



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

---

Efecto de 5-aza-2'-deoxicitidina sobre la actividad  
de CYP1A hepático en el modelo de *Rattus norvegicus*

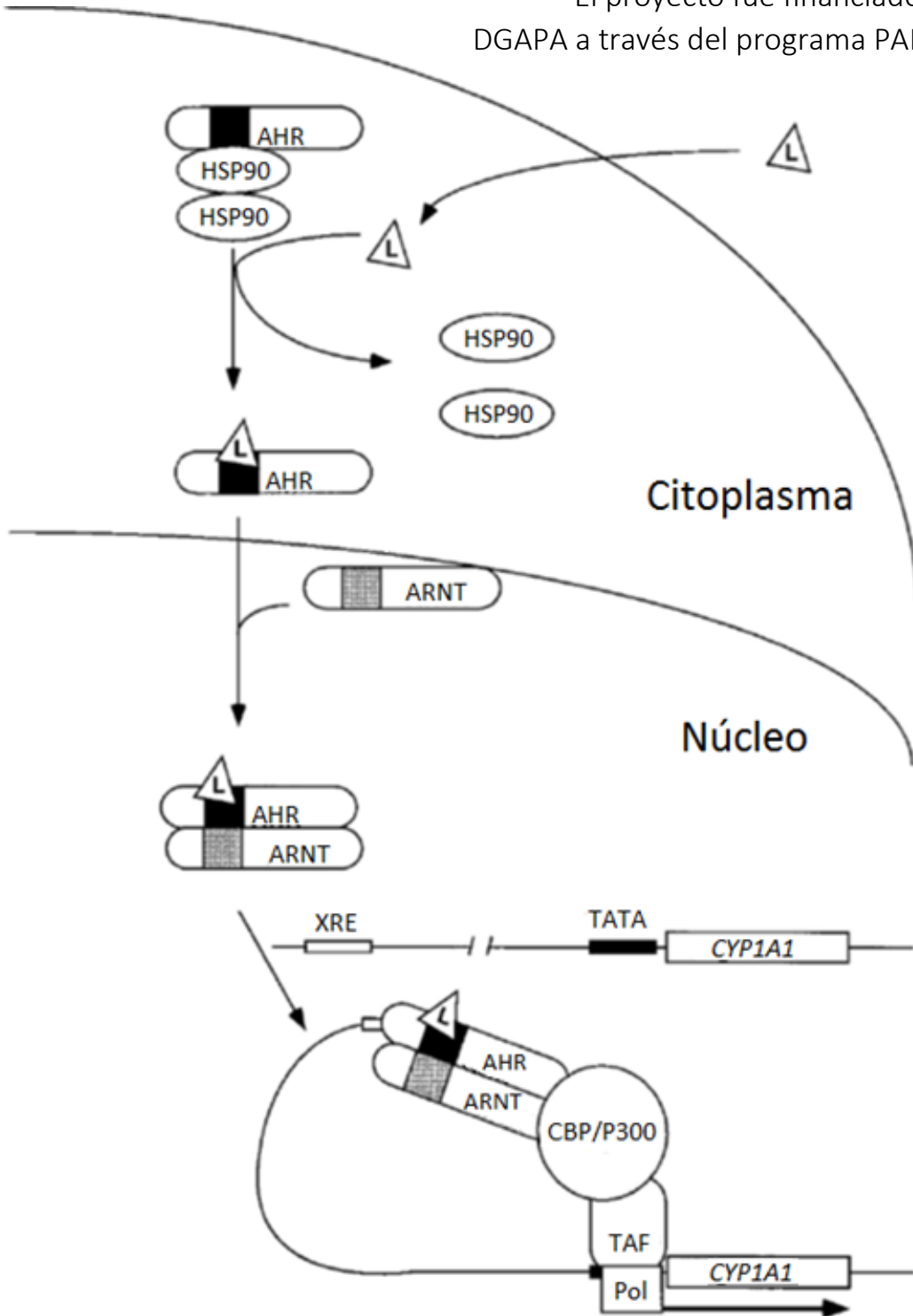
TESIS  
Para obtener el título de Biólogo

Presenta  
Oscar Samuel Avila Rosales

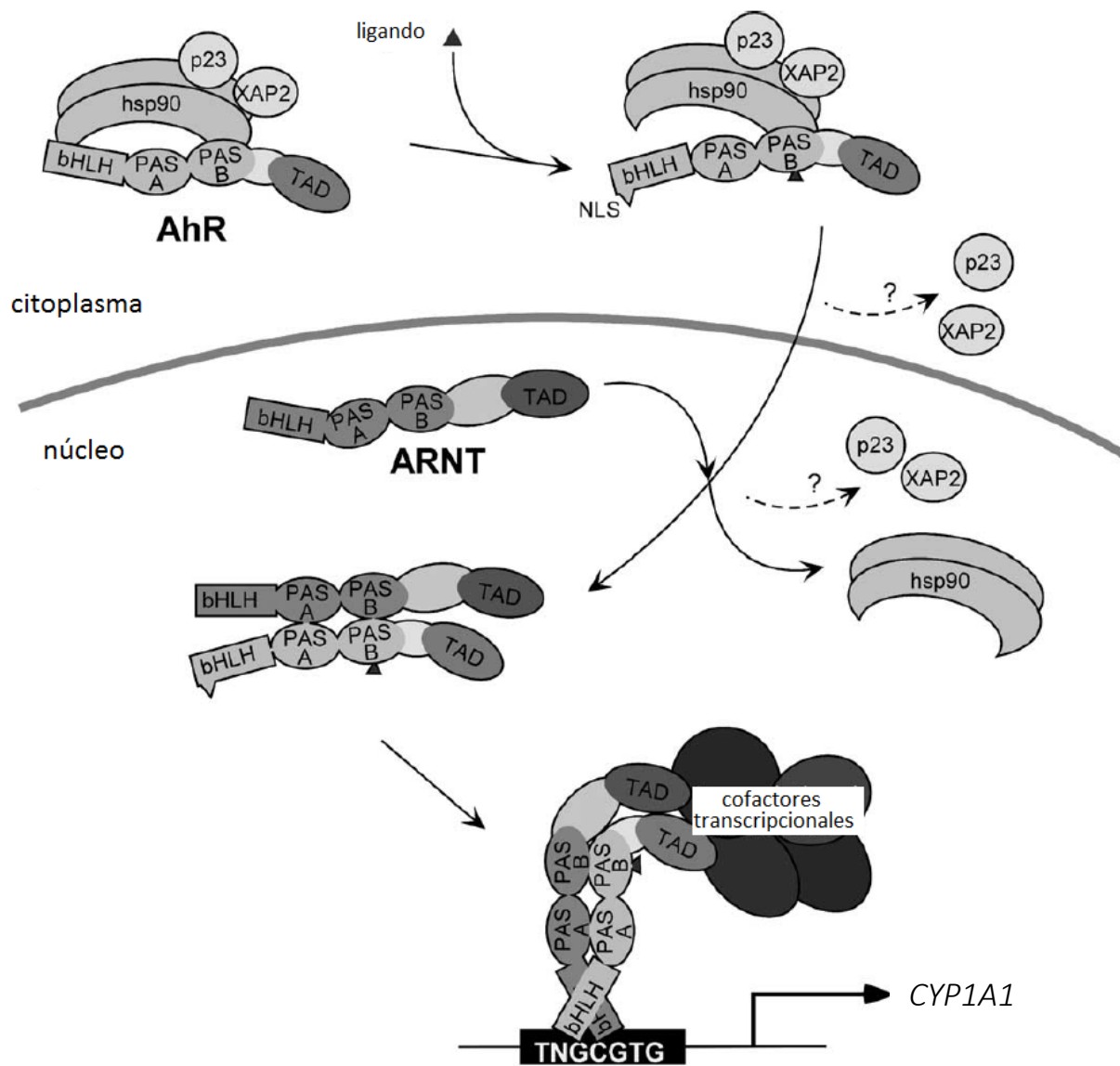
Director: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre  
Asesor: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

2014

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Bajo la tutela del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre. El proyecto fue financiado por la DGAPA a través del programa PAPIIT-IN206212.



Este trabajo está dedicado a todos los organismos involucrados en el desarrollo del mismo.



Índice	
Resumen	i
<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
1 Citocromos P450	1
1.1 CYP1A	3
1.1.1 CYP1A1	3
1.1.2 CYP1A2	4
1.2 Inductores de CYP1A	5
1.3 Receptor Aryl hidrocarburo	6
1.4 5-aza-2'deoxicitidina	8
<b>II Planteamiento del problema</b>	<b>9</b>
<b>III Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>IV Objetivos</b>	<b>10</b>
4 General	10
4.1 Particulares	10
<b>V Método</b>	<b>11</b>
5 Modelo biológico	11
5.1 Tratamientos	11
5.2 Determinación de niveles de ARNm de <i>CYP1A1</i> en hígado de rata	12
5.3 Preparación de la fracción microsomal de hígado de rata	13
5.4 Cuantificación de proteínas de la fracción microsomal de hígado de rata	13
5.5 Inmunodetección de CYP1A en la fracción microsomal de hígado de rata	13
5.6 Evaluación de la <i>O</i> -desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata	14
5.8 Análisis estadístico	14
<b>VI Resultados</b>	<b>14</b>
6.1 Determinación de niveles de ARNm de <i>CYP1A1</i> de hígado de rata	15
6.2 Inmunodetección de CYP1A en la fracción microsomal de hígado de rata	16
6.3 Evaluación de la <i>O</i> -desalquilación de EROD y MROD de la fracción microsomal de hígado de rata	17
<b>VII Discusión</b>	<b>18</b>
<b>VIII Conclusiones</b>	<b>21</b>
<b>IX Perspectivas</b>	<b>21</b>
<b>X Referencias</b>	<b>22</b>

## Resumen

Los citocromos P450 (CYP) forman una superfamilia de hemoproteínas que catalizan la monooxigenación de diferentes endobióticos y xenobióticos. Existen aproximadamente 57 familias presentes en vertebrados, de las cuales la CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4 se expresan principalmente en hígado encargándose del metabolismo de xenobióticos. La expresión hepática de CYP1A (CYP1A1 y CYP1A2) tiene un alto impacto a nivel sistémico, pues bioactiva xenobióticos que están asociados con la iniciación de la carcinogénesis, como el benzo [a] pireno (B[a]P); y este a su vez este modula la expresión de CYP1A por medio del receptor aryl hidrocarburo (AhR).

Por otro lado, se sabe que la 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadc) impide la metilación del ADN promoviendo un aumento en la expresión de múltiples genes en diferentes tipos celulares. Previamente en nuestro laboratorio, se detectó un aumento en la expresión del ARNm de *CYP1A1* por efecto del tratamiento con 5azadc mas B[a]P en la línea celular de hepatocitos de rata C9 (Olgúin *et al.*, 2014). En este sentido, nos interesó determinar si la administración de 5azadc mas B[a]P *in vivo* influye en la expresión de CYP1A.

Empleando a la rata como modelo biológico, se procedió a realizar cuatro tratamientos por vía intraperitoneal: al primer grupo solo se administró los vehículos; el segundo grupo recibió 0.2 mg/kg de 5azadc por cinco días; el tercer grupo recibió 50 mg/kg de B[a]P; el cuarto grupo recibió 0.2 mg/kg de 5azadc por cinco días y el quinto día además recibió 50 mg/kg de B[a]P.

Se realizó el sacrificio 24 h después del último tratamiento y se obtuvo el hígado; del cual se conservó un segmento para el análisis de ARNm de *CYP1A1* y del resto se obtuvo la fracción microsomal. A partir de la fracción microsomal se realizó la inmunodetección de CYP1A1 y CYP1A2; y la evaluación de la *O*-desalquilación de etoxiresorufina para CYP1A1 y de metoxiresorufina para CYP1A2.

Después del tratamiento con 5azadc, se detectó un aumento en la transcripción de *CYP1A1* con respecto al grupo control ( $P \leq 0.05$ ); mientras que la proteína no fue detectable al igual que en el grupo control; pero en la evaluación de la actividad de *CYP1A1* se observó una disminución en el tratamiento con 5azadc con respecto al grupo control ( $P \leq 0.05$ ). Como previamente se ha descrito, el B[a]P aumentó la transcripción de *CYP1A1*, lo cual se vio reflejado en la inmunodetección y su respectiva actividad. El tratamiento con 5azadc en combinación con B[a]P, no presentó cambio en la transcripción de *CYP1A1* con respecto al tratamiento con solo B[a]P; pero sí un aumento a nivel de proteína y de su actividad con respecto al tratamiento consistente en solo B[a]P ( $P \leq 0.05$ ).

La expresión de *CYP1A2* a nivel de proteína no fue detectable en el tratamiento con 5azadc al igual que en el control; mientras que la actividad no mostró un cambio entre estos grupos. Como previamente se ha descrito el B[a]P promueve la expresión de *CYP1A2*, y esta tendencia se reflejó tanto en la inmunodetección como en su respectiva actividad; de forma interesante el tratamiento de 5azadc en combinación con B[a]P, mostró una disminución a nivel de proteína y de actividad con respecto al tratamiento con solo B[a]P ( $P \leq 0.05$ ). Por lo que se puede concluir que existe un efecto potenciador de 5azadc sobre la inducción de *CYP1A1* por B[a]P, pero disminuye la expresión de *CYP1A2*.

# I Introducción

## 1 Citocromos P450

Los citocromos P450 forman una superfamilia de hemoproteínas catalíticas en la cual se encuentran más de 6000 miembros. El término “citocromo P450” es debido a que estas proteínas presentan una banda de absorción prominente cercana a 450 nm cuando su forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) está ligada con el monóxido de carbono (CO) (Omura y Sato, 1964; Zeldin y Seubert, 2008).

El origen de los citocromos P450 se encuentra presuntamente en los procariotes, antes de la acumulación de oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) en la atmósfera. En mamíferos se expresan en la mayoría de los órganos, siendo el hígado el que expresa mayor número de citocromos P450. A nivel celular los citocromos P450 comúnmente están anclados en el retículo endoplasmático (Figura 1) (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

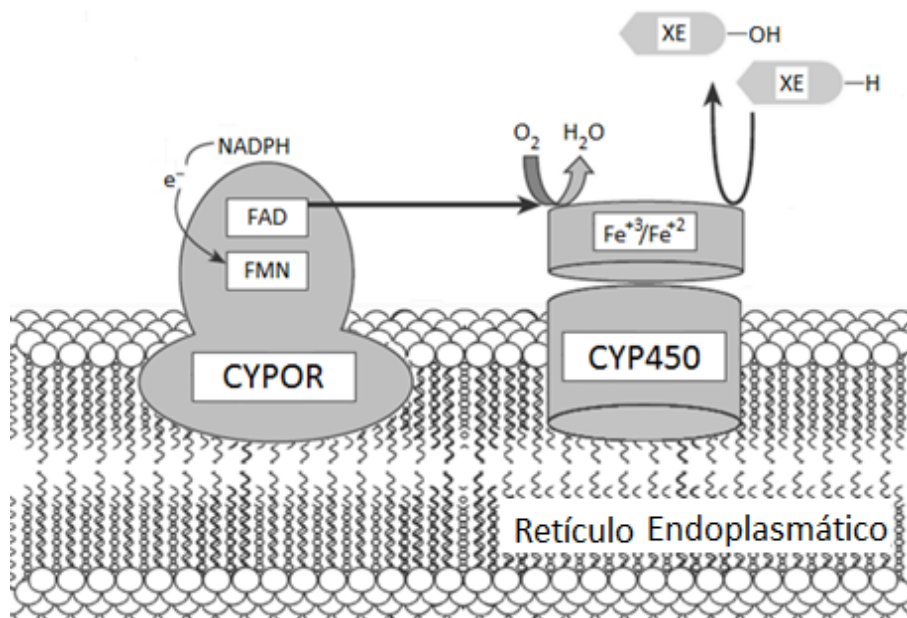


Figura 1 Esquema representativo de la asociación del citocromo P450 al retículo endoplasmático y del ciclo catalítico de los citocromos P450 (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000)

Las funciones biológicas de los citocromos P450 involucran modificaciones químicas por la adición de un átomo de oxígeno a moléculas endógenas (endobióticos) y exógenas (xenobióticos). Para facilitar este proceso la mayoría de los citocromos P450 usan 2 electrones derivados de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés), que son transferidos al citocromo P450 por una enzima denominada citocromo P450 oxidoreductasa (CYPOR, por sus siglas en inglés) (Munro *et al.*, 2007; Manoj *et al.*, 2010) (Figura 1).

La superfamilia de citocromos P450 es subdividida y clasificada con base a la similitud de aminoácidos, criterios filogenéticos y organización de genes. Donde el símbolo “CYP” hace alusión al término citocromo P450, este es seguido por un número arábigo que representa a la familia (donde se agrupa a los CYP con más del 40 % de similitud en su secuencias de aminoácidos), una letra para la subfamilia (CYP con más del 55 % de similitud en su secuencia de aminoácidos) y un número arábigo para el gen individual. Cuando se refiere a la proteína comúnmente se escriben con letras mayúsculas, y letras mayúsculas cursivas cuando se refiere al gen; estos detalles se aplican al emplear como modelo biológico a la rata (*Rattus norvegicus*) (Nerbert *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1993).

Dentro de las 57 familias presentes en vertebrados los miembros de CYP1, CYP2, CYP3 y CYP4 promueven principalmente la solubilidad de xenobióticos en agua y facilitan su conjugación con moléculas endógenas; procesos considerandos como metabolismo de fase I. (Munro *et al.*, 2007; Zeldin y Seubert, 2008; Manoj *et al.*, 2010). Una de las subfamilias con mayor interés biológico es la CYP1A, ya que su expresión hepática tiene un alto impacto a nivel sistémico, pues al metabolizar a los xenobióticos, estos incrementan su reactividad con diferentes biomoléculas, proceso denominado como biotransformación (Traber *et al.*, 1992; Whitlock, 1999).



## 1.1 CYP1A

CYP1A se conforma por 2 genes (*CYP1A1* y *CYP1A2*), los cuales poseen siete exones y su ADNc posee un 70 % de similitud entre ellos. Ambos se ubican en el cromosoma 8 de la rata en la región 8q24. Por su ubicación el *CYP1A1* se lee en dirección hacia el telómero mientras que el *CYP1A2* se lee en dirección hacia el centrómero (Figura 2); teniendo un espacio entre las regiones promotoras de aproximadamente 23 kilobases denominada zona inter *CYP1A1\_CYP1A2* (Corchero *et al.*, 2001; Operaña *et al.*, 2007).

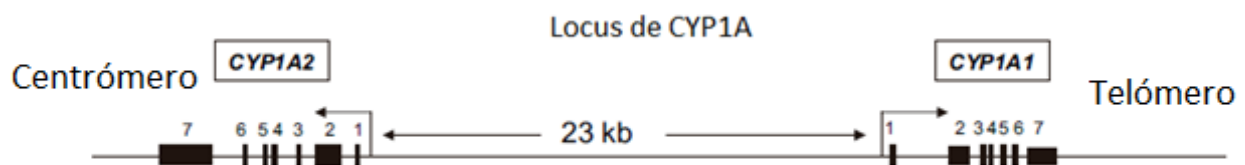


Figura 2 Esquema de la organización de CYP1A en el cromosoma 8 de la rata, las cajas negras representan los exones de cada gen (Modificado de Operaña *et al.*, 2007)

### 1.1.1 CYP1A1

El CYP1A1 se encarga del metabolismo de hidrocarburos policíclicos aromáticos como el Benzo[a]pireno (B[a]P) (Figura 3A), aminas heterocíclicas y aromáticas; los cuales son considerados promutágenos pues sus metabolitos son capaces de formar aductos en el ADN, proceso que está asociado con la iniciación de la carcinogénesis (Traber *et al.*, 1992, Whitlock, 1999). El CYP1A1 se expresa principalmente en pulmón, también se ha reportado en hígado fetal pero no de forma constitutiva en hígado de adulto; a nivel de ARNm se ha detectado en páncreas, timo, intestino delgado y colón; presuntamente reflejando la evolución de los mecanismos de defensa en las vías de exposición a xenobióticos (Omieceinski *et al.*, 1990; Kitada *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1995).

### 1.1.2 CYP1A2

El CYP1A2 participa en el metabolismo de *N*-nitrosaminas, aflatoxinas B<sub>1</sub> (Figura 3B), hidrocarburos nitropolicíclicos y aminas aromáticas que son reconocidos como promutágenos; además metaboliza fármacos como el acetaminofén, clozapina, fenacetina, tacrina, entre otros (Yamazaki *et al.*, 1992). El CYP1A2, es expresado constitutivamente en hígado y no se ha detectado en pulmón (Kitada *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1995; Zeldin y Seubert, 2008).

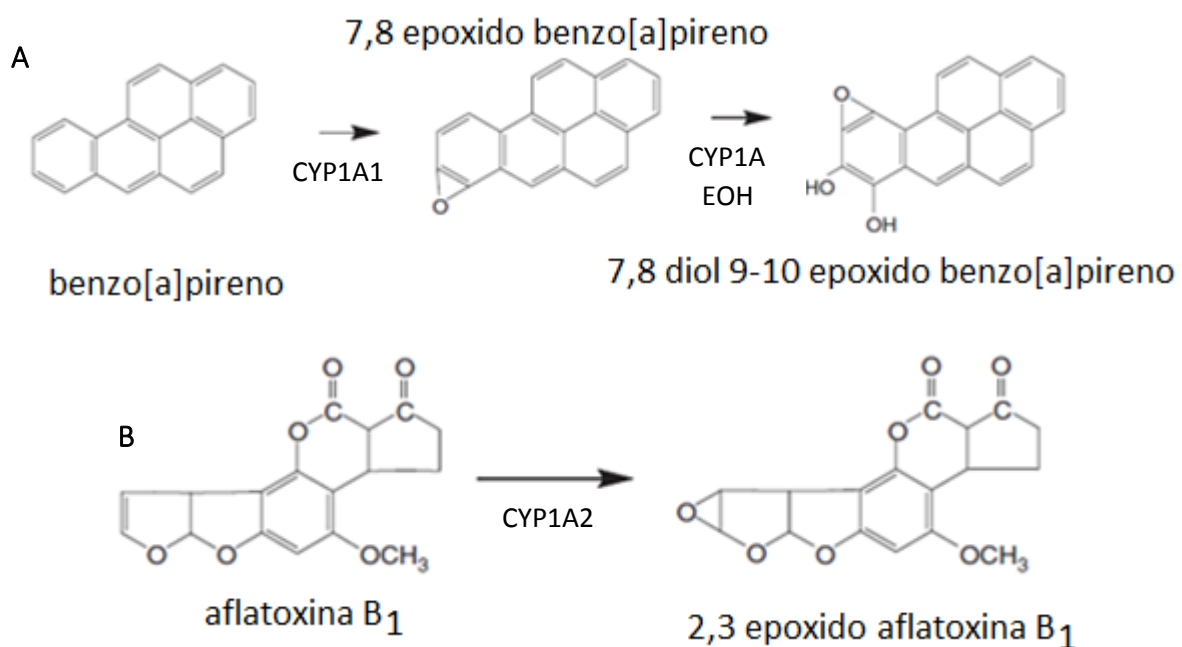


Figura 3 En A, se esquematiza el metabolismo de B[a]P un hidrocarburo policíclico aromático por medio de CYP1A1 y epóxido hidrolasa (EOH). En B, se esquematiza el metabolismo de Aflatoxina B<sub>1</sub> por medio de CYP1A2 (Modificado de Zeldin y Seubert, 2008)

## 1.2 Inductores de CYP1A

La inducción enzimática es el proceso por el cual una enzima es sintetizada en respuesta a una molécula. Comúnmente la molécula es un sustrato para la enzima que es inducida, permitiendo a los organismos adaptarse a un medio químico cambiante (Whitlock, 1999). CYP1A presenta la propiedad de inducción por un gran número de hidrocarburos halogenados aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenoles policlorados y dioxinas. Esto sugiere que las estructuras planas con una dimensión máxima de Van der Waals de 14 x 12 x 5 Å son capaces de ser inductores de CYP1A (Figura 4) (Denison *et al.*, 2002; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Verma *et al.*, 2012).

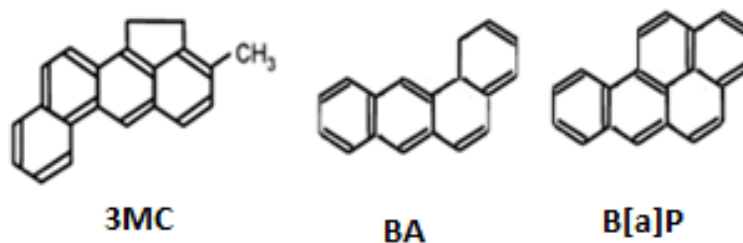


Figura 4 Esquema de los ligandos más comunes para AhR, 3-metilcolantreno (3MC), benzo antraceno (BA) y benzo[a]pireno (B[a]P) (Modificado de Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005)

Uno de los inductores de CYP1A más estudiados es el B[a]P, ya que es un contaminante ambiental persistente formado durante la combustión incompleta o pirolisis de materia orgánica. El B[a]P puede ser absorbido por inhalación, de manera oral o cutánea (Ramesh *et al.*, 2001). Una vez dentro del organismo se distribuye entre hígado, riñón y vejiga (Sun *et al.*, 1982); siendo el hígado el órgano con mayor número de enzimas requeridas para metabolizar B[a]P (Mitchell *et al.*, 1987). Una vez dentro de la célula, el B[a]P induce la expresión de CYP1A, siendo CYP1A1 el encargado de metabolizarlo en primera instancia, cuyos metabolitos son altamente reactivos y pueden formar aductos en el ADN, principalmente en zonas con alto grado de metilación (Sadikovic y Rondenhiser 2006; Verma *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2013).

### 1.3 Receptor aryl hidrocarburo

El receptor aryl hidrocarburo (AhR, por sus siglas en inglés) es un miembro de la superfamilia de reguladores transcripcionales con un sitio de unión al ADN del tipo hélice-bucle-hélice básico (bHLH, por sus siglas en inglés) y uno pre-Arnt-Sim (PAS) (McMillan y Bradfield, 2007). El AhR está conservado desde invertebrados, cumpliendo funciones en el desarrollo de diferentes órganos (Wernet *et al.*, 2006), mientras que en vertebrados presenta la función de sensor y transductor de señales para hidrocarburos halogenados aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenoles policlorados y dioxinas (Denison *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2012).

Normalmente el AhR está presente en el citoplasma asociado con un complejo formado por XAP2, p23 y dos proteínas HSP90. Cuando el inductor atraviesa membrana celular se acopla a AhR, éste se libera del complejo y es llevado al núcleo por medio del traslocador nuclear del AhR (Arnt, por sus siglas en inglés). Una vez en el núcleo el complejo AhR/Arnt se acopla al elemento de respuesta a xenobiótico (XRE, por sus siglas en inglés) y apoyado por un elemento básico de transcripción (BTE, por sus siglas en inglés), promoverá el reclutamiento de una batería de factores de transcripción que se encargarán del remodelado de la cromatina, los cuales a su vez promueven el reclutamiento de factores de transcripción donde se incluye a proteínas encargadas de acetilar la histona; facilitando un acceso para los factores generales de transcripción (GTF, por sus siglas en inglés) con lo que se inicia la expresión del gen *CYP1A1*, *CYP1A2* (Figura 5), genes que codifican enzimas que se encargan del metabolismo subsecuente de hidrocarburos policíclicos aromáticos y del represor de AhR (AhRR, por sus siglas en inglés) (Kazlauskas *et al.*, 2001; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005).

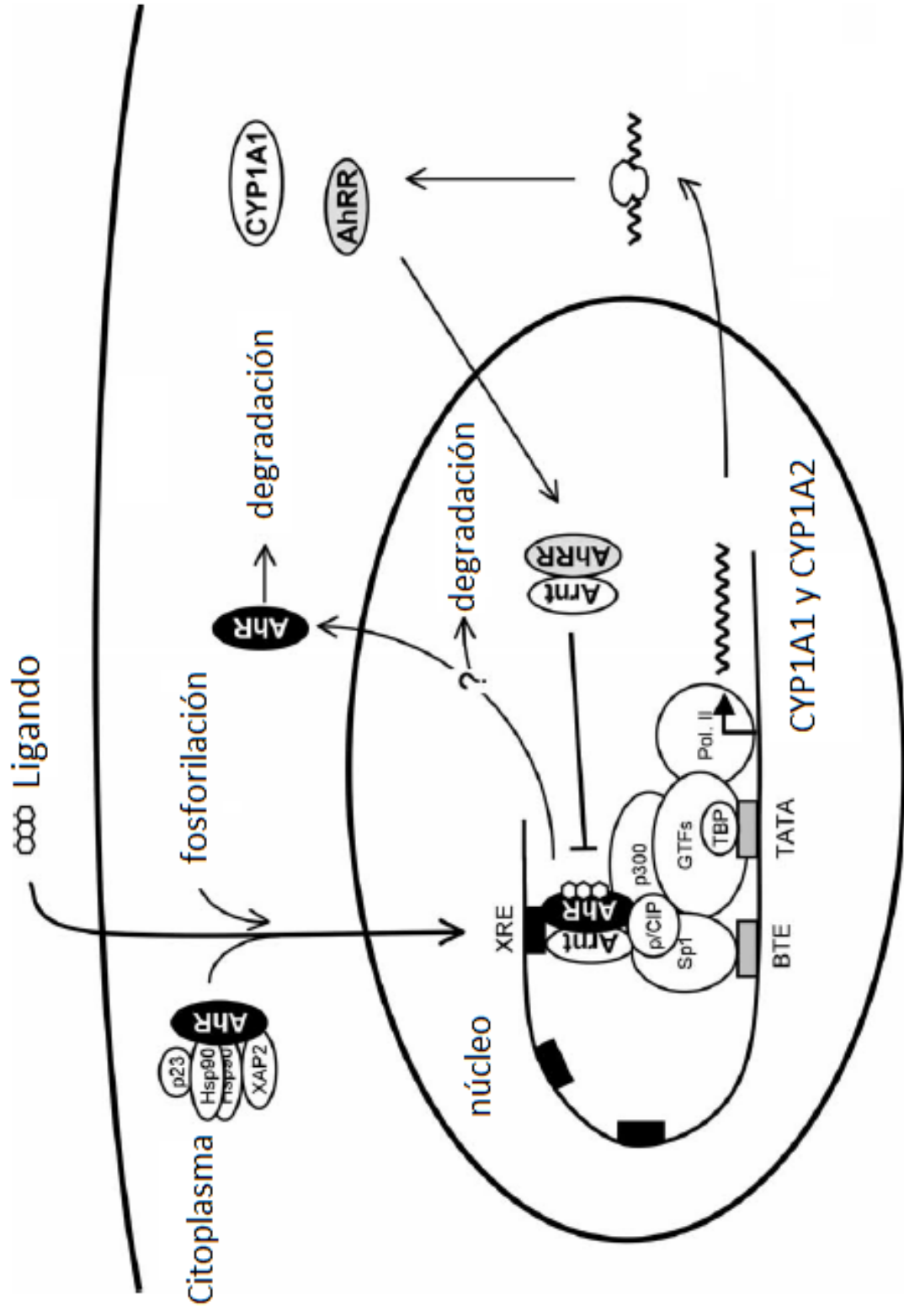


Figura 5 Esquema representativo de la vía de AhR (Modificado de Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005)

#### 1.4 5-aza-2'-deoxicitidina

La 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadc) (Figura 6A) es un fármaco que fue desarrollado como un nucleósido antimetabolito con la especificidad clínica para leucemia mielógena. Se ha reportado que 5azadc induce la ruptura de cromosomas, apoptosis, interfiere con la síntesis de proteínas, del timidilato, inhibe la regeneración del hígado; además es considerado un mutágeno (Gooderham y Mannering, 1985; Christman, 2002).

Por otro lado, se conoce que la metilación en las citosinas de las regiones promotoras de los genes, es una forma de inhibir su expresión en aquellos tipos celulares que no los expresan (Jones, 2012). Se ha observado que 5azadc se puede incorporar al ADN reemplazando a la citosina e inhibir a la enzima encargada de la metilación del ADN, la ADN metil-transferasa (DNMT, por sus siglas en inglés), provocando la pérdida de la metilación en el ADN (Figura 6B) y aumentando la expresión de múltiples genes en diferentes tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro* (Christman, 2002; Alikhani-Koopaei *et al.*, 2004; Stresemann y Lyko, 2008; Rivère *et al.*, 2011). Otro posible mecanismo sugiere un aumento en la síntesis de factores de transcripción derivado de la exposición de 5azadc, y acompañado con la desmetilación del ADN se promueve el aumento en la expresión de genes (Rivière *et al.*, 2011).

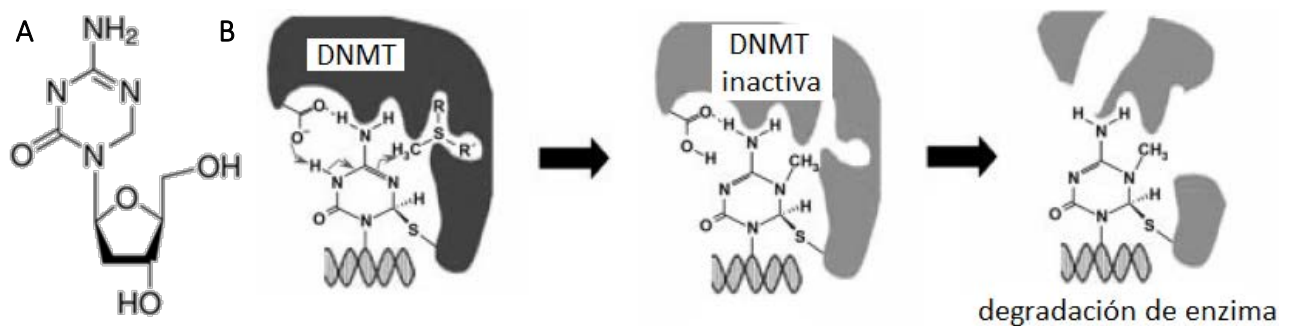


Figura 6 en A, se representa de forma esquemática la estructura de 5-aza-2'-deoxicitidina (Modificado de Christman, 2002). En B, se esquematiza el proceso de desmetilación por 5azadc (Modificado de Stresemann y Lyko, 2008)

En estudios que han empleado diferentes análogos de 5azadc y se ha estudiado su influencia sobre CYP, se observa la disminución del metabolismo de sustratos no específicos para CYP2D6 (Gooderham y Mannering, 1985); y la disminución de los CYP totales en hígado (Wagner *et al.*, 1988); ambos trabajos empleando como modelos biológicos a rata y ratón. Previamente en el laboratorio, se detectó un aumento de la expresión del ARNm de *CYP1A1* por efecto de un tratamiento con 5azadc mas B[a]P, en la línea celular de hepatocitos de rata C9 (Olguín *et al.*, 2014).

## II Planteamiento del problema

La expresión hepática de CYP1A tiene un alto impacto a nivel sistémico, ya que bioactiva xenobióticos que están asociados con la iniciación de carcinogénesis (Traber *et al.*, 1992, Whitlock, 1999). Al ser enzimas inducibles, los estudios se han enfocado en describir las características de los inductores y los factores de transcripción encargados de promover su expresión (Kazlauskas *et al.*, 2001; Denison *et al.*, 2002; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005; Verma *et al.*, 2012).

Por otro lado, además del efecto citotóxico de 5azadc, se conoce que a dosis bajas promueve el aumento de la expresión de genes en diferentes tipos celulares (Christman, 2002; Alikhani-Koopaei *et al.*, 2004; Stresemann y Lyko, 2008; Rivère *et al.*, 2011). Como antecedente directo en el laboratorio (Olguín *et al.*, 2014), se detectó un aumento de la expresión del ARNm de *CYP1A1* por efecto de un tratamiento de 5azadc mas B[a]P, en la línea celular de hepatocitos de rata (C9).

Por lo anterior, el interés de este estudio es determinar si la exposición previa de un fármaco con la capacidad de remplazar a la citosina en el ADN y eliminar la marca de metilación como lo es 5azadc, influye en la expresión de CYP1A, cuando el organismo fuera expuesto a B[a]P, usando como modelo biológico a la rata (*Rattus norvegicus*).

### III Hipótesis

La expresión de CYP1A hepático se verá aumentada como consecuencia del tratamiento previo con 5azadc mas B[a]P cuando se emplea a la rata como modelo biológico; ya que 5azadc posee la capacidad de aumentar la expresión de genes tanto *in vivo* como *in vitro*.

### IV Objetivos

#### 4 General

- Determinar la influencia de 5azadc sobre la inducción de CYP1A hepático de rata.

#### 4.1 Particulares

- Evaluar el efecto de 5azadc sobre la transcripción de *CYP1A1*, a nivel de proteína y actividad de CYP1A1 y CYP1A2 hepático.
- Evaluar el efecto de la combinación de 5azadc mas B[a]P sobre la transcripción de *CYP1A1*, a nivel de proteína y actividad de CYP1A1 y CYP1A2 hepático.



## V Método

### 5 Modelo biológico

Se utilizaron 16 ratas macho de la cepa Wistar de un peso aproximado de 210 g, obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales fueron mantenidos en 4 grupos de 4 individuos cada uno, en jaulas de acrílico con rejilla de metal recibiendo agua y alimento *ad libitum* con un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

#### 5.1 Tratamientos

El grupo control recibió un volumen diario de 0.4 ml de PBS vía intraperitoneal (ip) por cinco días, el quinto día una hora después recibió un volumen de 0.2 ml de aceite de maíz por la misma vía de administración.

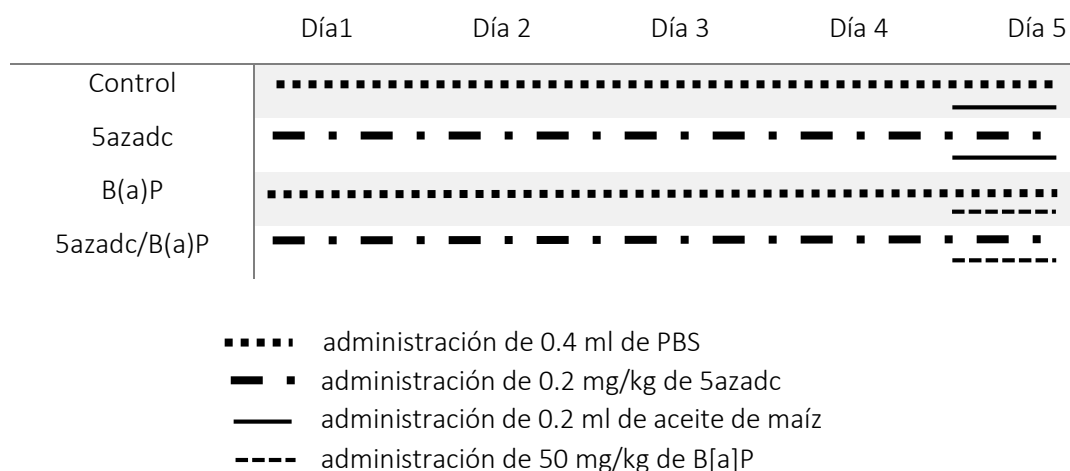
El segundo grupo (5azadc) recibió diariamente 0.2 mg/kg de 5azadc en 0.4 ml de PBS vía ip por cinco días (Rivière *et al.*, 2011); el quinto día una hora después recibió 0.2 ml de aceite de maíz por la misma vía de administración.

El tercer grupo (B[a]P) recibió un volumen diario de 0.4 ml de PBS vía ip por cinco días, el quinto día una hora después recibió 50 mg/kg de B[a]P en 0.2 ml de aceite de maíz por la misma vía de administración (Harrigan *et al.*, 2006).

El cuarto grupo (5azadc/B[a]P) recibió diariamente 0.2 mg/kg de 5azadc en 0.4 ml de PBS vía ip por cinco días, el quinto día una hora después recibió 50 mg/kg de B[a]P en 0.2 ml de aceite de maíz por la misma vía de administración.

Todos los grupos de animales se sacrificaron por dislocación cervical 24 h después de la última administración ip, se extrajo el hígado, del cual se tomó un trozo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para la obtención de ARNm de total; mientras que del resto del hígado se obtuvo la fracción microsomal.

Tabla 1. Esquema de administración



## 5.2 Determinación de niveles de ARNm de *CYP1A1* en hígado de rata

El ARN total fue aislado de las muestras de hígado, por medio del reactivo de TRIzol™ (Chomczynski y Sachi, 2006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se verificó su integridad por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2 %; mientras que la pureza se determinó en un nanodrop modelo 2000 marca Thermocientific™. La retrotranscripción fue realizada por la M-MVLR en un termociclador modelo Rapid Cyclor (Idaho technology™) con una programación de 25 °C por 10 min de incubación, 37 °C por 50 min de retrotranscripción. La reacción de PCR fue realizada en el equipo RotorGene 6000 modelo Corvette™, con una programación de calor de reacción de 95 °C por 15 s con una temperatura de lectura de 60 °C por 1 min durante 40 ciclos. La sonda empleada para *CYP1A1* fue Rn 00487218\_m1. Para hacer una interpretación cuantitativa, los datos obtenidos se ajustaron a una curva de mezcla de ADNc de todas las muestras con valores de 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.625 ng de ADNc, bajo las mismas condiciones de PCR previamente descritas. La expresión relativa se normalizo con el gen *18S* bajo el modelo propuesto por Livak y Schmittgen (2001).

### 5.3 Preparación de la fracción microsomal de hígado de rata

El hígado fue homogenizado en un volumen a razón de 3 ml por g de una solución de KCl 0.15 M. Se centrifugó el homogenado de hígado a 9 000 veces la gravedad ( $\times g$ ) por 15 min a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman L-80, posteriormente el botón se resuspendió en un volumen igual al inicial con PBS 0.1 M y sacarosa 0.25 M a pH 7.4, centrifugándose una vez más bajo las mismas condiciones en el mismo equipo. El botón final, la fracción microsomal, se resuspendió en PBS, EDTA 1 mM, DTT y 20 % de glicerol (Prigol *et al.*, 2012). Todas las muestras fueron procesadas individualmente.

### 5.4 Cuantificación de proteínas de la fracción microsomal de hígado de rata

Se cuantificaron las proteínas de la fracción microsomal con forme al ensayo original de Bradford en 1976, con modificaciones para su lectura en microplaca. Se empleó 10  $\mu$ l de una dilución 1:80 de la muestra microsomal en agua, adicionando 200  $\mu$ l de una dilución 1:4 del reactivo de Bradford en agua, cuantificando su absorbancia a 595 nm en el lector de microplaca Synergy H4™.

### 5.5 Inmunodetección de CYP1A en la fracción microsomal de hígado de rata

Se realizó la electroforesis de 20  $\mu$ g de proteína presentes en la fracción microsomal en un gel de 7.5 % poliacrilamida (SDS-PAGE) de 1 mm de grosor, en presencia de un sistema discontinuo tris-Base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 10 %. Se hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (BioRad™) a 100 V por 60 min en la presencia de una solución tris-Base 25 mM y glicina 192 mM. La membrana fue bloqueada por 2 h en albúmina 10 % en un amortiguador TBS, que contenía 0.1 % Tween 20, 10 mM Tris-Base y 150 mM de NaCl (Gallagher *et al.*, 2007). Posteriormente se incubó la membrana por toda la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal para CYP1A1 en una disolución de 1:2500 en TBS al 5 % de albúmina. Se incubó por 60 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Gt IgG H+L HRP) en una dilución 1:12500. Se empleó el mismo protocolo empelando un anticuerpo policlonal para CYP1A2 para la inmunodetección de CYP1A2.

## 5.6 Evaluación de la *O*-desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata

Esta reacción fue medida con forme al protocolo original (Burke *et al.*, 1994) con modificaciones para su lectura en microplaca. Se incubó a 37 °C por 3 min un volumen final de 200 µl, el cual contenía 150 µl de buffer Tris 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 40 µg de proteína de la fracción microsomal y 5 µl de EROD de una solución 50 µM. al final de la incubación la reacción se inició con la adición de 40 µl de NADPH 5 mM. Se tomaron 20 lecturas de la fluorescencia en intervalos de 20 s en un lector de microplaca Synergy H4™ con una excitación de 520 nm y una emisión de 585 nm. En el protocolo anterior se reemplazó EROD por MROD del cual se usó 0.75 µl de una solución de 500 µM.

## 5.7 Análisis estadístico

Para comparar los datos entre los tratamientos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney en el programa IBM SPSS statistics 21<sup>va</sup> versión para Windows, donde se consideró una  $P < 0.05$  como significativa. Los datos se muestran como la media del grupo +/- el error estándar (EE).

## VI Resultados

Para investigar el efecto que tiene 5azadc sobre la expresión de *CYP1A* en el hígado de rata, se empleó un tratamiento en el que se pueda observar el efecto de 5azadc sobre la expresión de *CYP1A*; un tratamiento positivo de inducción de *CYP1A*, que fue la administración de B[a]P; y un grupo al que se le administró 5azadc mas B[a]P, con el objetivo de observar el efecto que tiene 5azadc en conjunto de un inductor de *CYP1A*; considerando los parámetros de ARNm, proteína y de actividad enzimática.

### 6.1 Determinación de niveles de ARNm de *CYP1A1* en hígado de rata

La expresión de *CYP1A1* fue analizada por RT-PCR cuantitativo del tejido hepático de ratas del grupo control, tratadas con 5azadc, con B[a]P y con 5azadc mas B[a]P (5azadc/B[a]P). En la Figura 7, se presentan los resultados de la expresión relativa del ARNm de *CYP1A1* normalizados con el gen *18S*. En el grupo control se consideró la presencia basal de ARNm de *CYP1A1*. El tratamiento con 5azadc mostró un aumento en la transcripción de *CYP1A1* con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ); el tratamiento con B[a]P aumentó 24 000 veces la transcripción del *CYP1A1* con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ); mientras que en el tratamiento con 5azadc/B[a]P la transcripción de *CYP1A1* aumento 30 000 veces con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ), pero este cambio no es significativo con respecto al tratamiento con B[a]P.

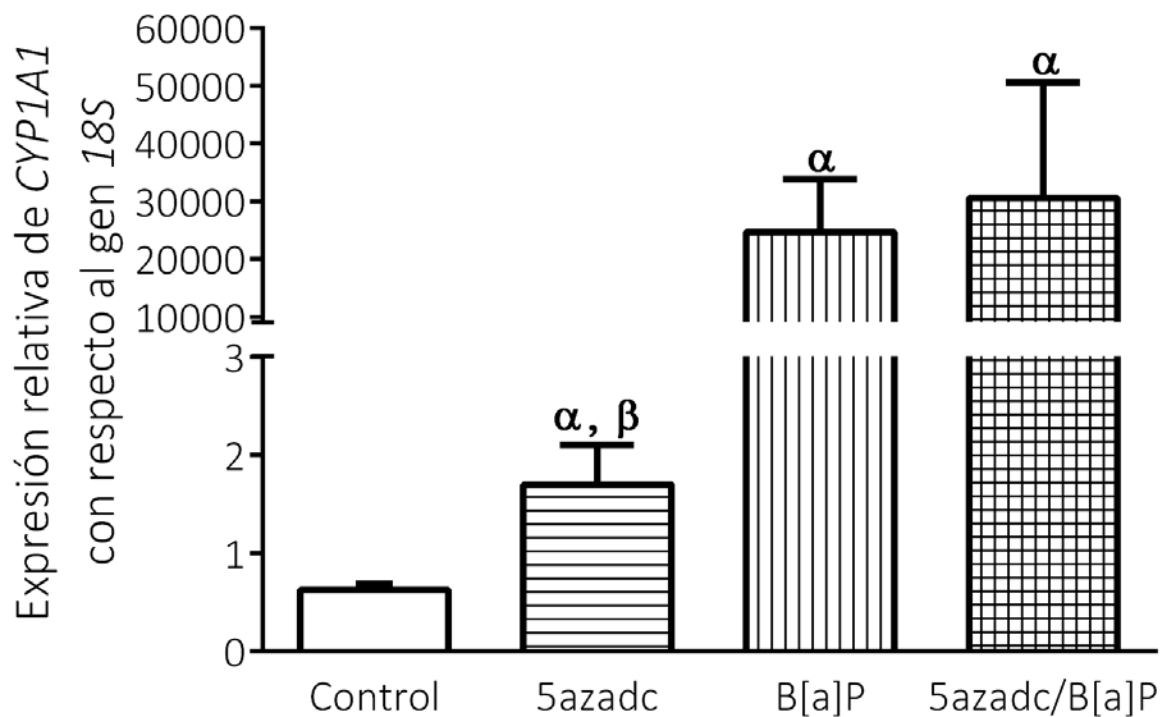


Figura 7. Efecto del tratamiento con 5azadc (0.2 mg/kg), B[a]P (50 mg/kg) o el tratamiento 5azadc más B[a]P sobre la expresión de ARNm de *CYP1A1* en hígado de rata. Los datos se expresan en veces de incrementos relativos con respecto al gen *18S*. Cada barra corresponde al promedio de 4 ratas por grupo +/- EE.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al control.  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al tratamiento con B[a]P.

## 6.2 Inmunodetección de CYP1A en la fracción microsomal de hígado de rata

Se utilizó 20 µg de proteínas presentes en la fracción microsomal de hígado de rata de cada uno de los tratamientos, éstas se separaron por medio de una electroforesis discontinua en un gel SDS-PAGE, y se realizó la inmunodetección de CYP1A1 y CYP1A2, empleado como control positivo supersoma de CYP1A1 y CYP1A2. En la Figura 8A se observa una inmunodetección representativa de CYP1A1 y CYP1A2, mientras que en la Figura 8B se presenta el análisis densitométrico en unidades de densidad óptica (ODU, por sus siglas en inglés) de CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente. La inmunodetección no logró determinar la presencia de CYP1A1 en el grupo control, caso que se repite en el tratamiento con 5azadc. En el tratamiento con B[a]P su presencia fue considerable; mientras que en el tratamiento con 5azadc/B[a]P la expresión de CYP1A1 fue mayor con respecto al tratamiento con B[a]P ( $P \leq 0.05$ ). La inmunodetección de CYP1A2 en el grupo control así como en el tratamiento con 5azadc no fue detectada; por otro lado, en el tratamiento con B[a]P la inmunodetección fue positiva, mientras que el tratamiento con 5azadc/B[a]P mostró una disminución con respecto al tratamiento con B[a]P ( $P \leq 0.05$ ).

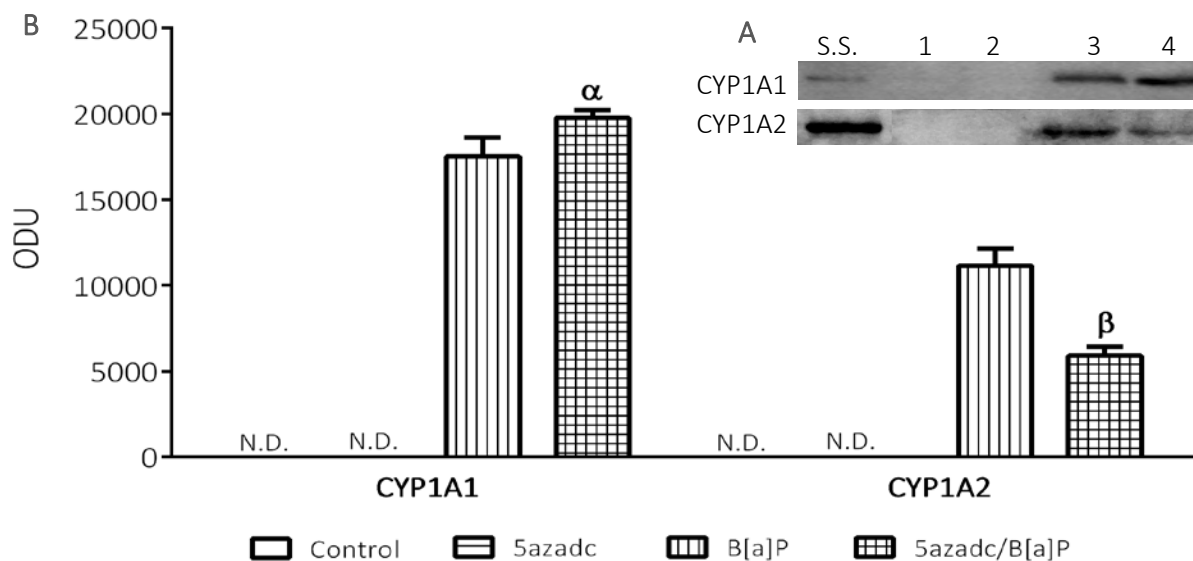


Figura 8. En A, se observa la inmunodetección representativa de CYP1A1 y CYP1A2 en microsomas de hígado de rata, del grupo control (1), tratados con 0.2 mg/kg de 5azadc (2), con 50 mg/kg de B[a]P (3) o del tratamiento de 5azadc mas B[a]P (4), supersoma (S.S.) de CYP1A1 y CYP1A2. En B, se muestra el análisis densitométrico de la inmunodetección de CYP1A1 Y CYP1A2. Cada barra corresponde al promedio de cuatro ratas +/- EE.  $\alpha P \leq 0.05$  con respecto a la presencia de CYP1A1 en microsomas del tratamiento con B[a]P.  $\beta P \leq 0.05$  con respecto la presencia de CYP1A2 en microsomas del tratamiento con B[a]P. N.D. No se detecta la presencia de la proteína.

### 6.3 Evaluación de la O-desalquilación de EROD y MROD por fracción microsomal de hígado de rata

Para evaluar la actividad de CYP1A1 en la fracción microsomal de hígado de rata, se evaluó el cambio de EROD a resorufina (RES), mientras que la actividad de CYP1A2 fue por el cambio de MROD a RES y los resultados se presentan en la Figura 9. La actividad de CYP1A1 exhibida por el tratamiento con 5azadc disminuyó con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ). El tratamiento con B[a]P mostró una elevación de 9 veces la actividad de CYP1A1 con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ); mientras el tratamiento con 5azadc/B[a]P mostró una alza de 13 veces con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ), siendo esta elevación significativa con respecto al tratamiento con B[a]P ( $P \leq 0.05$ ). La actividad de CYP1A2 exhibida por el tratamiento con 5azadc no es significativa con respecto al control. El tratamiento con B[a]P mostró una elevación de la actividad de CYP1A2 de 7 veces con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ); mientras que el tratamiento con 5azadc/B[a]P mostró un aumento con respecto al control ( $P \leq 0.05$ ), pero una disminución con respecto al tratamiento de B[a]P ( $P \leq 0.05$ ).

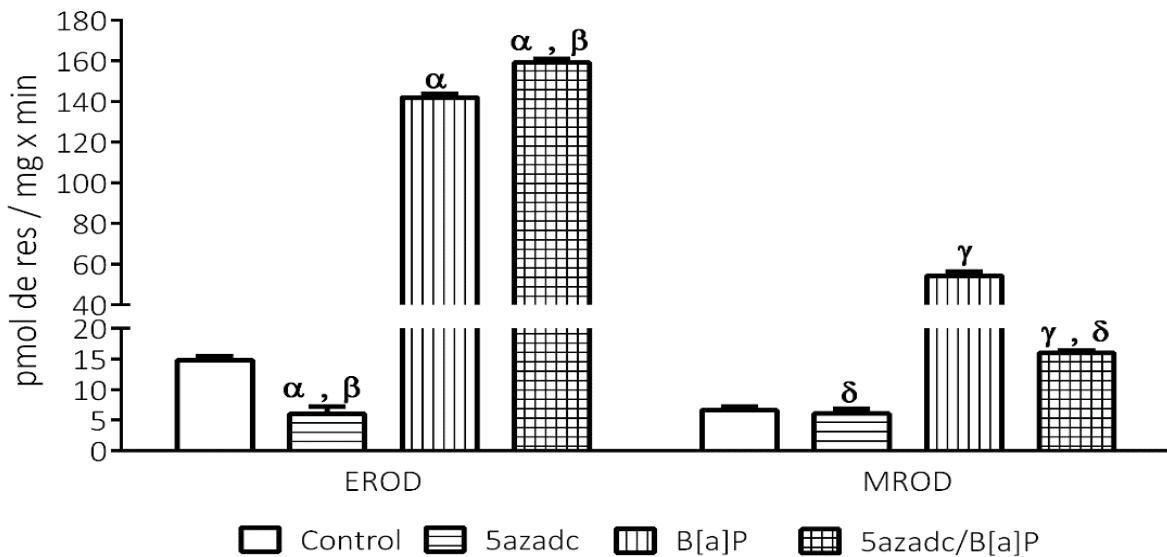


Figura 9. Efecto del tratamiento con 5azadc (0.2 mg/kg), B[a]P (50 mg/kg) o el tratamiento con 5azadc mas B[a]P en la inducción del metabolismo de EROD y MROD en microsomas de hígado de rata. Cada barra corresponde al promedio de tres lecturas de cuatro ratas +/- EE.  $\alpha$   $P \leq 0.05$  con respecto al metabolismo de EROD por el grupo control,  $\beta$   $P \leq 0.05$  con respecto al metabolismo de EROD por el tratamiento con B[a]P.  $\gamma$   $P \leq 0.05$  con respecto al metabolismo de MROD por el grupo control,  $\delta$   $P \leq 0.05$  con respecto al metabolismo de MROD por el tratamiento con B[a]P.

## VII Discusión

En este trabajo utilizamos en primera instancia la expresión de ARNm de *CYP1A1*, ya que es el miembro de CYP1A que tiene un aumento muy estable en la transcripción, cuando se administra B[a]P a la rata (Harrigan *et al.*, 2006). También se consideró la inmunodetección de CYP1A, la determinación de la *O*-desalquilación de EROD como parámetro para evaluar CYP1A1 y MROD para evaluar CYP1A2 en la fracción microsomal de hígado de rata (Burke *et al.*, 1994).

La elevación de la transcripción de *CYP1A1* en hígado de rata después del tratamiento con 5azadc, puede ser debida a que 5azadc haya aumentado la transcripción de múltiples factores de transcripción (Rivière *et al.*, 2011), los cuales están involucrados en la transcripción de *CYP1A1*, acompañado de un posible acoplamiento de un ligando endógeno para AhR (Denison *et al.*, 2002 y Verma *et al.*, 2012), con lo que se promovió la transcripción de *CYP1A1*.

Como está documentado, el B[a]P es un inductor de CYP1A1 por medio del AhR, siendo empleado en este trabajo como un control positivo de inducción de CYP1A1 (Whitlock, 1999). Existen reportes de que 50 mg/kg de B[a]P promueve el aumento de la transcripción de *CYP1A1* de 6 600 veces más con respecto al control en ratas de la cepa Sprague Dawley (Harrigan *et al.*, 2006); mientras que nuestros resultados mostraron 24 000 veces más con respecto al control, esto debido a la mayor sensibilidad que tiene la cepa Wistar sobre la expresión de ARNm de *CYP1A1* con respecto a la cepa Sprague Dawley cuando se administra B[a]P (Floreani *et al.*, 2012).

La transcripción de *CYP1A1* en el tratamiento con 5azadc/B[a]P, mostró un aumento de 30 000 veces más con respecto al control, cuyos valores no son significativos con respecto al tratamiento con B[a]P, es posible que la diferencia interindividual de los organismos haya influido en la muestra de ARNm obtenida, lo que impidió observar un cambio significativo.



Por medio de la inmunodetección en el grupo control no se observó la presencia de CYP1A1 al igual que en reportes previos (Floreani *et al.*, 2012), debido a que el CYP1A1 es un gen no constitutivo del hígado por lo que su expresión es muy baja (Corchero *et al.*, 2001). En el tratamiento con 5azadc de igual forma no fue detectable; considerando los resultados de la expresión de ARNm de *CYP1A1*, se sugiere que el aumento de la expresión de CYP1A1 no haya sido suficiente para ser observada por medio de la inmunodetección (Gallagher *et al.*, 2007; Floreani *et al.*, 2012).

El tratamiento con B[a]P mostró un aumento muy marcado en la expresión de CYP1A1, resultado que se refleja en la expresión de ARNm de *CYP1A1*, que coincide con reportes previos (Harrigan *et al.*, 2006; Floreani *et al.*, 2012). De manera interesante, se detectó un aumento significativo de la expresión de CYP1A1 en el tratamiento con 5azadc/B[a]P con respecto al tratamiento con B[a]P; si bien este resultado no coincide con los datos obtenidos de ARNm de *CYP1A1*; el aumento en la cantidad de proteína puede ser debido a que 5azadc haya promovido la síntesis de factores de transcripción necesarios para *CYP1A1*, y que en conjunto con la exposición al B[a]P se generaron las condiciones adecuadas para su transducción (Rivière *et al.*, 2011; Floreani *et al.*, 2012).

En el tratamiento con 5azadc, CYP1A2 no fue detectable al igual que el CYP1A1 en este trabajo; pese a que la expresión de CYP1A2 es constitutiva en hígado (Corchero *et al.*, 2001) 20 µg de fracción microsomal son insuficientes para realizar la inmunodetección.

El tratamiento con B[a]P mostró una inducción positiva de CYP1A2 (Harrigan *et al.*, 2006), pero en menor medida con respecto a CYP1A1 como se presenta en reporte previos (Quattrochi *et al.*, 1998); ya que presenta un menor número de zonas XRE en la región promotora de *CYP1A2* con respecto a la región promotora de *CYP1A1*, favoreciendo la expresión de CYP1A1 cuando al organismo se expone a un ligando de AhR (Nukaya y Bradfield, 2009).

De forma interesante el tratamiento con 5azadc/B[a]P mostró una disminución en la expresión de CYP1A2, este resultado pudo haber sido provocado por un mayor acoplamiento del complejo AhR/Arnt a los XRE de *CYP1A1*, y su constante transcripción generó una mayor tensión en las zonas adyacentes de *CYP1A1* haciendo que la región promotora de *CYP1A2* haya quedado poco accesible para el complejo AhR/Arnt, por lo que posiblemente su expresión se haya visto reducida (Pérez *et al.*, 2012).

Para evaluar la funcionalidad de la subfamilia CYP1A en microsomas de rata, EROD se empleó como sustrato indicativo para la actividad de CYP1A1; mientras que MROD es un sustrato indicativo de CYP1A2, tanto EROD como MROD al ser metabolizado por CYP1A1 y CYP1A2 respectivamente, producen RES, el cual es detectado por fluorescencia (Burke *et al.*, 1994).

La *O*-desalquilación de EROD en el tratamiento con 5azadc disminuyó con respecto al grupo control ( $P \leq 0.05$ ), estos datos los tomamos con reserva ya que no se observó a CYP1A1 en la inmunodetección; además esta prueba es indicativa de la presencia de CYP1A1, cuando los microsomas son obtenidos de rata que hayan sido tratadas con un ligando de AhR (Burke *et al.*, 1994). Por otro lado la *O*-desalquilación de MROD, no presento cambio con respecto al control, datos que pese a la ausencia de CYP1A2 en la inmunodetección, son considerados, ya que esta prueba es indicativa cuando los microsomas derivan de ratas que no se hayan tratado con algún ligando de AhR (Burke *et al.*, 1994).

Como era de esperarse, el tratamiento con B[a]P mostró un aumento en la *O*-desalquilación tanto de EROD y MROD (Floreani *et al.*, 2012). En el tratamiento con 5azadc/B[a]P, la *O*-desalquilación de EROD reflejó la tendencia de CYP1A1 en la inmunodetección; de misma forma se observa la baja de la *O*-desalquilación de MROD con la disminución de CYP1A2 en la inmunodetección.

Nuestros resultados del aumento de CYP1A1 y su actividad por efecto del tratamiento con 5azadc mas B[a]P, sugiere una posible modulación epigénetica sobre la expresión de CYP1A1 en la rata, apoyando la idea de cómo los procesos por los cuales el B[a]P, podrían estar influyendo en la expresión del CYP1A1 mas allá de la interacción con el AhR, ya que se ha reportado que los aductos producidos por el B[a]P tiene mayor afinidad por las regiones del ADN con mayor grado de metilación (Sadikovic y Rondenhisser, 2006, Fang *et al.*, 2013), con lo que podría promover un aumento de los mutágenos derivados del B[a]P, y posiblemente promover un proceso de carcinogénesis (Verma *et al.*, 2012).

## VIII Conclusiones

- El tratamiento con 0.2 mg/kg de 5azadc promueve un cambio en la transcripción de *CYP1A1*, disminuye el metabolismo de EROD, pero no el metabolismo de MROD; cuando se utiliza el modelo de *Rattus norvegicus*.
- El tratamiento combinado con 0.2 mg/kg de 5azadc y 50 mg/kg de B[a]P favorece la expresión de CYP1A1 pero disminuye la expresión de CYP1A2; cuando se utiliza el modelo de *Rattus norvegicus*.

## IX Perspectivas

- Evaluar la transcripción de *CYP1A2*, por RT-PCR para determinar si el efecto de disminución en CYP1A2, es a nivel transcripcional o transduccional.
- Determinar el mecanismo por el cual se ve favorecida la expresión de CYP1A1 y la disminución de CYP1A2, por medio de la evaluación de la tensión del ADN.
- Determinar la posible presencia de islas CpG en la región promotora de *CYP1A1* y *CYP1A2* por estudios en bioinformática, para determinar una posible regulación epigénetica.

## X Referencias

- Alikhani-Koopaei R., Fouladkou F., Frey F. y Frey B. (2004) Epigenetic regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression. *J. Clin. Invest.* **114**, 1146-1159.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Burke M., Thompson S., Weaver R., Wolf C. y Mayer R. (1994) Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver *Biochem. Pharmacol.* **48**, 923-936.
- Chomczynski P. y Sacchi N. (2006) The single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1**, 581-585.
- Christman J. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483-5495.
- Corchero J., Pimprale S., Kimura S. y Gonzalez J. (2001) Organization of the CYP 1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* **11**, 1-6.
- Deninson M, Pandii A., Nagy S. y Baldwin E. (2002) Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem. Biol. Interact.* **141**, 3-24.

- Fang X., Thornton C., Scheffler B. y Willetta K. (2013) Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental Toxicol. and Pharmacol.* **36**, 40-50.
- Floreani M., Gabbia D., Barrierato M., De Martin S. y Palatini P. (2012) Differential inducing effect of benzo[a]pyrene on gene expression and enzyme activity of cytochromes P450 1A1 and 1A2 in Sprague-Dawley and Wistar Rats. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**, 640-652.
- Fujii-Kuriyama Y. y Mimura J. (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys Res. Comm.* **338**, 311-317.
- Gallagher S. (2007) One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. Current protocols in cell biology. *John Wiley & Sons, Inc.* 6.1.1-6.1.38
- Gooderham N. y Mannering G. (1985) Depression of the hepatic cytochrome P450 monooxygenase system by treatment of mice with the antineoplastic agent 5-azacytidine. *Cancer Res* **45**, 1569-1572.
- Harrigan J., McGarrigle B., Sutter T. y Olson J. (2006) Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology* **20**, 426-438.
- Jones P. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, genes bodies and beyond. *Nature* **13**, 484-492.

- Kazlauskas A., Sundstorm S., Poellinger L. y Pongratz I. (2001) The HSP90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2594-2607.
- Kitada M., Taenda M., Itahashi K. y Kamataki T. (1991) Four forms of cytochrome P450 in human fetal liver: purification and their capacity to activate promutagens. *Jpn. J.Cancer Res.* **82**, 426-432.
- Livak K. y Schmittgen T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402-408.
- Manoj K., Gade S. y Mathew L. (2010) Cytochrome P450 reductase: A harbinger of diffusible reduced oxygen species. *PLoS ONE* **5**, 13272-13280.
- McMillan B. y Bradfield C. (2007) The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol. Pharmacol.* **72**, 487-98.
- Mitchell C., Fischer J. y Dahl A. (1987) Differential induction of cytochrome P-450 catalyzed activities by polychlorinated biphenyls and benzo[a]pyrene in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicology* **43**, 315-323.
- Munro A., Girvan H. y McLean K. (2007) Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 585-609.

- Nelson D., Kamataki T., Waxman D., Guengerich P., Estabrook R., Feyereisen R., Gonzalez F., Coon M., Gunsalus I., Gotoh O., Okuda K. y Nerbert D. (1993) The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell. Biol.* **12**, 1-51.
- Nerbert D., Adesnik M., Minor J., Estabrook R., Gonzalez F., Guengerich P., Gunsalus I., Jhonson E., Kemper B., Levin W., Philips I., Sato R. y Waterman M. (1987) The P450 gene superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA* **6**, 1-11.
- Nukaya I. y Bradfield I. (2009) Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and CYp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochemical Pharmacology* **77**, 654-659.
- Omieceinski C., Redlich C. y Costa P. (1990) Induction and developmental expression of cytochrome P450 1A1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **50**, 4315-4321.
- Omura T. y Sato R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **259**, 2370-2378.
- Olguín S., Camacho R. y Espinosa J. (2014) Perfil epigénético de CYP1A1 (inédito).
- Operaña T., Nguyen N., Chen S., Beaton D. y Tukey R. (2007) Human CYP1A1<sup>GFP</sup> expression in transgenic mice serves as a biomarker for environmental toxicant exposure. *Toxicological Sciences* **95**, 98-107.
- Pérez A., Castellazzi C., Battistini F., Collinet K., Flores O., Deniz O., Ruiz M., Torrents D., Eritija R., Soler M. y Orozco M. (2012) Impact of methylation on the physical properties of DNA. *Biophysical Journal* **102**, 2140-2148.

- Prigol M., Nogueira C., Zeni G., Bonze M. y Constantino L. (2012) *In vitro* metabolism of diphenyl diselenide in rat liver fractions. Conjugation with GSH and binding to thiol groups. *Chem Biol Interact.* **200**, 365-72.
- Quattrochi L., Shih H. y Pickwell G. (1998) Induction of the human CYP1A2 enhancer by phorbol ester. *Arch Biochem Biophys.* **350**, 41-48.
- Ramesh A., Inyang F., Hood D. y Archibong A. (2001) Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo[a]pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 275–290.
- Rivière G., Lienhard D., Andrieu T., Vieau D., Frey B. y Frey F. (2011) Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics* **6**, 1-12.
- Sadikovic B. y Rodenhiser D. (2006) Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **3**, 458-68.
- Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Wakamiya., Ueng Y., Guengerich P. y Inui Y. (1995) Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab. Disp.* **24**, 515-522.
- Stresemann C. y Lyko F. (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int. J. Cancer* **123**, 8-13.
- Sun J., Wolff R. y Kanapilly G. (1982) Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo[a]pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **65**, 231–244.



- Traber P., McDonnell W., Wang W. y Florence R. (1992) Expression and regulation of cytochrome P-450I genes (CYP1A1 and CYP1A2) in the rat alimentary tract. *Biochim Biophys Acta*. **29**, 167-75.
- Verma N., Pink M., Rettenmeier A. y Schmitz-Spanke S. (2012) Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics* **12**, 1731-1755.
- Wagner G., Pott U., Bruckschen M. y Sies H. (1988) Effects of 5-azacytidine and methyl-group deficiency on NAD(P)H: quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase in liver. *Biochem. J.* **251**, 825-829.
- Werck-Reichhart D. y Feyereisen R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*. **1**, 1-9.
- Wernet M., Mazzoni E., Celik A., Duncan D., Duncan I. y Desplan C. (2006) Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* **440**, 174–80.
- Whitlock J. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125.
- Yamazaki K., Teraoka H., Dong W., Stegeman J. y Hiraga T. (2002) cDNA cloning and expressions of cytochrome P450 1A in zebrafish embryos. *Vet. Med. Sci.* **9**, 829-833.
- Zeldin D. y Seubert J. (2008) Structure, mechanism, and regulation of cytochromes P450. En *Molecular and biochemical toxicology* 4ª edición (R. Smart, E. Hodgson, Ed). E.U.A. pp. 901.