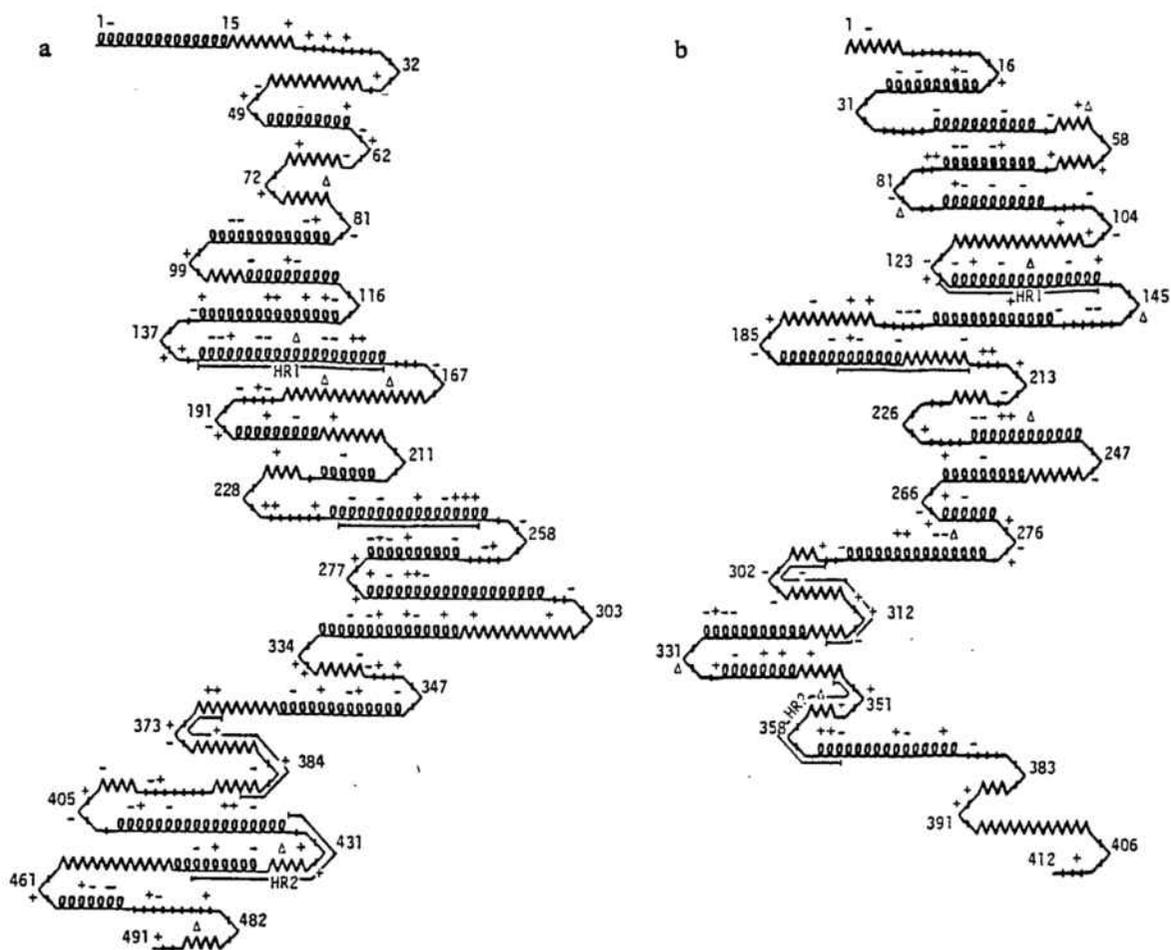


Fig.9: Esquema representativo de la estructura secundaria del P-450PB y del cit.P-450cam. Las regiones en hélice, plegadas y en espiral de la cadena de aminoácidos se representa por la espiral, zigzag y líneas punteadas respectivamente (GOTOH y col., 1983).

1:4.1.4.- Grupo hemo.-

OMURA y SATO (1964) demostraron que el protohemo es el único grupo hemo presente en los microsomas hepáticos. Generalmente, se aceptaba que el grupo hemo del cit.P-450 hepático era una ferriprotoporfirina IX. Este hecho fué corroborado por MAINES y ANDERS (1973) utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas. Estos autores demostraron que la degradación, por reducción, de los productos del grupo hemo era igual a la obtenida a partir de la ferriprotoporfirina IX de la hemoglobina.

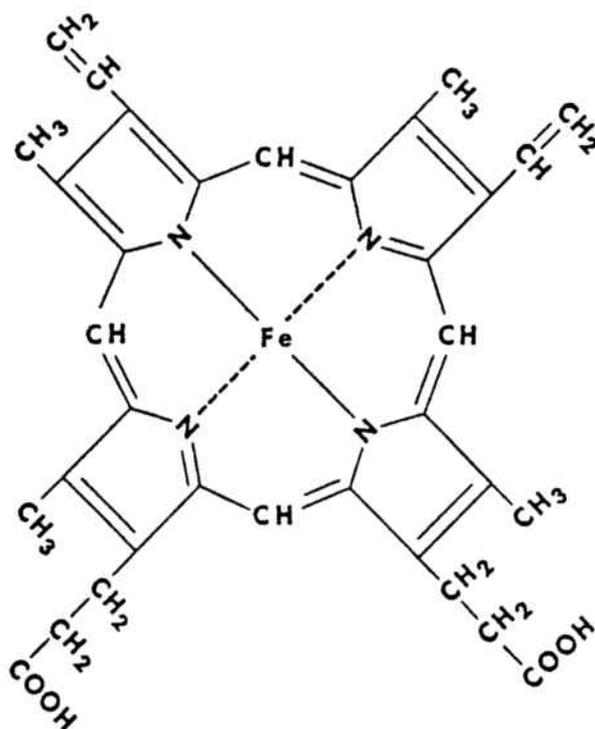


Figura 10: Estructura del grupo hemo del cit.P-450.

#### 1.4.1.5.- Ligandos del grupo hemo.-

Las propiedades físicas y funcionales del cit.P-450 son características y ésto llevó a suponer que los ligandos del hierro serían diferentes a los de los otros citocromos. La facultad del cit.P-450 de actuar como transferidor de electrones y también, como oxidasa durante el proceso de monooxigenación, planteó la posibilidad de que sufriese cambios durante la reacción.

Así, cuatro de los seis ligandos del hierro están coordinados con los nitrógenos pirrólicos. Sobre la base de que el sulfuro de mercurio convierte al cit.P-450 en cit.P-420, forma desnaturalizada y no reactiva, MASON y col., (1972) propusieron que uno de los ligandos restantes fuera un ión tiolato. WATERMAN y MASON (1972) determinaron un potencial redox muy bajo para el cit.P-450, típico en presencia de tiolatos. DUS y col. (1976) estudiando el espectro óptico y de resonancia magnética nuclear comprobaron que el quinto ligando era un sulfuro, hecho que, ha sido corroborado por los trabajos de GOTOH y col. (1983).

La naturaleza del sexto ligando todavía no se halla claramente establecida, pero parece que está formada por una molécula de agua o un grupo hidroxilo asociado a un grupo histidil imidazol (WHITE y COON, 1982 y DASON y col., 1982).

El lugar de unión, de los denominados sustratos tipo I, está localizado en una porción hidrofóbica de

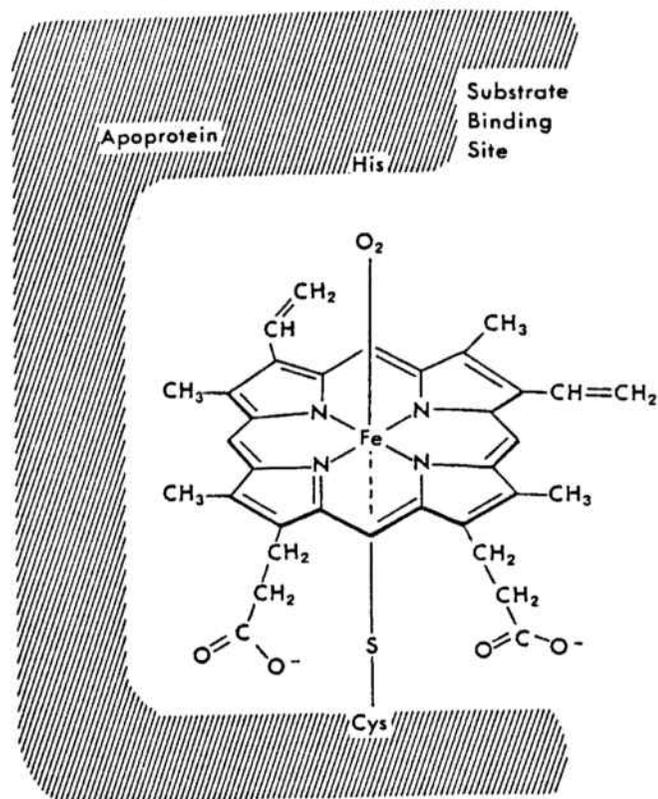


Figura 11: Estructura del lugar activo del cit.P-450 y los logandos del grupo hemo.

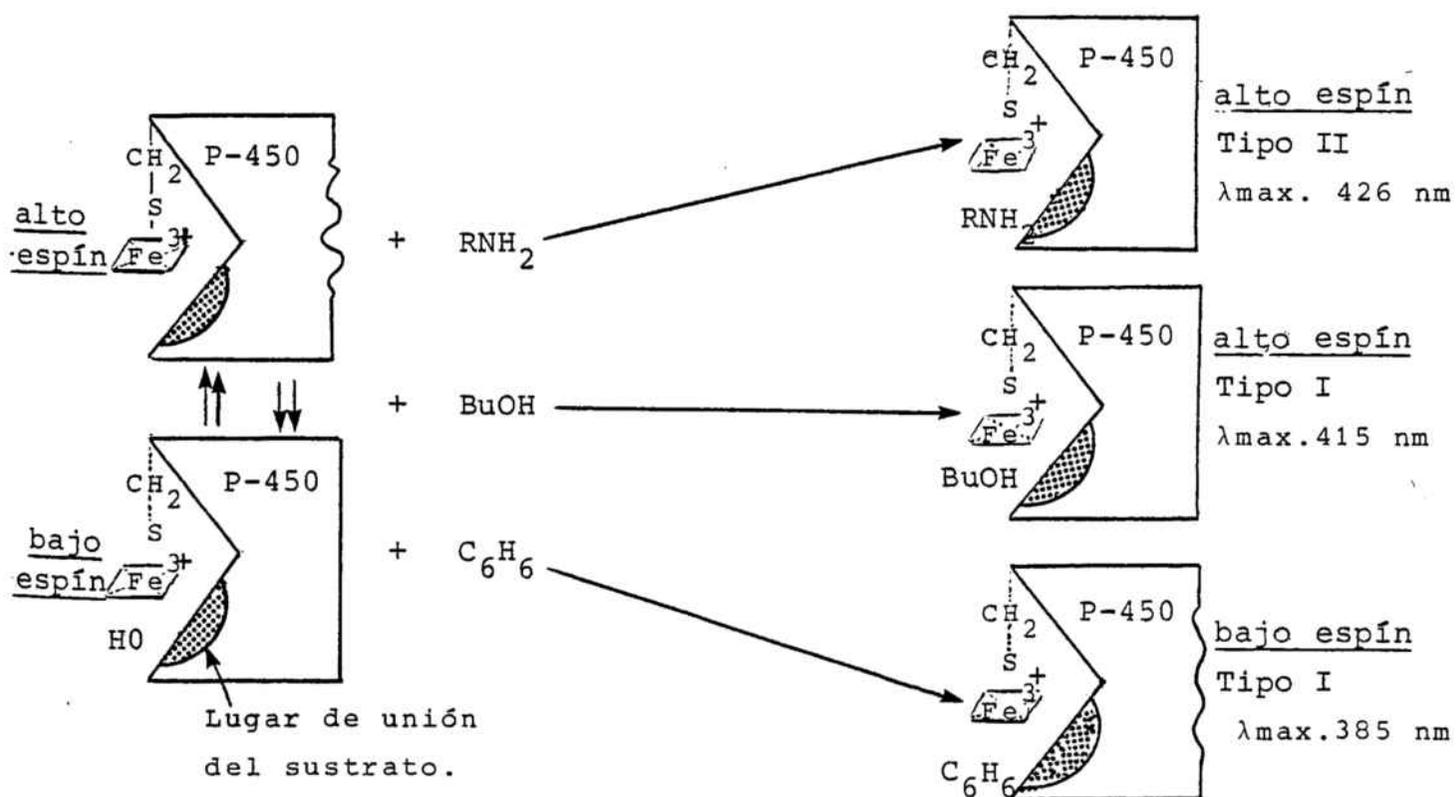


Figura 12: Unión de los diferentes tipos de sustrato y modificaciones que produce.

Tabla VI: Los sustratos producen cambios tipo I y tipo II en las propiedades espectrales del cit. P-420 microsomal cuando se combinan con él.

Tipo I (420→415 nm)	Tipo II (420→426 nm)
Anfetamina	Alcoholes
Barbitúricos	Acetanilida
Benzo(α)pireno	<u>Anilina</u>
Clorpromazina	Cortisol
Cumarina	Corticoesterona
DDT	Desipramina
Oestradiol	Metirapone
Imipramida	Nicotinamida
Morfina	Pirazol
Naftaleno	Piridina
Fenacetina	
<u>Aminopirina</u>	
SKF 525 A	
Testosterona	

Se han subrayado los dos fármacos que hemos utilizado para determinar la actividad metabolizadora microsomal de fármacos, uno pertenece al grupo de sustratos tipo I y el otro al de sustratos tipo II.

las proteínas cercanas al sexto ligando. Los llamados sustratos del tipo II, se combinan con el hierro y forman un ligando muy fuerte que mantiene al hierro en su estado de bajo espín y también hay sustratos que se pueden unir, indistintamente, por ambos lugares (fig.11 y tabla VI).

La unión del sustrato produce una variación en el estado de espín del hierro del cit.P-450. El paso de bajo espín a alto espín, al iniciarse la monooxigenación, es causado por la rotura cooperativa de las fuerzas de Van der Waals entre la proteína y la porfirina. IIZUKA y col. (1971) demostraron, que el equilibrio de espín de la hemo-proteína, está determinado por interacciones específicas entre la proteína y el hemo y no por el sexto ligando axial del hierro.

#### 1.4.1.6.- Propiedades ópticas.

Las propiedades ópticas del cit.P-450 hepático se establecieron antes de ser aislado y purificado, sin embargo, el coeficiente de extinción molar de  $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  determinado por OMURA y SATO en 1962, para el espectro del cit.P-450 reducido, entre 450 y 490 nm, todavía se considera un método preciso para determinar los niveles de cit.P-450 microsomal.

Los trabajos de OMURA y SATO en 1962 y de

NISHIBAYASHI y col. en 1968, establecieron las propiedades ópticas del cit.P-450. En primer lugar el monóxido de carbono produce una variación atípica de pico en la región del Soret del citocromo reducido hacia una absorbancia más alta. En segundo lugar la reducción sólo ocasiona un pequeño cambio en el espectro. En tercer lugar, la etilisocianida produce un típico hundimiento del pico Soret entre 430 y 455 nm . Por último los sustratos dan lugar a variaciones del espectro al unirse al citocromo. Es de señalar, que las diferencias funcionales de las diferentes isoénzimas del cit.P-450 no se reflejan en sus espectros.

#### 1.4.2.- CITOCROMO $b_5$ .-

El citocromo  $b_5$  (cit. $b_5$ ), al igual que el cit.P-450, pertenece al grupo de citocromos del tipo B. Como grupo prostético posee una ferriprotoporfirina IX y funciona en reacciones, univalentes, de oxidación-reducción. Además de localizarse en el hígado se ha encontrado en gran variedad de tejidos extrahepáticos como glándulas suprarrenales, páncreas, glándulas mamarias y mucosa intestinal.

El espectro del cit. $b_5$ , oxidado a pH neutro, muestra un pico a 413 nm en la región del Soret y bandas

alfa y beta a 560 y 530 nm, respectivamente. El espectro es característico de una hemoproteína. La forma reducida presenta picos a 423, 556 y 526 nm .

El grupo hemo no está unido covalentemente y se puede desplazar de la proteína por extracción con acetona ácida. El cit.b<sub>5</sub>, al contrario que el cit. P-450, puede reconstituirse fácilmente mezclando cantidades equimoleculares de apo cit.b<sub>5</sub> y protohemo. La adición del grupo hemo estabiliza la estructura terciaria de la proteína.

El cit.b<sub>5</sub> está unido, débilmente, a la membrana microsomal por una porción hidrofóbica de su molécula, porción que puede solubilizarse al tratar el citocromo con enzimas proteolíticas.

La porción hidrofílica es la que posee las propiedades catalíticas y espectrales. La secuencia de aminoácidos se ha establecido a partir del aislamiento de cits.b<sub>5</sub> de diferentes especies (NOBREGA y OZOLS, 1971).

El grupo hemo se sitúa sobre la porción hidrofóbica que corresponde al 40 % de la molécula (fig.13). El átomo de hierro se coordina por las histidinas de las posiciones 39 y 63. Los nitrógenos de las histidinas están en su forma tautómera, formando puentes de hidrógeno que se unen a la cadena principal por el carbonilo de la glicina en la posición 40 y la fenilalanina de la posición 58, respectivamente.

El cit.b<sub>5</sub> puede ser solubilizado por acción

de enzimas o detergentes como el Triton X-100<sup>R</sup>, agente utilizado por ITO y SATO (1968) para aislarlo y purificarlo por primera vez.

El cit.b<sub>5</sub> no reacciona tan fácilmente como el cit.P-450 con el oxígeno o ligandos como el monóxido de carbono o el cianuro.

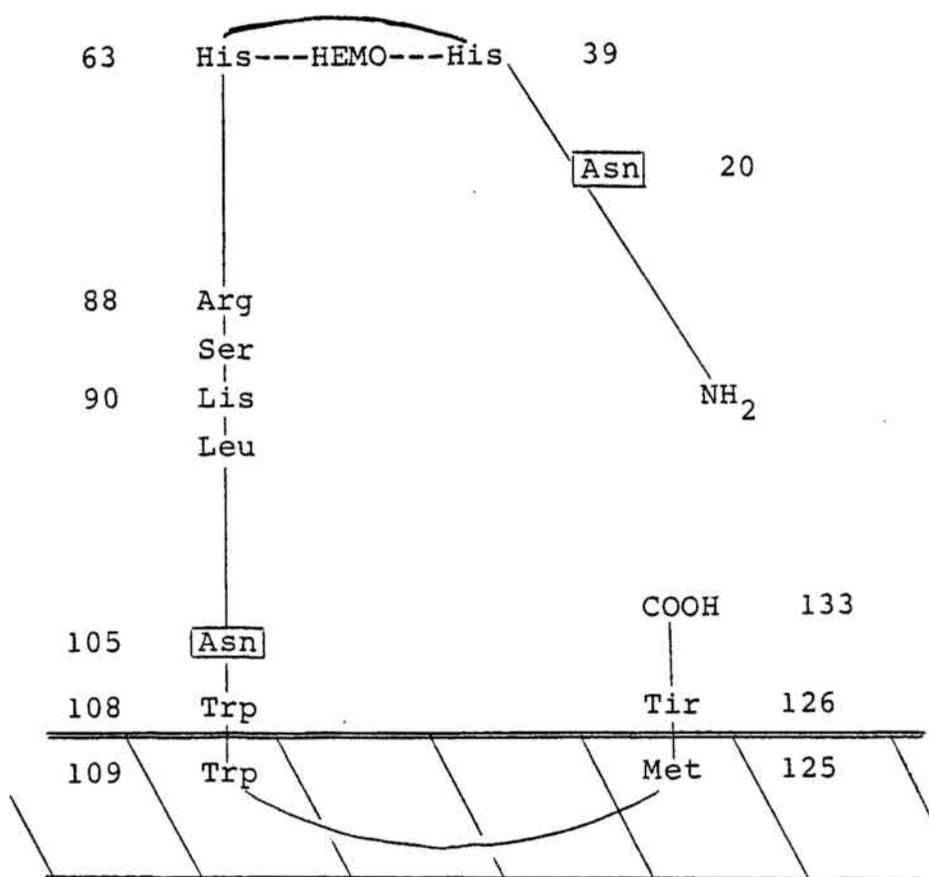


Figura 13: Relación molecular entre el citocromo b<sub>5</sub> y la membrana del retículo endoplasmático. (extraído de TAJIMA y col., 1978).

Se conocía su papel transportador de electrones desde NADH hasta el cit.c, pero hasta que OSHINO y col. (1967) y ITO y SATO (1968) no descubrieron su misión en la desaturación del acetil CoA, no se estableció su papel fisiológico en el retículo endoplasmático.

El cit.b<sub>5</sub> es el único componente microsomal que puede ser reducido por NADPH, NADH y ascorbato y, junto con NADH y la cit.b<sub>5</sub> reductasa, forma una cadena de transporte de electrones hacia el cit.P-450.

#### 1.4.3.- NADPH CITOCROMO P-450 REDUCTASA.-

La enzima conocida como NADPH cit.P-450 reductasa, es una de las pocas flavoproteínas que pueden oxidar al cit.c "in vitro". Recibió el nombre de NADPH-cit.P-450 reductasa al descubrirse que el cit.P-450 es el aceptor natural de electrones de esta reductasa. Su función transportadora de electrones al cit.P-450 se ha comprobado por el hecho que los anticuerpos frente a ella, bloquean la hidroxilación de la anilina en los microsomas hepáticos

MASTERS y col. (1965) propusieron que la reductasa contenía dos moléculas de flavín adenindinucleotido (FAD) por molécula de proteína, pero IYANAGUI y MASON (1973) señalaron que el grupo prostético consta de una mo-

lécua de flavín mononucleotido (FMN) y otra de FAD. La reductasa de hígado de rata fue purificada por YASOKOSHI y MASTERS (1976), KNAPP y col. (1977) y VERMILION y COON (1978), quienes comprobaron que FAD y FMN se encontraban en cantidades equimoleculares junto con la proteína. Sus pesos moleculares, valorados electroforéticamente, fueron 76.000, 79.000 y 76.500, respectivamente. VERMILION y COON (1978) indicaron que la FAD es la primera flavina que toma los electrones y los transporta hasta la FMN.

La reductasa también se encuentra unida a la membrana del RE microsomal por un pequeño segmento hidrofóbico, de aproximadamente 6.000 daltons (GUM y STOBEL, 1974 y BLACK y col., 1979). La gran parte hidrofílica de la molécula sale de la membrana hacia el espacio citoplasmático y acepta electrones del NADPH.

#### 1.4.4.- CITOCROMO $b_5$ REDUCTASA.-

El transportador capaz de hacer llegar electrones al cit.P-450 desde NADH es un citocromo b que recibió el nombre de cit. $b_5$  reductasa por su propiedad de reducir al cit.P-450. Esta enzima contiene una molécula de FAD por molécula de proteína.

Al igual que el cit. $b_5$  y la NADPH cit.P-450

reductasa, está formado por un segmento hidrofílico en el que se encuentra el lugar catalítico y un segmento hidrofílico que le une a la membrana microsomal.

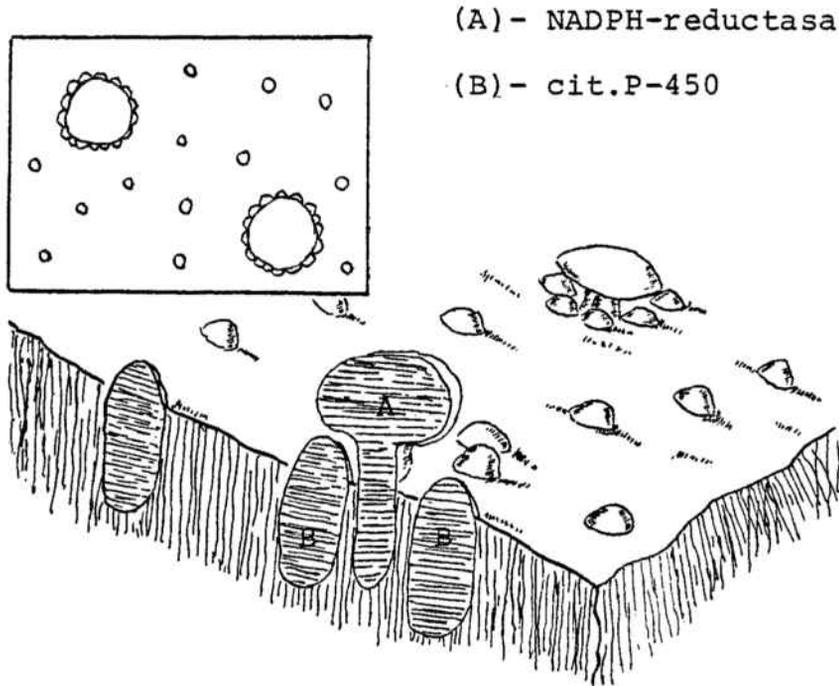
El empleo de detergentes permitió solubilizarlo y de esta forma, se ha determinado su localización unido a la membrana microsomal, mitocondrial, eritrocitaria y en liposomas de fosfolípidos, así como, establecer su peso molecular que es, aproximadamente, de 43.000 daltons, aunque varía con la especie.

La unión a la membrana juega un papel importante en el transporte de electrones por la reductasa y así, la adición de fosfolípidos, "in vitro", mejora su acción.

#### 1.4.5.- LA MEMBRANA MICROSOMAL.-

El modelo dinámico de membrana propuesto por SINGER y NICHOLSON (1972) propone la existencia de una matriz de fosfolípidos, dispuesta en una bicapa, en la cual las proteínas se hallan inmersas. Esta estructura se halla estabilizada por las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas hidrocarbурadas de los lípidos. Este modelo según DE PIERRE y ERNSTERL (1977) se ajusta a la estructura del sistema microsomal hepático del cit.P- 450 monooxigenasa (fig.14).

Figura 14: Modelo de la interacción del cit.P-450 y la NADPH-reductasa en la membrana (PETERSON y col.,1976).



La NADPH cit.P-450 reductasa, NADPH cit. $b_5$  reductasa y el cit. $b_5$  tienen carácter hidrofílico y pueden separarse de la membrana, enzimáticamente, dejando un segmento hidrofóbico unido a ésta. Por el contrario, el cit.P-450 tiene un porcentaje elevado de aminoácidos hidrofobos, lo que hace que se encuentre fuertemente unido a la membrana. Se ha propuesto que el cit.P-450 se encuentra embebido por un halo constituido por el 20 % de los fosfolípidos de la membrana.

Estudios inmunológicos han demostrado que por lo menos una pequeña parte del cit.P-450 permanece fuera de la membrana y es aquí donde se sitúan los lugares catalíticos a los que se unen los sustratos y cofactores o a través del cual, interactúan con otros componentes del sistema monooxigenasa.

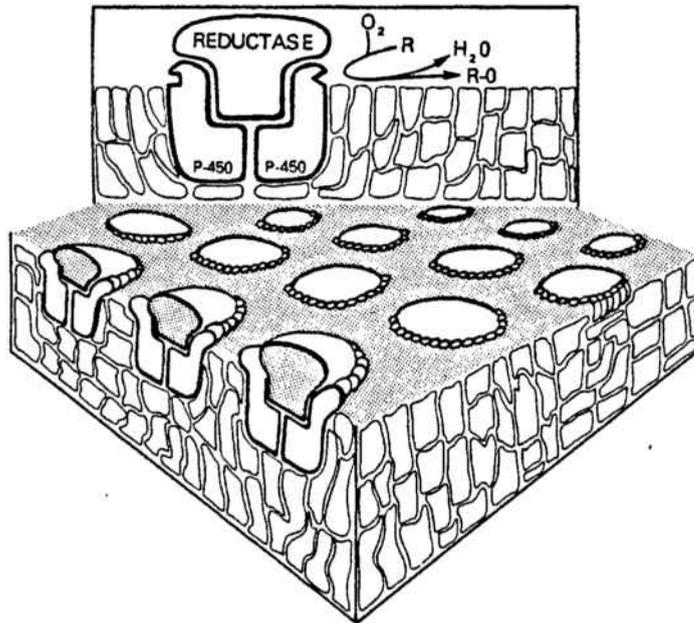


Figura 15: Diagrama hipotético de la relación entre la flavoproteína reductasa y las isoenzimas del cit. P-450 embebidas en la membrana . (R) es el sustrato (fármaco) y R-O el producto.

Los estudios "in vitro" de MIWA y col. (1978) observaron que el cociente P-450/NADPH reductasa idóneo, requerido para una actividad monooxigenasa óptima, era 1:1. Pero ESTABROOK y WERRINGLOER (1978), comprobaron que estas proteínas no se hallan presentes en ese cociente equimolecular. Los trabajos de SHEPHARD y col. (1983), mediante técnicas sensibles de radioanálisis, determinaron que el cociente P-450/reductasa era de 15:1, pudiendo variar con la exposición a xenobiontes. Esto se explica si se tiene en cuenta que muchas moléculas de cit.P-450 se pueden encontrar imposibilitadas de participar en la reacción de monooxigenación, al estar total-

mente embebidas en la membrana. Cuando el cociente disminuye, la velocidad de la reacción decrece.

La velocidad de la monooxigenación es baja apesar del cociente P-450/reductasa favorable, ya que las concentraciones de sustrato son bajas, puesto que en estas reacciones el sustrato es un complejo formado por la unión del sustrato con el ferricit.P-450 y no el sustrato "per se".

Un modelo adecuado del sistema sería un racimo homogéneo de *cits*.P-450, alrededor de una molécula de reductasa, fácilmente activable por el sustrato (fig.15).

Al estudiar las subfracciones microsomales se encontró que contenían diferentes clases de *cit*.P-450, lo que sugirió que grupos homogéneos de diferentes isoenzimas de *cit*.P-450 se unirían fuertemente a lugares específicos de la membrana.

TRUMP y col. (1970) han reafirmado el importante papel de la estructura de la membrana para la adecuada actividad monooxigenasa. Para que reaccionen las moléculas del *cit*.P-450 y reductasa, una o ambas deben migrar a través de la membrana. En función de su peso molecular parece que el *cit*.P-450 debería ser el que migrase más, ya que su peso molecular es de 50.000 frente al de la reductasa de 80.000 pero, es la reductasa la que tiene mayor movilidad por encontrarse, débilmente unida a la membrana.

Las propiedades del sistema monooxigenasa microsomal se deben, en parte, a la composición lipídica de la membrana, constituida por fosfolípidos con ácidos grasos insaturados, un 8 % de colesterol que juega un importante papel en el entramado lipídico y pequeñas cantidades de glicerofosfolípidos. En la fig.16 se observa el importante papel de los fosfolípidos de membrana en el sistema de monooxigenación.

En ausencia de lípidos, la reducción del cit.P-450 por la reductasa es muy bajo. Parece que los lípidos, reemplazables por fosfatidilcolina y detergentes

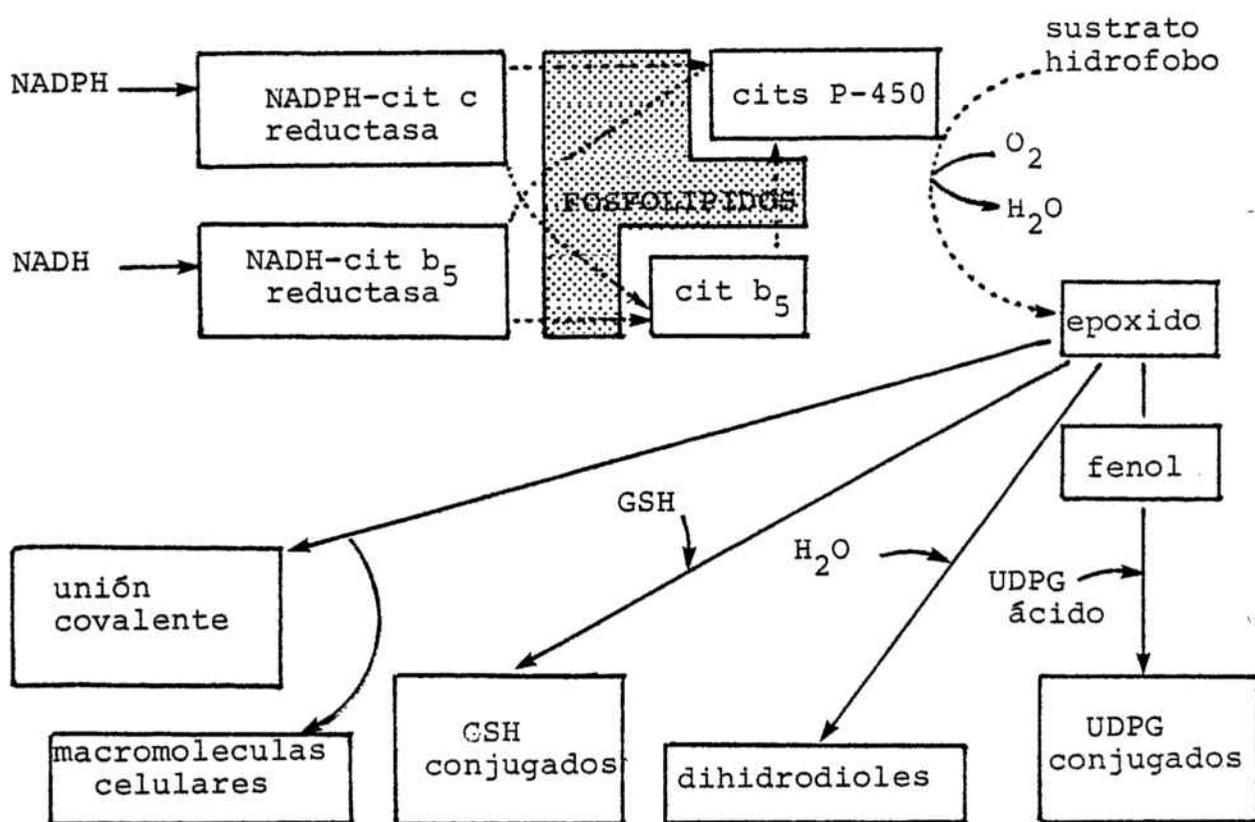


Figura 16: Papel de los fosfolípidos de la membrana microsomal en el sistema metabolizador del cit.P-450 (NEBERT y col., 1975).

no iónicos, pueden funcionar de varias formas: facilitando la unión de la reductasa al cit.P-450, facilitando la unión del sustrato al cit.P-450, o bien, incrementando el cociente P-450/reductasa.

La reductasa no reacciona con el cit.P-450 en un sistema reconstituido si no están presentes los lípidos (VERMILION y COON, 1978). Esto sugiere que la porción hidrófoba de la reductasa y los lípidos actúan, concertadamente, para facilitar la unión de la reductasa al cit.P-450.

También parece que los fosfolípidos facilitan la unión de sustratos al cit.P-450, sobre todo de los sustratos más insolubles en agua.

#### 1.5.- INTERACCIONES DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA.-

Las reacciones de monooxigenación son muy complejas ya que comprenden la transferencia de electrones y la activación de oxígeno y son difíciles de evaluar porque el sustrato de un paso se convierte en catalizador del siguiente. La transferencia de electrones es complicada, ya que la NADPH cit.P-450 reductasa contiene FAD y FMN y cada flavina existe en forma total y parcialmente reducida y los electrones son intercambiados entre las dos formas.

### 1.5.1.- ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION.-

Una reacción de monooxigenación requiere un consumo equimolar de NADPH, oxígeno y sustrato, pero cuando se utilizan microsomas hepáticos de rata se oxida más NADPH del necesario para la formación del producto (JEFFERY y MANNERING, 1977). Esto se debe a que la actividad endógena (NADPH oxidasa), puede consumir tanto o más NADPH que el utilizado en la oxidación del sustrato. La actividad pirofosfatasa es la que consume de forma endógena NADPH, así se ha demostrado que al inhibir dicha actividad, el consumo de NADPH y la formación del producto de la reacción se produce de forma equimolar (JEFFERY y MANNERING, 1979).

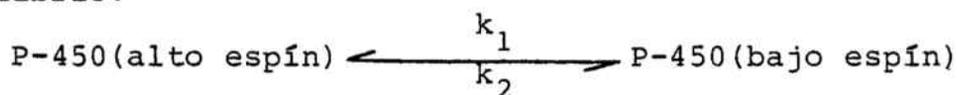
### 1.5.2.- UNION DEL SUSTRATO AL CIT.P-450.-

YOSHIDA (1983) comprobó que el sexto ligando más probable para el cit.P-450, en su forma de bajo espín, era una molécula de agua y que el agua se halla en un equilibrio. Este equilibrio esta condicionado por la hidrofobicidad del entorno del grupo hemo:



ZIEGLER y col. (1982) observaron que en el

equilibrio:



al añadirse el sustrato, las dos constantes aumentan, pero en mayor medida lo hacia la  $k_1$ , favoreciendo la transición de la forma de bajo espín a alto espín. Se puede considerar que el primer paso del proceso es la unión del sustrato y la transformación del cit.P-450 a su forma de alto espín, lo que producirá una rápida transferencia de electrones desde la reductasa.

BACKES y col. (1980) han comprobado que existe una estrecha relación entre el contenido del cit. P-450 de alto espín, la transferencia de electrones y las concentraciones de sustrato y NADPH oxidado.

### 1.5.3.- REDUCCION DEL FERRICIT.P- 450.-

Una vez el complejo sustrato-ferricit. P-450 está formado, puede aceptar un simple electrón de la cit.P-450 reductasa, con la consiguiente reducción del hierro del citocromo a su forma ferrosa.

PETERSON y col. (1976) habían observado que la reducción del ferricit.P-450, en condiciones anaerobias sigue un curso bifásico. A partir de considera-

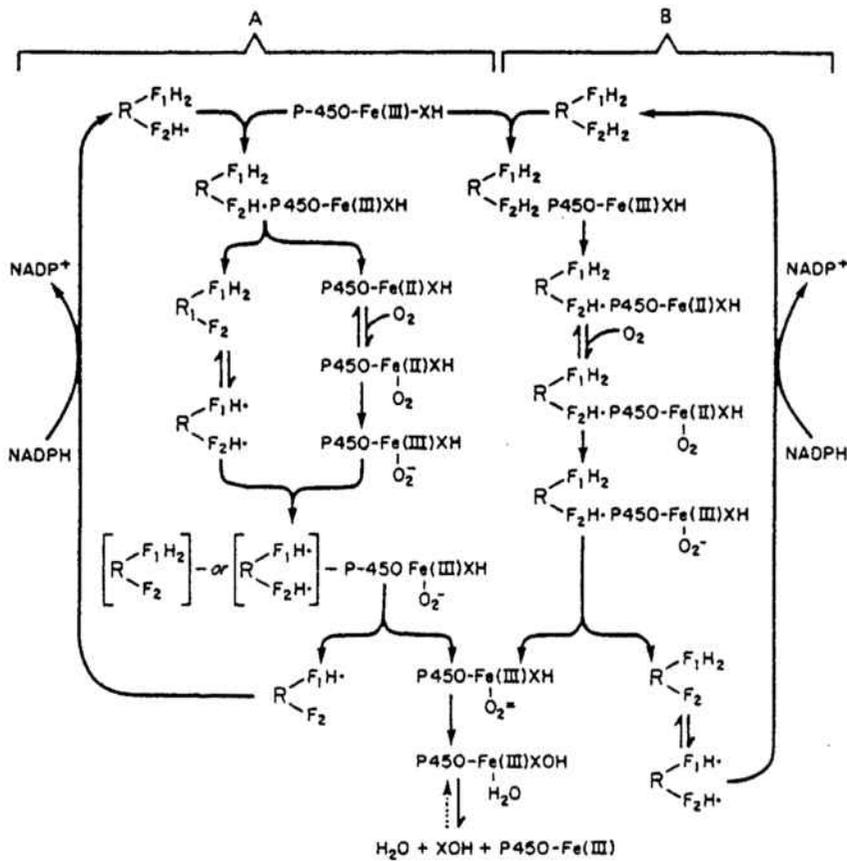
ciones termodinámicas, se ha propuesto un modelo con una reacción de reducción rápida y otra retardada del ferricit. P-450, que representa la transferencia de electrones de dos formas de NADPH cit.P-450 reductasa, así, la fase rápida tiene lugar cuando se transfieren electrones de la reductasa totalmente reducida y la fase retardada, con la reductasa sólo parcialmente reducida.

La fig. 17 indica como las dos especies de reductasa están formadas por NADPH y muestra las dos series de reacciones que se producen simultáneamente. El camino del lado B predomina cuando la concentración de NADPH es alta y el cociente  $NADP/NADPH$  es igual o superior a uno. IMAI y SATO (1977), encontraron que alrededor del 50 % o más del ferricit.P-450 es reducido por la reacción rápida con sustratos como hexobarbital, etilmorfina, ciclohexano, testosterona o anilina.

#### 1.5.4.- OXIGENACION DEL COMPLEJO SUSTRATO-FERROCIT.P-450.-

La forma reducida del complejo sustrato-cit.P-450(III) puede unirse al oxígeno, siendo una reacción reversible que puede ser desplazada por el monóxido de carbono, para formar el compuesto con espectro característico del cual deriva el nombre del citocromo.

Figura 17: Modelo que representa las interacciones de la reductasa total y parcialmente reducida con el complejo sustrato-cit.P-450.



El monóxido de carbono inhibe la reacción de monooxigenación por competencia con el oxígeno.

Hay evidencias de que los diferentes isoenzimas del cit.P-450 tienen distintas afinidades para el oxígeno (ESTABROOK y col., 1970). El oxígeno existe en tres estados: el estado fundamental (triplete) y dos estados excitados (singulete). En el estado fundamental, los espines con dos electrones no apareados, en los dos orbitales más externos de la molécula, son paralelos. El singulete se produce cuando los electrones tienen espines antiparalelos en el mismo o diferentes orbitales. Cada orbi-

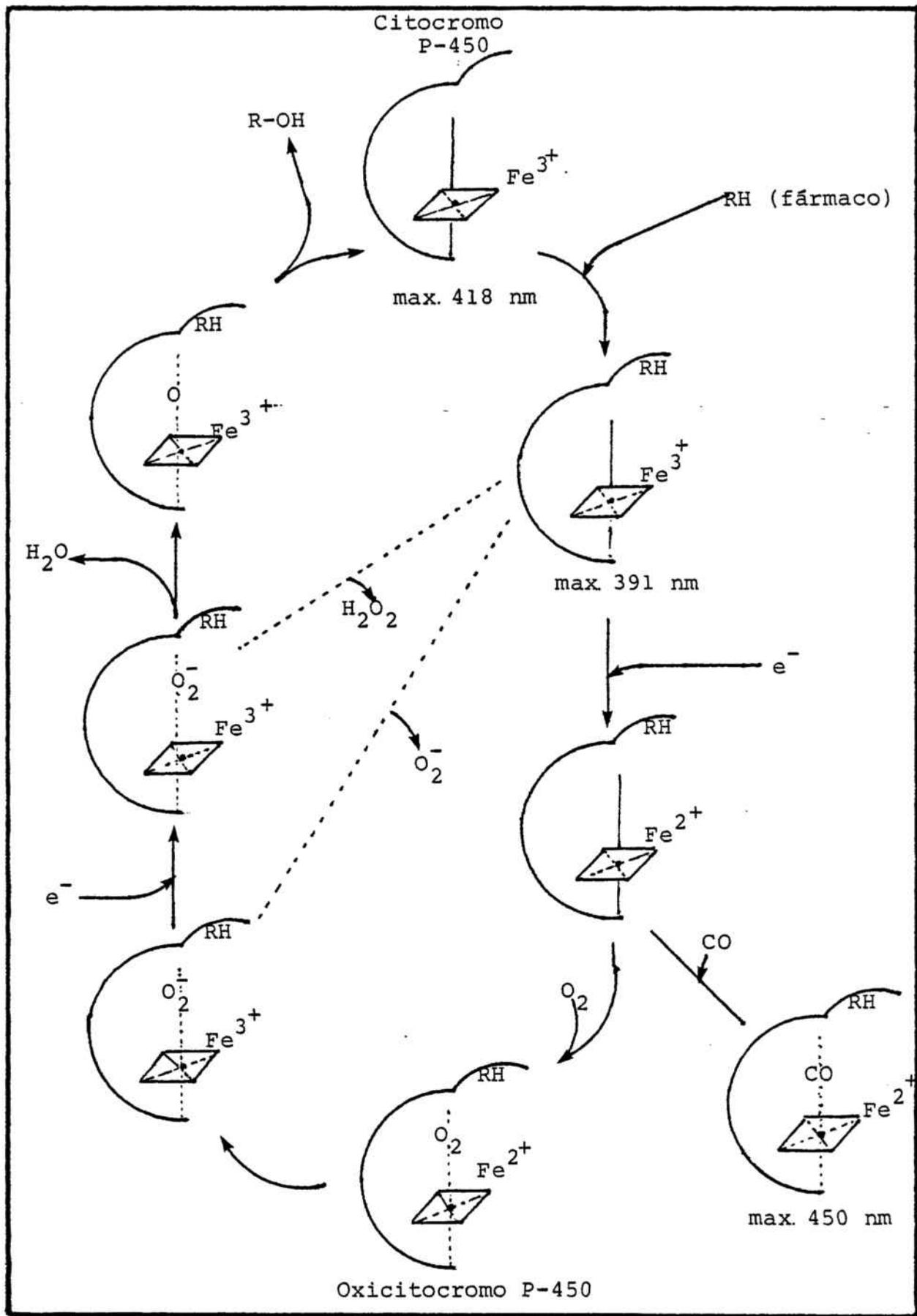


Figura 18: Esquema general del recorrido del fármaco a través de las distintas formas del cit.P-450.

tal externo de la molécula de oxígeno puede alojar a dos electrones. La adición de otro electrón produce el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ):



La suma de dos electrones produce el anión peróxido ( $O_2^{2-}$ ):



Si un electrón del Fe(II) del grupo hemo del citocromo se transfiere al oxígeno, este se activa y puede ser transferido, a su vez, al complejo oxiferrocit. P-450-sustrato, para formar por isomerización el oxianión-ferrocit.P-450-sustrato.

HAMILTON (1974) observó que las reacciones microsomales transcurren a través de intermediarios oxeno.

La unión del oxígeno al citocromo reducido puede dar tres especies activas: un complejo enzimático  $Fe^{3+}-O$ , un complejo  $Fe^{3+}$ -peróxido y, por último, un compuesto peróxido. Recientemente, se ha sugerido que el complejo enzimático  $Fe^{3+}-O$  es la forma activa del oxígeno en el cit. P-450.

MATSUBARA y col. (1976) comprobaron que las especies de oxígeno activo envueltas en las reacciones del citocromo contienen simplemente un átomo de oxígeno, además del  $Fe^{3+}$ -peróxido. Este último experimento indica que la reacción de monooxigenación es una transferencia de oxenos, en la que sólo un átomo de oxígeno unido al cit.P-450 es transportado hasta el sustrato.

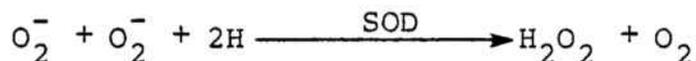
1.5.5.- REDUCCION DEL COMPLEJO SUSTRATO-  
OXIANIONFERROCIT.P-450 Y FORMACION  
DEL PRODUCTO FINAL.-

El complejo sustrato-oxianionferrocit.P-450 acepta finalmente otro electrón, de la forma reducida de la NADPH cit.P-450 reductasa o de la ferrocit.b<sub>5</sub> reductasa. El átomo de oxígeno es transferido al sustrato y el producto final es liberado del complejo enzimático. El cit.P-450 liberado de su sustrato vuelve a su estado de bajo espín.

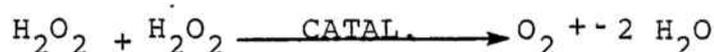
Este mecanismo se adapta a gran variedad de configuraciones moleculares por lo que gran número de sustratos pueden reaccionar con él.

Las formas de oxígeno que han aceptado un electrón (anión superóxido) o dos electrones (anión peróxido), a veces, se disocian del citocromo antes de la oxidación del sustrato. Tanto los aniones superóxido o el agua oxigenada, formada a partir del anión peróxido, son muy tóxicos debido a su naturaleza reactiva, por lo que "enzimas protectores" como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión reductasa mantienen sus concentraciones bajas:

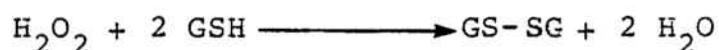
La superóxido dismutasa metaboliza los superóxidos a agua oxigenada:



el agua oxigenada es detoxificada por una catalasa:



y por la glutatión reductasa (GSH):



#### 1.5.6.- SINERGISMO DEL SISTEMA NADH.-

ESTABROOK y col. (1971) fueron los primeros en probar que el cit.b<sub>5</sub> dependiente de NADH y el cit. P-450 dependiente de NADPH, interactúan en los microsomas.

Las reacciones de monooxigenación consumen NADH sólo en un 10-20 % del valor con que lo hace con NADPH. Esto indica que el cit.P-450 generalmente acepta electrones del NADPH, aunque hay varios sustratos que, en caso de tener como única fuente de electrones NADH, pueden ser metabolizados con un rendimiento elevado (ej: la O-demetilación del p-nitrofenol) (CORREIA y MANNERING, 1973).

1.5.7.- FUENTE DE ELECTRONES PARA EL SISTEMA DEL CIT.P-450.-

La fuente de electrones para el sistema del cit.P-450 es la NADPH cit.P-450 reductasa. IYANAGI y col. (1974) observaron que la NADPH cit.P-450 reductasa transfería electrones en cuatro pasos de un electrón cada uno, los cuales tenían unos valores de potencial de: -110 mV, - 270 mV, - 290 mV y - 365 mV .

OPRIAN y COON (1982) asignaron los valores individuales del potencial de - 110 mV al par FMN/FMNH<sup>\*</sup>, - 270 mV al FMNH<sup>\*</sup>/FMNH<sub>2</sub>, - 290 mV a el par FAD/FADH<sup>\*</sup> y - 365 mV al FADH<sup>\*</sup>/FADH<sub>2</sub>, corroborando la hipótesis de VERMILION y col. (1981), que enunciaba que la ruta de transferencia de electrones hacia el cit.P-450 era:



A partir de estas comprobaciones es probable la oxidación del FMNH<sub>2</sub>/FADH<sup>\*</sup> a la forma FMNH<sup>\*</sup>/FADH de la reductasa, con equilibrio desplazado hacia FMNH<sub>2</sub>/FAD, por el ferricit.P-450.

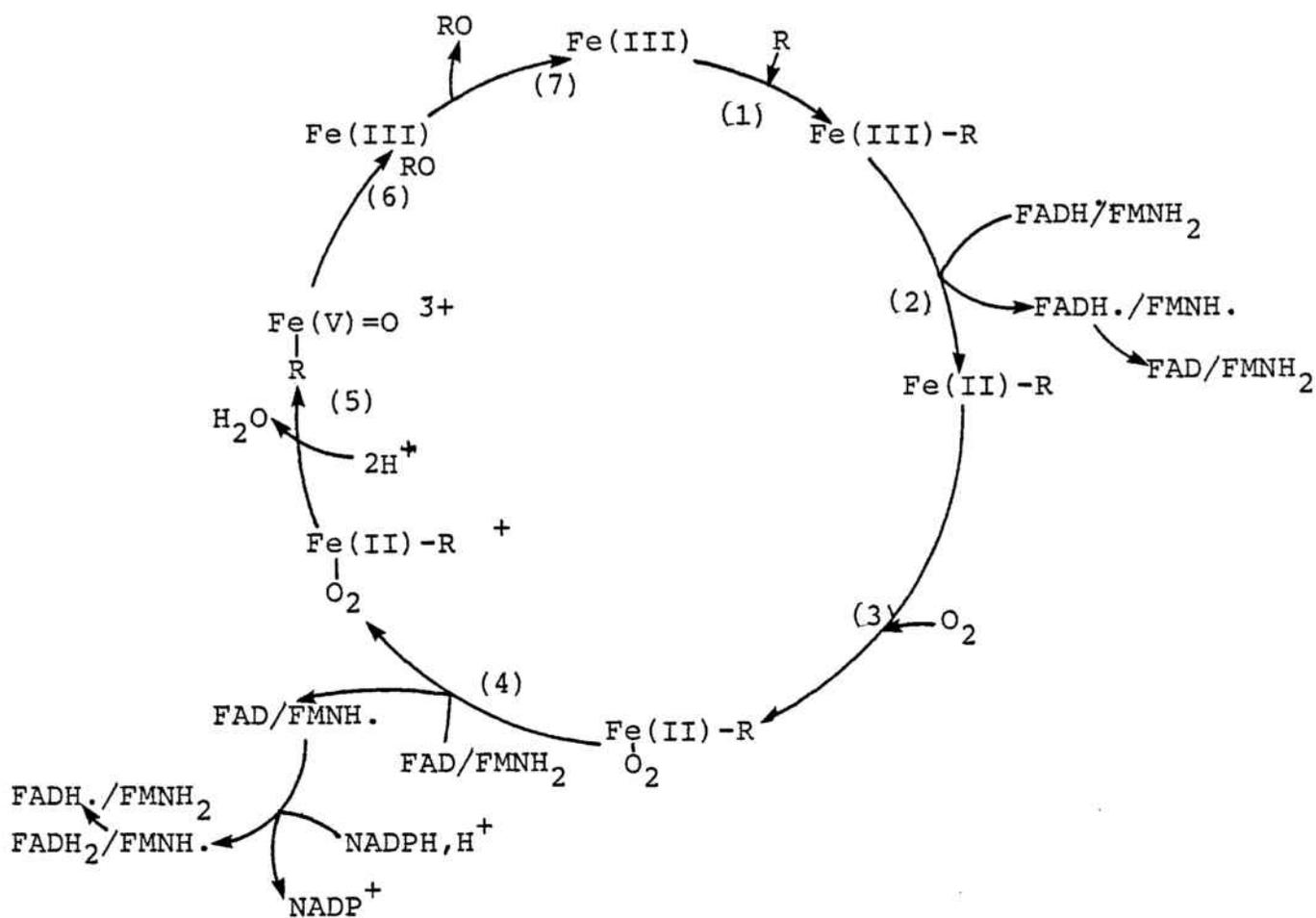
La forma FMNH<sub>2</sub>/FAD podría ceder otro electrón al complejo oxigenado ferrocit.P-450 para formar las especies FMNH<sup>\*</sup>/FAD y entonces, ser reducida a las especies FADH<sub>2</sub>/FMNH<sup>\*</sup>, por NADPH, en un proceso con transferencia de dos electrones. El FADH<sub>2</sub>/FMNH<sup>\*</sup> podría sufrir una transferencia interna de un electrón, para regenerar FADH<sup>\*</sup>/FMNH<sub>2</sub> y reiniciar el ciclo.

#### 1.5.8.- TERMODINAMICA DEL PROCESO.-

El paso de unión del sustrato al cit. P-450 es exergónico, con liberación de 4 a 9 Kcal mol<sup>-1</sup>, pero esta energía de unión no se almacena en la forma de un estado de espín de transición. La reducción del ferricit.P-450 requiere de 6 a 8 Kcal mol<sup>-1</sup>, los potenciales pasan de -350 a - 280 mV por la reducción del citocromo, proporcionadas por la oxidación del NADPH por la reductasa.

La unión del oxígeno a la forma ferrosa del cit.P-450 se realiza con una ganancia de 8 a 9 Kcal mol<sup>-1</sup>. La suma de un segundo electrón al sistema en el cuarto paso de la fig.19 está favorecido termodinámicamente (- 1 Kcal mol<sup>-1</sup>). El quinto paso es poco conocido Finalmente, en el séptimo paso se requiere energía para la liberación del producto, probablemente algo menos que la energía producida en la unión del sustrato, 4 a 8 Kcal mol<sup>-1</sup>.

De aquí se deduce que la cadena de transporte electrónico que es el sistema de monooxigenación del cit.P-450, resulta en una oxidación del sustrato pero no produce energía utilizable por el organismo al contrario de lo que ocurre en las mitocondrias.



**FIGURA 19:** Esquema en el que se representan los pasos del ciclo de oxidación de fármacos por el cit.P-450, en los que hay un intercambio energético.

#### 1.5.9.- PASOS LIMITANTES DEL SISTEMA.-

Del quinto paso de la reacción se sabe muy poco y el primer, tercer y séptimo pasos son relativamente rápidos para ser limitantes (WHITE y COON, 1980).

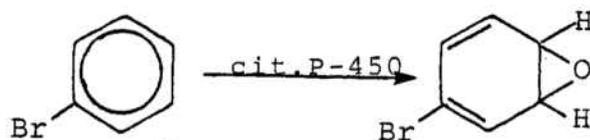
Sólo el segundo (IYANAGI y col., 1978), cuarto (SUGIYAMA y col., 1980 y IMAI, 1981) y sexto paso (WATANABE y col., 1980) pueden ser limitantes bajo determinadas condiciones.

1.6. REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS  
MICROSOMALES HEPATICOS.-

El metabolismo de fármacos conlleva un transporte de intermediarios oxeno del cit.P-450 al sustrato, que produzca la oxidación del sustrato para convertirlo en un producto más hidrofílico. Estas reacciones incluyen: epoxidaciones de anillos arílicos y dobles enlaces, hidroxilación de anillos arílicos, alifáticos y de cadenas alifáticas, oxidación de alcoholes, O-dealquilación de los grupos éter y éster, N-hidroxilaciones, N-dealquilaciones y desaminaciones oxidativas, S-oxidaciones, S-dealquilaciones y deshalogenaciones. Todas estas vías de detoxificación pertenecen a las reacciones de tipo I (ver apartado 2).

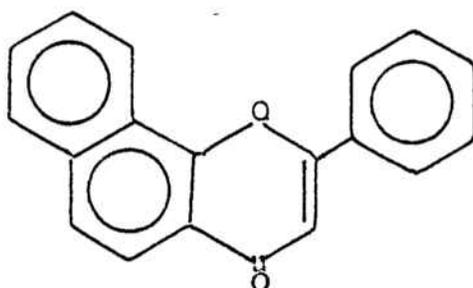
1.6.1.- EPOXIDACION.-

Mediante reacciones de epoxidación los derivados bencénicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y alquenos cíclicos pueden convertirse en epóxidos, mediante reacciones del tipo:



Los epoxidos formados suelen ser inestables.

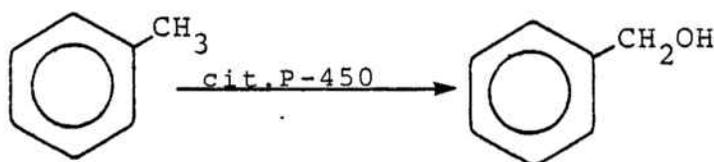
Esta actividad enzimática es bloqueada específicamente por la 7,8 benzoflavona:



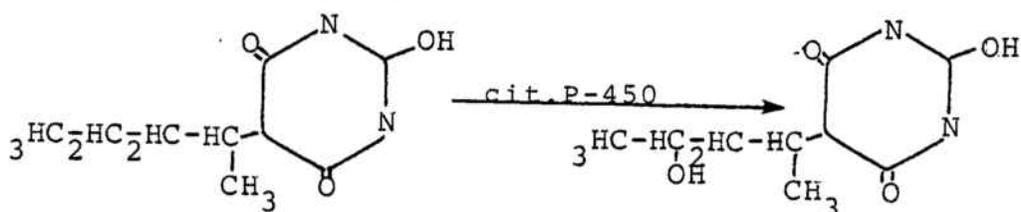
Muchos epóxidos son altamente reactivos: al ser fuertemente electrófilos pueden reaccionar de manera no enzimática con constituyentes tisulares de carácter nucleófilo, como son el glutati6n y otros componentes con grupos sulfidrilo y alcohol. Tambi6n pueden unirse covalentemente con zonas nucleofilas de las macrom6culas de los tejidos, por esta raz6n son hepatot6xicos y carcinog6nicos, en particular, los ep6xidos derivados de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

#### 1.6.2.- HIDROXILACION ALIFATICA.-

Las hidroxilaciones est6n favorecidas en el metilo terminal de las cadenas, as6, el tolueno se hidroxila a becilalcohol siguiendo el esquema:



Aunque existen muchos lugares con posibilidades de ser hidroxilados, la hidroxilación se produce en la posición  $\omega-1$ . Este es el caso del pentobarbital que se hidroxila al correspondiente alcohol y en menor cantidad a su ácido carboxílico:

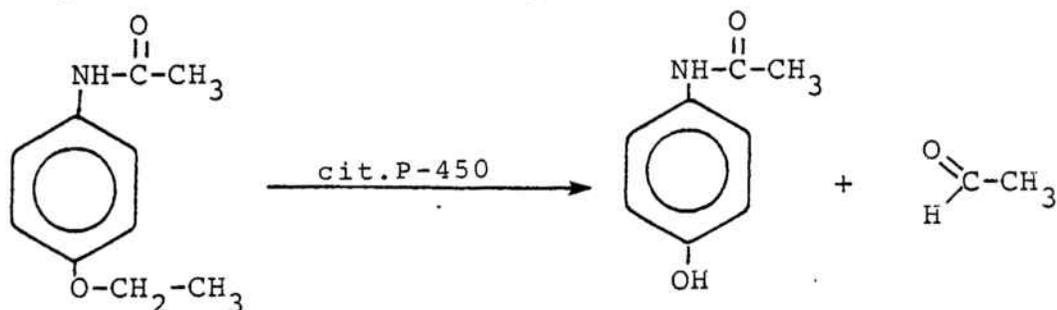


En las oxidaciones alifáticas los productos del sistema microsomal son alcoholes. La oxidación posterior a aldehidos y ácidos carboxílicos requiere la presencia de enzimas solubles como la alcohol y la aldehido-deshidrogenasa (GUILLETTE, 1959).

La hidroxilación en  $\omega-1$  de ácidos grasos de cadena larga es una reacción microsomal en la que esta involucrado el cit.P-450.

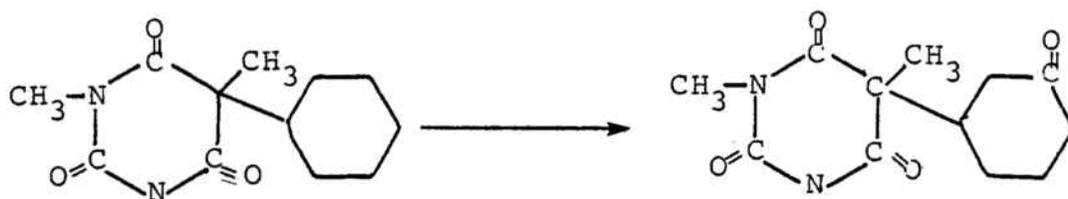
Una hidroxilación de la cadena lateral algo diferente se observa con el hexobarbital, que se oxida a la forma ceto (COOPER y BRODIE, 1955).

En los alquilcompuestos con O, N o S, la hidroxilación siempre ocurre adjacente al heteroátomo, independientemente de la longitud de la cadena.



### 1.6.3.- HIDROXILACION DE ANILLOS ALQUI- LICOS.-

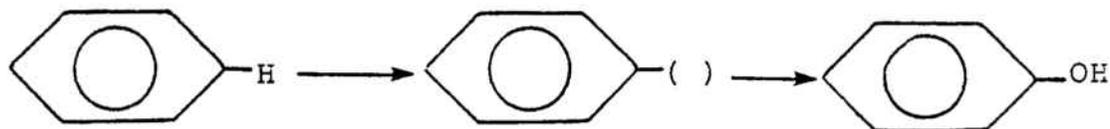
Una reacción típica de este grupo es la hidroxilación del hexobarbital que es metabolizado hasta su derivado ceto en el anillo alquílico:



### 1.6.4.- HIDROXILACIONES ARILICAS.-

Estas reacciones pueden transcurrir a través de cuatro mecanismos teóricos de inserción del grupo hidroxilo:

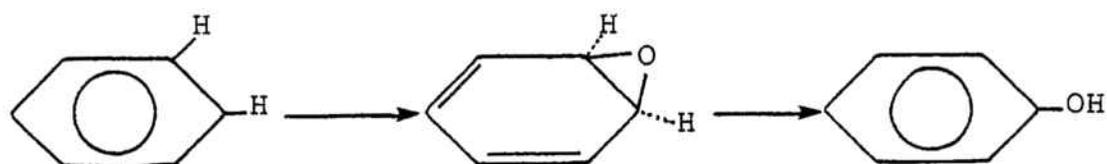
1.6.4.1.- Por inserción del OH directamente en el lugar del protón que se pierde en un paso intermedio.



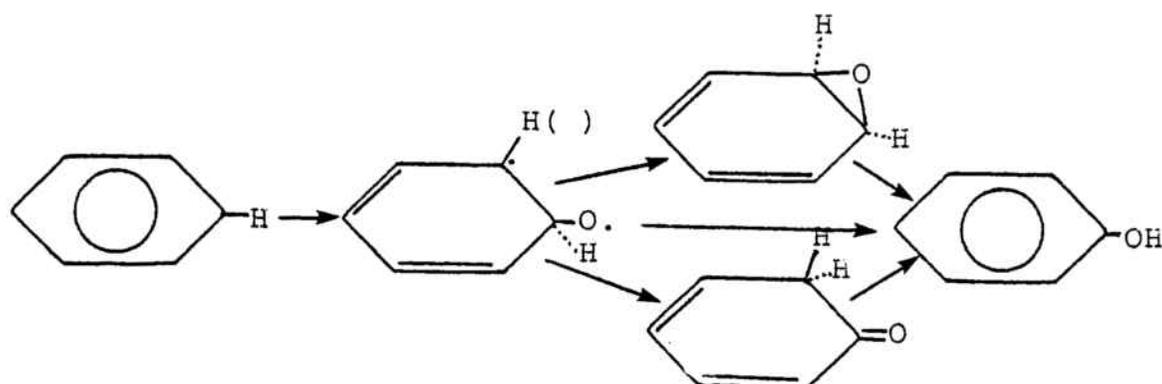
1.6.4.2.- Inserción del OH en el enlace C-H.



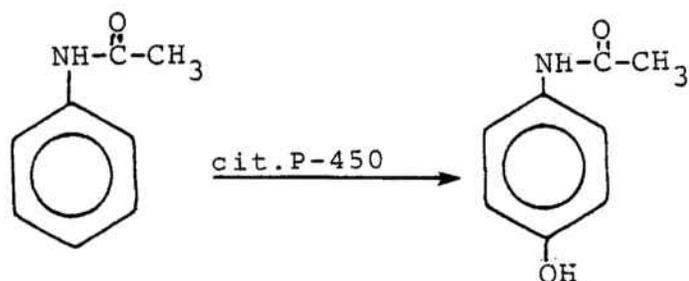
1.6.4.3.- Adición directa del hidroxilo al enlace aromático C=C:



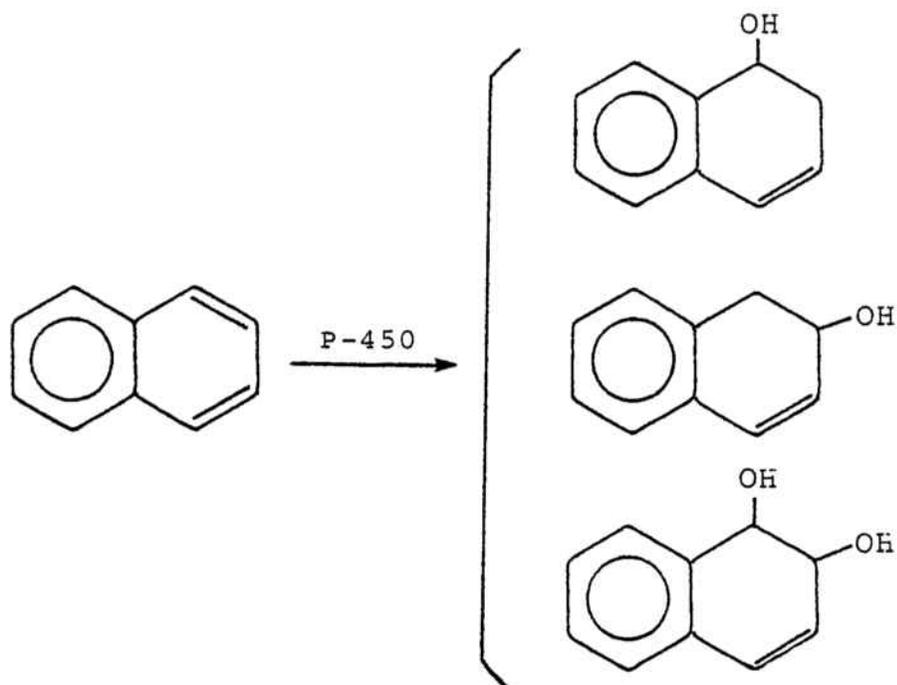
1.6.4.4.- Por adición y redistribución:



Los sustratos típicos para estas reacciones son los bencenos y los hidrocarburos policíclicos aromáticos sustituidos. No se sabe con certeza, si todas las aril hidroxilaciones se producen a través de un intermediario epóxido, aunque parece ser que así ocurre. Un ejemplo de estas reacciones es la hidroxilación de la acetanilida para formar el paracetamol, según el esquema siguiente:



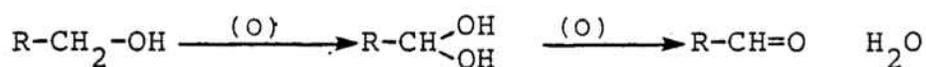
La hidroxilación puede realizarse en diversos puntos y añadirse más de un grupo hidróxilo como se observa en el siguiente esquema.



Algunas hormonas esteroideas como la testosterona y la  $17\beta$ -estradiol, son hidroxiladas por las enzimas microsomales (KUNTZMAN y col., 1964). Por otra parte la hidroxilación de la fenilalanina, tiroxina y triptofano (menos liposolubles) son catalizadas por sistemas enzimáticos específicos. Todos los compuestos biotransformados por hidroxilación pueden ser posteriormente metabolizados por conjugación para formar glucurónidos o sulfatos.

#### 1.6.5.- OXIDACIONES DE ALCOHOLES.-

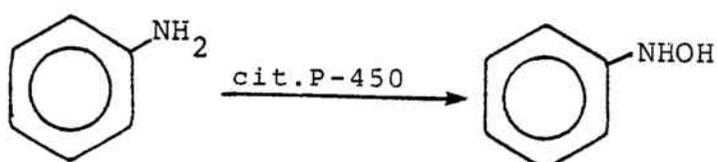
La oxidación microsomal de alcoholes a aldehidos se realiza a través de un intermedio inestable:



Esta ruta de oxidación de alcoholes es sólo un camino minoritario, habitualmente los alcoholes son metabolizados por un enzima no microsomal, la alcohol-deshidrogenasa.

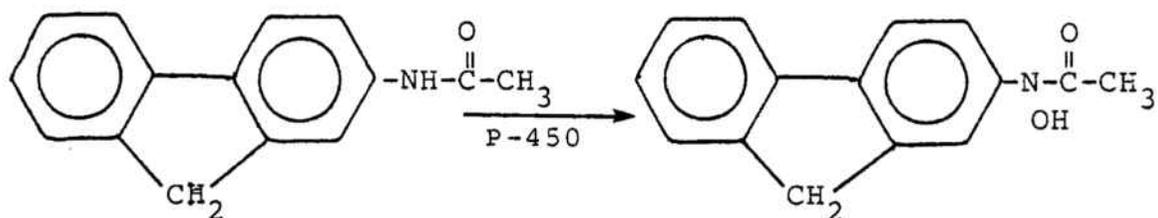
#### 1.6.6.- N-HIDROXILACION.-

Las aminas primarias pueden ser convertidas a hidroxilaminas, como sucede con la anilina (KIESE y UEHLEKE, 1961):



Las aminas secundarias también son metabolizadas por los enzimas microsomales formando hidroxilaminas, en cambio las aminas terciarias forman amino-óxidos que son inestables.

Otro ejemplo de N-hidroxilación es la descrita por CRAMER y col. (1960):

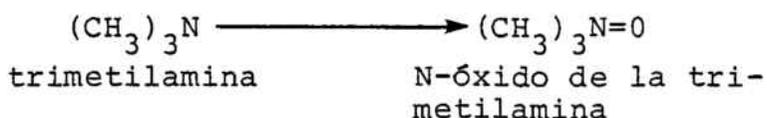


También se pueden hidroxilar las iminas (PARLI y col., 1971).

Las enzimas relacionadas con la N- hidroxilación no son inhibidas por el monóxido de carbono, por lo que es posible que no se produzca formación de un complejo sustrato-cit.P-450. Además las N-hidroxilaciones no son bloqueadas por inhibidores de grupos sulfidrilo (p-cloromercuribenzoato, N-etilmaleimida), a diferencia del resto de reacciones microsomales. Muchas aminas aromáticas son sustrato para la N-hidroxilación, produciendo potentes agentes carcinógenicos.

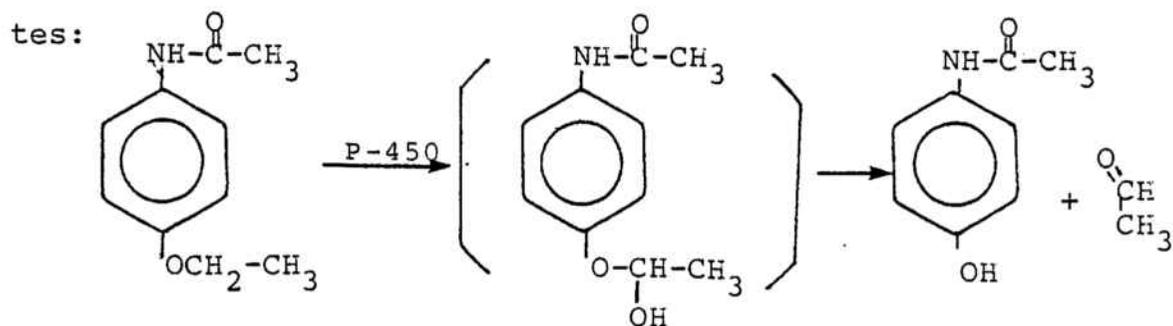
#### 1.6.7.- N-OXIDACION.-

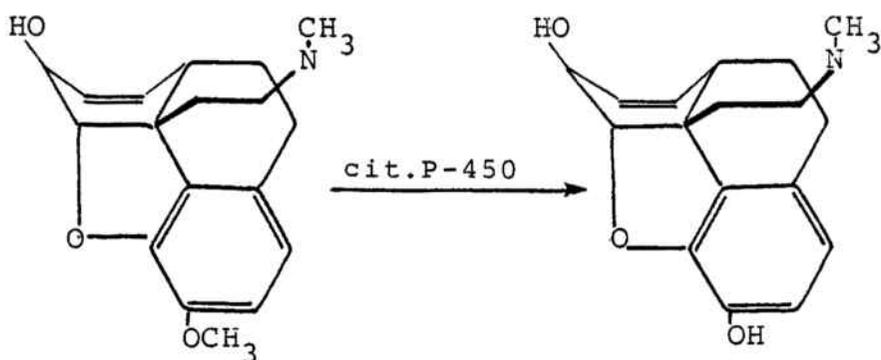
El mecanismo de este tipo de reacciones, siguiendo el ejemplo de BAKER y CHAYKIN (1962) es:



#### 1.6.8.- O-DEALQUILACION.-

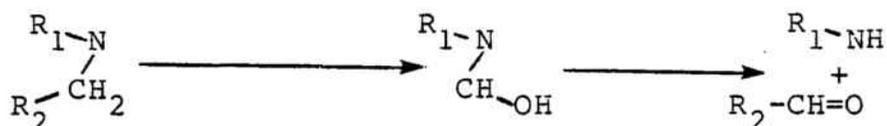
Los éteres aromáticos se degradan por acción del cit.P-450, como se indica en las dos reacciones siguientes:





### 1.6.9.- N-DEALQUILACION.-

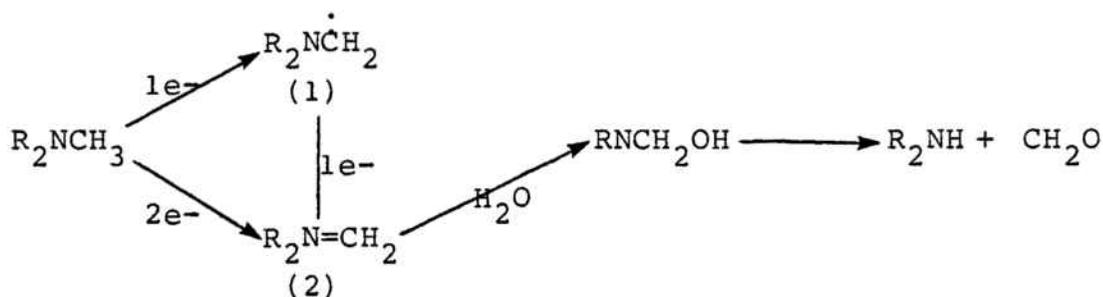
Cuando el sustrato es una amina secundaria como la N-metilamina y desipramina su metabolismo es inhibido por el monóxido de carbono, el esquema de la reacción es:



En el catabolismo de aminas terciarias, por N-demetilación, se acepta que transcurre a través de una hidroxilación del grupo N-metilo para formar una carbinolamina, la cual es inestable y espontáneamente se descompone formando formaldehído y la desmetilamina (TESTA y JENNER, 1976 y RAHIMTULA y col., 1978).

Existen varios mecanismos posibles para la formación de la carbinolamina. Uno de ellos involucra una oxidación, con dos electrones, de la amina directamente. La otra vía se inicia con la oxidación, con un electrón, de la amina produciendo un radical (1), que al volverse a oxidar

con otro electrón se convierte en el catión iminium (2), el cual podría reaccionar con agua para formar una carbinolamina (3). Si el catión iminium (2) fuera el producto liberado del enzima, entonces el átomo de oxígeno de la carbinolamina (3), derivaría del medio acuoso (ASHLEY y GRIFFIN, 1981).



Alternativamente, el catión iminium (2) podría reaccionar con los diferentes estadios de oxidación Fe-O del cit.P-450 (SHANNON y BRUCE, 1981) y entonces el átomo de oxígeno de la carbinolamina provendría del oxidante, el cit.P-450. El átomo de oxígeno en (3) también sería cedido por el oxidante si el radical (1) se recombina con el enlace Fe-O<sub>2</sub> en el lugar catalítico del cit.P-450 (WHITE y COON, 1980).

No se ha podido diferenciar cuál de los mecanismos se sigue en la demetilación, pero el oxígeno, en el producto demetilado, procede del oxidante y no del agua.

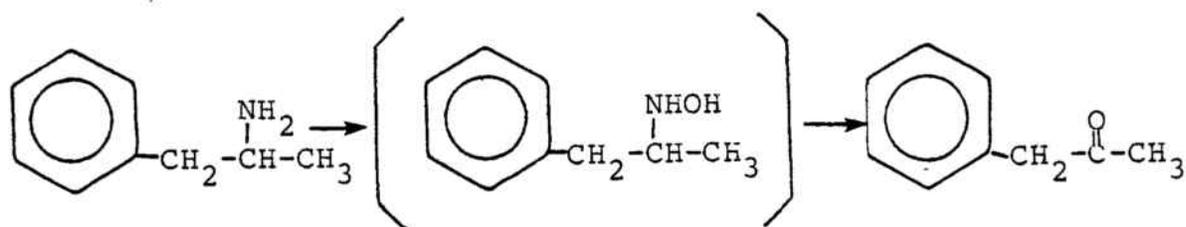
GRIFFIN y col. (1978 y 1980) propusieron un mecanismo de demetilación donde la imina (2), disociada del enzima, reacciona con el agua para formar la carbinolamina y finalmente, el formaldehído y la desmetilamina. Aunque este mecanismo puede tener lugar en la demetilación de la

aminopirina, no es un mecanismo general para las reacciones de N-demetilación catalizadas por el cit.P-450.

#### 1.6.10.- DESAMINACION.-

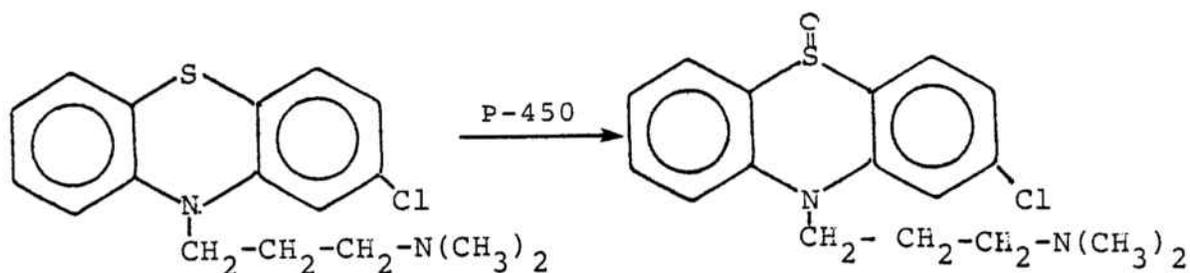
Las enzimas hepáticas pueden desaminar aminas  $\alpha$ -metiladas, mientras que la monoaminoxidasa puede utilizar como sustrato, sólo a aminas que no tienen sustituido el carbono alfa.

Se ha propuesto la aparición de un intermedio inestable carbinolamina, en la desaminación oxidativa dependiente del cit.P-450 de aminas primarias alicíclicas, donde el átomo de oxígeno en el producto cetónico, se deriva del oxígeno molecular (KUREBAYASHI y col., 1982). La desaminación de la anfetamina es un ejemplo de este tipo de reacciones:

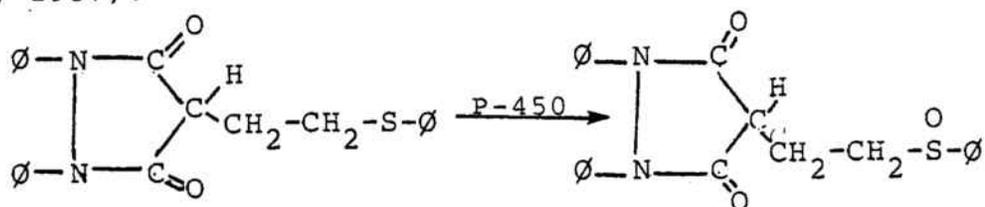


#### 1.6.11.- SULFOXIDACION.-

En general este tipo de oxidaciones ocurre en productos con un anillo heterocíclico que contiene azufre, como es el caso de la clorpromazina (SALZMAN y BRODIE, 1956):



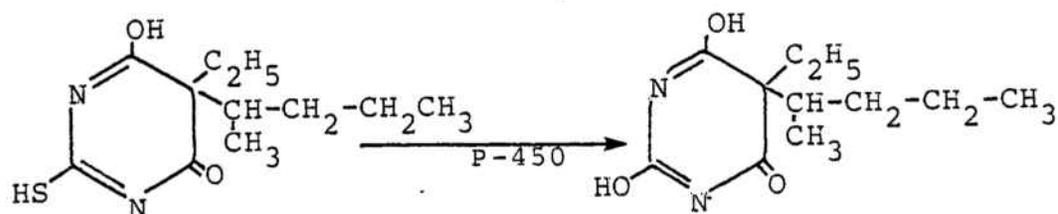
También puede producirse en compuestos con grupos tioéter como es el tioderivado de la fenilbutazona que, al metabolizarse, forma un sulfóxido, la sulfipirazona, con acción farmacológica más potente (BURNS y col., 1957):



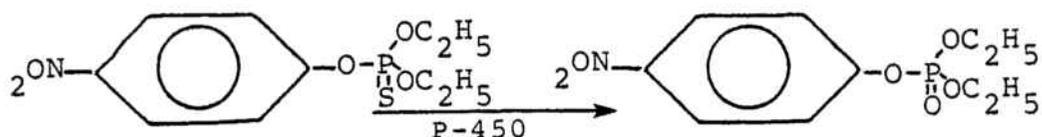
Muchos de estos sulfóxidos son posteriormente oxidados a sulfonas.

#### 1.6.12.- S-DEALQUILACION.-

Se ha descrito la sustitución del azufre por oxígeno en el tiopental y tiopirimidinas relacionadas (SPENCER y SHIDEMAN, 1959):

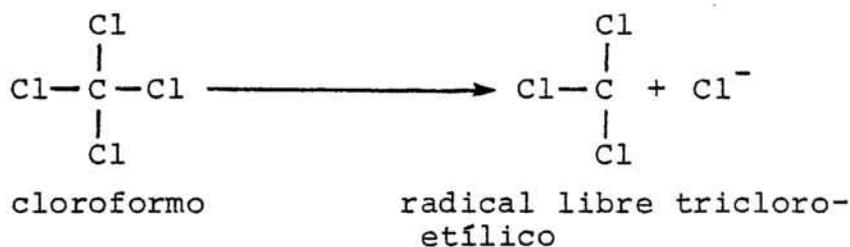


Otro ejemplo de este tipo de reacciones es la conversión del paratión en su análogo oxigenado, el paraoxón que es tóxico (DAVISON, 1954):



#### 1.6.13.- DESHALOGENACION.-

Las enzimas microsomales catalizan la eliminación de derivados clorados de sustratos tales como el tetracloruro de carbono, cloroformo, halotano y metoxifluorano.



Las hormonas tiroideas, tiroxina y la triiodotironina son deshalogenadas por enzimas microsomales.

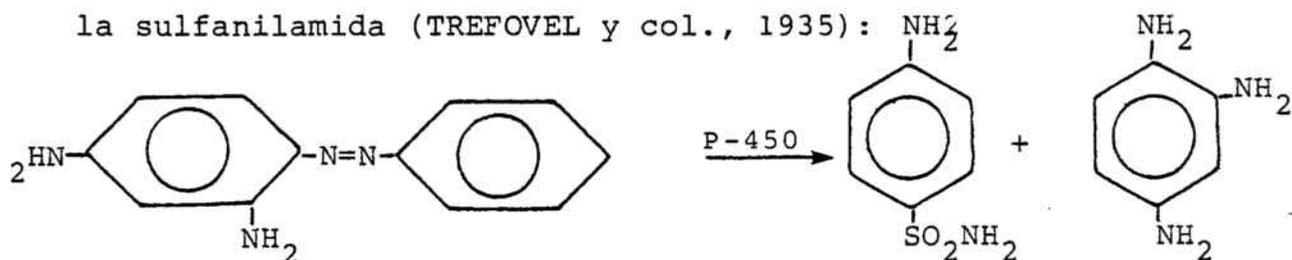
#### 1.6.14.- REDUCCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS MICROSOMALES.-

Aunque las reacciones catalizadas por el sistema microsomal son, principalmente, oxidaciones, también par-

ticipa en algunas reducciones de compuestos extraños a través de reacciones de azoreducción y nitroreducción.

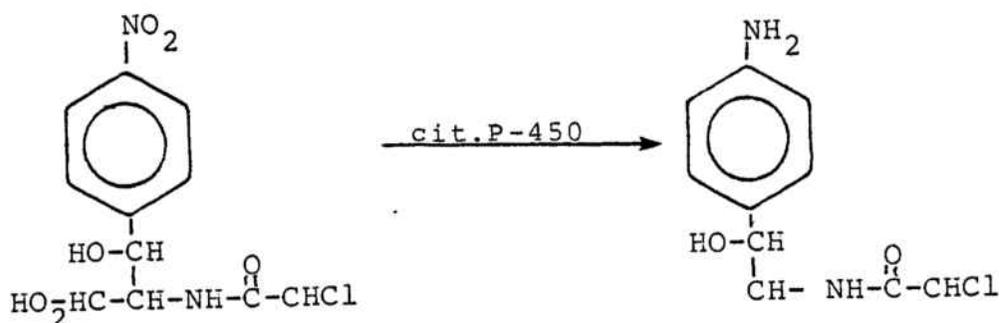
#### 1.6.14.1.- Azoreducción.-

Parece tener lugar de dos formas: una sensible al monóxido de carbono en la que, probablemente, participa el cit.P-450; o bien, otra que utiliza NADPH y una flavoproteína reductasa. La reducción del pigmento azo, del prontosil produce la liberación del metabolito activo, la sulfanilamida (TREFOVEL y col., 1935):



#### 1.6.14.2.- Nitrorreducción.-

Compuestos aromáticos con el grupo nitro son convertidos, a través de intermediarios nitroso e hidroxilamina, a las correspondientes aminas. Este es el mecanismo de metabolización del cloramfenicol (FOUTS y BRODIE, 1957):



## 2.- PARTE EXPERIMENTAL.-

## 2.1.- MATERIAL.-

### 2.1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO.-

Se han utilizado ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, de pesos comprendidos entre 100 y 200 g, según el experimento, procedentes del estabulario de esta Facultad. Hasta el momento de realizar los ensayos, los animales se mantuvieron con agua "ad libitum" y con una dieta estándar (UAR-A-04) para rata-ratón, elaborada de acuerdo con las normas del "National Research Council" y del "Bureau National d'Alimentation", con la siguiente composición: proteínas (17%), lípidos (3%), celulosa (5%), minerales (5%), glúcidos (58%) y humedad (12%).

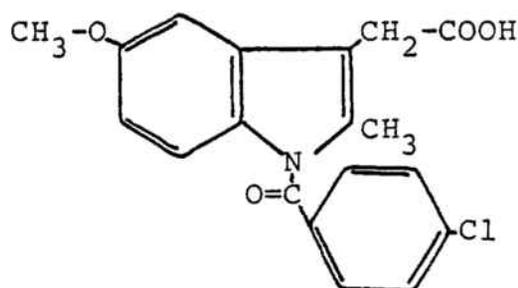
Los animales estuvieron alojados en jaulas de material plástico (Makrolon) de 524 x 274 x 150 mm, por lo menos una semana antes de empezar el experimento para su habituación. Cada jaula albergó un máximo de diez animales del mismo sexo y edad. La temperatura del estabulario se mantuvo constante a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y la humedad del mismo entre 40 y 60%, con un ritmo circadiano de luz de 12 h (desde las 6 h a las 18 h).

## 2.1.2.- FARMACOS.-

En este trabajo hemos utilizado sólo un fármaco en las series experimentales, la indometacina.

### 2.1.2.1.- Indometacina.-

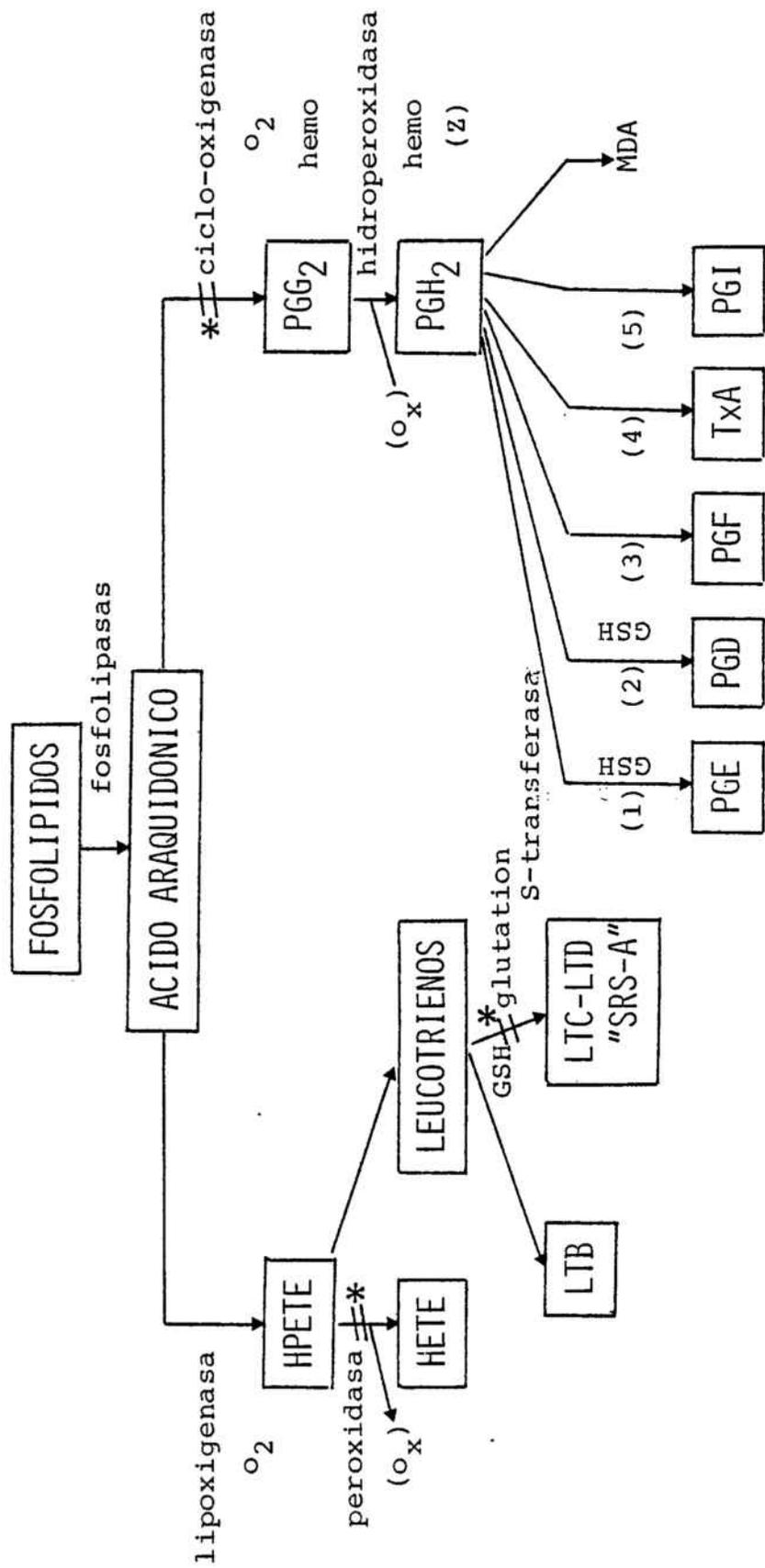
Figura 20: Estructura molecular de la indometacina.



La indometacina, (ácido 1-(p-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-indol-3-acético, es un inhibidor de la ciclooxigenasa y, por consiguiente, de la síntesis de prostaglandinas, de forma reversible al contrario que los salicilatos, siendo éste uno de los principales mecanismos postulados para explicar su actividad farmacológica (FERREIRA y VANE, 1974). Los trabajos de SMITH y WILLIS (1971) y VANE (1974) señalan a la indometacina como uno de los antiinflamatorios no esteroideos que más potentemente inhiben a la prostaciclín-sintetasa. Recientemente WU y MATHEWS (1983) han comprobado que la indometacina no sólo inhibe la ruta de la ciclooxigenasa sino también la producción de 12 HETE, al inhibir la peroxidasa, y de sustancias reactivas en la ana-

filaxis como los LTC y LTD, por inhibición de la glutatión-S-transferasa como se representa en la fig.21. Las inhibiciones indicadas puede ser que expliquen el hecho que la indometacina inhiba la migración leucocitaria hacia el foco inflamatorio (FORD-HUTCCHINSON y col., 1977). ROBINSON, TASHJAN y LEVINE (1975) descubrieron que las ratas artríticas poseen en la sinovial una sustancia con fuerte acción estimuladora de la reabsorción del hueso que sin embargo desaparece "in vitro" con el tratamiento con indometacina.

WEISS y WAIT (1977) observaron "in vitro" que la indometacina inhibe la fosfodiesterasa y aumenta los niveles de AMPc intracelular, lo que conducira a una estabilización de la membrana celular de los polimorfo-nucleares (PMN) y macrófagos. Este hecho fue comprobado por DAMAS y BOURDON (1982) al demostrar que la indometacina provoca una disminución en la liberación de enzimas lisosomales y radicales libres superóxido e hidroxilo (KOCH-WESER, 1980). Del mismo modo PUNZI y col. (1982) demostraron que la indometacina aumenta los niveles de AMPc en el fluido sinovial y éllo conlleva una acción antiflogística, por inhibición de la liberación de enzimas lisosomales de los PMN durante la fagocitosis (WEISSMANN y col., 1971) y por disminución de la activación de los linfocitos T y secreción de linfoquinas (BOURNE y col. 1974).



(1) - isomerasa

(2) - isomerasa

(3) - reductasa

(4) - tromboxano sintetasa

(5) - prostaciclina sintetasa

MDA - malonaldehido

\* - lugares de acción de la indometacina en la cascada del ácido araquidonico.

Figura 21: Esquema que representa los lugares de acción de la indometacina en la cascada del ácido araquidonico.

La indometacina tanto en la rata como en el hombre, se absorbe rápidamente, alcanzándose los niveles plasmáticos máximos entre 20 min y 2 h después de la administración oral. La vida media, es dosis dependiente oscilando entre 2.5 y 11 h (ALVAN y col., 1975; RIMBAU y FORN, 1983).

Este fármaco circula fijado a las proteínas plasmáticas en un 90 %. ZINI y col. (1979) demostraron que hay dos tipos de lugares de unión de la indometacina a la albumina, teniendo sólo uno de ellos alta afinidad ( $K= 10$ ) para fármacos acídicos como la indometacina.

Sus efectos adversos son dosis dependientes (BOARMAN y HAIT, 1967). Se producen alteraciones gastrointestinales como: náuseas, anorexia, dolor abdominal y úlceras pépticas; también se ha descrito la producción de diarreas y pancreatitis aguda. Asimismo, puede causar neutropenia, trombocitopenia y raramente anemia. A dosis elevadas actúa sobre el sistema nervioso central produciendo vértigo, dolor de cabeza y confusión mental (BABER y col., 1974).

Hasta ahora su efecto sobre el hígado no había sido apenas descrito, recientemente se ha observado que a niveles terapéuticos, la indometacina produce una disminución en la síntesis de albumina y de alfa glucoproteínas (JAMIESON y KUTRYX, 1980 y JAMIESON y col., 1982).

En nuestros experimentos hemos utilizado indometacina a dosis terapéutica de 1 mg/kg/día, por vía oral (administrada de 10 a 11 mañana) como suspensión estemporanea en C.M.C. al 0.1 % y Tween 80 al 0.1 %.

## 2.2.- METODOS BIOLOGICOS.-

### 2.2.1.- INDUCCION DE LA ARTRITIS.-

La artritis se induce mediante la inyección subplantar en la extremidad posterior derecha, de 0.1 ml de una suspensión de Mycobacterium butyricum (Difco, ref. 0640-33) al 0.5% en vaselina líquida.

Para ello se pesan 100 mg del preparado comercial que contiene M. butyricum y se diluye en 0.5 ml de agua destilada, se homogeneiza durante unos minutos (homogeneizador Andermann & col. L.T.D., Londres) y el homogeneizado obtenido se lleva hasta 20 ml con vaselina líquida.

### 2.2.2.- VALORACION DEL GRADO DE INFLAMACION.-

La evolución del proceso inflamatorio se realizó midiendo el volumen de la extremidad administrada (ipsilateral) y contralateral, utilizando para ello un ple-tismómetro de mercurio (Ugo Basile, Milan) de 30 mm de diámetro.

### 2.2.3.- SELECCION DE LOS ANIMALES ARTRITICOS.-

Después de la inducción, en la extremidad administrada se puede observar un edema pronunciado, que es

evidente ya a las 24 h . Esta reacción se denomina reacción local, a menudo, reacción primaria y se puede considerar como una respuesta inespecífica. Entre la primera y segunda semana siguientes a la inyección subplantar comienza a manifestarse un edema en la extremidad izquierda (contralateral) y también en las extremidades anteriores, pudiendo llegar a afectar a la cola y el hocico. Este síndrome es considerado como la verdadera artritis sistémica o artritis secundaria.

Después de 14 días de la inyección se seleccionan los animales que han desarrollado artritis. Como criterio de selección se estableció el siguiente:

$$\Delta EC > m + 2S$$

siendo  $\Delta EC$  el incremento de volumen (ml) de la extremidad contralateral,  $m$  el valor medio de los incrementos de volumen del grupo control y  $S$  la desviación estándar observada en este último grupo. En las diversas series experimentales realizadas, un 75 % de los animales, aproximadamente, alcanzaron el criterio mencionado.

Una vez seleccionados los animales, fueron distribuidos en lotes de manera que la media del incremento de volumen en la extremidad contralateral, fuera del mismo orden en los diferentes lotes.

#### 2.2.4.- TOMA DE MUESTRAS.-

A los animales, previa anestesia con éter, se les practicó toracotomía, se separó el pericardio y extrajo sangre por punción cardiaca a nivel del ápice, según el método descrito por SCHERMER (1967). Se obtuvieron aproximadamente 8 ml de sangre, que fué rápidamente introducida en tubos de plástico en baño a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta la formación completa del coágulo. Para la obtención del suero, los tubos se centrifugaron a 300 g durante 10 min (centrifuga Beckman mod. TJ-6). Alícuotas del suero fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

De los mismos animales se extraía el hígado, se pesaba y congelaba inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo. El hígado se dividía después de la extracción y cada porción se congelaba por separado en vial de vidrio.

#### 2.2.5.- EVOLUCION CLINICA.-

Como parámetros de evolución clínica se ha determinado la curva ponderal, la inflamación local y sistémica y el peso de órganos.

#### 2.2.5.1.- Curva ponderal.-

Se siguió la evolución del peso corporal semanalmente. Para la valoración del peso se utilizó una balanza Sauter KM 1.000 .

#### 2.2.5.2.- Inflamación local y sistémica.-

Se valora dos veces a la semana, mediante pletismómetro de mercurio, el volumen de las extremidades posteriores ipsi y contralateral, según el método descrito por SPECTOR y WILLOUGMBY (1968).

#### 2.2.5.3.- Peso de órganos.-

En nuestro trabajo sólo nos interesó determinar el peso del hígado, con una balanza Sartorius mod. 1.212 MP (0.001-0.005).

#### 2.3.- MÉTODOS BIOQUÍMICOS.-

Se han determinado las proteínas totales séricas, se ha realizado el proteinograma y valorado la

actividad metabolizadora del citocromo P-450 hepático estudiando, sus actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa.

### 2.3.1.- DETERMINACION DE PROTEINAS SERICAS TOTALES.-

La determinación de las proteínas séricas totales se realizó por refracción, índice relacionado directamente con el peso de soluto por unidad de volumen de la solución valorada (HENRY y col., 1974). Se utilizó un refractómetro Erma Optical (Worns L.T.D.,Tokyo). Las lecturas obtenidas en la escala del aparato proporcionan la concentración de proteínas en g/100 ml. Los resultados obtenidos se han expresado en g/l .

### 2.3.2.- DETERMINACION DEL PROTEINOGRAMA.-

Fundamento: El método utilizado para determinar cuantitativamente las distintas fracciones de proteínas séricas se basa en la distinta migración, según la carga eléctrica, de las proteínas en un campo eléctrico (KOHN, 1957).

Material:

- Solución de rojo Ponceau (Carlo Erba ref. 476.981) al 0.5 % en ácido tricloroacético al 5 %.

- Solución transparentadora: agua destilada, metanol, ácido acético y alcohol diacetona (500:350:70:80).

- Solución amortiguadora: barbital ácido (Merck) 1.84 g y barbital sódico (Merck ref. 6.318) 10.3 g se disuelven en un litro de agua destilada y se ajusta el pH de la solución a 8.6 .

Técnica: Las tiras de Cellogel<sup>R</sup> utilizadas para la ejecución del proteinograma se sumergen en solución amortiguadora de barbital a PH 8.6 durante 10 min, a continuación se secan parcialmente, para eliminar el exceso de solución amortiguadora y se depositan sobre el puente de la cubeta electroforética (Atom AC/5), colocando las muestras de suero cerca del polo negativo, mediante un aplicador adecuado.

Se realiza la electroforesis durante una hora (fuente de alimentación Pharmacia, ECPS 2.000/300); al finalizar se sumergen las tiras durante 10 min en una solución de rojo Ponceau y a continuación, se pasan varias veces por una solución decolorante de ácido acético al 5 % y seguidamente, se sumerguen durante 15 min en una solución transparentadora. Con la ayuda de pinzas, las tiras se disponen en placas de vidrio, secándolas a 80 °C en estufa hasta su total transparencia. La lectura se realizó con ayuda de un fotodensitómetro automático (Atom 429, Digiscan).

Expresión de los resultados: Los resultados se han expresado en porcentajes de cada fracción proteica con respecto a las proteínas totales.

2.3.3.- AISLAMIENTO DE LA FRACCION  
MICROSOMAL.-

En este trabajo se han puesto a punto tres métodos para separar la fracción microsomal, comparandose su exactitud, dispersión y sencillez. Estos métodos han sido: centrifugación, ultracentrifugación y precipitación con cloruro de calcio.

Material:

- Fosfato dihidrógeno potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck ref. 4873).
- Fosfato monohidrógeno dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck ref.5099).
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck ref. 4936)
- Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'2-etanosulfónico (HEPES) (Sigma ref. H-3375).
- Sacarosa (Sigma ref. S-9378).

Métodos:

2.3.3.1.- Centrifugación.-

Se tomó 1 g, aproximadamente, de hígado conservado a  $-20^\circ\text{C}$  que fue homogeneizado (homogeneizador Anderman y Co. L.T.D., London) con 5 ml de tampón fosfatos 0.2 M a pH 7.4 y 1.15 % de cloruro potásico (KCl). El homogeneizado se centrifugó a 1.000 g en una centrífuga Beckman, mod. TJ-21 durante 5 min y posteriormente a 10.000 g durante 15 min. Se recoge el sobrenadante que se utiliza directamente, para determinar la actividad enzimática. Todo el proceso se realizó entre 0 y  $4^\circ\text{C}$ .

#### 2.3.3.2.- Ultracentrifugación.-

Se homogeneiza el hígado, 1 g, con 5 ml de tampón fosfatos 0.2 M, pH 7.4 con HEPES 0.02 M y sacarosa 0.25 M, que mantiene la hipertonicidad de la solución con lo que se impide la rotura de los liposomas. El homogeneizado se centrifuga a 1.000 g durante 5 min y posteriormente, a 10.000 g durante 10 min. Separamos el sobrenadante postmitocondrial y se ultracentrifuga a 105.000 g durante 60 min en una centrifuga Beckman L5-65B, rotor Ty-40. Se recoge el precipitado de microsomas y se redisuelve en tampón fosfatos 0.02 M, pH 7.4 y 1.15 % de KCl, en la proporción de 1 ml de tampón por cada 0.25 g de hígado inicial. Todo el proceso se realizó por debajo de 4°C.

#### 2.3.3.3.- Precipitación con cloruro de calcio.-

Este es el método puesto a punto por KAMATH y col. (1971) y que KUPFER y LEVIN (1972) aplicaron al aislamiento microsomal, previo a la determinación de actividades enzimáticas del sistema del cit.P-450.

Se homogeneiza, como en los casos anteriores, 1 g de hígado con 5 ml de tampón fosfatos 0.2 M, pH 7.4 con sacarosa 0.25 M y cloruro de calcio 0.008 M. El homogeneizado se centrifuga a 1.000 g durante 5 min, con lo que preci-

pitan los núcleos y fragmentos de las membranas. Posteriormente se centrifuga a 10.000 g durante 10 min, para precipitar las mitocondrias y el sobrenadante se recoge y se le adiciona en la proporción 1:6 una solución de cloruro de calcio hasta llegar a la concentración de 0.008 M, y 0.0125 M de sacarosa. El conjunto se centrifuga a 10.000 g durante 10 min, con lo que precipitarán los microsomas, al unirse al calcio, separandose de los enzimas solubles que quedan en el sobrenadante. Se redisuelve el precipitado microsomal con 4 ml de tampón fosfatos 0.2 M, pH 7.4 y 1.15 % de KCl, con lo que en la solución microsomal se pueden determinar las distintas actividades enzimáticas. Todo el proceso se realizó por debajo de 4°C.

ULTRACENTRIFUGACION

PRECIPITACION CON CLORURO DE CALCIO

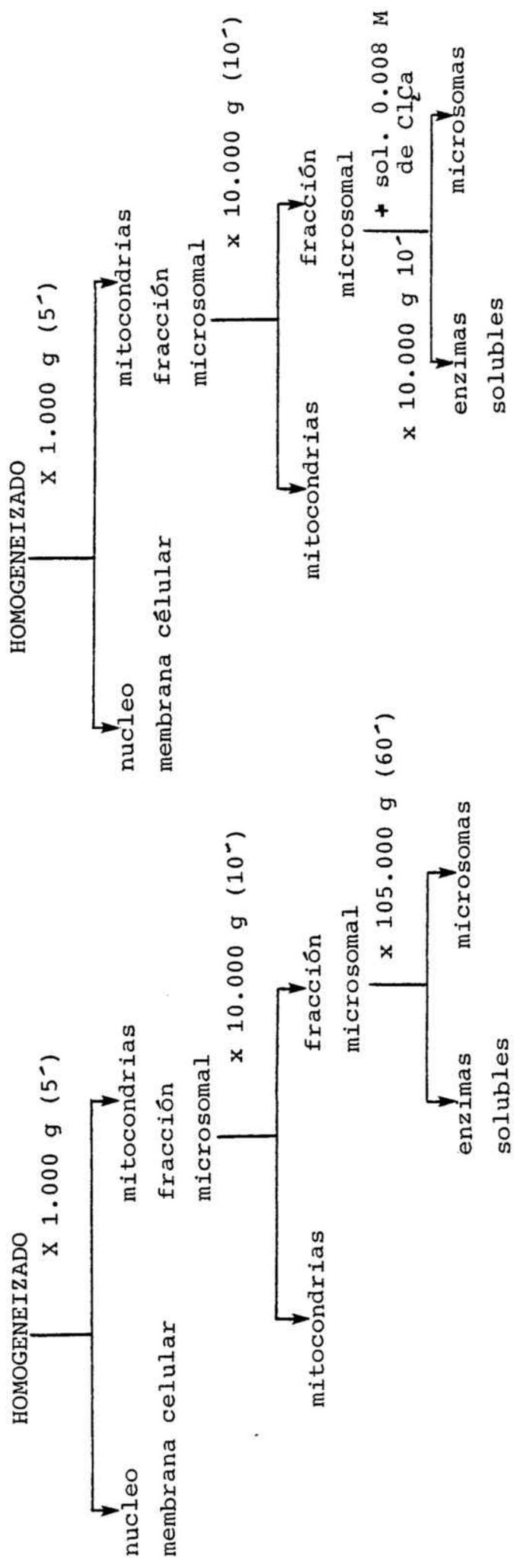
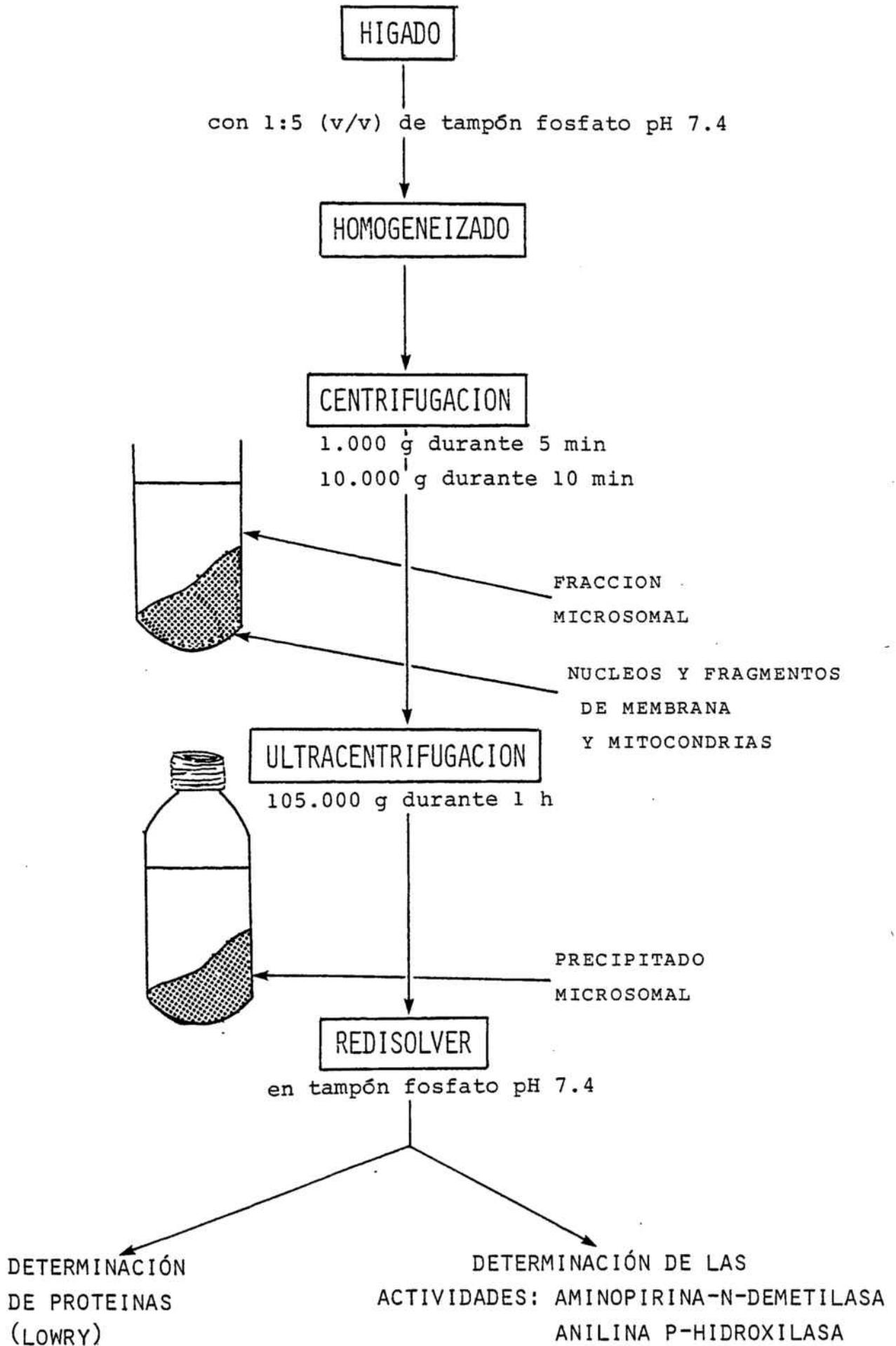


Figura 22: Esquema comparativo de los pasos seguidos en el aislamiento microosomal por las técnicas de precipitación con cloruro de calcio y ultracentrifugación.

Figura 23: Proceso seguido para el aislamiento microsomal.



2.3.4.- Determinación de proteínas en la fracción microsomal.-

Se ha seguido el método seguido por LOWRY (1951).

Fundamento: Folin y Denis encontraron que un reactivo con ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico da un color azul con sustancias conteniendo grupos fenólicos. Folin y Ciocalteu modificaron el reactivo al sustituir las sales sódicas por sales de litio, que no producían turbidez. LOWRY y col. (1951) descubrieron que el pretratamiento de la solución de proteínas, con una solución alcalina conteniendo cobre, incrementaba la sensibilidad del reactivo. El color obtenido en la reacción es producto del resultado de la reducción del ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico a tungsteno (azul) y molibdico (azul), por el complejo Cu-proteína y por el triptófano y la tirosina.

Reactivos:

- Reactivo A: solución al 2 % de carbonato sódico en hidróxido sódico 0.1N.
- Reactivo B: 100 ml del reactivo A con 2 ml de solución de sulfato cúprico al 0.5 % y 2 ml de una solución de tartrato sódico potásico al 1 %.
- Reactivo C: reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck ref. 9.001), diluido a la mitad.

- Albúmina bovina (Metrix, Arnou pharmaceutical Co., Chicago).

Método: Al redissolver el precipitado microsomal en el aislamiento microsomal, una pequeña alícuota se conserva en nevera a 4 °C hasta la determinación de las proteínas uno o dos días después.

Se toman 0.1 ml de la solución de proteínas microsomales y se lleva hasta 2 ml con agua destilada, se agita y se toman 0.3 ml de esta dilución a los que se añaden 1.5 ml del reactivo B, se agita y deja reposar 10 min. Finalmente, se adicionan 0.15 ml del reactivo C agitando nuevamente y preservando las muestras de la luz durante 40 min, pasados los cuales, se lee la absorbancia en un espectrofotómetro (Espectronic-100), a 715 nm, y frente a un blanco.

Paralelamente se realiza una curva estándar partiendo de una solución de albúmina bovina (1 mg/1 ml). De esta solución se realizan diluciones sucesivas hasta obtener soluciones estándar de 0.05, 0.1, 0.25, 0.375 y 0.5 µg de proteína/ml.

Expresión de los resultados: Los resultados se expresaron en mg de proteína/ml de solución microsomal.

En la Figura 24 se expone la curva media de calibración obtenida por nosotros, a partir de 18 curvas diferentes, Los coeficientes de correlación han oscilado entre  $0.9872 < r < 0.9999$  ( $p < 0.05$ ).

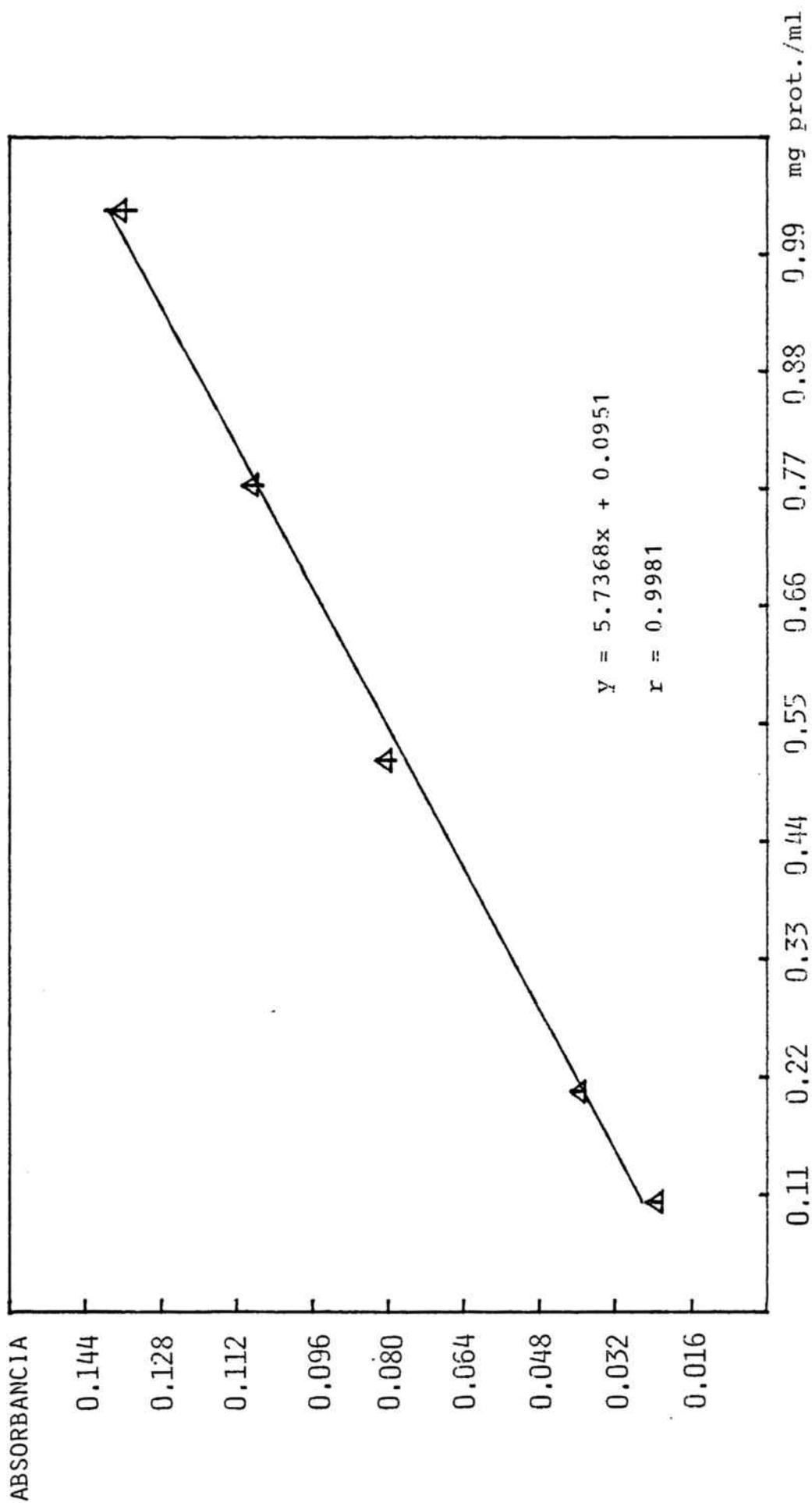


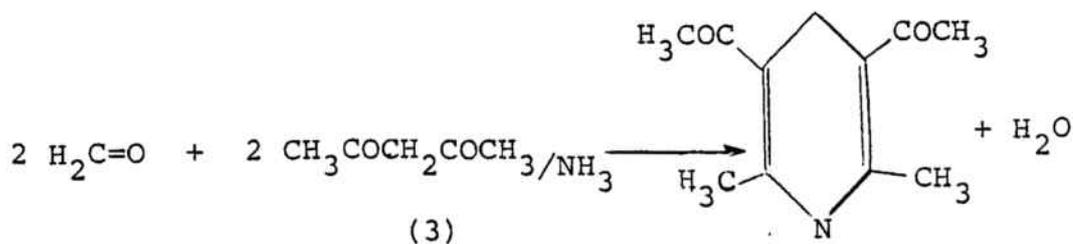
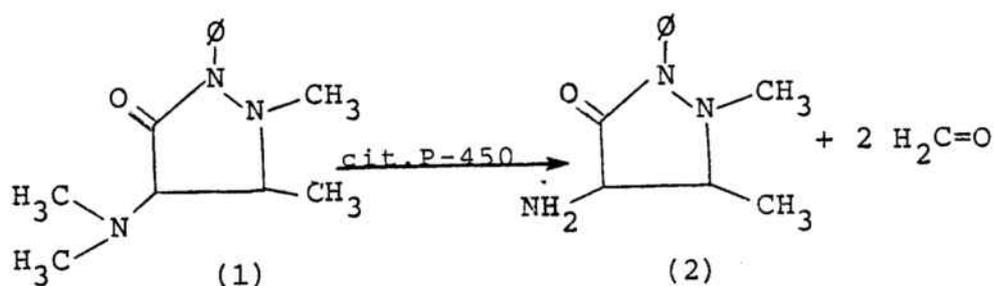
FIGURA 24: Curva de calibración para la determinación de proteínas microsomales.

2.3.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL  
CITOCROMO P-450.-

Para determinar la actividad metabolizadora de fármacos del cit.P-450 hemos determinado su actividad frente a la aminopirina, una N-demetilación y frente a la anilina, una hidroxilación.

2.3.5.1.- Actividad aminopirina N-demetilasa.-

Fundamento: El método se basa en la capacidad del cit.P-450 en biotransformar, por demetilación, la 4-di-<sup>(1)</sup>metilaminoantipirina a aminoantipirina <sup>(2)</sup> y formol. La cantidad de formol producido es proporcional a la actividad del citocromo, que se determina acoplando una reacción colorimétrica, como la reacción de NASH <sup>(3)</sup> (1953), que cuantifique el formol liberado durante la oxidación del fármaco.



(λ<sub>máx.</sub> a 415 nm)

Material:

- Aminopirina (Sigma ref. D-8015)
- Cloruro de magnesio (Merck ref.5833)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Merck ref. 49280).
- Nicotinamida (Merck ref.6818).
- Nicotinamida adenin-dinucleotido-trifosfato (NADP)  
(Merk ref.24541).
- Reactivo de Nash (30 g de acetato de amonio y 0.4 ml de acetilacetona en agua destilada hasta 100 ml).
- Sal disódica de glucosa-6-fosfato (Merck ref.49280).
- Semicarbazida (Merck ref.7722).

Método: Se usan erlenmeyers de 25 ml como recipiente para el medio de incubación. Dichos medios consistían en: 0.9 ml de tampón fosfato 0.2 M, pH 7.4 y 1.15 % de KCl; 0.2 ml de solución de cloruro de magnesio 0.3 M; 0.1 ml de solución de semicarbazida 0.5 M (que secuestra el formol que se produce durante la reacción e impide se pierda); 0.2 ml de solución de nicotinamida 0.5 M; 0.3 ml de solución de NADP 0.005 M; 0.2 ml de solución de glucosa-6-fosfato 0.15 M y 5 U.I. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para cada muestra. Se introduce el medio de incubación en estufa (Selecta mod. 207) en atmósfera de aire a 37°C durante 5 min para que se active el sistema generador de NADP ( al actuar la deshidrogenasa sobre la glucosa-6-fosfato). La reacción se inicia al añadir 0.1 ml de aminopirina 0.1 M, (el sustrato). Después de incubar las muestras durante 30 min a 37°C, la reacción

se detiene al adicionar 2 ml de sulfato de zinc al 15 % seguidos de 2 ml de solución saturada de hidróxido de bario a cada muestra, con lo que precipitan las proteínas.

Se centrifuga durante 10 min a 1000 g para separar las proteínas precipitadas. Se recogen 5 ml del sobrenadante y se le suma 2 ml del reactivo de Nash, recién preparado, y después de agitar se lleva a baño a 60 °C durante 30 min. El color producido durante la incubación se lee a 415 nm.

La absorbancia obtenida se comparó con una curva estándar interna realizada siguiendo el mismo proceso que con las muestras problema pero sustituyendo los cofactores, a excepción de la semicarbazida, por tampón fosfato pH 7.4 y la solución de sustrato por soluciones con 1.816, 0.908, 0.454, 0.227 y 0.1125  $\mu$ M de formol. En la fig.24 se expone la curva de calibración media obtenida por nosotros, junto a la desviación estándar, que informa sobre su variabilidad. Los coeficientes de correlación han oscilado entre  $0.9852 < r < 0.9996$  ( $P < 0.05$ ).

En la fig.25 se representa la curva de calibración obtenida por el método de calibración externa, que consiste en determinar por el método de Nash, la absorbancia de las concentraciones de formol usadas en la curva anterior. Con este método se despreña el formol que se pierde durante la incubación. En la fig.25 se representa la curva de ca-

libración externa media obtenida por nosotros, a partir de dos curvas distintas. Los coeficientes de correlación han sido de 0.9999 ( $p < 0.05$ ). En la Figura 26 se representa la curva media de calibración interna que hemos obtenido a partir de 15 curvas diferentes. Los coeficientes de correlación han oscilado entre  $0.9852 < r < 0.9996$ . Esta es la curva que hemos empleado en nuestras determinaciones de la actividad aminopirina N-demetilasa.

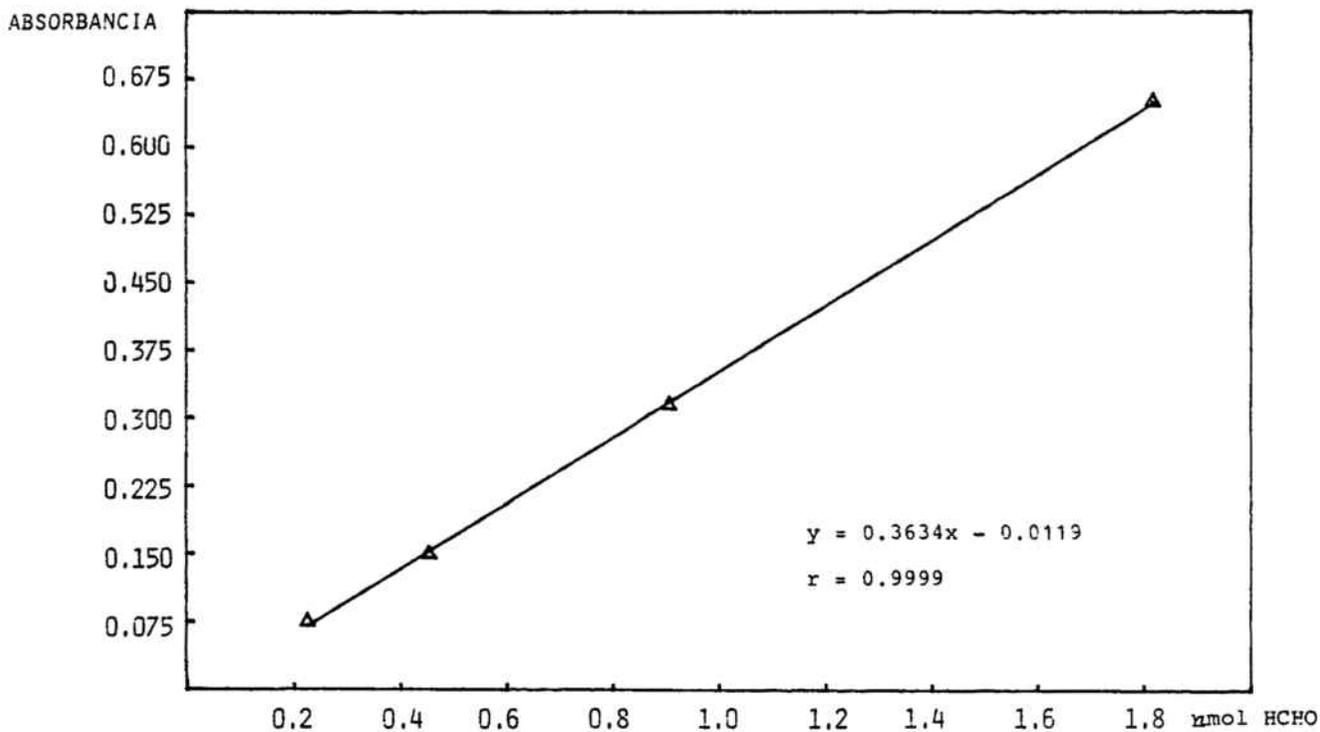


FIGURA 25: Curva de calibración externa de la actividad aminopirina N-demetilasa.

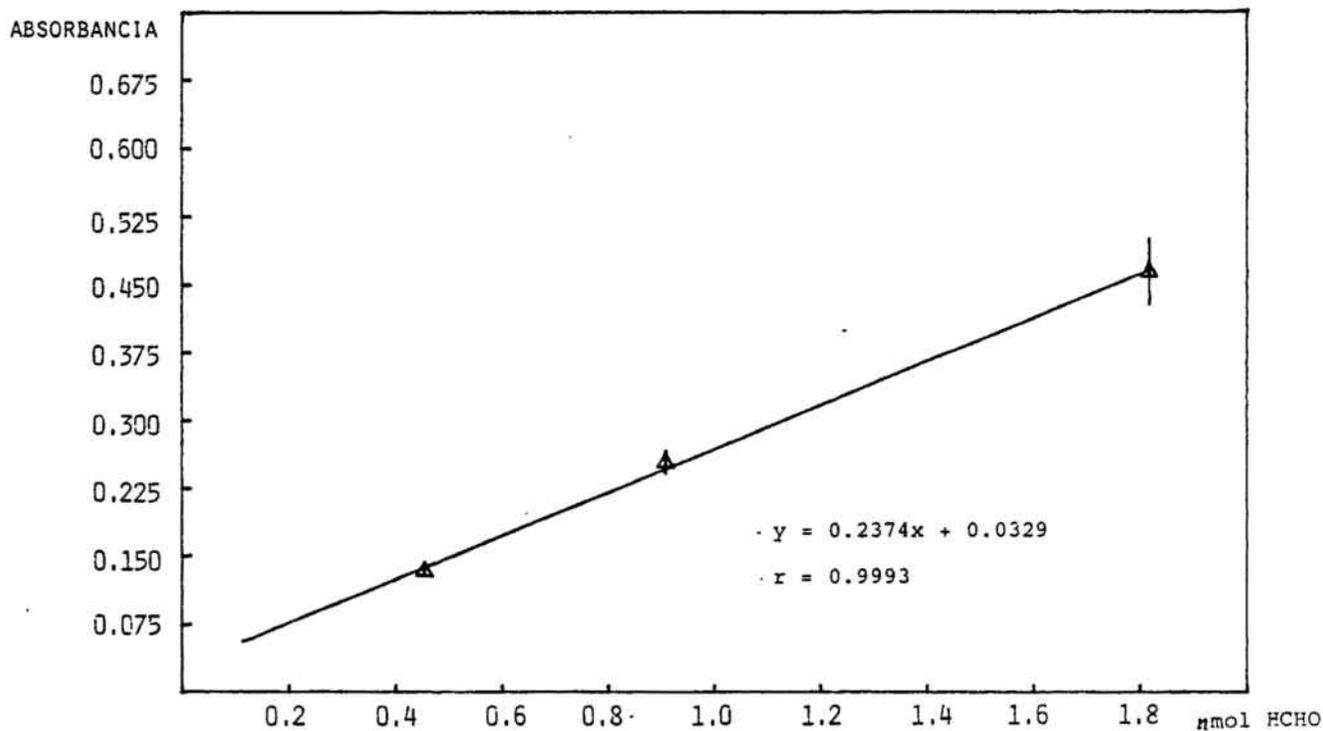
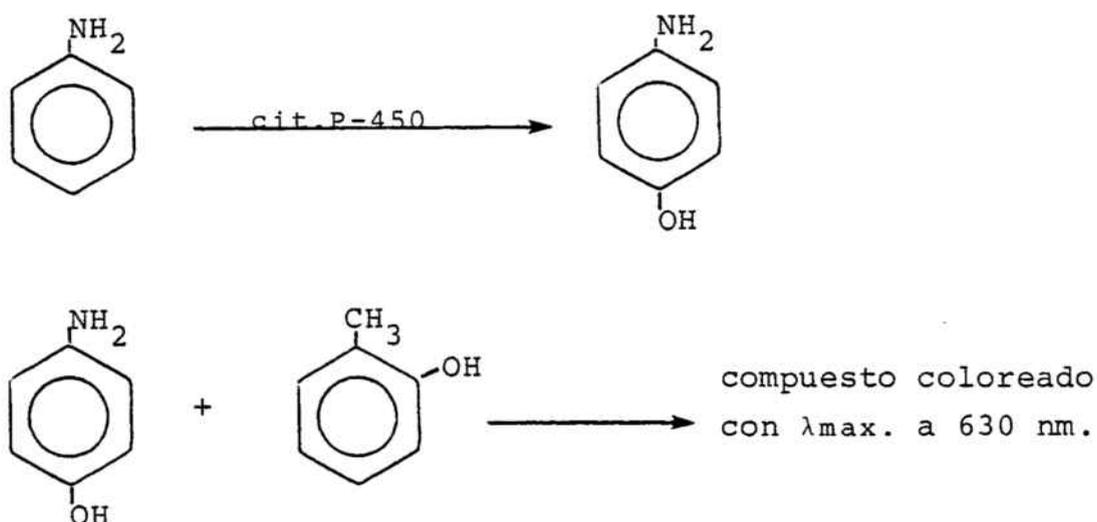


FIGURA 26: Curva de calibración interna de la actividad aminopirina N-demetilasa.

### 2.3.5.2.- Actividad anilina p-hidroxilasa.-

Fundamento: La medida de la actividad metabolizadora del cit.P-450 se basa en la determinación de la cantidad de anilina (sustrato de la reacción) que es metabolizada por la fracción microsomal, previamente aislada, a p-amino fenol . La cantidad de p-amino fenol se cuantifica a través de el método de MATHUR y col. (1976).



Material: Además de el material que ya se reseño en la anterior técnica se utilizó en ésta:

- Anilina (Merck ref.1261).
- Cloruro de sodio (Carlo Erba ref.479687).
- Eter (Merck ref.923)
- o-cresol (Merck ref.809692).
- p-amino fenol (Merck ref.800421).

Método: El medio de incubación está formado por: 1 ml de tampón fosfato 0.2 M, pH 7.4; 0.3 ml de NADPH 0.005 M; 0.2 ml de glucosa-6-fosfato 0.1 M; 0.2 ml de nicotinamida 0.5 M; 0.2 ml de cloruro de magnesio 0.3 M; 5 U.I. de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y 3 ml de solución de la fracción microsomal, en cada muestra, que se depositaron en matraces de 100 ml. Se llevaron a un baño a 37 °C durante 5 min para activar el sistema generador de NADP. La reacción se inició al añadir el sustrato, 0.1 ml de solución de anilina 0.1 M.

Después de incubar las muestras durante 30 min a 37 °C, la reacción se paro al añadir 2 g de cloruro sódico y 40 ml de éter en cada muestra. Agitamos fuertemente durante 10 min y separamos alrededor de 30 ml de la fase etérea, a la que se adiciona 6 ml de una solución de o-cresol, recién preparada, al 1 %. Se agita en embudo de decantación y se elimina la fase etérea.

Al final se lee la absorbancia de la solución coloreada obtenida en un espectrofotómetro a 630 nm.

Se realizaron curvas de calibrage interno y externo. La curva de calibrage externo consistia en adicionar 6 ml de la solución de o-cresol a 5 ml de soluciones con 0.3665, 0.096 y 0.0028  $\mu$ M de p-amino fenol.

La curva de calibrage interno se realiza con las mismas soluciones que en la curva anterior a las que se añadió 3 ml de agua destilada en vez de la solución microso-

mal (ya que decaída al p-amino fenol) y 1,9 ml de tampón fosfato en lugar de los cofactores y se siguió una pauta paralela a la de las muestras problema.

En la Figura 27 representa la curva de calibración externa, media de tres curvas distintas. Los coeficientes de correlación han oscilado entre  $0.9991 < r < 0.9999$  ( $p < 0.05$ ). En la Figura 28 se representa la curva de calibración interna media, obtenida a partir de cinco diferentes curvas. Los coeficientes de correlación han oscilado entre  $0.9942 < r < 0.9997$  ( $p < 0.05$ ). Esta es la curva que hemos usado en la calibración de la actividad anilina p-hidroxilasa.

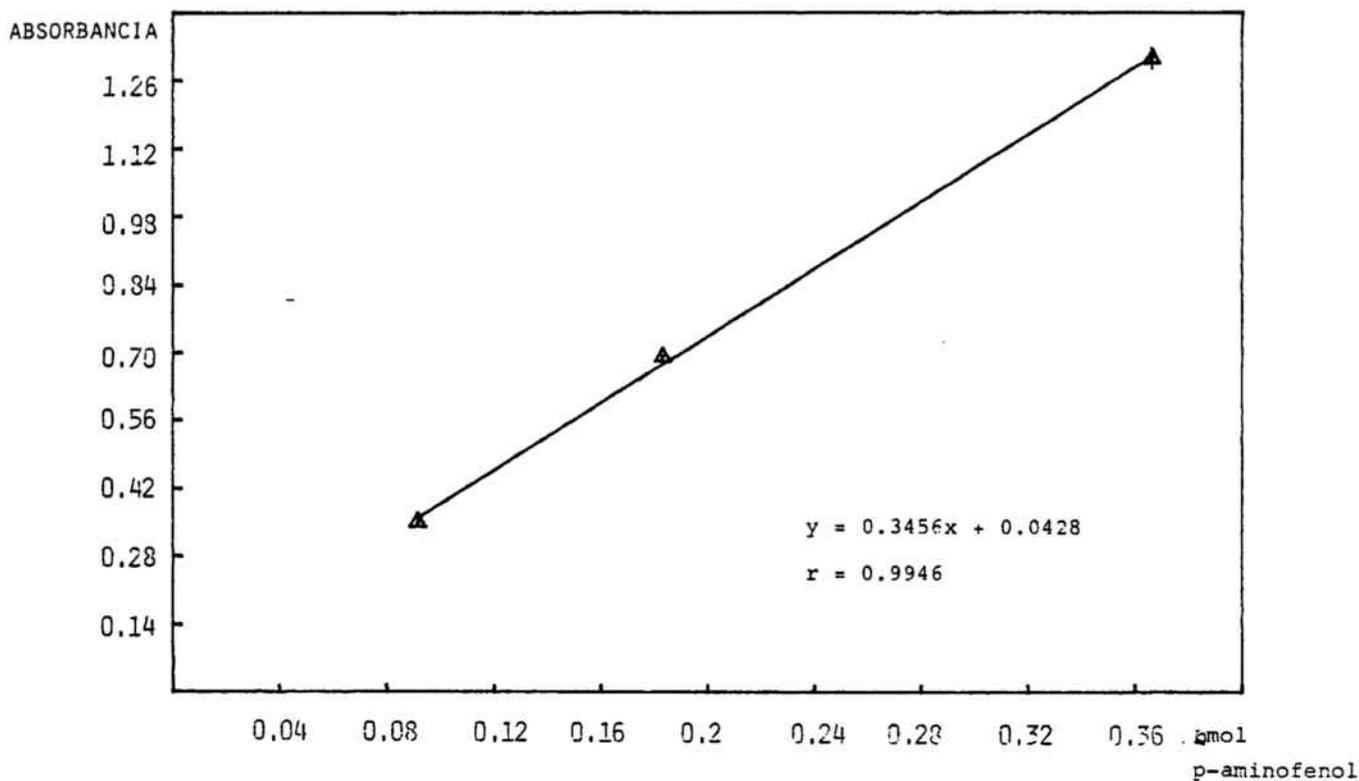


FIGURA 27: Curva de calibración externa de la actividad anilina p-hidroxilasa.

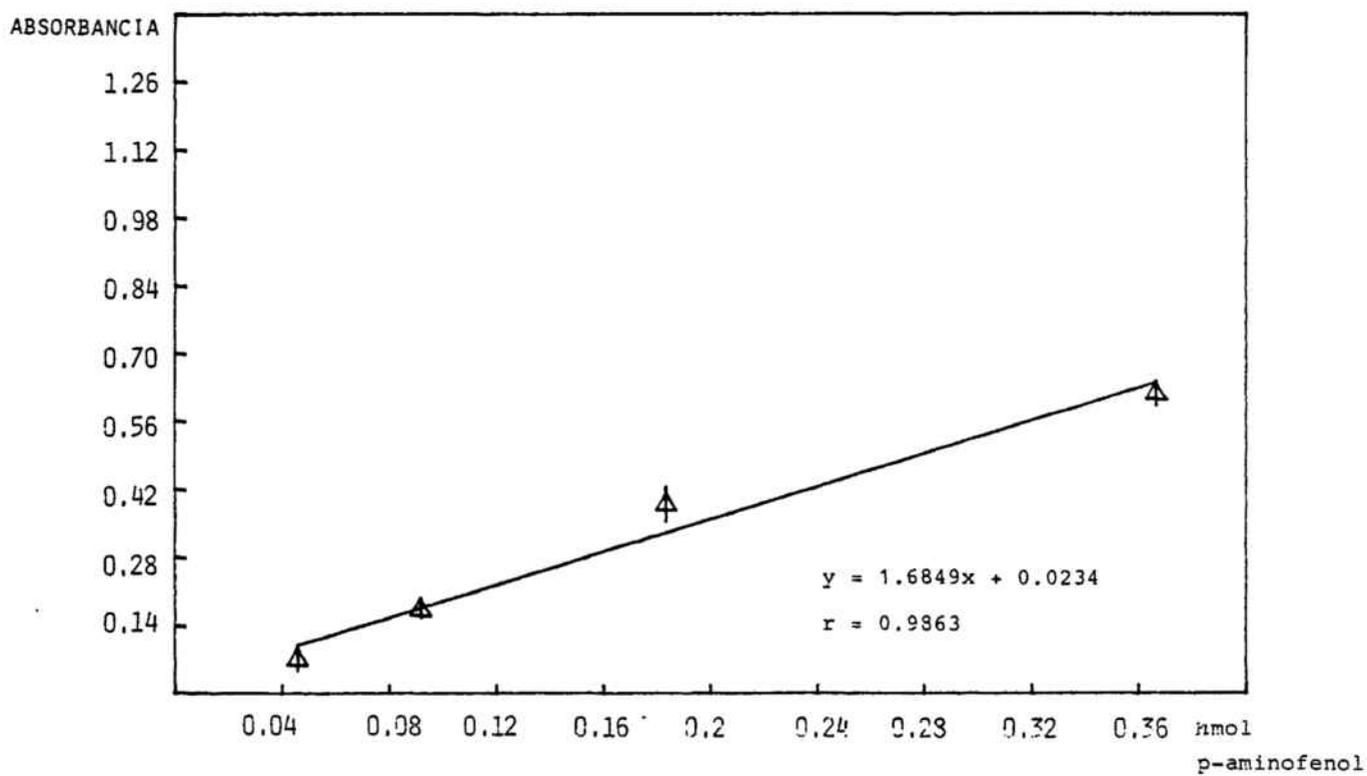


FIGURA 28: Curva de calibración interna de la actividad anilina p-hidroxilasa.

## 2.4.- PAUTAS EXPERIMENTALES.-

### 2.4.1.- PAUTA EXPERIMENTAL A

Todas las ratas Sprague-Dawley eran hembras de 190 a 250 g.

Se distribuyeron en los siguientes lotes:

- Lote I- Animales control. Administrados por vía oral con 10 ml/kg/día de una solución de carboximetilcelulosa 0.1 % (excipiente). El número total de animales fue de 24 (en 3 lotes de 8 animales).

- Lote II- Animales artríticos. Administrados por vía oral con 10 ml/kg/día del excipiente al igual que el lote anterior. El número de animales utilizados fue de 30 (distribuidos en lotes de 10 animales).

- Lote III- Animales artríticos sometidos a tratamiento farmacológico con indometacina, 1 mg/kg/día en un volumen correspondiente a 10 ml/kg. El número de animales empleados fue de 30 (en lotes de 10 animales cada uno).

Los animales de los tres lotes fueron sacrificados semanalmente, los días 14, 21 y 28. Se determinó el peso de hígado y se tomaron muestras de sangre y de hígado que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

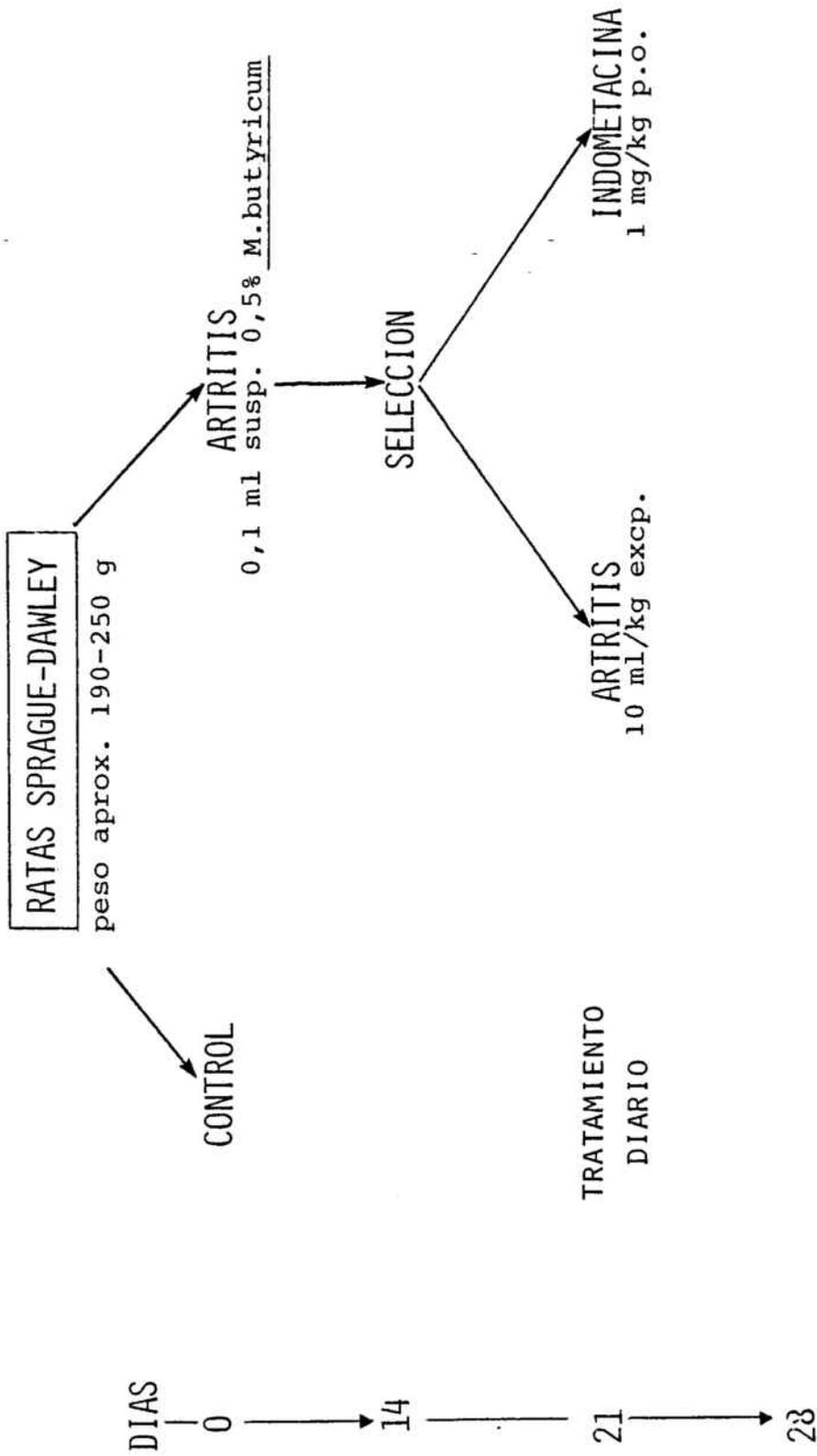


Figura 29: Diseño experimental.

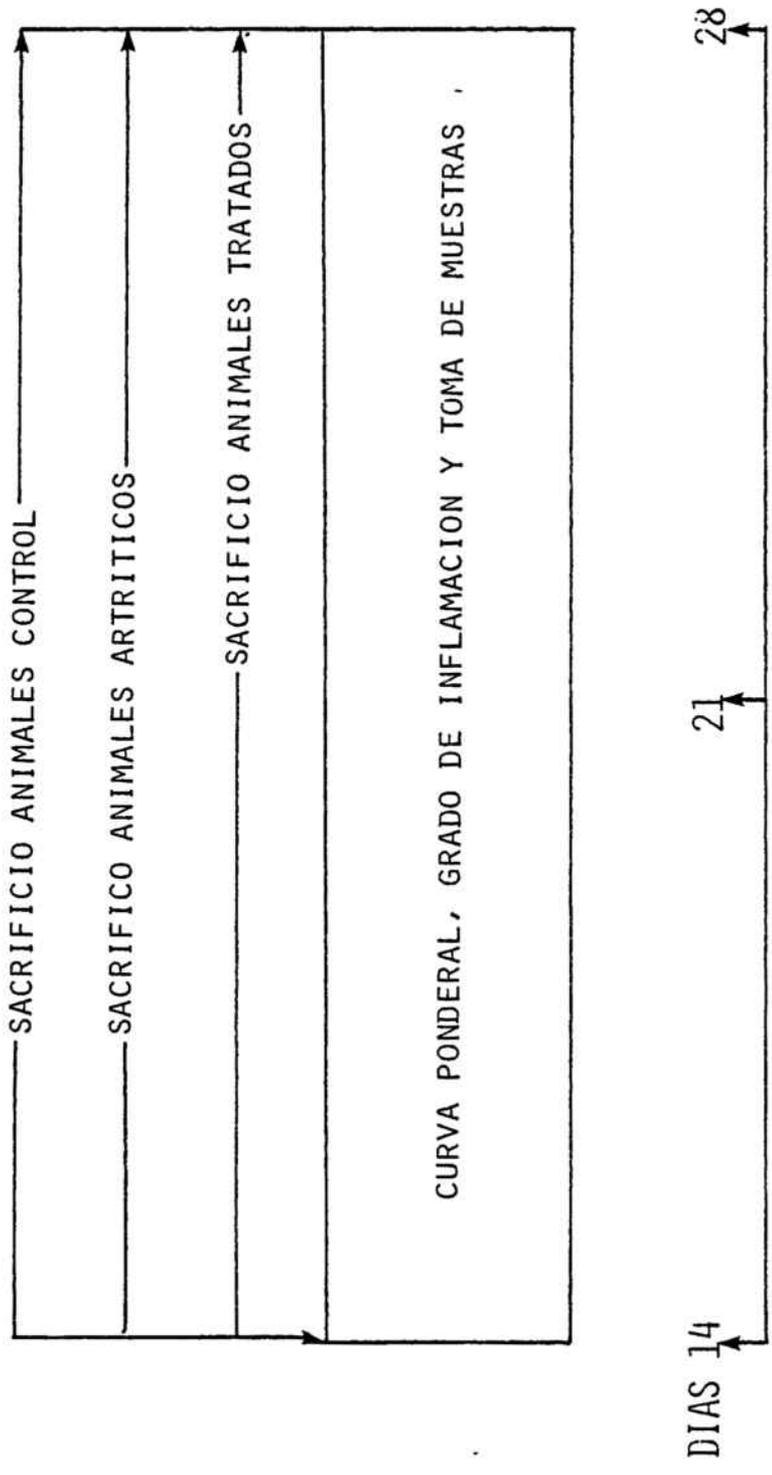


Figura 30: Diseño experimental (continuación).

#### 2.4.2.- PAUTA EXPERIMENTAL B

En esta serie intentamos observar cual es el efecto de la indometacina "perose" sobre la síntesis de proteínas plasmáticas y la actividad metabolizadora de drogas del cit.P-450. Para ello usamos ratas hembras de 100-190 g y 1.5 meses de edad que distribuimos de la siguiente forma:

- Lote I- Animales control. Se les administramos el excipiente (C.M.C. y Tween) 10 ml/kg/día. El número de animales fue de 9 , distribuidos en lotes de 3.

- Lote II- Animales tratados con indometacina. Se les administró vía oral la indometacina a dosis de 1 mg/kg/día en un volumen correspondiente a 10 ml/kg. El número total de animales empleados fue de 15, en lotes de 5 cada uno.

Los animales control y tratados fueron sacrificados los días 21, 28 y 33, (7, 14 y 19 días de tratamiento). Se siguió su evolución de peso y se observó si había alguna alteración en la ingesta consumida. Determinamos el peso del hígado que extraíamos rápidamente y congelabamos para el posterior analisis de la actividad del cit.P-450. También se extrajo sangre para el análisis de las proteínas séricas.

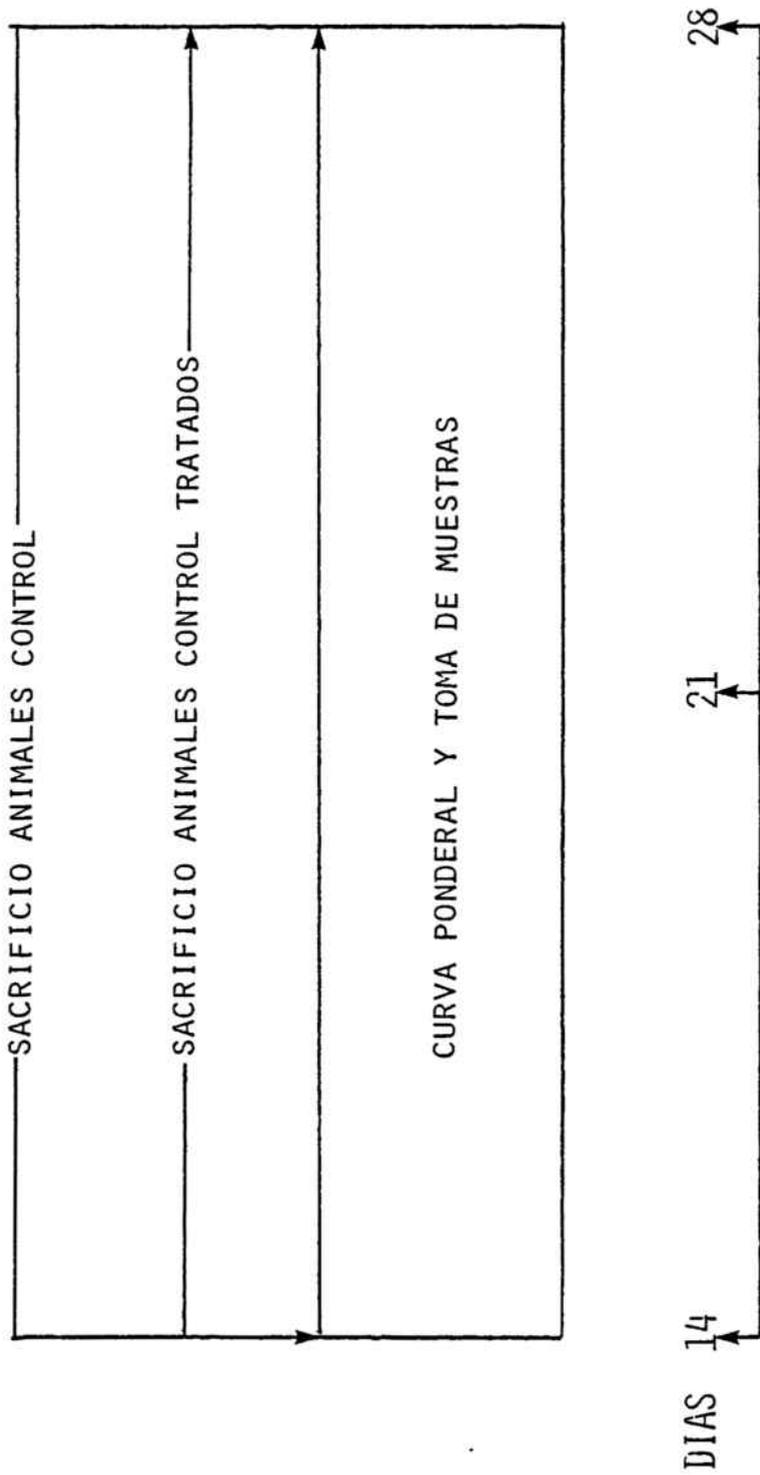


Figura 31: Diseño experimental.

### 2.3.- CRITERIOS ESTADISTICOS APLICADOS.-

#### 2.3.1.- INDICES DEL GRADO DE DISPERSION.-

Como índices del grado de dispersión de los resultados experimentales, se ha utilizado la desviación estándar, efectuando la corrección de SHERPARD si el número de valores observados era inferior a diez y el error estándar del valor medio.

De los valores medios obtenidos se han establecido sus límites fiduciales, admitiendo un riesgo de error del 5 %, en aquellas poblaciones de distribución normal. El cálculo de los límites de confianza del valor medio observado se ha realizado en función del tamaño de la muestra: si  $N > 30$ , viene definido por  $m \pm \epsilon t$ .

Paralelamente se ha realizado el cálculo de los límites para un sujeto,  $m \pm 1.96 s$ , intervalo que concierne a un individuo y que permite detectar los estados patológicos.

#### 2.3.2.- CORRELACION Y REGRESION.-

Se han efectuado estudios de la relación o dependencia entre dos variables cuantitativas, basadas en el cálculo de un índice "r".

### 2.3.3.- PRUEBA DE COMPARACION DE DOS GRUPOS.-

Para el análisis de la posible significación de la diferencia entre dos medias es preciso que las distribuciones de los conjuntos, de donde proceden las medias sean normales o logarítmico-normales y por otra, que ambos grupos tengan la misma varianza. Debe considerarse, asimismo, cuando  $N > 30$ , cuya comparación se efectúa con la ayuda del valor tabulado  $z$ , a partir de la ecuación de la curva normal reducida para el valor aceptado de  $\alpha$ . Si  $N > 30$ , el valor "t" de Student hallado, teniendo en cuenta el riesgo consentido y los grados de libertad, se compara con el valor de "t" tabulado según la ley de Student-Fisher. En todos los casos el riesgo  $\alpha$  aceptado a side igual a 0.05.

Conviene puntualizar que si se observa una diferencia significativa entre dos medias, aun cuando el número de casos sea reducido, este dato tiene valor absoluto, de manera que, en otras condiciones experimentales se podrá, como máximo, elevar al grado de significación, pero nunca se observa una ausencia de significación.

### 2.3.4.- CALCULO ESTADISTICO.-

El cálculo estadístico se ha efectuado con la ayuda de un programador ATAI0 COMPUCORD 327 Scientist y un computador TEKTRONIK 4051, provisto de "interactive di-

gital plotter" Tektronik 4662, "hard copy unit" Tektronik 4631 y salida impresa de datos Tektronik 4641-1. Asimismo se ha utilizado un computador SHARP MZ-80B, provisto de "floppy disk" Sharp MZ-80B y salida impresa de datos Sharp MZ-80P5.

## 2.6.- RESULTADOS.-

### 2.6.1.- SERIE EXPERIMENTAL A.-

En esta serie experimental se ha utilizado un total de 84 ratas, de las que 24 constituyen el grupo control y al resto les fue inducida la poliartrítis. Al cabo de 14 días se seleccionaron de acuerdo con el criterio anteriormente establecido (ver aptdo. 2.2.3.).

En esta serie el incremento medio de la extremidad contralateral de los animales control resultó ser de  $0.34 + 0.16$  (m + s). En el 89 % de los animales a los que se indujo la artrítis, el incremento de la extremidad contralateral superó el límite establecido en  $0.66$  ml ( $0.34 + 2 \times 0.16$ ) (m + 2s), considerándose dichos animales con una inflamación sistémica óptima para el estudio.

#### 2.6.1.1.- Curva ponderal.-

En la Tabla VIII se indica el valor medio y los índices del grado de dispersión obtenidos en los animales control, artríticos y artríticos tratados con indometacina, los días 0, 14, 21 y 28. En la Figura 32 se muestra gráficamente la evolución del peso corporal de los

diferentes grupos y se señalan las diferencias estadísticas significativas encontradas.

Como se observa en la Figura 32, mientras que el peso de los animales control aumentó a lo largo de las semanas estudiadas, el peso de los animales artríticos descendió durante la artritis primaria (primeros 14 días) y posteriormente se mantuvo estacionario.

En el día 14 posterior a la inducción de la artritis, se observó diferencia significativa entre el lote control y lote de animales artríticos. El día 21 y 28 una y dos semanas de tratamiento, respectivamente, no se observa diferencia significativa entre estos grupos y las ratas artríticas no tratadas, manteniéndose la diferencia de estos lotes en relación al grupo control.

#### 2.6.1.2.- Inflamación local y sistémica.-

En las Tablas X y XI se indican los valores medios e índices del grado de dispersión, obtenidos de la extremidad ipsi y contralateral, respectivamente, en los diferentes grupos, expresados como incremento de volumen de las extremidades en los días 14, 21 y 28, respecto al volumen observado previa la inducción de la patología.

De modo gráfico, en la Figura 33 y 34 se observa el gran incremento de volumen de pata que presentan los ani-

males artríticos respecto a los animales control, debido a la inflamación, aumento significativamente superior en la extremidad ipsilateral con relación a la contralateral. En estas figuras además se señalan las diferencias significativas encontradas. Por lo que se refiere a la extremidad ipsilateral, es de señalar que los animales artríticos mantienen durante todo el proceso estudiado, diferencia significativa respecto al lote control, mientras que los animales bajo tratamiento con indometacina experimentan mejoría, en el sentido de que a la semana de tratamiento, se observa diferencia significativa con respecto al lote de artríticos, diferencia que se acentúa en la segunda semana de tratamiento sin llegar a alcanzar la normalidad.

En relación a la extremidad contralateral el proceso es similar en el lote de animales artríticos y con el tratamiento se produce una mejoría significativa ya en la primera semana de tratamiento y aumentando hasta llegar a una inhibición del 65 % de la inflamación en la segunda semana de tratamiento.

#### 2.6.1.3.- Evolución peso de hígado.-

En la Tabla XII se hallan los valores medios e índices de dispersión del peso de hígado. Se observa en las ratas artríticas un aumento significativo del peso del hígado respecto al peso total, que se representa en la Figura 35, no produciéndose la vuelta a los valores normales con el tratamiento farmacológico.

En las ratas control tratadas con indometacina no se observa variación del porcentaje de peso hepático.

#### 2.6.1.4.- Proteínas totales.-

En la Tabla XIV se indican los valores medios e índices del grado de dispersión de los niveles de proteínas séricas totales, obtenidos en los tres grupos de animales a lo largo del periodo estudiado. En relación a las comparaciones estadísticas efectuadas, no se ha observado diferencia significativa entre los diversos grupos, ni tampoco en ninguno de los días determinados.

#### 2.6.1.5.- Resultados obtenidos a partir del proteínograma.-

##### 2.6.1.5.1.- Albúmina.-

En la Tabla XVI se muestra el valor medio, la desviación y el error estándar de los porcentajes de la fracción albúmina, obtenidos en los animales control, artríticos y artríticos tratados con indometacina. Asimismo, en la Figura 37 se halla representada, en histogramas, la evolución de dichos valores a la vez que se detallan las comparaciones estadísticas efectuadas. Hay que señalar, que en los animales artríticos se produce una hipoalbuminemia estadísticamente significativa, respecto al grupo control, a lo largo de todo el proceso estudiado. En los

animales tratados con indometacina, a la semana de tratamiento (día 21) se observa una recuperación de los niveles, que aumenta con la segunda semana de tratamiento sin llegar a la normalidad, conservándose todavía diferencia significativa con respecto a las control.

Los animales control tratados con indometacina no sufrieron alteraciones significativas de la albuminemia.

#### 2.6.5.2.- Fracción de $\alpha$ -globulina.-

En la Tabla XVIII se muestran los valores medios e índices del grado de dispersión obtenidos en los diferentes grupos de animales, a lo largo del periodo estudiado.

Los animales artríticos, presentan, desde el día 14 una hiperalfa-globulinemia muy acentuada, estadísticamente significativa respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ), incremento que se mantiene durante todo el proceso estudiado.

En relación al grupo de animales tratados, éstos muestran una recuperación de sus valores, puesto que se observa diferencia significativa respecto a los animales artríticos sin tratamiento, a la segunda semana de tratamiento, sin llegar a recuperar totalmente los valores normales.

En la Tabla XIX se muestran los valores medios

e índices de dispersión entre un grupo control y otro de animales control administrados con indometacina (EXP-B), no observandose alteración de la alfa-globulinemia por la administración del fármaco.

#### 2.6.5.3.- Fracción de $\alpha_1$ -globulinas.-

En la Tabla XX se muestran los valores medios e índices del grado de dispersión obtenidos, a lo largo del periodo estudiado.

Los animales artríticos, presentan, desde el día 21, una hiperalfa<sub>1</sub>-globulinemia acentuada, estadísticamente significativa respecto al grupo control ( $p < 0.5$ ), incremento que se acentua cuando llegamos a el día 28 donde  $p < 0.01$  .

En los animales artríticos tratados no se ha observado normalización significativa de esta fracción.

En la Tabla XXI se muestran los valores medios e índices del grado de dispersión obtenidos al tratar con indometacina a animales control, observandose que el fármaco no afecta significativamente, por sí sólo, a los niveles de esta fracción.

#### 2.6.5.4.- Fracción de $\alpha_2$ - globulinas.-

En la Tabla XXII se muestran los valores medios e índices del grado de dispersión obtenidos, a lo lar-

go del periodo estudiado. Asimismo, en la Figura 38 se representa en forma de histogramas la evolución de esta fracción proteica y se incluyen las comparaciones estadísticas efectuadas ("t de Students").

Los animales artríticos presentan ya el día 14, unos niveles de alfa<sub>2</sub>-globulinas muy significativamente elevados respecto a los valores control, incremento que se mantiene durante todo el proceso estudiado.

En el grupo de animales artríticos tratados con indometacina, a la semana de tratamiento ya se observa una ligera recuperación, puesto que se observa diferencia significativa con respecto a los animales artríticos sin tratar. A la segunda semana de tratamiento se alcanzan los niveles del grupo control, mientras que en los animales artríticos todavía se mantiene sus niveles significativamente elevados. Esto se refleja en el alto tanto por ciento de inhibición de la indometacina sobre el elevado nivel de alfa<sub>2</sub>-globulinas durante la artritis que llega al 55 % después de la segunda semana de tratamiento.

La administración de indometacina a animales control ( ver Tabla XXIII) no produce ninguna alteración significativa de esta fracción proteica.

#### 2.6.5.5.- Fracción de $\beta$ -globulinas.-

En la Tabla XXIV se indican los valores medios, desviación y error estándar, de los valores de esta

fracción, obtenidos en los animales control, artríticos y artríticos tratados con indometacina. En la Figura 39 se representan gráficamente la evolución de dichos valores durante el periodo estudiado, y se apuntan las diferencias estadísticamente significativas observadas, en las que cabe señalar una hiperbeta-globulinemia marcada en los animales artríticos, significativamente estadística, no sólo inicialmente sino durante todo el proceso analizado, aunque esta alteración va disminuyendo ligeramente con el tiempo. En los animales artríticos tratados con indometacina no se normalizan los valores.

En la Tabla XXV se indican los valores medios e índices de dispersión de los valores de esta fracción en animales control y control tratados con indometacina. El fármaco no altera los niveles séricos de esta fracción en animales sanos.

#### 2.6.5.6.- Fracción de $\gamma$ -globulinas.-

En la Tabla XXVI se indican los valores medios e índices de dispersión de los datos de gama-globulinas obtenidos en los diferentes grupos durante el proceso estudiado. Como se observa, la evolución de esta fracción proteica es inversa a la sufrida por las fracciones alfa y beta, es decir, los animales artríticos, poseen valores ligeramente inferiores a los animales control aunque no llegan a ser significativos. El tratamiento de

los animales artríticos con indometacina no produce alteración apreciable en la concentración de esta fracción.

Como vemos en la Tabla XXVII en el grupo de animales control tratados con indometacina aparece un aumento en los niveles de gama-globulinas que llega a ser significativo (  $p < 0.001$ ).

#### 2.6.5.7.- Cociente albúmina/globulina.-

Este cociente resume las alteraciones producidas en las fracciones de proteínas séricas. En la Tabla XXVIII se indican los valores y desviaciones y errores estándar de los diferentes grupos los días 14, 21 y 28 después de la inducción. En la Figura 36 se representan en histogramas las variaciones de este cociente durante en proceso estudiado y se señalan las diferencias significativas presentes.

Los animales artríticos, presentan, desde el día 14, un cociente muy significativamente disminuido, alteración que se mantendrá durante todo el proceso estudiado.

Los animales artríticos tratados presentan una recuperación del cociente que llega a ser significativa con respecto a los animales artríticos no tratados, y que se traduce en un 22 % de inhibición de la disminución del cociente albúmina/globulinas por la patología artrítica. A pesar de esta acción del tratamiento, los animales

tratados continúan manteniendo un cociente A/G inferior, estadísticamente significativo, con respecto al de los animales control.

En la Tabla XXIX se encuentran los valores medios e índices de dispersión de los animales control y animales control tratados con indometacina. No se observa ninguna alteración del cociente debido a la acción del fármaco.

2.6.6.- Resultados del estudio comparativo entre las tres técnicas de aislamiento microsomal utilizadas.

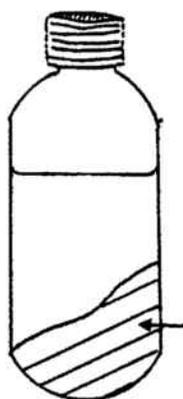
La Tabla XXX expone los los valores individuales, medios e índices de dispersión en el estudio llevado a cabo para escoger la técnica de aislamiento microsomal que más nos interese.

Estudiando los datos proporcionados por la Tabla XXX y la XXX (bis) que es una ampliación detallada de la Tabla XXX, observamos que la fracción microsomal aislada por centrifugación manifiesta una actividad aminopirina N-demetilasa por mg de proteína de dos a tres veces inferior a la observada siguiendo el método de ultracentrifugación o el de precipitación con cloruro de calcio. También se observa que los mg de proteína por ml de solución microsomal obtenidos por centrifugación son de cuatro a cinco veces superiores a los valores que se obtienen al aislar los microsomas por ultracentrifugación.

Si comparamos los métodos de ultracentrifugación con cloruro calcico se observa que la actividad enzimática por mg de proteína es muy similar, no siendo significativo el aumento presente al utilizar el método del cloruro cálcico. Aunque sus actividades referidas a mg de proteína son similares, por el método de recipitación se aíslan la mitad de las proteínas obtenidas por ultracentrifugación y la solución forma durante 30 min de incubación la mitad de los nM de HCHO que produce la incubación de la misma cantidad

forma durante 30 min de incubación la mitad de los nM de HCHO que produce la incubación de la misma cantidad de la solución microsomal obtenida por ultracentrifugación.

Al finalizar el método de ultracentrifugación se determino que tanto el precipitado microsomal resuspendido como el sobrenadante tienen actividad metabolizadora.



	<u>nM HCHO</u>	<u>mg prot.</u>	<u>nM HCHO</u>
	<u>3 ml sol. M.</u>	<u>3 ml sol. M.</u>	<u>30'</u>
			<u>mg prot. M.</u>
1-	376.4	17.30	21.757
2-	781.0	18.0	43.388
1-	541.9	34.4	15.752
2-	1112.0	41.28	26.937

En el sobrenadante se encuentra mayor actividad enzimática absoluta pero al referirla a mg de proteína su actividad desciende casi a la mitad con respecto a la que presenta el precipitado microsomal, ya que éste tiene mucha menor cantidad de proteínas.

2.6.7.- Resultados de las puestas a punto de las determinaciones de actividad enzimática.

Hemos realizado la curva de calibración interna y externa para las dos técnicas, en el caso de la aminopirina N-demetilasa (AND) son las figuras 25 y 26 y en la actividad anilina p-hidroxilasa (APH) corresponde a las Figuras 27 y 28. Hay que resaltar que la curva de calibración interna que es la que usamos, posee una pendiente un 30 % menor que la curva de calibración externo.

Asociada a la actividad enzimática hay una reacción colorimétrica que nos permite medir, facilmente, dicha actividad. Esta reacción colorimétrica se basa en la reacción del producto de la reacción de biotransformación microsomal con un reactivo, reactivo de Nash en el caso de la determinación de aminopirina N-demetilasa y solución de o-cresol en la determinación de la actividad anilina p-hidroxilasa.

nM HCHO	ABSORBANCIAS		
	curva interna R. Nash reciente	curva externa R. Nash reciente	curva externa R. Nash de día anterior a 4 °C.
1816.5	0.271	0.650	0.487
908.0	0.166	0.315	0.233
454.0	0.116	0.150	0.100
277.0	0.075	0.075	0.044

En la Tabla superior no sólo se observa la notable diferencia , ya mencionada, entre la curva interna y externa, sino que se observa la diferencia significativa al usar el reactivo de Nash recién preparado, frente a la misma determinación pero con el reactivo de Nash preparado el día anterior y guardado a 4°C.

#### 2.6.8.- Actividad aminopirina N-demetilasa.-

En la Tabla XXXI se indican los valores medios e índices del grado de dispersión de los diferentes grupos durante el periodo estudiado. En la Figura 40 se representa gráficamente la evolución de esta actividad hepática, observándose que los animales artríticos muestran actividades significativamente reducidas, en relación al grupo control, fe-

nómeno que se manifiesta durante todo el proceso estudiado aunque se observa una ligera mejoría de la actividad enzimática al ir restableciéndose la patología.

Los animales artríticos tratados con indometacina no modifican su actividad.

#### 2.6.9.- Actividad anilina p-hidroxilasa.

En la Tabla XXIII se indican los valores medios, desviación y error estándar de los diferentes lotes, los días 14, 21 y 28 después de la inducción. En la Figura 41 se representa gráficamente la variación de esta actividad, observándose que la patología artrítica produce una disminución altamente significativa de ésta actividad enzimática y que el tratamiento con la indometacina no produce el restablecimiento de ésta, reflejándose en un tanto por ciento de inhibición, de esta alteración, casi nulo.

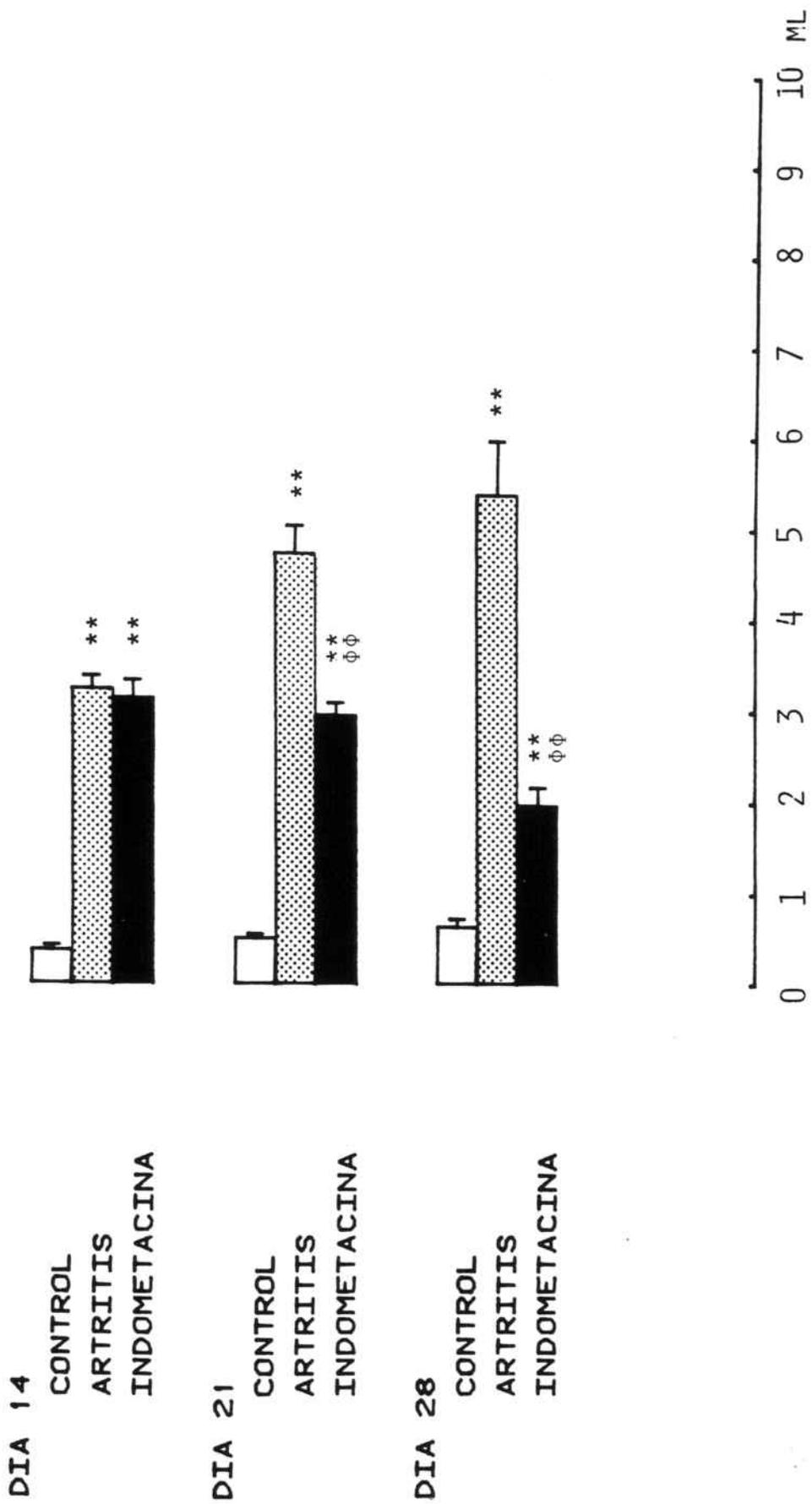
TABLA VIII (superior) y TABLA IX (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión del peso corporal, en los diferentes grupos, en el periodo estudiado en EXP-A y EXP-B respectivamente.

**PESO CORPORAL (g)**

	DIAS			
	0	14	21	28
<b>Control</b>				
m	236.208	245.125	257.687	266.500
s	30.607	29.719	24.110	33.949
e	6.248	6.066	6.028	12.003
N	24.000	24.000	16.000	8.000
<b>Artritis</b>				
m	208.900	193.774	186.950	190.200
s	32.374	41.215	23.733	27.026
e	5.911	7.525	5.307	8.546
N	30.000	30.000	20.000	10.000
<b>Indometacina</b>				
m	225.050	210.350	202.050	211.100
s	32.982	34.047	32.399	25.903
e	7.375	7.613	10.246	8.191
N	20.000	20.000	20.000	10.000

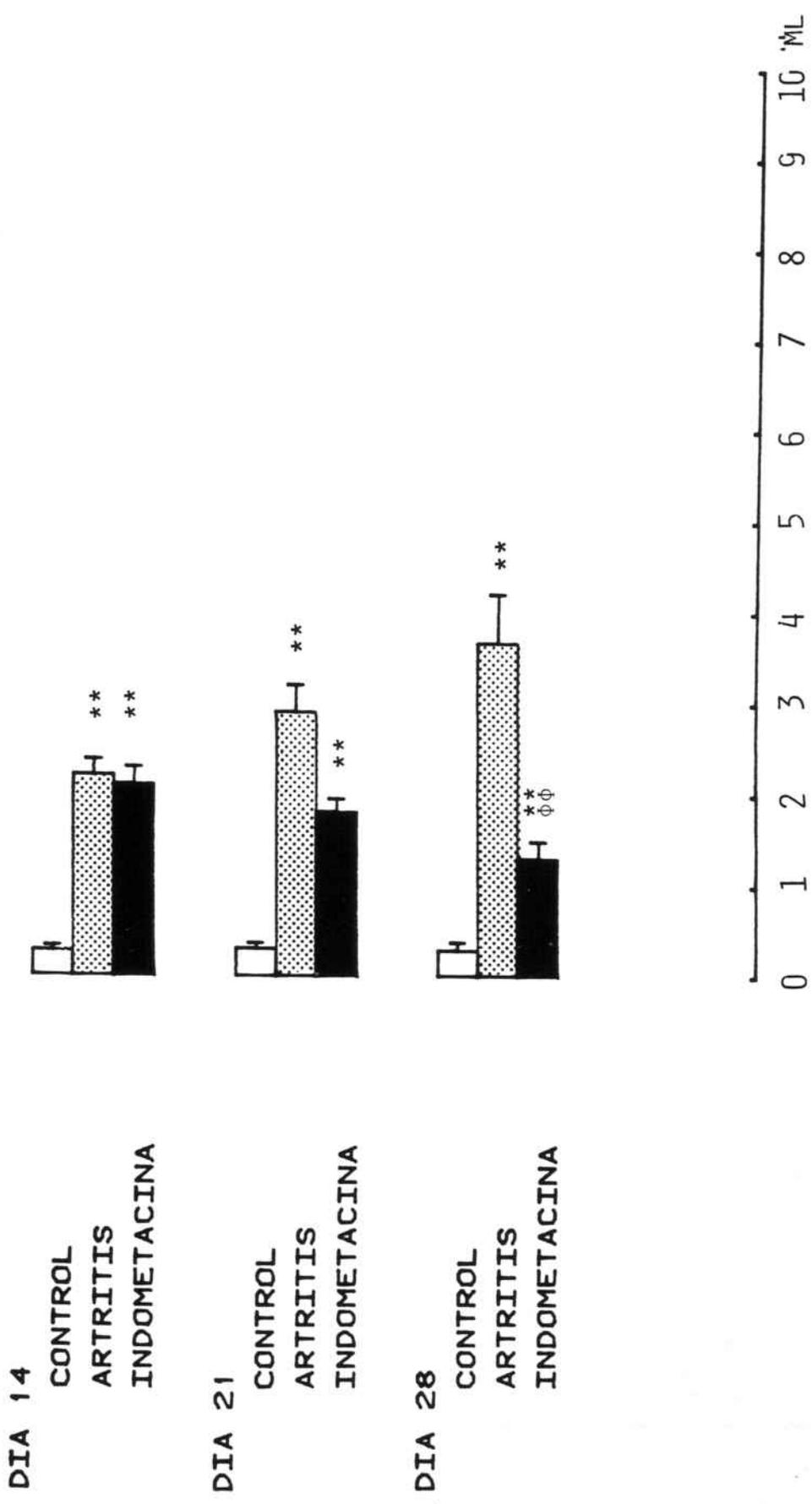
**PESO CORPORAL (g)**

	DIAS		
	21	28	33
<b>Control</b>			
m	140.7220	165.166	174.0000
s	21.3350	14.878	10.5630
e	2.3705	2.480	3.5276
N	9.0000	6.000	3.0000
<b>Control-Indometacina</b>			
m	146.4370	175.272	187.4000
s	23.4206	22.539	18.9550
e	1.4637	2.047	3.7910
N	16.0000	11.000	5.0000



**FIGURA 33:** Evolución del incremento de la extremidad ipsilateral.

\*\* P < 0.01 respecto al grupo control.  
 φφ P < 0.01 respecto al grupo artrítico.



**FIGURA 34:** Evolución del incremento de la extremidad contralateral.

\*\* P < 0.01 respecto al grupo control.  
 φφ P < 0.01 respecto al grupo artificial.

TABLA XII (superior) y TABLA XIII (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión del peso del hígado, expresado en % respecto al peso corporal, durante el EXP-A y el EXP-B.

**PESO DE HIGADO**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	2.8950	3.1530	3.0890
s	0.2310	0.4450	0.4240
e	0.0820	0.1580	0.1500
N	8.0000	8.0000	8.0000
<b>Artritis</b>			
m	3.0490	4.1020	3.9170
s	0.7740	0.6370	0.5400
e	0.2450	0.2080	0.1800
N	10.0000	10.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	4.2800	3.6800
s	-----	0.7300	0.6700
e	-----	0.2300	0.2100
N	-----	10.0000	10.0000

**PESO DE HIGADO**

	DIAS		
	21	28	33
<b>Control</b>			
m	3.4462	3.694	3.869
s	0.3557	0.402	0.434
e	0.2054	0.232	0.251
N	3.0000	3.000	3.000
<b>Control-Indometacina</b>			
m	3.1994	3.609	3.731
s	0.2649	0.611	0.501
e	0.1184	0.249	0.224
N	5.0000	6.000	5.000

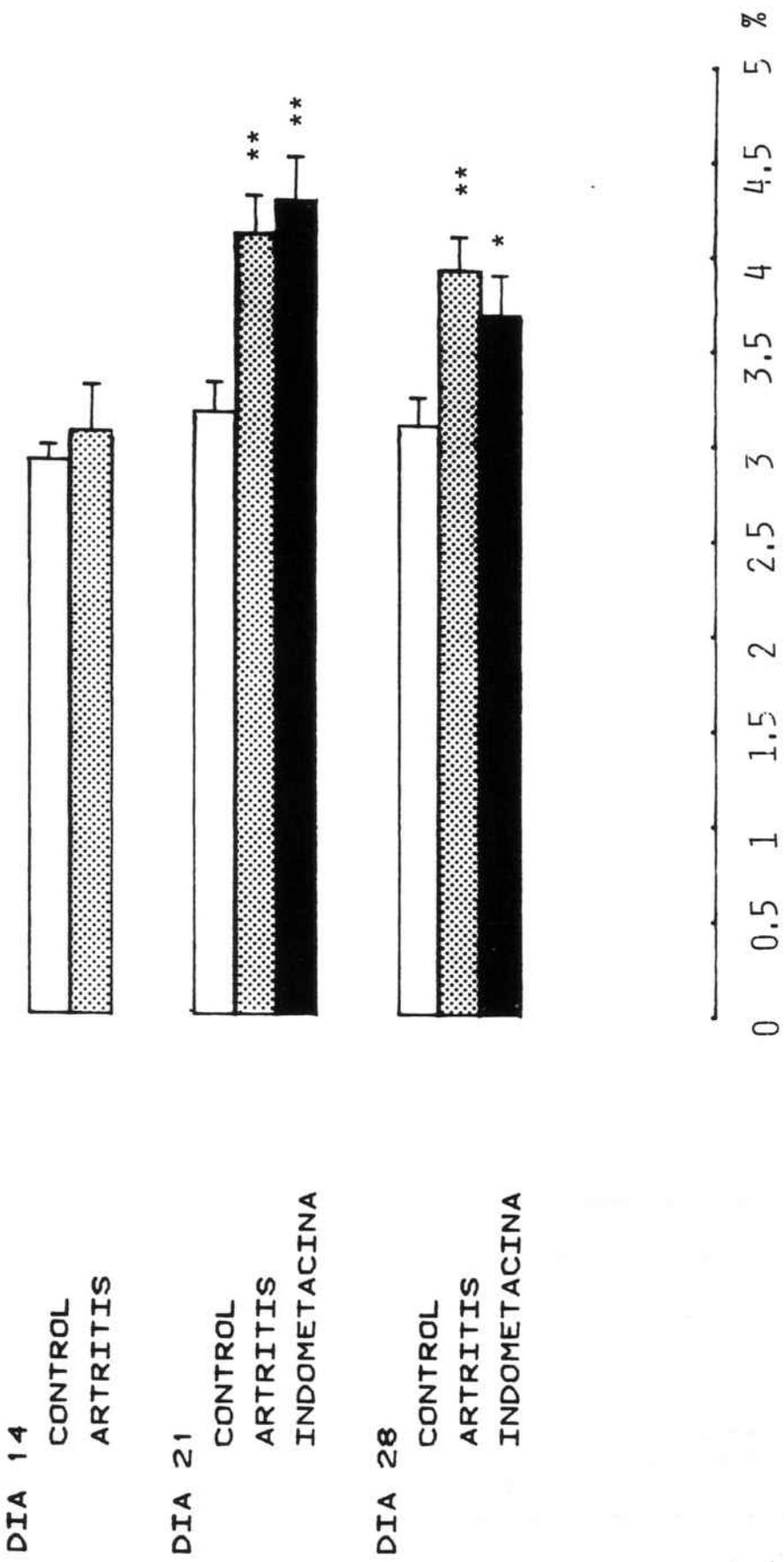


FIGURA 35: Evolución del peso de hígado. \* P < 0.05 y \*\* P < 0.01 respecto al grupo control

TABLA XIV (superior) y TABLA XV (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de las proteínas totales, expresadas en g/l, a lo largo del periodo estudiado en EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**PROTEINAS TOTALES**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	6.3714	6.4750	6.4857
s	0.4423	0.3991	0.5580
e	0.1672	0.1411	0.2109
N	7.0000	8.0000	7.0000
<b>Artritis</b>			
m	5.9333	6.2666	6.5222
s	0.5645	0.9246	0.4294
e	0.2304	0.3082	0.1358
N	6.0000	9.0000	6.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	6.7875	6.4290
s	-----	0.4969	0.5195
e	-----	0.1757	0.1643
N	-----	8.0000	10.0000

**PROTEINAS TOTALES**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	5.9333	6.200000	6.15000
s	0.1527	0.721000	0.49490
e	0.0881	0.416300	0.34990
N	3.0000	3.000000	2.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	5.5000	6.266600	6.50000
s	0.3265	0.338600	0.10000
e	0.1632	0.151400	0.04470
N	4.0000	5.000000	5.00000

TABLA XVI (superior) y TABLA XVII (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de los porcentajes de albúmina, a lo largo de EXP-A y EXP-B.

**ALBUMINA**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	45.1318	46.8396	43.3866
s	4.2763	3.1849	3.8451
e	1.6163	1.3002	1.5697
N	7.0000	6.0000	6.0000
<b>Artritis</b>			
m	21.6391	24.5975	23.9363
s	1.7621	2.6307	7.0757
e	0.6660	0.8769	2.3585
N	7.0000	9.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	28.9845	34.5778
s	-----	8.4268	6.6731
e	-----	3.1850	2.1102
N	-----	7.0000	10.0000

**ALBUMINA**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	54.0313	61.169300	56.39000
s	5.2384	3.653600	5.05210
e	3.0244	2.109400	2.91680
N	3.0000	2.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	51.4217	55.599100	51.00220
s	3.6390	6.111700	5.68380
e	1.8195	2.733200	2.54180
N	4.0000	5.000000	5.00000

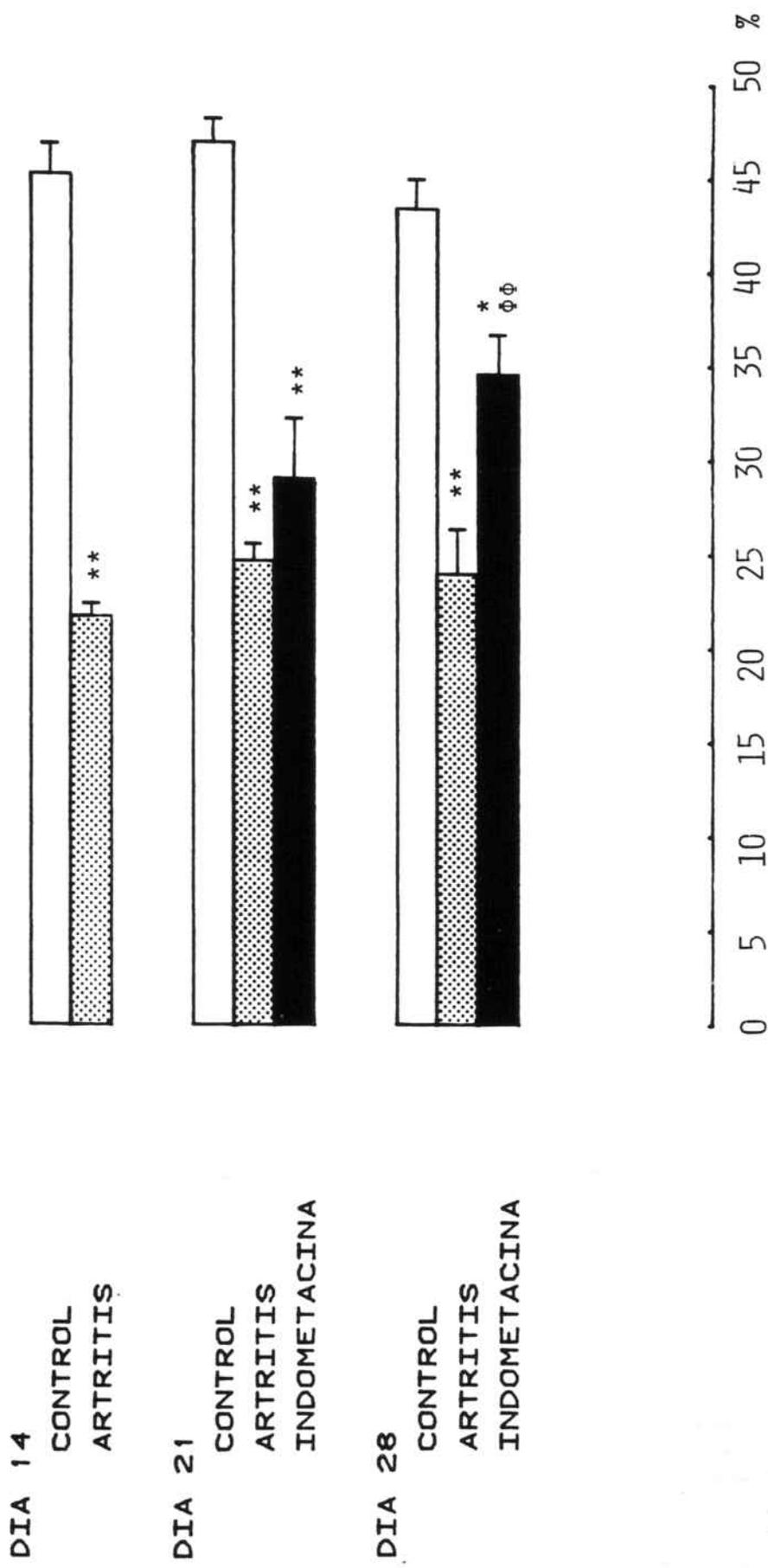


FIGURA 37: Evolución de la albúmina. \* P < 0.05 \*\* P < 0.01 respecto al grupo control.  $\phi\phi$  P < 0.01 respecto al grupo artrítico.

TABLA XVIII (superior) y TABLA XIX (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de los porcentajes de  $\alpha$ -globulinas totales, en EXP-A y EXP-B, respectivamente.

ALFA-GLOBULINA (TOTALES)		DIAS		
		14	21	28
Control				
m		21.8084	23.0666	23.6311
s		8.7756	2.1812	3.2453
e		3.3198	0.8904	1.3248
N		7.0000	9.0000	6.0000
Artritis				
m		35.4568	38.9878	38.1476
s		6.5100	5.6916	6.4898
e		2.4605	1.8972	2.1632
N		7.0000	9.0000	9.0000
Indometacina				
m		-----	29.8088	29.6396
s		-----	12.9298	6.6498
e		-----	4.8870	2.1028
N		-----	7.0000	10.0000

ALFA-GLOBULINA (TOTALES)		DIAS		
		21	28	33
CONTROL				
m		25.9818	19.886000	24.93500
s		0.2353	0.233600	0.26940
e		0.1359	0.134900	0.15550
N		3.0000	3.000000	3.00000
CONTROL-INDOMETACINA				
m		24.8037	23.393500	20.99160
s		3.3683	3.361700	3.20400
e		1.6841	1.503400	1.43280
N		4.0000	5.000000	5.00000

TABLA XX (superior) y TABLA XXI (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de los porcentajes de  $\alpha_1$ -globulinas, a lo largo del EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**ALFA-1 GLOBULINAS**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	18.0262	15.2148	17.1116
s	1.5544	2.8993	1.9332
e	0.5875	1.0954	0.7892
N	7.0000	7.0000	6.0000
<b>Artritis</b>			
m	18.6931	20.3204	20.0353
s	1.7306	3.8064	3.5344
e	0.6541	1.2688	0.3552
N	7.0000	9.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	19.9882	23.6915
s	-----	2.8983	3.6456
e	-----	1.0954	1.1528
N	-----	7.0000	10.0000

**ALFA-1 GLOBULINAS**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	21.7046	16.830000	19.26700
s	0.7670	0.800300	3.05400
e	0.4428	0.462000	1.76320
N	3.0000	3.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	17.1360	15.922300	14.78820
s	4.2774	2.196700	3.19350
e	2.1387	0.982300	1.42820
N	4.0000	5.000000	5.00000

TABLA XXII (superior) y TABLA XXIII (inferior): Valores medios e índice del grado de dispersión de los porcentajes de  $\alpha_2$ -globulinas de EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**ALFA-2 GLOBULINA**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	7.6392	7.8215	6.4783
s	1.6184	1.4454	2.1538
e	0.6117	0.5900	0.8793
N	7.0000	6.0000	6.0000
<b>Artritis</b>			
m	18.1481	18.6674	18.5354
s	6.6543	5.2734	5.8990
e	2.5151	1.7578	1.9663
N	7.0000	9.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	14.9708	8.3271
s	-----	4.9671	1.4603
e	-----	1.8774	0.5163
N	-----	7.0000	8.0000

**ALFA-2 GLOBULINA**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	4.4380	4.584000	5.66800
s	1.0239	0.066400	0.73080
e	0.5911	0.046900	0.42190
N	3.0000	2.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	7.6677	7.471100	6.19160
s	1.2709	1.567400	1.06310
e	0.6354	0.701000	0.47540
N	4.0000	5.000000	5.00000

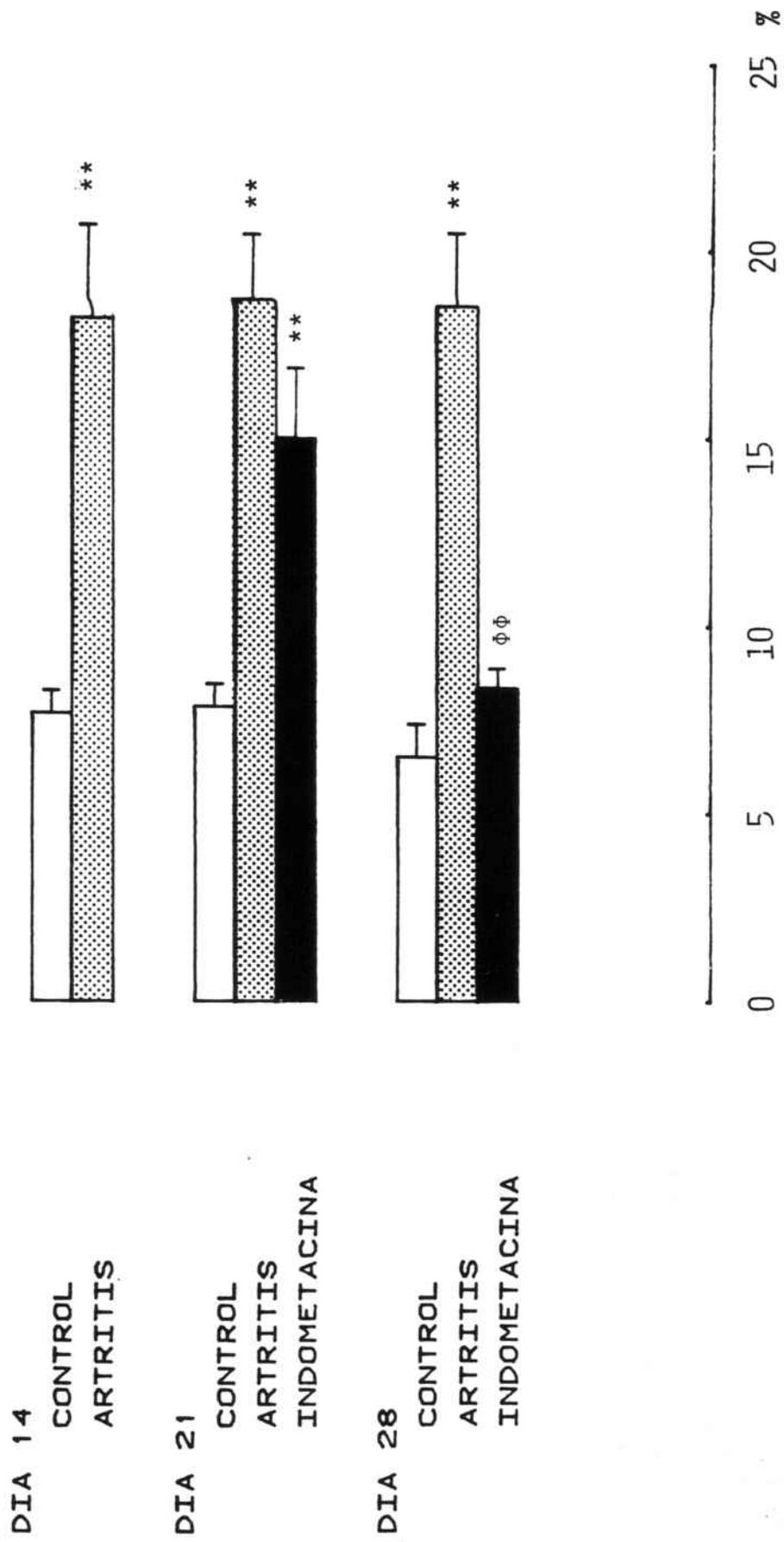


FIGURA 38: Evolución de las alfa<sub>2</sub>-globulinas. \*\* P < 0.01 respecto al grupo control.  
 φφ P < 0.01 respecto al grupo artrítico.

TABLA XXIV (superior) y TABLA XXV (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de los porcentajes de  $\beta$ -globulinas en EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**BETA GLOBULINAS**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	17.9340	17.5741	19.1050
s	2.9034	1.0683	1.4397
e	1.0973	0.4361	0.5877
N	7.0000	6.0000	6.0000
<b>Artritis</b>			
m	29.5552	25.7795	25.0870
s	6.1916	3.7849	2.0307
e	0.6883	1.2616	0.6769
N	7.0000	9.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	27.4164	25.5114
s	-----	3.5422	2.8111
e	-----	1.3388	0.8889
N	-----	7.0000	10.0000

**BETA GLOBULINAS**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	13.1860	11.793300	13.48300
s	2.4465	0.818900	1.53250
e	1.4125	0.472800	0.88480
N	3.0000	3.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	14.8277	15.759000	17.18960
s	3.0871	2.807000	3.49360
e	1.5435	1.255300	1.56240
N	4.0000	5.000000	5.00000

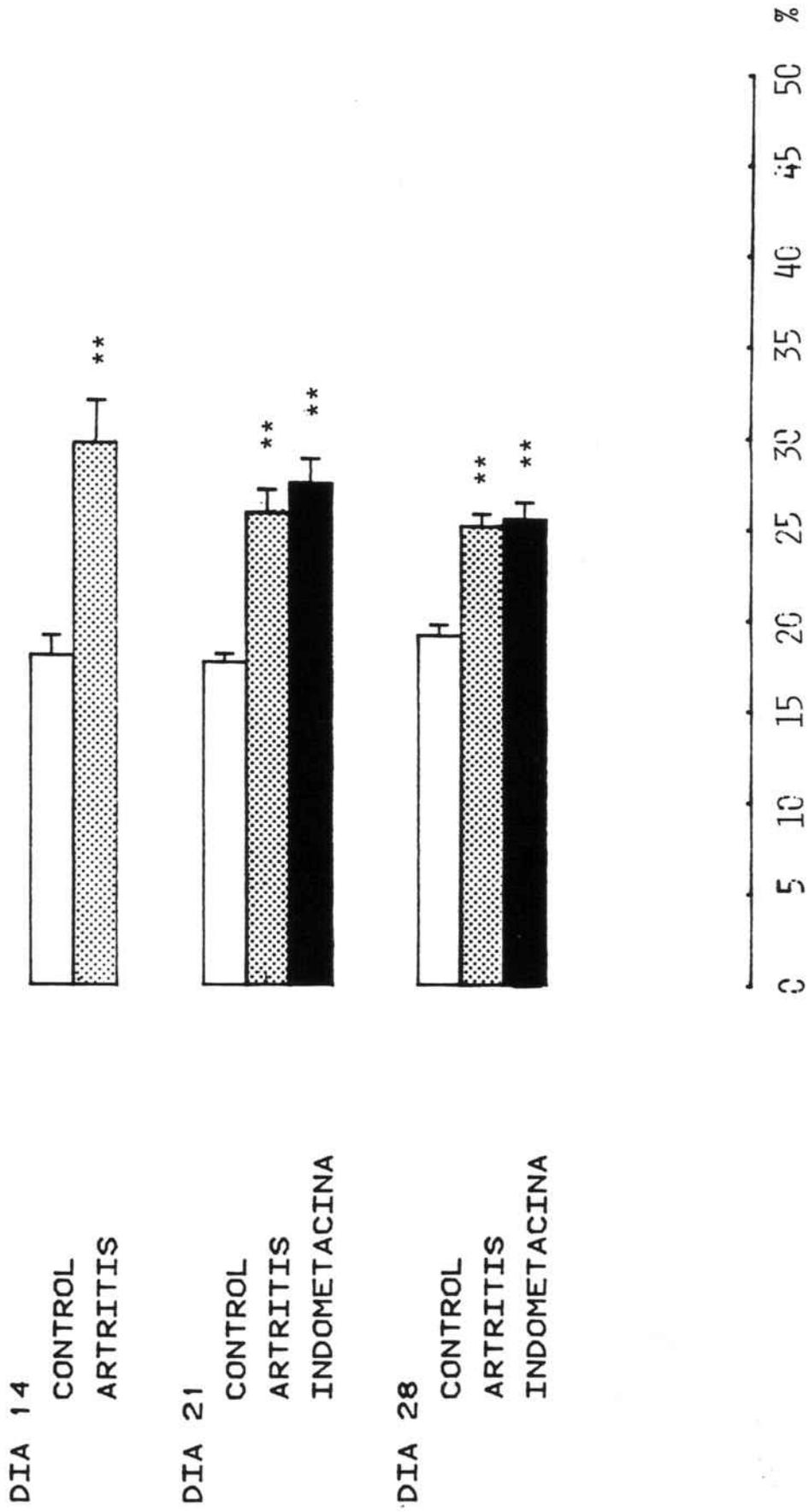


FIGURA 39: Evolución de las beta-globulinas.

\*\* P < 0.01 respecto al grupo control

TABLA XXVI (superior) y TABLA XXVII (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de los porcentajes de  $\gamma$ -globulinas, en EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**GAMA GLOBULINAS**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	12.3078	13.1641	13.0560
s	1.4965	1.3040	3.0448
e	0.5656	1.1419	1.2430
N	7.0000	6.0000	6.0000
<b>Artritis</b>			
m	11.9645	11.2297	11.9125
s	1.8211	1.8437	2.7415
e	0.6883	0.6145	0.9138
N	7.0000	9.0000	9.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	11.4911	10.0223
s	-----	2.5765	6.6498
e	-----	0.9738	0.7229
N	-----	7.0000	10.0000

**GAMA GLOBULINAS**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	4.2020	3.982000	4.06360
s	1.3656	1.682900	1.28270
e	0.7884	1.189900	0.74050
N	3.0000	2.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	7.4052	7.736100	8.62180
s	2.1517	1.931400	0.48180
e	1.0758	0.863700	0.21540
N	4.0000	5.000000	5.00000

TABLA XXVIII (superior) y TABLA XXIX (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión del cociente albúmina/globulina en EXP-A y el EXP-B, respectivamente.

**ALBUMINA/GLOBULINA**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	0.832000	0.885900	0.77240
s	0.148700	0.106500	0.11710
e	0.056200	0.043500	0.04780
N	7.000000	6.000000	6.00000
<b>Artritis</b>			
m	0.276100	0.327600	0.32560
s	0.028800	0.048200	0.13650
e	0.010800	0.005300	0.04550
N	7.000000	9.000000	9.00000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	0.430200	0.54240
s	-----	0.183200	0.15630
e	-----	0.069200	0.04940
N	-----	7.000000	10.00000

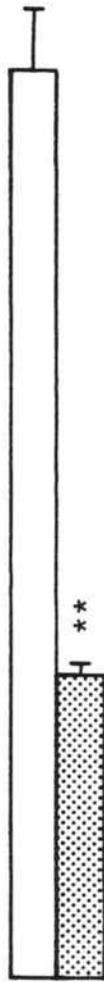
**ALBUMINA/GLOBULINA**

	DIAS		
	21	28	33
<b>Control</b>			
m	1.1926	1.588	1.313
s	0.2353	0.234	0.269
e	0.1359	0.135	0.156
N	3.0000	3.000	3.000
<b>Control-Indometacina</b>			
m	1.0667	1.289	1.119
s	0.1555	0.326	0.374
e	0.0777	0.146	0.167
N	4.0000	5.000	5.000

DIA 14

CONTROL

ARTRITIS

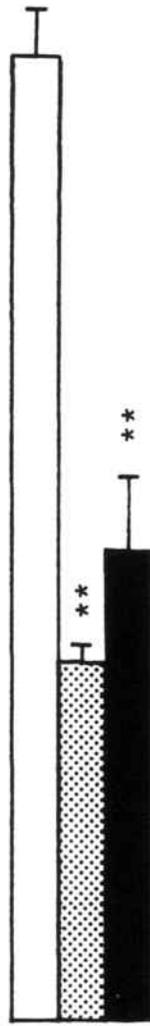


DIA 21

CONTROL

ARTRITIS

INDOMETACINA



DIA 28

CONTROL

ARTRITIS

INDOMETACINA

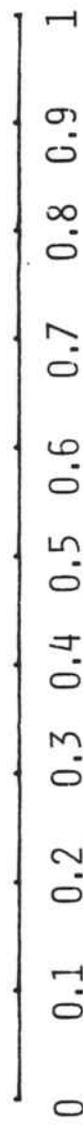


FIGURA 36: Evolución del cociente albúmina/globulinas.

\*\* P < 0.01 respecto al grupo control.

φφ P < 0.01 respecto al grupo artrítico.

**TABLA XXX: Valores individuales, valores medios e índices del grado de dispersión en el estudio comparativo de las tres técnicas probadas de aislamiento microsomal.**

<b>AISLAMIENTO MICROSOMAL (actividad N-demetilasa)</b>			
	<b>CENTRIFUGACION</b>	<b>ULTRACENTRIFUGACION</b>	<b>PRECIPITACION-C12Ca</b>
1	24.524	102.986	-----
2	29.709	109.026	-----
3	22.002	104.911	-----
4	26.435	65.738	-----
5	28.940	69.240	69.876
6	24.873	64.085	-----
7	14.602	46.256	47.614
8	-----	49.895	49.894
9	-----	57.778	64.982
10	-----	74.011	75.616
11	-----	75.628	124.260
12	34.972	63.421	-----
13	-----	36.849	46.611
m	25.707	70.756	68.407
s	5.913	22.700	27.189
e	0.739	1.746	3.884
N	8.000	13.000	7.000

TABLA XXX(bis): Desarrollo detallado de una parte de la

Tabla XXX.

CENTRIFUGACION			ULTRACENTRIFUGACION			PRECIPITACION CL <sub>2</sub> CA		
nM HCHO formado 3 ml sol. mic. 3 ml sol. mic.	mg prot.	$\frac{\text{nM HCHO}}{30'}$ mg prot.	nM HCHO formado 3 ml sol. mic. 3 ml sol. mic.	mg prot.	$\frac{\text{nM HCHO}}{30'}$ mg prot.	nM HCHO formado 3 ml sol. mic. 3 ml sol.	mg prot.	$\frac{\text{nM HCHO}}{30'}$ mg prot.
1682.4	68.6	24.524						
1605.3	72.96	22.00						
1727.8	65.36	26.43						
1873.0	64.72	28.94	519.93	7.50	69.24	226.4	3.28	69.88
1609.8	64.72	24.87	448.6	7.00	64.085			
			621.7	12.46	49.895	283.4	5.68	49.89
			621.7	10.76	57.778	379.5	5.84	64.98
			1175.3	15.88	74.011	429.5	5.68	75.616
			633.2	17.16	36.899	283.4	6.08	46.611

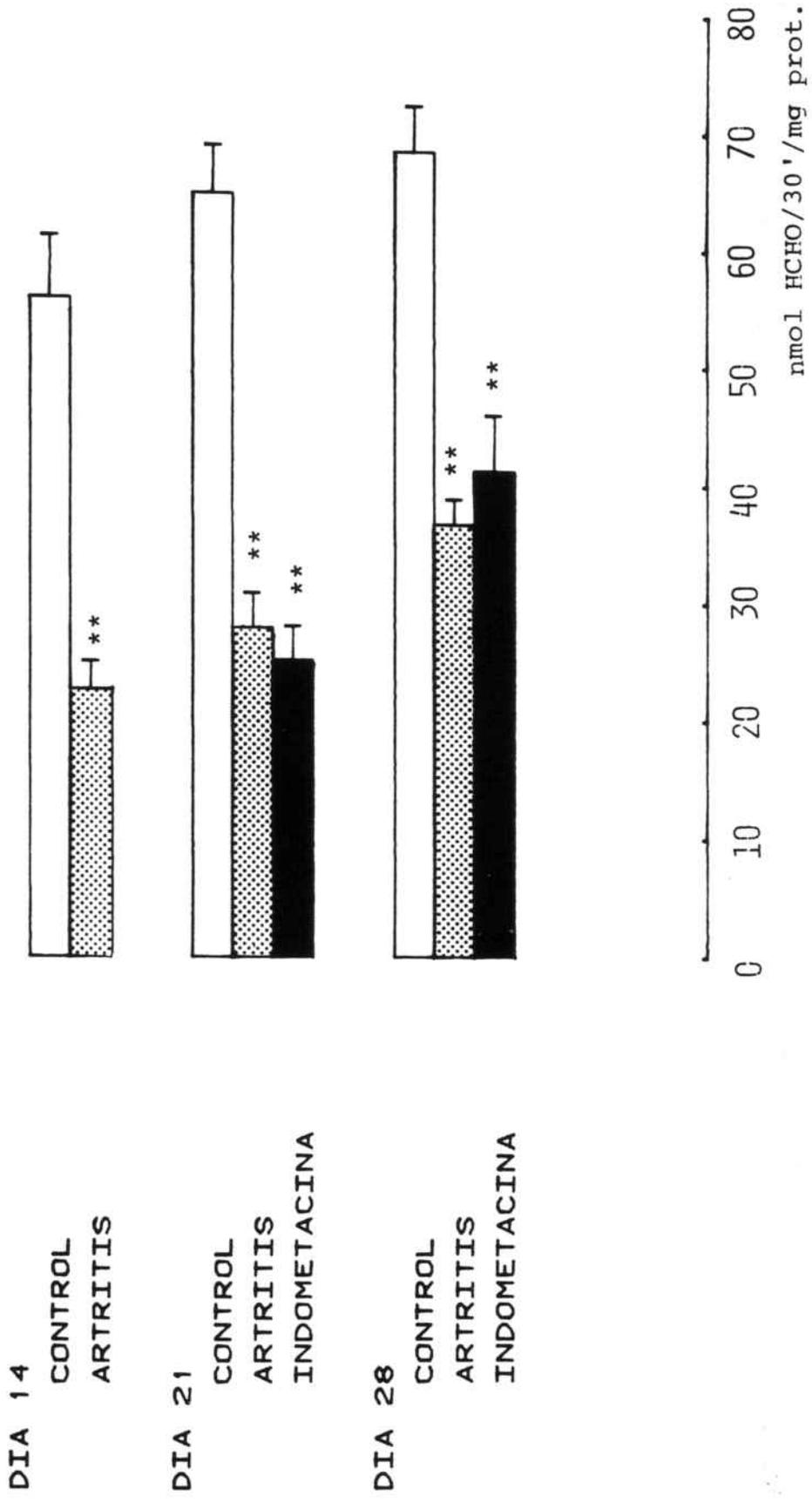
TABLA XXXI (superior) y TABLA XXXII (inferior): Valores medios e índices del grado de dispersión de la actividad aminopirina N-demetilasa, expresada en nM HCHO/30<sup>7</sup>/mg prot., en EXP-A y EXP-B, respectivamente.

**ACT. AMINOPIRINA N-DEMETILASA**

	DIAS		
	14	21	28
<b>Control</b>			
m	55.9322	64.8501	68.5030
s	10.6475	10.9996	10.9602
e	5.3237	4.1574	3.8750
N	4.0000	7.0000	8.0000
<b>Artritis</b>			
m	22.4349	27.7311	36.7158
s	6.3067	8.2344	5.5514
e	2.5747	3.1123	2.0982
N	6.0000	7.0000	7.0000
<b>Indometacina</b>			
m	-----	25.1323	41.2277
s	-----	8.2427	13.4568
e	-----	2.9142	4.7577
N	-----	8.0000	8.0000

**ACTIVIDAD N-DEMETILASA**

	DIAS		
	21	28	33
<b>CONTROL</b>			
m	88.6990	74.437300	66.12800
s	17.3330	19.069100	14.89820
e	10.0062	11.009500	8.60150
N	3.0000	3.000000	3.00000
<b>CONTROL-INDOMETACINA</b>			
m	74.7032	57.305400	79.62270
s	14.6484	9.571100	20.07470
e	7.3242	4.280300	10.07370
N	4.0000	5.000000	4.00000

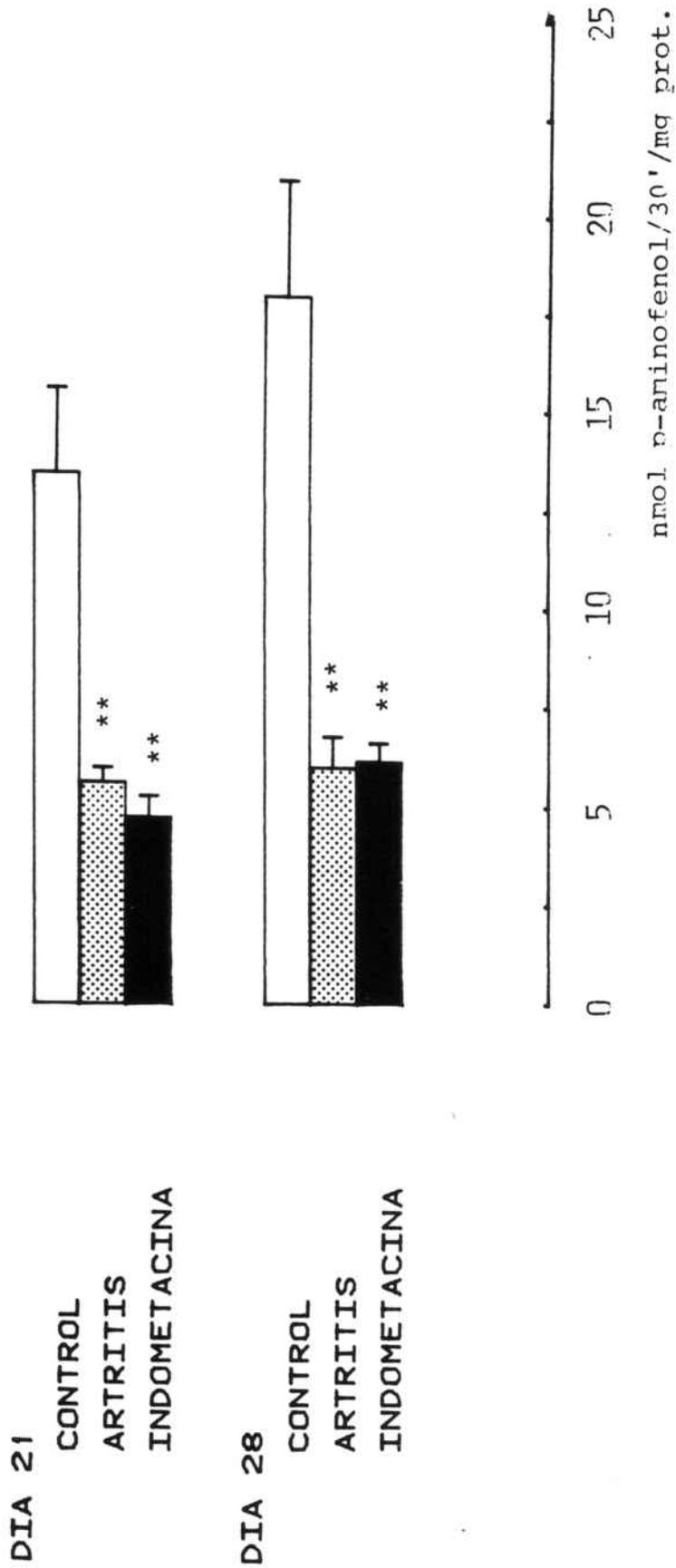


**FIGURA 30:** Evolución de la actividad N-demetilasa. \*\* P < 0.01 respecto al grupo control.

TABLA XXXIII:Valores medios e índices del grado de dispersión de la actividad anilina p-hidroxilasa, expresada en nM de p-aminofenol/30<sup>o</sup>/mg prot., en el EXP-A.

**ANILINA p-HIDROXILASA**

		DIAS		
		14	21	28
<b>Control</b>				
m	-----		13.4422	17.9386
s	-----		4.8167	5.1225
e	-----		0.9633	1.7075
N	-----		5.0000	3.0000
<b>Artritis</b>				
m	-----		5.6062	5.9812
s	-----		1.0511	1.7362
e	-----		0.1331	0.3472
N	-----		8.0000	5.0000
<b>Indometacina</b>				
m	-----		4.7186	6.6365
s	-----		0.9571	0.9434
e	-----		0.3190	0.2358
N	-----		3.0000	4.0000



**FIGURA 41:** Evolución de la actividad anilina p-hidroxilasa. \*\* p < 0.01 respecto al grupo control.

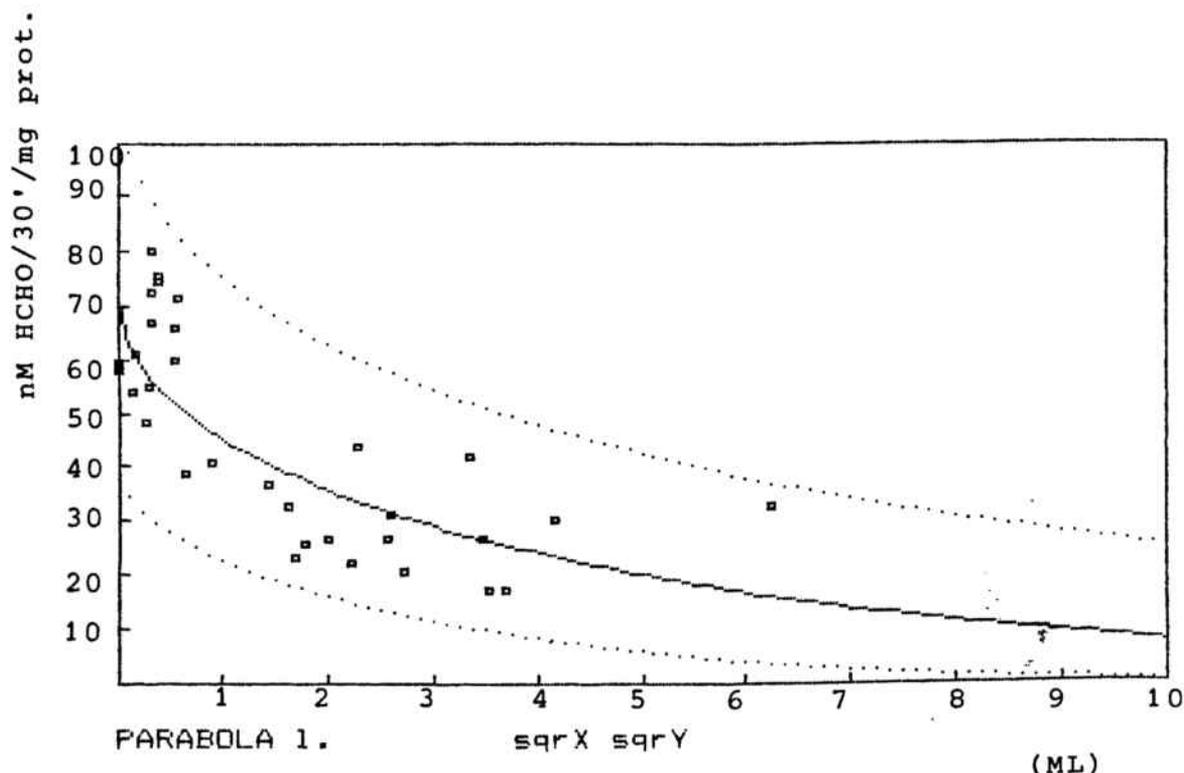
**FIGURA 42:** Valores de la ecuación de las funciones que representan la correlación entre el volumen de la extremidad contralateral y la actividad aminopirina N-demetilasa de las ratas control y artríticas del EXP-A, y representación de la mejor función.

y=bx+a N= 32 Asimptota= 80.108028

FUNCIÓN	f(x)	f(y)	pendiente B	ordenada a	error B	factor R
LINIAL	X	Y	-9.2214434	59.527727	5759.0421	0.71867164
LOGARITMICA	lnX	Y	-3.910517	42.712536	8925.9223	0.50060724
EXPONENCIAL	X	lnY	-0.22241658	4.0557468	5009.4212	0.76119953
POTENCIAL	lnX	lnY	-0.097334819	3.6485883	11584.815	0.16545482
PARABOLA v.	X	sqrY	-0.70643535	7.6589652	5140.6803	0.75392615
PARABOLA h.	sqrX	Y	-23.894016	71.078876	4821.1066	0.77151477
PARABOLA l.	sqrX	sqrY	-1.8358624	8.5498121	4753.8708	0.77516446
HIPERBOLA aIIY	X	1/Y	.60219005E-02	0.017934801	5571.9516	0.72951796
HIPERBOLA aIIX	1/X	Y	.14857679E-02	43.836704	11497.107	0.18638396
MICHAELIS-M.	1/X	1/Y	-.11250326E-05	0.028278521	13652.757	0.38241672
EXP. INV.	X	ln(C-Y)	0.40478792	2.5587062	20898.832	0.86867731

LA MILLOR REGRESSIO ES LA PARABOLA l.: sqrX sqrY

# de serie: 1,

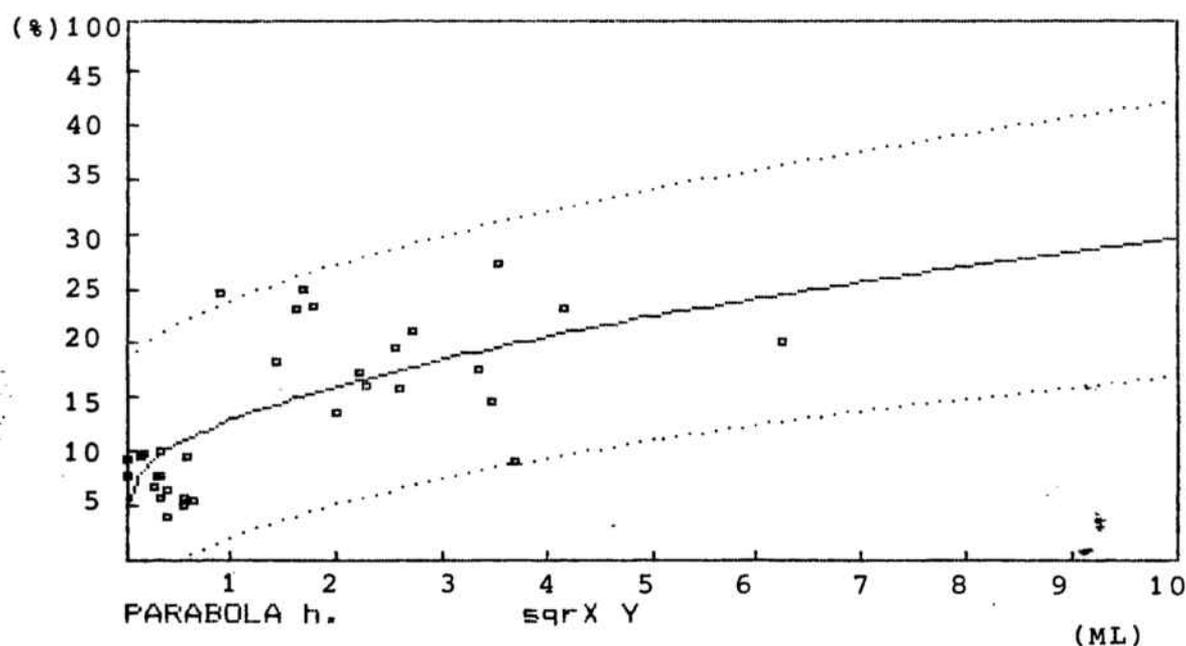


**FIGURA 43:** Valores de la ecuación de las funciones que definen la correlación entre el incremento en el volumen de la extremidad contralateral y el tanto por ciento de la fracción de alfa<sub>2</sub>-globulinas de las ratas control y artríticas del EXP-A, y representación de la mejor función.

y=bx+a N= 32 Asimptota= 27.234207

FUNCION	f(x)	f(y)	pendiente b	ordenada a	error en	coeficiente
LINIAL	X	Y	2.9233548	9.0195369	953.05265	0.62726917
LOGARITMICA	lnX	Y	1.3158511	14.390258	1233.3372	0.46377839
EXPONENCIAL	X	lnY	0.238615	2.0897484	1285.5427	0.4264578
POTENCIAL	lnX	lnY	0.098432615	2.5234115	1257.9311	0.44658544
PARABOLA v.	X	sqrY	0.41061155	2.9167302	1050.3279	0.57581209
PARABOLA h.	sqrX	Y	7.6628065	5.2607277	842.13957	0.68121431
PARABOLA l.	sqrX	sqrY	1.0675709	2.398395	878.61057	0.66395963
HIPERBOLA aIIY	X	1/Y	-0.022440193	0.13450886	41816.612	5.0608853
HIPERBOLA aIIX	1/X	Y	-.55051482E-03	14.043669	1514.5048	0.19013734
MICHAELIS-M.	1/X	1/Y	.20594254E-05	0.097300076	1939.8954	0.48432545
EXP. INV.	X	ln(C-Y)	-0.36368468	2.8553315	999.2936	0.60335591

LA MILLOR REGRESSIO ES LA PARABOLA h.: sqrX Y  
# de serie: 3,



**FIGURA 44:** Valores de la ecuación de las funciones que definen la correlación entre la actividad aminopirina N-demetilasa y el porcentaje de alfa<sub>2</sub>-globulinas de las ratas control y artríticas de el EXP-A , y representación de la mejor función.

y=ax+b N= 32 Asimptota= 27.234207

FUNCIÓN	f(x)	f(y)	pendiente a	ordenada b	Error 0	Cor. r
LINIAL	X	Y	-0.26987496	25.780665	703.83163	0.7430166
LOGARITMICA	lnX	Y	-10.979014	54.31851	742.31184	0.72635007
EXPONENCIAL	X	lnY	-0.021620201	3.4395884	742.77237	0.72614829
POTENCIAL	lnX	lnY	-0.8703137	5.6916382	885.58792	0.66060724
PARABOLA v.	X	sqrY	-0.03746089	5.2510381	705.9303	0.74211727
PARABOLA h.	sqrX	Y	-3.5361513	36.783802	711.05908	0.73991488
PARABOLA l.	sqrX	sqrY	-0.48956223	6.7699764	735.5361	0.72931241
HIPERBOLA aIIY	X	1/Y	.20408037E-02	.72265335E-02	928.79434	0.6394567
HIPERBOLA aIIX	1/X	Y	354.54227	3.922938	872.57014	0.66684825
MICHAELIS-M.	1/X	1/Y	-2.5757453	0.16961154	3997.3954	1.2425728
EXP. INV.	X	ln(C-Y)	0.035331628	0.69146013	1308.2738	0.40914531

LA MILLOR REGRESSIO ES LA LINIAL: X Y

# de serie: 2,

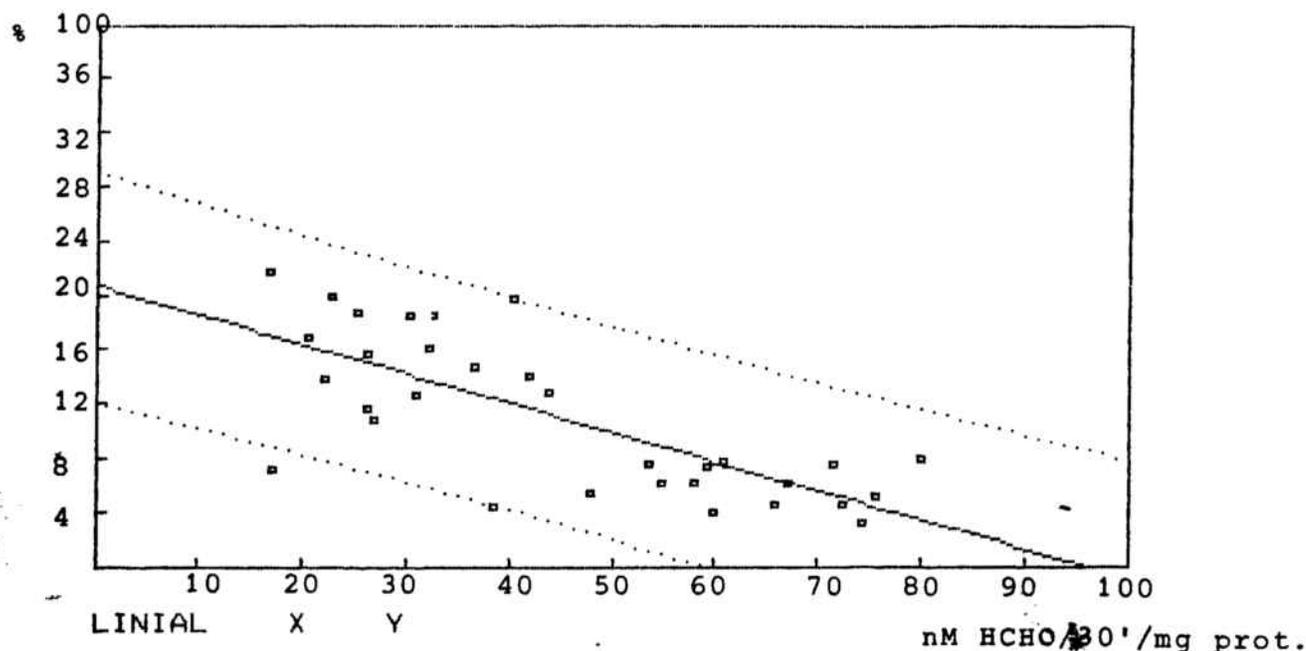


TABLA XXXIV :% de inhibición de la indometacina sobre los  
 parametros estudiados en ratas con artritis  
 experimental (tratamiento diario de 1 mg/kg rata).

parametros	PERIODO DE TRATAMIENTO	
	1 semana	2 semanas
peso corporal (g)	9.31 1.86 <sup>a</sup> (10)	10.99 1.36 (10)
peso de hígado (%)	-4.39 1.78 (10)	6.07 1.71 (10)
Incremento vol. pata contralateral (ml)	44.67 1.61 (10)	64.68 1.61 (10)
aminopirina N-demetilasa (nM HCHO/30'/mg prot.)	9.35 3.71 (8)	12.28 4.58 (8)
anilina p-hidroxilasa (nM p-NH <sub>2</sub> fenol/30'/mg prot.)	-14.76 5.69 (3)	2.60 3.94 (4)
albúmina (%)	13.47 3.67 (7)	47.88 2,36 (10)
α-globulinas totales (%)	10.35 2.19 (7)	22.29 1.74 (10)
α <sub>1</sub> -globulinas (%)	1.68 2.03 (7)	-14.84 1.74 (9)
α <sub>2</sub> -globulinas (%)	19.58 3.83 (7)	55.07 0.98 (8)
β-globulinas (%)	-6.35 1.96 (7)	-1.69 1.12 (10)
γ-globulinas (%)	2.43 3.26 (7)	-15.53 1.92 (10)
albúmina/globulinas (A/G)	20.57 5.83 (7)	71.82 4.70 (10)

<sup>a</sup> media ± error estándar  
 (número de ratas)

### 3.-DISCUSSION.-

La primera parte del trabajo ha consistido en el estudio del aislamiento de la fracción microsomal de tejido hepático mediante tres técnicas diferentes: centrifugación, ultracentrifugación y precipitación con cloruro de calcio. Nuestros resultados demuestran que la centrifugación es un método poco selectivo para aislar la fracción microsomal, hecho que se pone de manifiesto en una actividad enzimática por milígramo de proteína, significativamente reducida, si lo comparamos con los otros dos métodos, debido a la gran cantidad de proteínas sin actividad metabolizadora de fármacos, que quedan sin separar de la fracción microsomal con este método.

KAMATH y col. (1971) observaron que determinadas actividades enzimáticas microsomales como glucosa-6-fosfatasa o 5' nucleotidasa, no eran diferentes significativamente, cuando se obtenían a partir de microsomas aislados por ultracentrifugación o precipitación con cloruro de calcio. Nosotros hemos comprobado que la actividad aminopirina N-demetilasa de microsomas aislados por ambos métodos, no es significativamente diferente, observando al igual que KAMATH y col. que, en el caso de la precipitación con cloruro de calcio, se obtiene una actividad ligeramente superior, sin llegar a ser significativamente como proponen KUPFER y LEVIN (1972). Pese a la similar actividad obtenida por ambos métodos, ninguno de ellos se destaca por una mayor sencillez de manejo, de aquí que se

escogiera el método de ultracentrifugación, por su mayor rendimiento en el aislamiento de la fracción microsomal.

Una vez establecido el método de ultracentrifugación, se estudió la actividad de la fracción precipitada y del sobrenadante, observando que este último poseía una actividad enzimática absoluta superior, quizás debida a la presencia de pequeños microsomas que no sedimentan en nuestras condiciones experimentales de ultracentrifugación; también posee mayor concentración de proteínas, debido a la presencia de hemoglobina y otras proteínas no microsomales, por lo que su actividad enzimática referida a miligramos de proteína, es significativamente inferior a la encontrada en el precipitado microsomal utilizado en nuestras determinaciones. Para obtener las curvas estándar de formol (determinación de aminopirina N-demetilasa) y p-aminofenol (determinación de anilina p-hidroxilasa). se ha seguido el mismo proceso que con las muestras. De esta forma las curvas estándar poseen una pendiente inferior al estándar externo, ya que tiene en cuenta las posibles pérdidas de formol o p-aminofenol durante el largo proceso de su determinación. Los resultados expresados con respecto al estándar interno son por consiguiente más fiables. También hemos constatado la importancia de que los reactivos de las reacciones colorimétricas, reactivo de Nash y solución de o-cresol, se preparen inmediatamente antes de su uso, ya que sino pueden alterarse los resultados.

La mayoría de los compuestos extraños al organismo son metabolizados por los enzimas microsomales del hígado, así el metabolismo de fármacos, biotransformados en el hígado, está disminuido en enfermedades hepáticas como la hepatitis (GORESKY y col. 1974) y la cirrosis (MAKINO y NAKAWAGA, 1978)

En el presente trabajo se ha comprobado que la inducción de la artritis por adyuvante en ratas, disminuye su actividad aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa del sistema del cit.P-450. Estos resultados indican una reducción en la capacidad del metabolismo oxidativo de compuestos extraños tanto de tipo I, como la aminopirina, como de tipo II, como la anilina. Este hecho había sido señalado con anterioridad por MORTON y CHATFIELD (1970), al observar que en las ratas con artritis experimental se incrementaba el periodo de sueño inducido por el fenobarbital.

A pesar de la alteración de la funcionalidad del sistema microsomal hepático, no se han observado en las ratas artríticas, necrosis o lesiones macroscópicas apreciables. Sin embargo, se ha detectado un aumento significativo del peso del hígado con respecto al peso corporal. Recientemente, ISHIZUKI y col. (1983) han observado marcadas alteraciones morfológicas de los hepatocitos en ratas artríticas, que conllevan la reducción de la superficie del retículo endoplasmático liso, metabolizador de fármacos.

Durante el curso de nuestros experimentos, hemos constatado que el suero de ratas artríticas mostraba una tonalidad verdosa debida, quizás, a un aumento de la degradación de hemoproteínas como el cit. P-450. Este hecho podría estar relacionado con el aumento en ratas artríticas de su actividad hemo oxigenasa hepática, encargada de degradar al cit.P-450 (BISSELL y HAMMAKER, 1979).

A pesar de que los niveles de proteínas séricas se mantienen constantes, hemos observado que la artritis provoca una marcada alteración del proteinograma, aumentando las fracciones alfa<sub>2</sub> y beta y disminuyendo la albúmina. El aumento en la síntesis hepática de las alfa<sub>2</sub>-globulinas denominadas proteínas de fase aguda (COURTOY y col., 1981), guarda una estrecha correlación (Fig. 43), con las manifestaciones inflamatorias de la artritis, resultados que coinciden con los obtenidos por LOWE (1964), GLENN (1968) y HIRSHELMANN y col., (1981). También existe correlación entre el proceso inflamatorio y la reducción de la actividad metabolizadora, así como entre el aumento de alfa<sub>2</sub>-globulinas y la disminución de la actividad metabolizadora microsomal (Figuras 42 y 44).

Este último hecho podría deberse a que el aumento en la síntesis de alfa<sub>2</sub>-globulinas por el retículo endoplasmático rugoso, produce una reducción de la superficie neta ocupada por el retículo endoplasmático liso, encargado del metabolismo de fármacos (ISHIZUKI y col., 1983). Esta hipó-

tesis que intentaría explicar la reducción de las actividades enzimáticas, halladas en ratas artríticas, no explica los resultados obtenidos en los animales bajo tratamiento con indometacina. Después de dos semanas de tratamiento diario a dosis terapéuticas, la inflamación se reduce en un 65 % y los niveles de alfa<sub>2</sub>-globulinas casi han vuelto a sus valores normales, sin que, paralelamente, como sería de esperar, se recupere la actividad metabolizadora microsomal disminuída.

La indometacina al inhibir la cicloxigenasa, evitará la síntesis de las prostaglandinas, responsables de la sintomatología inflamatoria y, por consiguiente, reducirá la inflamación. Esta disminución en la inflamación, tendrá, como consecuencia directa, el cese de la síntesis aumentada de las alfa<sub>2</sub>-globulinas.

Sin embargo, la disminución en el metabolismo oxidativo de fármacos, a pesar de haber sido provocada por un mecanismo común con la inflamación, no es inhibida por la indometacina, hecho que lleva a considerar que este proceso se desarrolle a través de un mecanismo diferente. Este aspecto parece haberse comprobado, por el hecho de que la inducción de la artritis por vía i.p., produce la reducción del metabolismo oxidativo, sin apenas respuesta inflamatoria (CAWTHORNE y col., 1976).

Quizás la lipidoperoxidación de la membrana microsomal, relacionada con la funcionalidad del sistema del citocromo P-450, sea la causa de la reducción de la actividad me-

tabolizadora como propone LEVINE (1982), o bien, la inducción de la artritis, provoca la liberación, por parte de los macrófagos, de sustancias capaces de disminuir la funcionalidad del sistema microsomal (TRESCEC y col., 1983). Es preciso clarificar totalmente estos puntos para conocer cuál es el mecanismo por el que se reduce el metabolismo oxidativo de los fármacos durante la artritis.

Los animales sanos tratados con indometacina nos han permitido observar que este fármaco no provoca la inducción o inhibición del metabolismo oxidativo microsomal y que tampoco modifica, significativamente, el proteinograma, aunque hay una ligera disminución de las fracciones alfa<sub>1</sub> y albúmina y un aumento de las alfa<sub>2</sub> y gamma globulinas. JAMIESON y col., (1982), trabajando "in vitro", comprobaron que estas diferencias llegan a ser significativas; no obstante, estas modificaciones se producen a concentraciones más elevadas de las que se consiguen "in vivo", en la biofase, después de administrar una dosis terapéutica de indometacina.

Dadas las similitudes entre la artritis experimental en rata con la artritis reumatoide humana, parece posible que se produzca una reducción en la capacidad metabolizadora de fármacos en el hombre y que esto, a su vez, ocasione un aumento en la toxicidad de aquellos fármacos metabolizados por el sistema microsomal hepático, relacionada con las variaciones farmacocinéticas originadas por la patología, o una disminución en la acción de los fármacos que requieren

su transformación a metabolitos activos. Este hecho, de ser extrapolable a clínica humana, tendría un extraordinario interés y permitiría establecer unas pautas de dosificación en función del grado de patología artrítica, tanto para fármacos antiinflamatorios de uso común en estos pacientes, como de otros, utilizados con frecuencia concomitantemente en dichos enfermos, ya que, en general, se trata de personas de edad avanzada.

#### 4.- CONCLUSIONES.-

## PATOLOGIA DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL

1. En los animales artríticos, la inflamación articular se presenta acompañada de un retraso en el crecimiento, aumento del peso de hígado respecto al peso corporal, disminución de la albúmina y aumento de las  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y beta-globulinas séricas, sin variación en la proteinemia.

2. Se observa una buena correlación entre el grado de inflamación articular y el aumento de las  $\alpha_2$ -globulinas séricas.

3. En la artritis experimental existe una disminución significativa de las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa, durante todo el periodo estudiado.

4. Existe correlación entre la disminución de las actividades enzimáticas determinadas y el grado de inflamación observado.

## TERAPEUTICA DE LA ARTRITIS EXPERIMENTAL

1. El tratamiento curativo con indometacina a dosis de 1 mg/Kg/día por vía oral durante dos semanas, produce una reducción significativa en la inflamación articular y normaliza los niveles de  $\alpha_2$ -globulinas.

2. El tratamiento con indometacina no restaura las actividades aminopirina N-demetilasa y anilina p-hidroxilasa reducidas en el proceso artrítico.

## 5.-BIBLIOGRAFIA.-

- AGOSIN, M.; MORELLO, A.; WHITE, R.; REPETTO, Y. y PEDEMONTE, J. (1979).- "Multiple forms of noinduced rat liver cytochrome P-450. Metabolism of 1-(4'-ethylphenoxy) 3,7-dimethyl-6,7-epoxy-trans-2 octene by reconstituted preparations." J. Biol. Chem., 254, 9915-9920.
- ALTMAN, L.C. (1978).- "Chemotactic lymphokines", en "Leukocyte chemotaxis: methods, physiology and clinical implications". (Gallen, J.I.; Quie, P.G. Eds.), Raven Press, New York, pp. 267-287.
- ALVARES, A.P. y MANNERING, G.J. (1970).- "Two-substrate kinetic of drugs-metabolizing enzyme systems of hepatic microsomes." Molecular Pharmacol. 6, 206-212.
- AOYAMA, T.; IMAI, Y. y SATO, R. (1982).- en "Microsomes, drug oxidations and drug toxicity." (Sato, R. y Kato, R. Eds.) Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 83- 84.
- BABER, N.; HALLIDAY, L.D.C.; VAN DER HEUVEL, W.J.A.; WALKER, R.W.; SIBEON, R.; KEENAN, J.P.; LITTER, T. y ORME, M. (1979). "Indomethacin in rheumatoid arthritis: clinical effects, pharmacokinetics and platelet studies in responders and non-responders". Ann. Rheum. Dis. 38, 128-137.
- BAKER, J.R. y CHAYKIN, S. (1962).- "The biosynthesis of trimethylamine N-oxide". J. Biol. Chem. 237, 1309.
- BHATTACHARYA, M.H. y DE LUCA, H.F. (1974).- "Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase". Arch. Biochem. Biophys. 160, 58.
- BETZ, G.; TSAI, P. y WEAKLEY, R. (1976).- "Heterogeneity of cytochrome P-450 in rat testis microsomes". J. Biol. Chem. 251, 2839.

- BISSELL, D.M. y HAMMAKER, L.E. (1976).- "Cytochrome P-450 heme and the regulation of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetase in the liver". Arch. Biochem. Biophys. 176, 103-112.
- BITO, L.Z. (1976).- "Inhibition of renal prostaglandin metabolism and excretion by probenecid, bromocresol green and indomethacin". Prostaglandins 12, 639-646.
- BLACK, S.D.; FRENCH, J.S. y WILLIAMS, C.H. (1979).- Biochem. Biophys. Res. Comm. 91, 1528-1535.
- BOARDMAN, P.L. y HART, E.D. (1967).- "Side-effects of indomethacin". Ann. Rheum. Dis. 26, 127-132.
- BOURNE, H.R.; LICHTENSTEIN, L.M.; MELMON, K.L.; HENNEY, C.S.; WEINSTEIN, Y. y SHEARES, G.M. (1974).- "Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP". Science 184, 19-20.
- BURNS, J.J.; YU, T.F.; RITTERBAND, A.; PEREL, J.M.; GUTMAN, A.B. y BRODIE, B.B. (1957).- "A potent new uricosuric agent, the sulfoxide metabolite of the phenylbutazone analogue, G-2567". J. Pharmacol. Exp. Therap. 119, 418.
- CANTRELL, E. y BRESNICK, E. (1972).- "Benz( $\alpha$ )pyrene hydroxylase activity in isolated parenchymal and nonparenchymal cells of rat liver". J. Cell. Biol. 52, 316.
- CARANASOS, G.J.; STEWART, R.B. y CLUFF, L.E. (1974).- "Drug induced illness leading to hospitalization". J.A.M.A. 728, 713-718.
- CATALAN, R.; EDGARDO, A. y MARIA, D. (1980).- "Effects of indomethacin on the cyclic AMP-dependent protein kinase". Eur. J. Pharmacol. 63, 187-190.

- CHIU, P.; WEEMS, H.B.; WONG, I.K.; FU, P.P. y YANG, S.K. (1983).- "Stereoselective metabolism of benzo( $\alpha$ )pyrene and 7-methylbenzo( $\alpha$ )pyrene by liver microsomes from Sprague-Dawley rats pretreated with polychlorinated biphenyls". Chem.-Biol. Interactions 44, 155-168.
- COHN, J.A.; ALVARES, A.P. y KAPPAS, A. (1977).- J. Exp. Med. 145, 16076.
- CONNEY, A.H.; GILLETTE, J.R.; INSCUE, J.K.; TRAMS, E.G. y POSNER, H.S. (1959).- "3,4-benzo( $\alpha$ )pyrene-induced synthesis of liver microsomal enzymes which metabolize foreign compounds". Science 130, 1478-1479.
- COOPER, J.R. y BRODIE, B.B. (1955).- "The enzymatic metabolism of hexobarbital". J. Pharmacol. Exp. Therap. 114, 409.
- COURTOY, P.J.; LORUBART, C.; FELDMAN, G.; MOGERILEVSKY, N. y ROGIER, E. (1981).- "Synchronous increase of four acute phase proteins synthesized by the same hepatocytes during the inflammatory reaction. A combined biochemical and morphological kinetics study in the rat". Lab. Invest. 44, 105-115.
- CRAMEN, J.M.; MILLER, J.A. y MILLER, E.C. (1960).- "N-hydroxylation: a new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-acetylaminofluorene". J. Biol. Chem. 235, 885.
- CREASEY, W.A. (1979).- "Drug disposition in humans". Oxford University Press. Oxford., pag. 109-112.
- DAMAS, J. y BOURDON, J. (1982).- "Inhibition de la libération d'enzymes lysosomiales par l'indometacine in vivo". Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, 176 (5), pag. 744.

- DAVISON, A.N. (1954).- "Conversion of Schradas and parathion by an ényzyme system of the rat liver". Nature 174, 1056.
- DAWSON, J.H.; ANDERSSON, L.A. y SONO, M. (1980).- "Spectroscopic investigations of ferric cy tichrome P- 450 CAM ligand complexes". J. Biol. Chem. 257, 3606-3617.
- DEAN, W.L. y COON, M.J. (1977).- "Immunochemical studies on two electrophoretically homogeneous forms of rabbit liver microsomal cytochrome P-450: P-450LM<sub>2</sub> and P- 450LM<sub>4</sub>". J. Biol. Chem. 252, 3255.
- DE MATTEIS, F. y SPARKS, R.G. (1973).- "Iron-dependent of liver cytochrome P-450 haem in vivo and in vitro". FEBS LETTERS 29, 141.
- DE PIERRE, J.W. y ERNSTERL, L. (1977).- "Enzyme topology of intracellular membranes". Ann. Rev. Biochem. 46, 201- 262.
- ERILL, S. (1981).- "Problemas que se plantean en la admistración de medicamentos a pacientes con insuficiencia renal o hepática". Avances en terapeutica 10. Ed. Salvat. Barcelona, pag. 156-170.
- ELLIN, A.; JAKOBSON, S.; SHENKMAN, J.B. y ORRENIUS, S. (1972). "Cytochrome P-450k of the rat kidney cortex microsomes: its involvement in fatty acid  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation". Arch. Biochem. Biophys. 150, 64.
- ELSHOURBAGY, N.A. y GUZEBIAN, P.S. (1980).- "Separation, purification and characterization of a nowel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16- $\alpha$ -carbonitril". J. Biol. Chem. 255, 1279-1285.

- ESTABROOK, R.W.; COOPER, D.Y. y ROSENTHAL, D. (1963).-  
"Properties of microsomes and ribosomes from thymus".  
Bichem. Z. 338, 741.
- ESTABROOK, R.W.; FRANKLIN, M.R. y HILDEBRANDL, A. (1970).-  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 174, 218.
- ESTABROOK, R.W. y WENINGLOER J. (1978).- en "The induction  
of drug metabolism". (Estabrook, R.W. y Lindenbaub, E. Eds.).  
Schattanen-Verlag, Stuttgart and New York. Pag. 187- 199.
- FERREIRA, S.H. y VANE, J.R. (1974).- "New aspects of the  
mode of action of non-steroid anti-inflammatory drugs".  
Ann. Rev. Pharmacol. 14, 57.
- FORD-HUTCHINSON, A.W.; WALKER, J.R.; CONNOR, N.S.; OLIVE,  
A.M. y SMITH, M.J.H. (1979).- "Separate anti-inflammatory  
effects of indomethacin, flurbiprofen and benoxaprofen".  
J. Pharm. Pharmacol. 29, 372.
- FOUTS, J.R. y BRODIE, B.B. (1957).- "The enzymatic reduc-  
tion of chloramphenicol, p-nitrobenzoic acid and other  
aromatic nitro compounds in mammals". J. Pharmacol. Exp.  
Therap. 119, 197.
- FUJITA, S.; KITAGAWA, H.; TSAI, S.G.; SUZUKI, M.; MATSUNAGA,  
T.; TATSUMU, J.; KATO, M.; NISHIHARA, E.; FUNAMURA, M.;  
SUZUKI, T. y KITAMI, K. (1983).- "Age-associated change  
in hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activities".  
J. Pharm. Dyn. 6, S-88.
- GARFINKEL, D. (1963).- Comp. Biochem. Physiol. 8 , 367.
- GELBOIN, H. V. (1980).- "Benzo( $\alpha$ ) pyrene metabolism, acti

- vation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes". *Physiol. Rev.*, 60, 1166.
- GILLETTE, J. R. (1959).- "Side chain oxidation of alkyl substituted ring compounds". *J. Biol. Chem.*, 234, 139.
  - GLENN, E. M.; BOWMAN, B. J. y KOSLOUSKE, T. C. (1968).- "The systemic response to inflammation". *Biochem. Pharmacol.*, 17, S-27.
  - GORESKY, C. A.; HADDAD, H. H.; KLUGER, W. S.; NADEAN, B. E. y BACH, G. G. (1974).- *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52, 389.
  - GOTOH, O.; TAGASHIRA, Y.; IIXUKA, T. y FUJII-KURIYAMA, Y. (1983).- "Structural characteristics of Cyt. P<sub>450</sub>. Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino-acid sequences". *J. Biochem.*, 93, 807.
  - GRAF, H.; RUF, H. H. y ULHRICH, V. (1983).- "Prostacyclin Synthase a Cyt. P<sub>450</sub> enzyme". *Angewandte Chemie*, 22, 487.
  - GRAY, R. (1983).- "Kinetics and mechanism of CO binding to Cyt. P<sub>450</sub> and P<sub>450</sub><sup>LM<sub>4</sub></sup>". *J. Biol. Chem.*, 258, 3764.
  - GRIFFIN, B. W. y TING, P. L. (1978).- "Mechanism of N-demethylation of aminopyrine by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase, metmyoglobin and protohemin". *Biochem.*, 17, 2206.
  - GRIFFIN, B. W.; MARTH, C.; YASUKOCHI, Y. y MASTERS, B. S. S. (1980).- "Radical mechanisms of aminopyrine oxidation by cumene hydroperoxide catalyzed by purified liver microsomal Cyt. P<sub>450</sub>". *Arch. Biochem. Biophys.*, 205, 543.
  - GUENGERICH, F. P. (1978).- "Separation and purification of

- multiple forms of microsomal Cyt. P<sub>450</sub>. Partial characterization of three apparently homogeneous Cyts. P<sub>450</sub> prepared from livers of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treated rats". J. Biol. Chem., 253, 7931.
- GUENGERICH, F. P. (1982).- "Microsomal enzymes involved in toxicology". Ed. A. Wallace Hayes. Raven Press, New York, 609-634.
  - GUM, J. R. y STOBEL, H. N. (1979).- J. Biol. Chem., 254, 4177.
  - HAYAISHI, O. (1962).- Oxigenases. Academic Press, New York, 1-29.
  - HAMILTON, G. A. (1974).- Molecular mechanisms of Oxigen activation. Academic Press, New York, 405-451.
  - HANSSON, R. y WIKVALL, K. (1979).- "Properties of reconstituted cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase system from rat and rabbit liver microsomes". Eur. J. Biochem., 93, 419.
  - HANSSON, R. y WIKVALL, K. (1980).- "Hydroxylations in biosynthesis and metabolism of bile acids. Catalytic properties of different forms of Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 255, 1643.
  - HANSSON, R. y WIKVALL, K. (1982).- "Hydroxylations in Biosynthesis of bile acids". Eur. J. Biochem., 125, 423.
  - HAUGER, D. A.; COON, H. J. y NEBERT, D. W. (1976).- "Induction of Multiple forms of mouse liver Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 251, 1817.
  - HELLEBERY, L. (1981).- "Clinical pharmacokinetics of indomethacin". Clin. Pharmacokinet. 6, 245.
  - HIRSHELMANN, R.; SCHADE, R. y BEKERNEIER, H. (1981).- "The modulation of inflammation by the acute phase reaction in adjuvant arthritis of rats". Agents Actions, 11, 642.

- HOLTZMAN, J. (1972).- "Metabolism of drug by isolated hepatocytes". *Biochem. Pharmacol.*, 21, 581.
- IIZUKA, T.; KOTANI, M. y YONETANI, T. (1971).- "Magnetic susceptibility measurements of Cyt. C peroxidase and its complexes". *J. Biol. Chem.*, 246, 4731.
- IMAI, Y.; ITO, A. y SATO, R. (1966).- "Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction". *J. Biochem.*, 60, 417.
- IMAI, Y. y SATO, R. (1974).- "A gel-electrophoretically homogeneous preparation of Cyt. P<sub>450</sub> from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 60, 8.
- IMAI, Y. y SATO, R. (1977).- "The roles of Cyt. b5 in a reconstituted N-demethylase system containing Cyt. P<sub>450</sub>". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 75, 240.
- IMAI, Y. (1978).- *Cyt. P<sub>450</sub>*. Academic Press, New York, 37-72.
- IMAI, Y. (1981).- *J. Biochem. (Tokyo)*, 84, 351.
- ISHIZUKI, S.; FURUHATA, K.; KANETA, S. y FUJIHIRA, F. (1983).- "Reduced drug metabolism in isolated hepatocytes from adjuvant arthritic rats". *Res. Comm. in Chem. Pathol. Pharmacol.*, 39, 261.
- ITO, A. y SATO, R. (1968).- "Purification by means of detergents and properties of Cyt. b5 from liver microsomes". *J. Biol. Chem.*, 243, 4922.
- IYANAGI, T. y MASON, H. S. (1973).- "Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate-Cyt C-reductase". *Biochem.*, 12, 2297.

- IYANAGI, T.; MAKINO, N. y MASON, H. S. (1974).- Biochem. 13, 1701.
- IYANAGI, T.; AWAN, F. K.; IMAI, Y. y MASON, H. S. (1978).- Biochem., 17, 2224.
- JAMIESON, J. C.; KUTRYK, M.; WOLOSKY, B.M.R.N.J. y KAPLAN, H.A. (1982).- "Studies on the effect of indomethacin and sulfinpyrazone in the rates of synthesis of albumin and acute-phase  $\alpha_1$ -acid glycoprotein by rat liver slices". Biochem. Med., 28, 176.
- JAMIESON, J. C. y KUTRYK, M. (1980).- "Studies on the effect of phenylbutazone and salicylate on the rates of synthesis of albumin and acute-phase  $\alpha_1$ -acid glycoprotein by rat liver slices". Biochem. Med., 23, 293.
- JEFFERY, E.; KOTAKE, A.; el AZHARY, R. y MANNERING, G.J. (1976).- Microsomes and drug oxidations. Ed. Ulhrich U., I. Roots, A. Hildebrant, R.W. Estabrook y A.H. Conney. Pergamon Press, New York, 323-330.
- JEFFERY, E. y MANNERING, G.J. (1979).- Mol. Pharmacol. 15, 396.
- JOHNSON, E. F. (1979).- Reviews in Biochemical Toxicology. Eds. E. Hodgson, J. R. Bend y R. M. Philpot. Elsevier Publ., Amsterdam, 1-26.
- KAMATAKI, T.; BELCHER, D. A. y NEAL, R. A. (1976).- "Studies of the metabolism of diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) and benzphetamine using and apparently homogeneous preparation of rat liver Cyt. P<sub>450</sub>: effect of a Cyt. P<sub>450</sub> antibody preparation". Mol. Pharmacol., 12, 921.
- KAMATH, S. A.; KUMMEROW, F. A. y NARAYAN, K. A. (1971).- "A single procedure for the isolation of rat liver microsomes". FEBS Letters, 17, 90.

- KIESE, M. y UERLEKE, H. (1961).- "Zwei Wege der Entmethylierung von N-methylaminin durch Mikrosomen aus Rattenlebern". Naturwissenschaften, 48, 379.
- KOCH-WESER, J. (1980).- "Nonsteroidal antiinflammatory drugs". New Engl. J. Med., 302, 1179.
- KOHN, J. (1957).- "A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis". Clin. Chim. Acta., 2, 297.
- KNAPP, J.A.; DIGNAM, J. O. y STROBEL, H. W. (1977).- "NADPH-Cyt. P<sub>450</sub>-reductase". J. Biol. Chem., 251, 437.
- KUNTZMAN, R.; JACOBSON, M.; SCHNEIDMAN, K. y CONNEY, A. H. (1964).- "Similarities between oxidative drug-metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes". J. Pharmacol. Exp. Therap., 146, 280.
- KUPFER, D. y LEVIN, E. (1972).- "Monoxygenase drug metabolizing activity in CaCl<sub>2</sub>-aggregated hepatic microsomes from rat liver". Biochem. Biophys. Res. Comm., 47, 611.
- KUREBAYASHI, H.; TANAKA, A. y YAMAHA, T. (1982).- "Oxygen-18 studies on the oxidative deamination mechanism of alicyclic primary amines in rabbit liver microsomes". Arch. Biochem. Biophys., 215, 433.
- LEVI, J.; SHERLOCK, S. y WALKER, D. (1968).- Lancet, 1275.
- LEVINE, W. C. (1982).- "Glutathione, lipid-peroxidation and regulation of Cyt. P<sub>450</sub> activity". Life Sciences, 31, 779.
- LOWE, J. S. (1964).- "Serum protein changes in rats with arthritis induced by mycobacterial adjuvant". Biochem. Pharmacol., 13, 633.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROURHG, N. J.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951).- "Protein measurement with the folin phenol reagent". J. Biol. Chem., 193, 265.

- LU, A. Y. y WEST, S. B. (1980).- "Multiplicity of mammalian microsomal Cits. P<sub>450</sub>". Pharmacol. Rev., 31, 277.
- MADYASTHA, K. M.; MEEHAN, T. D. y COSCIA, C. J. (1976).- "Characterization of a Cyt. P<sub>450</sub> dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant Vinca Rosea". Biochem., 15, 1097.
- MARILMAN, R. B.; BARTHALMAS, G. T.; MUSE, K. y HODGSON, E. (1977).- Gen. Pharmacol., 8, 275.
- MAINES, M. D. y ANDERS, M. W. (1973).- "Characterization of the Heme of Cyt. P<sub>450</sub> using Gas Chromatography Mass Spectrometry". Arch. Biochem. Biophys., 159, 201.
- MAKINO, I. y NAKAWAYA, S. (1978).- J. Lipid Res., 19, 723.
- MASON, H.S.; NORTH, J. C. y VANNESTE, M. (1965).- Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 1072.
- MASTERS, B. S. S.; KAMIN, H.; GIBSON, Q. H. y WILLIAMS, C. H. (1965).- "Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-Cit. C-reductase". J. Biol. Chem. 240, 921.
- MATHUR, P. P.; SMYTH, R. D.; HERCZEG, T. y REAVEY<sup>4</sup>CANTWELL, N. H. (1976).- "Induction of hepatic enzymes by methaqualone and effect on warfarin-induced hypoprothrombinemia". J. Pharmacol. Exp. Ther., 196, 204.
- MEIGS, R. A. y RYAN, K. J. (1968).- Biochem. Biophys. Acta. 165, 470.
- MIWA, G. T.; WEST, J. B. y LU, A. Y. (1978).- "Studies on the rate-limiting enzyme component in the microsomal monooxygenase system". J. Biol. Chem., 253, 1921.

- MORTON, D. M. y CHATFIELD, D. H. (1970).- "The effects of adjuvant-induced arthritis on the liver metabolism on drugs in rats". *Biochem. Pharmacol.*, 19, 473.
- MURPHY, P. J. y WEST, C. A. (1969).- *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 395.
- NASH, T. (1953).- "The colorimetric estimation of formaldehyde of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature". *J. Biol. Chem.*, 239, 2370.
- NEBERT, D. W.; FELTON, S. S. y ROBINSON, J. R. (1975).- *Proc. Eur. Soc. Toxicol.*, 16, 82.
- NEBERT, D. W.; EISEN, H. J.; NEGISHI, M.; LANG, M. A. y HJELMELAND, L. M. (1981).- "Genetic mechanism controlling the induction of polysubstrate monooxygenase P<sub>450</sub>-activities". *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 431.
- NEGISHI, M. y KREIBICH, G. (1978).- "Coordinated polypeptide synthesis and insertion of protoheme in Cyt. P<sub>450</sub> during the development of endoplasmic reticulum membranes". *J. Biol. Chem.*, 253, 4791.
- NISHIBAYASHI, H.; OMURA, T.; SATO, R. y ESTABROOK, R. W. (1968).- *Structure and Function of Cytochromes*. Ed. K. Okumuki, K. D. Kamen y I. Sekuzu, Univ. Tokyo Press, Tokyo, 658.
- NOBREGA, F. C. y OZOLS, J. (1971).- "Amino-acid sequences of tryptic peptides of Cyt. b5 from microsomes of human, monkey, porcine and chicken livers". *J. Biol. Chem.*, 246, 1706.
- OMURA, T. y SATO, R. (1962).- *J. Biol. Chem.*, 237, 1375.
- OMURA, T. y SATO, R. (1964).- "The carbon Monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein

- nature". J. Biol. Chem., 239, 2370.
- OPRIAN, D. D. y COON, M. J. (1982).- J. Biol. Chem., 257, 8435.
  - ORRENIUS, S. (1976).- Proc. of The Sixth International Congress of Pharmacology. Ed. N. T. Karki. Pergamon Press, Oxford, 39.
  - OSHINO, N.; IMAI, Y. y SATO, R. (1967).- Proc. of the Seventh International Congress of Biochemistry. Tokyo, 725.
  - PETERSON, J. A.; EBEL, R. E.; O'KEEFFE, D. H.; MATSUBARA, T. y ESTARBROOK, R. W. (1976).- "Temperature dependence of Cyt. P<sub>450</sub> reduction. A model for NADPH-Cyt. P<sub>450</sub>-reductase: Cyt. P<sub>450</sub> interaction". J. Biol. Chem., 251, 13.
  - PHILIPS, J. R.; SHEPHARD, E. A.; BAYNEY, R.H.; PIKE, J. F.; RABIN, B. R.; HEATH, R. y CARTER, N. (1983).- "Induction and repression of the major phenobarbital-induced cytochrome P<sub>450</sub> measured by radioimmunoassay". Biochem. J., 212, 55.
  - POLAND, A. P.; GLOVER, E.; ROBINSON, J. R. y NEBERT, D. W. (1974).- "Genetic expression of aryl hydrocarbon hydrolase activity". J. Biol. Chem., 249, 5599.
  - POTTS, J. R. M.; WEKLYCH, R. y COON, E. E. (1974).- "The 4-hydroxylation of cinnamic acid by *Sorghum* microsomes and the requirements for Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 249, 5019.
  - PUNZIL, M. D.; MAZZI, A.; TONON, R.; BAGGID, B.; BURSATTI, A. y TODESCOS, M. D. (1982).- "Influence of diflunisal and indomethacin on synovial fluid levels of AMPc and GMPd: relationship with inflammation and pain". Curr. Ther. Res., 32, 6.
  - RAHIMTULA, A. D.; O'BRIEN, P. J.; SEIFRIED, H. E. y JERINA, D. H. (1978).- "The mechanism of action of Cyt. P<sub>450</sub>. Occurrene

- ce of the "NIH shift" during hydroperoxide-dependent aromatic hydroxylations". *Eur. J. Biochem.*, 89, 133.
- RASMUSSEN, L. F.; AHLFORS, C. E. y WEINBERG, R. P. (1978).- "Displacement of bilirrubin from albumin by indomethacin". *J. Clin. Pharm.* 18, 477.
  - RHYMER, M. y GEWGOS, D. C. (1979).- "Indomethacin". *Clin. Rheum. Dis.*, 5, 541.
  - RIMBAU, V. y FORN, J. (1983).- "Estudios farmacocinéticos de la delmetacina y la indometacina en la rata". *Arch. Farmacol. Toxicol.* (en prensa).
  - ROBERTSON, I. C. C.; ZEIGER, E. y GOLDSTEIN, J. A. (1983).- "Specificity of rat liver Cyt. P<sub>450</sub> isozymes in the mutagenic activation of benzo(alpha)pyrene, aromatic amines and aflatoxin B". *Carcinogenesis*, 4, 93.
  - ROBINSON, D. R.; MCGUIRE, M. B.; BASTIAN, D.; KANTROWITZ, F. y LEVINE, L. (1979).- "The effects of anti-inflammatory drugs on prostaglandin production by rheumatoid synovial tissue". *Prostaglandins Med.* 1, 461.
  - ROBINSON, D. R.; TASHJIAN, A. H. y LEVINE, L. (1975).- "Prostaglandin-induced bone resorption by rheumatoid synovia". *Trans. Assoc. Am. Phys.* 88, 146.
  - RONNE, A.; BRAMM, E. y ARRIGONI-MARTELLI, E. (1981).- "Chronic inflammation in adjuvant arthritic rats correlates with enhancement of 12-L-HETE-synthesis". *Les Colloques de l'INSERM, Pharmacol. of Inflammation and Allergy*. Ed. F. Russo, B. B. Vargafling y J. Benveniste. *INSERM*, 100, 191-195.
  - RYAN, D. E.; THOMAS, P. E.; KORZENIOWSKI, D. y LEVIN, W. (1979)

- "Separation and characterization of highly purified forms of liver rat treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital and 3-methylcolanthrene". J. Biol. Chem., 254, 1365.
- RYAN, D. E.; THOMAS, P. E. y LEVIN, W. (1980).- "Hepatic microsomal cytochrome P<sub>450</sub> from rats treated with isosafrole. Purification and characterization of four enzymic forms". J. Biol. Chem., 255, 7941.
  - SALZMAN, N. P. y BRODIE, B. B. (1956).- "Physiological disposition and fate of chlorpromazine and a method for its estimation in biological material". J. Pharmacol. Exp. Ther. 118, 46.
  - SATO, R. y KATO, R. (1982).- Microsomes, drug oxidations, and drug toxicology. Japan Scien. Press, Tokyo.
  - SCHERMER, S. (1967).- The blood morphology of laboratory animals". Davis Co. Publ., Philadelphia.
  - SCHULZE, H. V. y STAUDINGER, H. (1971).- Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 352, 1659.
  - SHANKARAN, S.; PANTOJA, A. y POLAND, R. L. (1982).- "Indomethacin and bilirubin-albumin binding". Dev. Pharmacol. Ther. 4, 124.
  - SHANNON, P. y BRUICE, T. C. (1981).- "A novel P<sub>450</sub> model system for the N-dealkylation reaction". J. Am. Chem. Soc., 103, 4580.
  - SHEPHARD, E. A.; PHILLIPS, I. R.; BAYNEY, R. M.; PIKE, S. F. y RABIN, B. R. (1983).- "Quantification of NADPH-Cyt. P<sub>450</sub>-reductase in liver microsomes by a specific radioimmunoassay technique". Biochem. J., 211, 333.

- SINGER, S. J. y NICHOLSON, G.L. (1972).- "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes". *Science*, 175, 720.
- SMITH, J. B. y WILLIS, A. L. (1971).- "Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets". *Nature*, 231, 235.
- SPECTOR, W. G. y WILLOUGHBY, D. A. (1968).- *The Pharmacology of Inflammation*. English Univ. Press Ltd., Londres.
- SPENCTOR, E. y SHIDEMAN, F. E. (1959).- "Metabolism of thio-pyrimidine derivatives: thiamidal, thiopental and thiouracil". *Biochem. Pharmacol.*, 2, 182.
- STRITTMATER, C. F. y UMBERGER, F. T. (1969).- *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 18.
- SUGIYAMA, T.; MIKI, N. y YAMANO, T. (1980).- *J. Biochem. (Tokyo)*, 87, 1457.
- TAJIMA, S.; ENOMOTO, K. y SATO, R. (1978).- "Nature of tryptic attack on cytochrome b5 and further evidence for the two domain structure of the cytochrome molecule". *J. Biochem.*, 84, 1573.
- TAKEMORI, A. E. y MANNERING, G. J. (1958).- "Metabolic N- and O-demethylation of morphine and morphinan-type analgesics". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 123, 111.
- TAKESUE, Y. y SATO, R. (1968).- *J. Biochem.*, 64, 885.
- TESTA, B. y JENNER, P. (1976).- *Oxidative N-dealkylation. In Drug Metabolism Chemical and Biochemical Aspects*. Marcel Dekker Ed., New York, 82-97.

- TREFOVEL, J. et Mme.; NITTI, F. y BOVET, D. (1935).- "Activité du p-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques experimentales de la souris et du lapin". Compt. Rend. 120, 756.
- TREŠĆEC, A.; ISKRIĆ, S.; HRSAK, I. y TOMASIĆ, J. (1983).- "Effect of immunoadjuvant peptidoglycan monomer on liver Cyt. P<sub>450</sub>". Biochem. Pharmacol., 32, 2354.
- TRUMP, B. F.; DUTTERA, S. M.; BYRNE, W. L. y ARSTILA, A. U., (1970).- Proc. Soc. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 433.
- TSUJI, H.; MORTON, E. y ULHRICH, V. (1980).- "Separation and purification of liver microsomal monooxygenases from induced and untreated pigs". Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 361, 681.
- ULHRICH, V. y KREMERS, R. (1977).- Arch. Toxicol., 39, 44.
- ULHRICH, V. y HAURAND, M. (1982).- Thromboxane Synthase as a Cytochrome P<sub>450</sub> Enzyme. En Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene. Plenum Press, New York.
- Van der HOEVEN, I. A.; HANGEN, D. A. y COON, M. J. (1974).- "Cyt. P<sub>450</sub> purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: catalytic activity and other properties". Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 569.
- VANE, J. R. (1974).- "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs". Nature, 231, 232.
- VATSIS, K. J.; THEOHARIDES, A. D.; KUPFER, D. y COON, M. J. (1982).- "Hydroxylation of prostaglandins by inducible isoenzymes of rabbit liver microsomal Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 257, 11221.

- VERMILLION, J. L. y COON, M. J. (1978).- "Purified liver microsomal NADPH-Cyt. P<sub>450</sub>-reductase". J. Biol. Chem., 253, 2694.
- WATERMAN, M. R. y MASON, H. S. (1972).- "Redox properties of liver Cyt. P<sub>450</sub>". Arch. Biochem. Biophys., 150, 57.
- WATTENBERG, L. W. (1972).- "Dietary modification of intestinal and pulmonary aryl hydrocarbon hydrolase activity". Toxicol. Appl. Pharmacol., 23, 741.
- WAXMAN; D. J. y WALSH, C. (1982).- "Phenobarbital-induced rat liver Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 257, 10446.
- WAXMAN, D. J., KO, A. y WALSH, C. (1982).- Testosterone hydroxylations catalyzed by purified rat liver Cyt. P<sub>450</sub> isozymes, en Cyt. P<sub>450</sub>, Biochemistry, Biophysic and Environmental Implications. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- WEISS, B. y HAIT, W. N. (1977).- "Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor as potential therapeutic agents". Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17, 441.
- WEISSMANN, G.; DUKOR, P. y ZURIER, R. B. (1971).- "Effect of cyclic-AMP on release of lysosomal enzymes from phagocytes". Nature 231, 131.
- WHITE, R. E. y COON, M. J. (1980).- "Oxygen activation by Cyt. P<sub>450</sub>". Annual Rev. Biochem., 49, 315.
- WHITE, R. E. y COON, M. J. (1982).- "Heme ligand replacement. Reactions of Cyt. P<sub>450</sub>". J. Biol. Chem., 257, 3073.
- WU, C. y MATHEUS, K. P. (1983).- "Indomethacin inhibition of glutathione S-transferases". Biochem. Biophys. Res. Comm. 112, 980.

- YASUKOCHI, Y. MASTERS, B. S. S. (1976).- "Some Properties of a detergent-solubilized NADPH-Cyt. C (Cyt. P<sub>450</sub>)-reductase purified by biospecific affinity chromatography". J. Biol. Chem., 251, 5337.
- YOSHIDA, Y. (1983).- "Studies on the relationship between the spin-state and the heme environment of ferric cytochrome P<sub>450</sub>". J. Pharm. Dyn., 6, S-89.
- ZIEGLER, M.; BLANCK, J. y RUCKPAUL, K. (1982).- "Spin equilibrium relaxation kinetics of Cyt. P<sub>450</sub> LM<sub>2</sub>". FEBBS Letters 150, 219.
- ZINI, R.; D'ATHIS, P.; BARRE, J. y TILLEMENT, J. P. (1979).- "Binding of indomethacin to human serum albumin. Its non-displacement by various agents; influence of free fatty acids and the unexpected effect of indomethacin on warfarin binding". Biochem. Pharmac. 28, 2661.