



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INDUCCION DEL CITOCROMO P4501A1 EN
EPITELIO NASAL DE FUMADORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A:

EDITH DANNY MOLINA SERVIN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE



M. 332712

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Inducción del Citocromo P4501A1 en epitelio nasal de fumadores

realizado por Edith Danny Molina Servin

con número de cuenta 09734823-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

Dr. Jesus Javier Espinosa Aguirre

Propietario

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Suplente

Dra. Julieta Rubio Lightbourn

Suplente

M. en C. Diana María Escobar García

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

A mis padres

Yolanda Servin Zavala y Rafael Molina Bernabé

A mis Hermanos

Bernabé y Misael

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este proyecto fue parcialmente financiado por PAPIIT IN215301.

Deseo agradecer a la M en C. Clementina Castro por su ayuda en la estandarización en la técnica de inmunohistoquímica.

A la M en C. Diana Escobar por su ayuda en el desarrollo de la metodología para la Inmunodetección.

A la M en C. Patricia Guzmán por su ayuda en el procesamiento de las muestras nasales.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mis padres por darme la oportunidad de vivir y disfrutar de la vida misma, además por apoyarme, aceptarme y amarme como solo ellos lo hacen. En especial a mi mamá por demostrarme lo fuerte, tenaz y amorosa que puede llegar a ser una persona, por inculcarme el valor de la persistencia. A mis hermanos por tolerarme, principalmente Misael, a mi hermanito Bernabé, te admiro por lo valiente y amoroso que eres, por esa ternura que en tus ojos brilla siempre; sin su apoyo y comprensión no lo hubiera logrado, a los cuatro los quiero muchísimo.

A esos amigos verdaderos que de alguna manera aparecían cuando más los necesitaba, Verónica de Dios, Patricia Lucero, mi primo Alejandro Hunab, Rafa y Mariana (Chicha).

A mis grandes amigos del laboratorio Gerardo que me enseñó a poder ver mis defectos de una forma graciosa y objetiva, a Valeria por comprenderme tanto y sobretodo escucharme, a Wendy y Jorge que viven en su propio mundo, a Paty Guzmán por ser siempre “todo oídos”, Roxana y Elsa por su compañía, a la Señora Delfina por hacer agradables pequeños momentos y por su gran amistad.

Sobre todo agradezco a la Doctora María Eugenia Gonsebatt, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por dejarme ser parte de su laboratorio, gracias por demostrarme el valor de la dedicación, perseverancia hacia el mundo de la ciencia, llegar a creer en uno mismo y hacia lo que se realiza; además gracias por tolerarme.

A Dianita Escobar que me apoyo innumerables veces, por ayudarme a tener calma cuando más se requería, sin dejar de mencionar lo experta que es para el laboratorio y compartir conmigo un poco de esa experiencia.

Gracias a todas las personas que permitieron tomarles muestras de su nariz, algunas varias veces, prometí poner el nombre de cada uno, pero ustedes comprenden, sin su aportación esta tesis no existiría.

Agradezco a cada una de las personas que diariamente comprueban mi aguante, tolerancia y persistencia.

Los grandes logros que tengo, no solo es el conocimiento de una bella carrera, Biología, sino el aprender de mí misma, el conocerme y aceptarme. Sobre todo seguir en la escuela de la vida, aceptar sus grandes retos, además de adquirir esa inquietud por el saber y explorar nuevos caminos del conocimiento.

*¡Oh la profundidad de las riquezas y de la sabiduría
del conocimiento de Dios! ¡Cuán inescrutables son
sus juicios e investigables sus caminos!*

Romanos 11:33

*Trata de defenderse, de sostenerse, hace esfuerzos,
nada. ¡Pobre fuerza agotada ya, que combate con lo
inagotable!... Se ve ya sepultado entre dos infinitos, el
océano y el cielo; uno es su tumba; otro su mortaja.*

*La mar es la inexorable noche social en que la penalidad
arroja a sus condenados. La mar es la inmensa miseria. El
alma, naufragando es este abismo, puede convertirse en un
cadáver... Pero lucha todavía.*

*La ola y la sombra; Los Miserables,
Víctor Hugo*

ABREVIATURAS

AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos (aromatic hydrocarbon receptor)
Arnt	Translocador nuclear del AhR (AhR nuclear translocator)
bHLH	basica hélice-rizo- hélice (basic helix-loop-helix)
BP	Benzo[a]pireno
CYP1A1	Citocromo P4501A1
D	Daltons
D.O	Densidades Ópticas
DAB	Diaminobencidina
EROD	etoxiresorufina <i>O</i> -deetilasa
FMO	Flavin-monooxigenasa
GSH	Glutati6n
GST	Glutati6n S-transferasa
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HSP90	Proteínas de choque térmico de 90 kD (heat shok protein)
HTA	Humo del Tabaco Ambiental
IgA	Inmunoglobulinas de tipo A (E y G)
MFOs	Oxidasas de funci6n mixta (mixed-function oxidases)
NADPH	Fosfato de nicotin adenin dinucle6tido, forma reducida
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive of oxygen species)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida Sodio Dodecil Sulfato
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
XAP2	Virus X de hepatitis B unido a proteínas
XRE	Elementos de respuesta a xenobi6ticos

Contenido

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1 Los hidrocarburos aromáticos policíclicos	6
2.2 Exposición	8
2.3 Depósito, absorción, distribución y excreción de partículas inhaladas por el sistema respiratorio	8
2.4 El sistema respiratorio	9
2.5 Fisiología y función de las vías aéreas superiores	10
2.5.1 Mecanismos de defensa no específicos	11
2.5.2 Mecanismos de defensa específicos	12
2.6 Los citocromos P450	13
2.6.1 Actividad de los citocromos	14
2.6.2 Subfamilia 1A	15
2.6.3 El CYP1A1	15
2.7 Los efectos del humo del tabaco en el sistema respiratorio	17
3. Planteamiento del problema	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Material y métodos	20
6.1 Toma y procesamiento de las muestras	20
6.2 Determinación de la concentración de proteínas	20
6.3 Electroforesis	21
6.4 Inmunotransferencia	21
6.5 Revelado	21
6.6 Análisis	22
7. Resultados	23
8. Discusión	31
9. Conclusiones	33
10. Perspectivas	33
11. Bibliografía	34
12. Apéndices	39

1. Resumen

El citocromo 1A1 (CYPIA1) metaboliza los hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP, como el benzo[a]pireno (BP), que se encuentran en el humo del cigarro. Se ha demostrado la inducción de dicha enzima en tejido pulmonar de fumadores y en células epiteliales no ciliadas del sistema respiratorio de ratas expuestas a humo de tabaco (Kim, et al., 2004;Dahl et al., 1993; Witschi et al., 1997).

Existe una importante cantidad de evidencia epidemiológica que asocian el desarrollo de enfermedades respiratorias y cáncer de pulmón al tabaquismo (Hemminki et al., 1994), de allí la intensa campaña de las autoridades sanitarias en todo el mundo para disminuir el consumo de tabaco. Los HAP también se encuentran presentes en el aire contaminado de las grandes concentraciones urbanas como la ciudad de México y son considerados como los principales compuestos carcinogénicos de aire urbano (Hemminky et al., 1994). En nuestro laboratorio hemos desarrollado ensayos en tejido epitelial para evaluar el impacto de la exposición a agentes potencialmente carcinogénicos (Gonsebatt et al., 2000), por lo que nos interesó el investigar la posibilidad de monitorear la expresión de una enzima inducible como el CYPIA1 en epitelio nasal, ya que constituiría un excelente indicador de exposición a HAP. Para ello solicitamos muestras de epitelio nasal a 33 voluntarios, de los cuales 17 declararon ser fumadores y 16 no fumadores. Las muestras fueron procesadas para separar el contenido proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE al 10%) para luego proceder a transferirlas a una membrana de nitrocelulosa y a su inmunodetección con anticuerpos específicos.

Los resultados muestran que las células de epitelio pseudoestratificado de los fumadores presentan una cantidad significativamente mayor de CYPIA1. La cantidad de proteína está relacionada con la cantidad de cigarrillos que los voluntarios afirmaron consumir. Asimismo, cuando comparamos en algunos sujetos la cantidad de la enzima antes y después de fumar observamos un aumento, así como cierta cantidad de la enzima expresándose de manera constitutiva en sujetos no fumadores o fumadores pasivos.

De este trabajo concluimos que el CYPIA1 expresado en epitelio nasal de fumadores prueba la capacidad del epitelio nasal en responder a xenobióticos inhalados que pueden ser sustratos de la enzima, y que van a distribuir en el sistema respiratorio y en el resto del organismo. Esta metodología se puede utilizar para realizar monitoreos individuales de exposición a HAP.

2. Introducción

La Toxicología Ambiental presta mayor atención en descubrir la presencia de agentes tóxicos y sus mecanismos de acción para así poder prevenir sus efectos. Por la importancia en desarrollar mejores mecanismos de protección y nuevas metodologías para evaluar los riesgos de exposición, se han generado estudios experimentales, estudios de prevención, monitoreos ambientales e incluso estudios epidemiológicos.

En el ambiente urbano, la gran cantidad de industrias, ríos de aguas negras, tiraderos de basura así como la intensa movilidad de automóviles, van generando una mala calidad del aire, en el que encontramos mezclas de agentes químicos y materia particulada, contaminantes como hidrocarburos y otros compuestos volátiles orgánicos, esto representa un riesgo de salud a las poblaciones. La exposición a compuestos externos como fármacos, metabolitos de plantas y contaminantes ambientales no polares, se acumulan en los lípidos del organismo. Muchos son carcinógenos, mutagénicos, o se unen al ADN formando aductos como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) (Piipari, et al., 2000).

2.1 Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) son una clase de agentes químicos que se encuentran en la atmósfera, suelo, lagos, océanos e incluso en la cadena alimenticia. Se generan en los procesos de pirólisis y pirosíntesis, es decir, en la combustión incompleta de la materia orgánica, en la quema de desperdicios y en procesos industriales incluso en la contaminación por derrames en pozos petroleros.

Pueden encontrarse en fase gaseosa, sólida o particulada, esto es, dependiendo del peso molecular y la presión de vapor, así como de la temperatura ambiental. Son compuestos no polares por lo que son liposolubles absorbiéndose fácilmente por la piel para penetrar al organismo, sobre todo en fase particulada, insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos como acetona y metanol entre otros. Un ejemplo de HAP es el benzo[a]pireno (BP), este se adhiere a partículas que se encuentran en el ambiente, menores de $3\mu\text{m}$ facilitando su absorción pulmonar, a través de la fracción respirable. Boström et al., (1994) reportaron que la exposición humana a la contaminación del aire urbano, medida como concentración de HAP, es aproximadamente de 20 ng/m^3 , pero la concentración de HAP varía además, dependiendo de la estación del año.

Los HAP más carcinógenos se encuentran en el humo del cigarrillo. Uno de ellos, es el BP que alcanza concentraciones entre 10 a 50 ng por cigarrillo (Smith, et al., 2000). Numerosos estudios señalan a este hidrocarburo como carcinógeno, mutagénico y tóxico (Pelkonen et al., 1982). El BP es biotransformado a 40 metabolitos y conjugados solubles en agua. Este proceso es catalizado por varias enzimas; la primera reacción es con oxidasas de función mixta (MFOs) entre ellas los citocromos P450 (Gelboin, et al., 1980).

El metabolismo del BP es complejo, pero la ruta más importante es mediante monooxigenasas que introducen un átomo de oxígeno en alguna de las diferentes posiciones de la molécula produciendo primeramente un epóxido simple; el segundo paso es una reacción espontánea de epóxidos a fenoles. Otra ruta es la reducción del epóxido con un hidrocarburo (paso 3). El paso cuatro es la formación de quinonas, formándose previamente el radical 6-oxi; mientras los epóxidos pueden ser metabolizados a dioles por la enzima epóxido hidrolasa microsomal (paso 5) o formarse conjugados con glutatión (GSH) por la enzima de fase II glutatión transferasa citosólica (paso 6). Los dioles son deshidrogenados a catecolaminas por dehidrogenasas (paso 7). Dioles, fenoles y quinonas también son conjugadas con ácido glucurónico catalizadas por UDP glucuronosiltransferasa (paso 8) o con sulfato catalizándolas la enzima sulfotransferasa (paso 9). Los fenoles y dioles son sustratos de otras monooxigenasas (paso 10) (Pelkonen O., Nebert D., 1982). En cada una de estas reacciones los productos suelen ser tóxicos, por su reactividad, ya que pueden unirse a macromoléculas como el ADN y proteínas, provocando toxicidad, mutagénesis, y carcinogénesis.

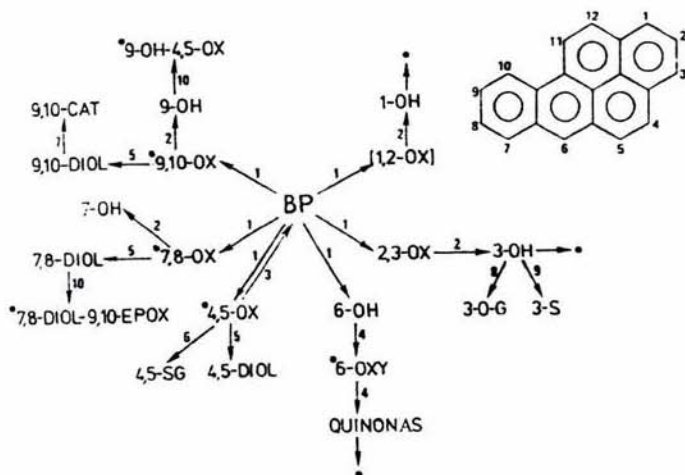


Figura 1. Metabolismo del Benzo[a]pireno. Los metabolitos que se unen covalentemente con macromoléculas están marcados con asterisco. OX, óxido; CAT, catecolamina; DIOL, *trans*-diol; OH, fenol; EPOX, epóxido; SG, conjugados de glutatión; O-G, conjugados glucurónidos; S, conjugados con sulfato; OXY, radical libre oxi.

2.2 Exposición

La exposición ocurre cuando el agente entra en contacto con el individuo. Las vías de exposición más comunes son: respiratoria, dérmica y oral. Después de que el agente químico se pone en contacto con el organismo por las diferentes vías de exposición mencionadas, el agente químico es biotransformado.

La vía respiratoria permite el paso directo de los agentes químicos al torrente sanguíneo. En humanos, aproximadamente 23,000 litros de aire por día interactúan con 70 m² de superficie del tracto respiratorio (Hashek, 1998). Además, el pasaje nasal provee protección al tracto respiratorio de ciertos contaminantes filtrando el aire inspirado. Esto es de vital importancia en ciudades tan contaminadas como México, ya que en el aire existe una gran cantidad de agentes químicos generados, en su mayor parte, por las industrias.

2.3 Depósito, absorción, distribución y excreción de partículas inhaladas por el sistema respiratorio

Las partículas que constituyen la fracción respirable al ser inhaladas presentan un diámetro entre el 0.1 y 100 micras (Hashek et al., 1998). El depósito de la partícula inhalada en el sistema respiratorio depende principalmente de sus características fisicoquímicas así como de los mecanismos de equilibrio del tracto respiratorio. Las partículas con diámetro aerodinámico de 5µm son depositadas por impacto, primero en la región nasofaríngea, en donde hay una velocidad alta del aire. Partículas entre 1-5µm de diámetro se depositan por sedimentación a través del tracto traqueobronquial. Las más pequeñas que oscilan de 0.1 a 2µm de diámetro se depositan en el conducto aéreo en la zona alveolar y es aquí donde actúan los macrófagos alveolares fagocitando las partículas para ser destruidas (Fig. 2).

La absorción, distribución y excreción de partículas que llegan a la nasofaringe pueden ser removidas por reflejos tales como la tos, estornudo o ser ingeridas transportándolas al tracto gastrointestinal excretándose en las heces fecales. Otra ruta, es cuando de la nasofaringe pasan al torrente sanguíneo, se filtran en el riñón y son excretadas en la orina; o bien del torrente sanguíneo pasan al fluido intersticial depositándose en órganos, músculos, hueso o en zonas lipídicas (Fig.3).

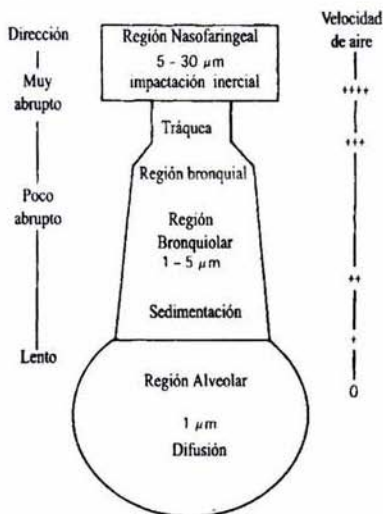


Figura 2. Parámetros de depósito de partículas. Reproducido de Haschek, W. M., Rousseaux, C.G. 1998. Fundamentals of Toxicologic Pathology.

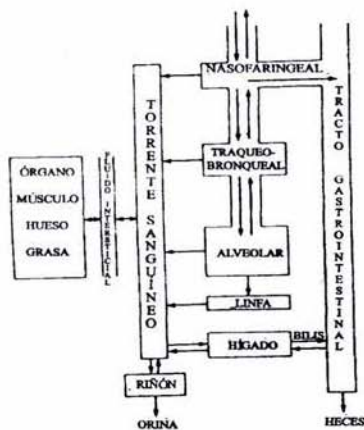


Figura 3. Posible ruta de depósito, absorción, distribución y excreción de agentes inhalados. Reproducido de Haschek, W. M., Rousseaux, C.G. 1998.

2.4 El sistema respiratorio

El sistema respiratorio consta de series de pasajes como la nariz, nasofaringe, faringe, tráquea, bronquios y dos pulmones; su principal función es proveer de oxígeno al organismo y eliminar el dióxido de carbono (CO_2) de la sangre.

Se divide en tres grandes partes: una *respiratoria* localizada en los pulmones, aquí se realiza el intercambio de gases entre el aire inspirado y la sangre; otra *conductora*, que incluye las cavidades nasales, nasofaringe, faringe y tráquea, su principal función es calentar, humedecer y filtrar el aire inspirado antes de que llegue hasta los pulmones donde ocurrirá el intercambio gaseoso. La tercer parte es el sistema *ventilador* que incluye la caja torácica y los músculos intercostales, diafragma y tejido conectivo elástico con el pulmón, los cuales trabajan juntos para mover el aire del tracto respiratorio (Ross et al., 1998).

Las cavidades nasales son cámaras pares separadas por un tabique óseo y cartilaginoso, su epitelio es linear altamente vascularizado con membrana mucosa y consiste de cuatro tipos de epitelios: escamoso estratificado, transicional, respiratorio y olfatorio. Cada cámara se divide en tres regiones: el vestíbulo, el segmento respiratorio y el segmento olfatorio.

El vestíbulo se comunica hacia la parte anterior con el ambiente externo, está revestido por *epitelio estratificado plano* no queratinizado, continúa hacia la piel de la cara, contiene vellosidades que filtran las partículas más grandes antes de que el torrente de aire pase al resto de la cavidad. También posee glándulas sebáceas y sus secreciones contribuyen al atrapamiento de las

partículas, donde finaliza el vestíbulo, el epitelio estratificado plano se hace más delgado transformándose en epitelio pseudoestratificado característico del sistema respiratorio.

El segmento respiratorio o *mucosa respiratoria* calienta, humedece y filtra el aire inspirado. Está constituido por epitelio *pseudoestratificado cilíndrico ciliado*. A su vez este epitelio se compone de seis tipos celulares: células ciliadas, cada cilio de 7µm de altura (Ham, A.W., 1986) células no ciliadas columnares, células cuboidales, células en cepillo, células globulares con mucus y células basales.

El segmento olfatorio está revestido por la *mucosa olfatoria*. Consiste principalmente en un epitelio pseudoestratificado columnar, con lámina basal y lámina propia. También presenta tres tipos celulares: las células basales, las células neurales (olfatorias), y las células sustentaculares las cuales se extienden hasta la lámina basal distribuyéndose uniformemente a través del epitelio olfatorio. La *mucosa transicional* está separada del epitelio escamoso y del epitelio respiratorio ya que consiste de células no ciliadas. Además, el epitelio transicional es el sitio blanco cuando se inhalan tóxicos, aquí son transformados dentro del epitelio secretor (Hashek et al., 1998).

La mucosa de los pasajes nasales contiene diferentes glándulas, como son las glándulas de Bowman's, localizadas en la superficie del neuroepitelio olfatorio, las glándulas sero-mucosas y las glándulas veronasaes situadas en el septum nasal; dichas glándulas contienen gran cantidad de retículo endoplásmico liso, conocido por la presencia de citocromos P450 y otras enzimas que ayudan al ciclo de los citocromos, como la NADPH- citocromo P450 reductasa; enzimas de fase II como glutatión S transferasa y γ -glutamyl transpeptidasa (Brittebo, 1997).

2.5 Fisiología y función de las vías aéreas superiores

La función de las fosas nasales es la de filtrar y calentar el aire inspirado. La filtración se lleva a cabo mediante la ayuda de vellosidades situadas en el vestíbulo de las fosas nasales, las cuales filtran partículas grandes. Sin embargo, la principal vía de eliminación de partículas es mediante *la precipitación turbulenta*, que sucede cuando el aire pasa a través de las vías nasales y golpea muchos de sus relieves obstructivos: los cornetes nasales, el tabique y la pared faríngea, de manera que al cambiar de trayectoria las partículas son atrapadas por el revestimiento de moco y transportadas por los cilios a la faringe para ser deglutidas (Gayton, 2001).

Toda la superficie de las vías respiratorias está revestida de un epitelio ciliado, con unos 200 cilios por cada célula; estos cilios baten continuamente, a una frecuencia de 10 a 20 veces por segundo hacia donde se encuentra la faringe, logrando que el revestimiento del moco fluya

lentamente a una velocidad de 1cm/min (Gayton, 2001). Después, el moco y las partículas que lleva atrapadas se degluten o expulsan al exterior mediante la tos.

El mecanismo nasal de turbulencia para eliminar partículas de aire es tan eficaz que, a través de las fosas nasales, casi no penetran en los pulmones partículas de más de 6 micras de diámetro (Jones, 2001). Sin embargo muchas partículas del tamaño de 1 a 5 micras se depositan en los bronquiolos más pequeños por precipitación o efecto de la gravedad. Otras partículas menores de 0.5 micras de diámetro permanecen suspendidas en el aire alveolar y son expulsadas posteriormente por la espiración.

Las partículas del humo de cigarrillo tienen un tamaño de unas 0.3 micras y casi ninguna de estas partículas se precipitan en las vías respiratorias antes de alcanzar los alvéolos. Hasta una tercera parte de ellas se precipita en los alvéolos por el proceso de difusión, quedando el resto suspendido y siendo expulsado con la espiración. Las partículas atrapadas en los alvéolos son eliminadas por los macrófagos alveolares y otras son eliminadas por los linfáticos pulmonares. El exceso de partículas hace crecer tejido en los tabiques alveolares y produce una debilidad permanente.

El sistema respiratorio presenta mecanismos de defensa específicos y no específicos.

2.5.1 Mecanismos de defensa no específicos

La primer forma de defensa es la precipitación turbulenta, ya antes mencionada, la segunda son los reflejos como la tos y el estornudo que ayudan a eliminar los agentes externos del tracto respiratorio. Esta respuesta fisiológica depende del sitio receptor e incluye cambios en la ventilación, presión sanguínea y en la secreción del moco. Estas funciones minimizan la penetración de partículas al tracto respiratorio.

Las pequeñas partículas que llegan a sedimentarse en el pulmón son destruidas por los macrófagos alveolares quienes destruyen los agentes externos produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico y superóxidos (Hashek et. Al. 1998 y Lang J.D., et. Al. 2002), además contienen enzimas de digestión como las hidrolasas y lisoenzimas.

El pulmón contiene mecanismos de defensa antioxidantes los cuales son importantes para la protección celular contra el estrés oxidativo endógeno y exógeno. Esta protección la llevan a cabo enzimas tales como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, así como sustancias antioxidantes como las vitaminas E, C y el glutatión.

2.5.2 Mecanismos de defensa específicos

Están íntimamente ligados con la defensa inmunológica. El sistema respiratorio presenta dos compartimientos el primero se localiza en el tracto respiratorio superior donde se producen anticuerpos del tipo IgA que son predominantes en la respuesta inmune al nivel de la mucosa. Los anticuerpos del tipo IgE también son sintetizados formando parte de la respuesta hipersensitiva inmediata. El segundo compartimiento inmunológico se localiza en el tracto respiratorio bajo o en la región alveolar, donde hay una respuesta típica inmunológica, con anticuerpos del tipo IgG (Hashek et. Al. 1998 y Jones, 2001).

En las vías respiratorias superiores, las células presentan un gran número de enzimas que metabolizan xenobióticos y están ampliamente distribuidas en las células nasales epiteliales. Existen enzimas donde su principal función es metabolizar dichos compuestos externos, es decir *biotransforman* estos agentes químicos a compuestos solubles en agua para así ser eliminados del organismo.

La biotransformación de los compuestos xenobióticos se divide en dos fases:

FASE I o funcionalización. En esta etapa, un grupo polar es introducido en la molécula, incrementando así su solubilidad en el agua. El efecto más importante es que el agente externo se convierte en un sustrato para las enzimas de la fase II. Las reacciones son oxidación, reducción o hidrólisis, la hidratación de epóxidos y la dehidrohalogenación (Hodgson et. Al. 1994) Dentro del grupo de enzimas de Fase I se encuentran las flavin-monooxigenasa (FMO) y los citocromos P450 (CYP450)

FASE II o de conjugación, aquí el compuesto alterado se combina con un intermediario endógeno produciendo así un producto conjugado más hidrofílico que fácilmente se puede excretar. Las vías de excreción son biliares o conductos urinarios. Los intermediarios endógenos se derivan de carbohidratos, proteínas, componentes con azufre o fosfatos e intermediarios del metabolismo lipídico (Dauterman, 1994). Las enzimas de fase II son la glutatión S-transferasa (GST), glucuronil transferasa y sulfotransferasas entre otras.

En estos procesos de biotransformación, en algunos casos, los productos intermedios o finales suelen ser más tóxicos que el compuesto original, a este fenómeno se le llama *activación metabólica*. Un claro ejemplo de la activación metabólica es la biotransformación que sufren los hidrocarburos aromáticos policíclicos con algunas enzimas de fase I como los citocromos P450s.

2.6 Los citocromos P450

La función de los citocromos P450 fue descubierta por Estabrook, Cooper y Rosenthal en 1963, ellos demostraron que la acción del citocromo P450 se basaba en una reacción de hidroxilación. Más tarde, demostraron la oxidación de varios fármacos por microsomas de hígado que contenían los citocromos P450. Para 1970, habían sido publicados una gran variedad de trabajos donde se demostraba que los citocromos P450 se encontraban ampliamente distribuidos en organismos eucariontes: animales, plantas, hongos y en algunos procariontes. Con la técnica de clonación de DNA en 1980, se comparó la secuencia de aminoácidos de los P450 entre especies, encontrándose una divergencia evolutiva a partir de una forma ancestral simple. Más tarde se demostró que la expresión de algunos P450 es tejido-específica, y durante el desarrollo estadio-específico para algunos animales y plantas, lo que indica la existencia de una alta diversidad de funciones de estas hemoproteínas. (Costas, 1996; Omura 1999).

Los citocromos P450 (CYP450) constituyen una gran familia de hemoproteínas ampliamente distribuidas en tejidos de vertebrados, invertebrados, plantas, hongos y bacterias (Omura, 1993) son enzimas esenciales para la biosíntesis y metabolismo de varios compuestos endógenos como hormonas esteroideas, vitaminas y ácidos grasos (Omura, 1999); también participan en el metabolismo de compuestos exógenos como fármacos, contaminantes ambientales, carcinógenos y xenobióticos. Su principal papel es reaccionar como oxidasas de función mixta.

La distribución de los citocromos a nivel tisular, se ha estudiado principalmente en la fracción microsomal del hígado de mamíferos. Se encuentran localizados en la membrana del retículo endoplásmico (Escobar- García, 2003). Estas enzimas exhiben similitud entre su estructura y sus mecanismos de acción, sin embargo tienen diferencias significativas en la función detallada, y en propiedades del sitio activo (Anzenbacher, et al., 2001). La propiedad más importante de estas enzimas es su habilidad por unir y activar dos átomos de oxígeno. Debido a su amplia distribución y al gran número de enzimas actualmente reportados, se creó una nomenclatura que incluye la raíz del nombre CYP (citocromo P450), un número arábigo designando la familia, una letra indicando la subfamilia y un segundo número arábigo denotando los miembros de dicha subfamilia. Una familia está integrada por aquellas proteínas que tengan un grado de similitud en su secuencia de aminoácidos $\geq 40\%$; a su vez, los miembros de una subfamilia tienen al menos el 55% de similitud en su secuencia de aminoácidos y los miembros de cada subfamilia sólo difieren en un 3% de su secuencia (Gonzalez, 1990; Anzenbacher, 2001).

2.6.1 Actividad de los citocromos

La reacción del CYP450 se propone como un “mecanismo cíclico” el cual inicia con la reducción del grupo hemo del CYP, a una forma ferrosa (Fe^{2+}), se introduce un primer electrón donado por la molécula NADPH, así el sustrato se puede unir al citocromo P450, a este complejo se une el O_2 molecular. El segundo electrón es introducido a la forma oxidada de la hemoproteína ferrosa resultando en la activación de la molécula unida la oxígeno, el sustrato oxidado es liberado y el citocromo regresa a su estado férrico (Fe^{3+}) para iniciar otro ciclo (Omura, 1993). El primer electrón de la reducción a la forma ferrosa del citocromo P450 es siempre suministrado por NADPH-citocromo P450 reductasa, mientras que el segundo electrón de la activación del hemo unido a átomos de oxígeno es transportado por la citocromo b_5 reductasa. (Donald deBethizy y Hayes, 1994)

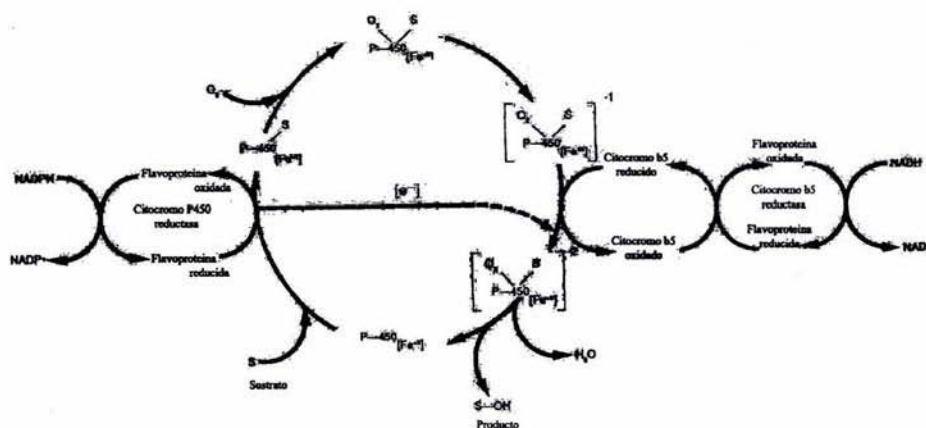


Figura 4. Ciclo catalítico del citocromo P450 dependiente a monooxigenasas

2.6.2 Subfamilia 1A

Esta subfamilia tiene dos miembros el CYP1A1 y el CYP1A2 cuyos genes se encuentran localizados en el cromosoma 15 en humanos. Poseen una secuencia de 512 aminoácidos, su peso molecular es de 58,165 D, el CYP1A2 con 516 aminoácidos y su peso molecular de 58,082 D, el porcentaje de similitud entre ellos es de 71.7% (Kawajiri, 1996). Se han hallado en el perro, el

conejo, el ratón, la rata y en el hámster. La secuencia del CYP1A1 se ha determinado también en monos y en peces.

Los dos miembros de la subfamilia CYP1A son muy similares entre sí por su estructura primaria, así como sus propiedades fisicoquímicas, aunque presentan diferencias al nivel de los sustratos que metabolizan como en su distribución en los tejidos, expresados en niveles de RNAm y de proteínas. Por ejemplo el CYP1A1 no sólo se expresa en el hígado, también se expresa en varios tejidos, como pulmón, riñones, esófago, estómago, intestino delgado y colon (Ding X., 2003); mientras que la expresión del CYP1A2 se mantiene confinado únicamente al hígado. El CYP1A1 se caracteriza por metabolizar a los HAP y el CYP1A2 metaboliza las aminas aromáticas y la cafeína.

2.6.3 El CYP1A1

El producto del gen *cyp1a1* es la enzima conocida como hidroxilasa de hidrocarburos aromáticos (AHH) que cataliza el primer paso en la bioactivación de muchos carcinógenos ambientales tales como el BP presente en el humo del cigarrillo. En humanos se considera como una enzima extrahepática, porque se ha encontrado cantidades considerables de RNAm y su proteína en pulmón, linfocitos y placenta de fumadores activos. El CYP1A1 es la enzima microsomal responsable de la activación de hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinógenos, tal como el BP en tejidos extrahepáticos. (Kawajiri, 1996)

El gen *cyp1a1* esta localizado en el cromosoma 15q22-q24 (Gibson y Skett, 1994), se han estudiado cuatro polimorfismos genéticos en relación con la susceptibilidad al cáncer. Uno es el CYP1A1*2A que fue detectado por medio del reconocimiento de la enzima *MspI*, este polimorfismo se encuentra en la región 3'-flanqueante con una sustitución de Arg554 por lisina, asociada con la susceptibilidad a cáncer de pulmón en la población Japonesa (Landi et al., 1994 en Smart et al., 2000) CYP1A1*2B es también positiva para el reconocimiento de la enzima *MspI*, se encuentra en la región del exón 7 con resultados en la sustitución del aminoácido Ile462 por valina (Hayashi et al., 1991 en Smart et al., 2000). Otro polimorfismo, el CYP1A1*3 es específico para la población Afro-Americana se localiza en la región 3' no codificante (Taioli et al., 1998 en Smart et al., 2000). El polimorfismo más reciente es el CYP1A1*4 localizado también en el exón 7 con una sustitución de Thr461 por asparagina. (Kawajiri, 1999 y Smart et al., 2000).

La expresión del gen de CYP1A1 es regulada por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR). En ausencia del inductor, este receptor se encuentra en el citoplasma unido a proteínas de choque térmico con un peso de 90 kD (HSP90), XAP2 (virus X de hepatitis B unido a proteínas) y p23 se requieren para mantener la estabilidad del complejo de hsp90 (Mimura, 2003 y Whitlock, 1995).

Cuando un agente o xenobiótico inductor liposoluble como el BP o el TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina) se une al AhR, se disocia el complejo AhR/Hsp90/XAP2/p23 para unirse al inductor formando un complejo BaP-AhR en el citoplasma este complejo se une al translocador nuclear del AhR (Arnt), facilitando la translocación al núcleo celular, en el núcleo este complejo se une a la secuencia consenso de los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) determinada por 5'-TNGCGTG-3', resultando en la transcripción del *CYP1A1*. Tanto el AhR y Arnt son miembros estructuralmente relacionados con la familia de factores de transcripción designada como bHLH (basic helix-loop-helix) (Mimura, 2003 y Whitlock, 1995).

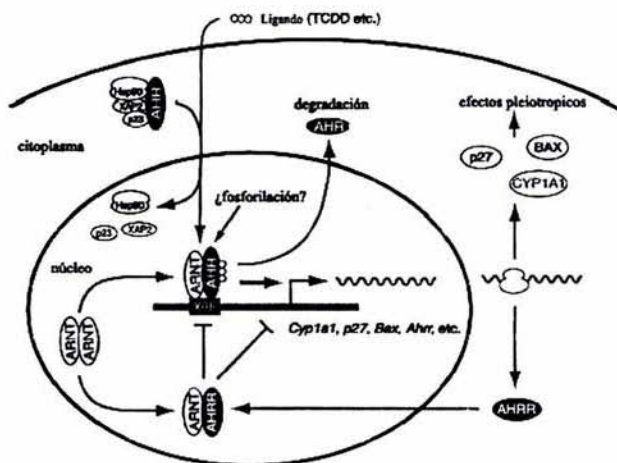


Figura 5. Inducción del CYP1A1 por el AhR. Mimura. J., Fujii-Kuriyama. Y. 2003

2.7 Los efectos del humo del tabaco en el sistema respiratorio

Un estudio epidemiológico reporta la existencia de al menos 482 ingredientes activos en el tabaco; muchos incrementan la actividad biológica enzimática, producen carcinogenicidad, mutagenicidad y citotoxicidad; de estos ingredientes, 291 se transfieren un 99% intactos a la atmósfera y el 1% son transformados por pirólisis (Baker et al., 2004)

Los estudios epidemiológicos proveen una evidencia directa sobre el riesgo de cáncer pulmonar en humanos. En el caso de una exposición ocupacional, se requiere una exposición de $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ de BP por día, para desarrollar cáncer de pulmón. Un fumador activo (promedio 8 cigarrillos por día) se encuentra expuesto a aproximadamente 400 ng/día de BP. Fumar tabaco es el primer factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón y en áreas urbanas hay un aumento al riesgo en padecer cáncer de pulmón en mujeres y en no fumadores por la exposición ambiental a HAP (Hemminki et al., 1994).

En 1997 Witschi y colaboradores (1997) reportaron la carcinogenicidad del humo del tabaco ambiental (HTA); este humo se compone de un 15% del humo interno, siendo el humo inhalado y luego exhalado por el fumador, y un 85% del humo externo; esta mezcla es la que inhalan los fumadores pasivos. Al exponer ratas a dicho HTA se generan tumores en epitelio bronquial y alveolar, además un incremento en la síntesis del ADN, así como de la enzima CYP1A1 en pulmones y en células epiteliales no ciliadas.

El efecto del humo externo se refleja a nivel celular afectando la estructura y función de fibroblastos (las células encargadas de la cicatrización y reparación de los tejidos), activa proteínas de estrés en el retículo endoplásmico, estimula proteínas encargadas en la proliferación e inhibe la migración celular, estos procesos repercuten en una mala cicatrización, muy común entre fumadores, además en enfermedades como cáncer y fibrosis pulmonar (Wong et al., 2004).

Diferentes estudios han demostrado que la cantidad de aductos HAP-ADN en macrófagos bronqueoalveolares de fumadores es mayor que la observada en no fumadores y se relaciona exponencialmente con el número de cigarrillos fumados por día. Además, los fumadores presentan un incremento en la expresión de enzimas que metabolizan xenobióticos como CYP1B1 y CYP3A; la proporción de macrófagos también resultó más elevada en fumadores. Sin embargo en este estudio no se observó una relación entre la expresión del CYP1A1 en los macrófagos y la formación de aductos HAP-DNA como lo reportaron Piipari et al., 2000.

McLemore et al. (1990) reportaron una asociación positiva entre la actividad de fumar cigarrillos y la expresión del gen *cyp1a1* en tejido normal de pulmón; la expresión de dicho gen se ha detectado en ciertos carcinomas pulmonares acompañada con otros citocromos que metabolizan compuestos promutagénicos y procarcinógenos. Además, la cantidad de RNAm del CYP1A1

disminuye al dejar de fumar durante dos semanas y desaparece por completo a las seis semanas. Gervasi et al., (1991) reporta la actividad general de enzimas que metabolizan xenobióticos en epitelio nasal de humanos; entre ellas la actividad del CYP1A1 mediante el ensayo de EROD (etoxiresorufina *O*-deetilasa) en biopsias de mucosa respiratoria de humanos encontrando una baja actividad del CYP1A1 con respecto al hígado humano, y una alta expresión de la enzima de fase II GST (glutatión *s*-transferasa).

Los fumadores muestran mayores niveles de expresión del *CYP1A1* en pulmón (15.5 pmol/mg microsomal de proteína) que los no fumadores (6.5 pmol/mg microsomal de proteína) pero no diferentes que de los ex-fumadores (19.0 pmol/mg microsomal de proteína), indicando así que en los fumadores hay una mayor capacidad metabólica responsable de la activación de muchos procarcinógenos y xenobióticos causados por el tabaco (Kim, et al., 2004).

La mucosa nasal de varias especies presenta niveles significativos de enzimas que metabolizan xenobióticos. Por ejemplo, en la mucosa nasal de rata, se hallaron isoenzimas P450 como la CYP1A1, CYP2B1 y CYP4B1 (Dahl et al., 1993). También en la cepa de rata F344 se observó la expresión del CYP1A1, CYP1A2 y CYP2B1/2 en células ciliadas de la mucosa nasal expuesta al humo de cigarrillo (Wardlaw, et al., 1998). Los citocromos P450 que se han detectado en los pasajes nasales sugieren que éste es el primer mecanismo de defensa contra los xenobióticos inhalados.

El transporte de BP inhalado por ratas llega a la mucosa olfatoria, en las células sustentaculares y en las células con glándulas de Bowman's aquí es bioactivado por el CYP1A1, sus productos se establecen en la zona apical de las células olfatorias neuronales uniéndose covalentemente a macromoléculas, además el BP o sus metabolitos pueden viajar a través de los axones de dichas células, generando inducción de tumores cerebrales (Persson et al., 2002).

Frye y colaboradores (1990) reportan los efectos del humo del cigarro en la función olfatoria de animales, mostrando que se causan cambios anatómicos en el epitelio olfatorio, incluyendo la reducción en el tamaño y número de vesículas olfatorias además de las células ciliadas.

A pesar de los efectos del cigarro, un estudio epidemiológico concluye que el riesgo a desarrollar cáncer se incrementa con los años que se ha fumado y se intensifica con la cantidad de cigarrillos por día (Flanders et al., 2003), este riesgo se incrementa también para los fumadores pasivos que consumen un bajo nivel de vegetales (Brennan et al., 2004).

3. Planteamiento del problema

El tejido nasal es el primer punto de contacto que tienen los xenobióticos inhalados por un organismo. Por lo tanto, el epitelio nasal es un tejido centinela en donde podemos evaluar la exposición humana a sustancias tóxicas y carcinógenas, ya que “la nariz es la ventana abierta hacia el sistema respiratorio” (Calderón et al., 1998).

Los HAP son los carcinógenos más abundantes en el aire urbano. El humo del tabaco, contiene algunos de estos HAP, por lo que los fumadores están expuestos a niveles más elevados de ellos. Existen trabajos que demuestran la expresión de CYP1A1 en la mucosa nasal de roedores expuestos al humo de cigarro, (Dahl, 1993; Wardlaw, 1998) dicha expresión se ha relacionado con la etiología de carcinomas pulmonares (Witschi et al., 1997; Kim, et al., 2004) por lo tanto sería posible demostrar un efecto similar en la mucosa nasal de humanos, específicamente en la mucosa nasal de fumadores.

4. Hipótesis

Si el humo del cigarrillo contiene hidrocarburos aromáticos policíclicos inductores de enzimas que metabolizan xenobióticos entonces las personas fumadoras presentarán una mayor concentración de CYP1A1 en células del epitelio nasal.

5. Objetivo general

Investigar la presencia del CYP1A1 en células del epitelio nasal de personas fumadoras y no fumadoras.

Objetivos particulares

- ❖ Determinar la presencia del CYP1A1 en células del epitelio nasal de personas fumadoras mediante western blots.
- ❖ Determinar la presencia del CYP1A1 en células del epitelio nasal de personas no fumadoras mediante western blots.
- ❖ Realizar un análisis semicuantitativo comparando la concentración de CYP1A1 entre fumadores y no fumadores.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Toma y procesamiento de las muestras:

Un grupo de 33 personas adultas sanas, accedieron voluntariamente a participar en el estudio, 17 de ellas fueron fumadores y 16 no fumadores. Se les realizó un cuestionario en donde se colectó información acerca de la edad, género, número de cigarrillos consumidos, estado general de salud y en el caso de los no fumadores si vivían o pasaban mucho tiempo junto a personas que fumaban. La toma de muestra se realizó con un cepillo citológico, raspando la cavidad nasal de ambas fosas. El cepillo fue sumergido inmediatamente en un tubo tipo Eppendorf conteniendo 500µl de una solución para lisar las células compuesta por: 50mM de Tris- HCl (pH: 8); 150mM NaCl; 0.02% de Azida de Sodio; 100 µg/ml de PMSF; 1 µg/ml de Aprotinina y 1% de Tritón X-100. Se cortó el mango del cepillo, para tapar el tubo el cual se agitó en un vortex durante 3 minutos, se extrajo el cepillo y se congeló el lisado celular a -70°C hasta su análisis. Antes de proceder al análisis de las proteínas, se eliminó parte del disolvente para concentrar las muestras hasta obtener un volumen final de 200 µl en una concentradora tipo Eppendorf, a temperatura ambiente, durante 90 minutos aproximadamente.

6.2 Determinación de la concentración de proteínas:

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras con el Kit Lowry D_C (BIORAD). Para ello se realiza una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina (BSA). Se parte de una solución madre de 1.4mg/ml. Se hicieron duplicados de 3.6, 7.0, 14.2, 21.4, 28.6, 35.6, 71.4, 107.1 µl del stock de albúmina, equivalentes a 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, y 250 µg respectivamente, se agregó a cada uno 100 µl de la solución A' (adicionar 20 µl del reactivo S a cada mililitro del reactivo A preparar al instante), se agita y se agrega 800 µl de la solución B (BIORAD), se vuelve a agitar y se deja incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se determinó en una absorbancia de 750 nm en una cubeta de polipropileno de 1ml en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). Tomando un volumen de 20 µl de la muestra se agrega el mismo volumen de las soluciones A' y B, se incuba durante 15min, y se lee a la misma absorbancia. Los valores de absorbancia de la albúmina se utilizan para realizar la curva estándar en el programa Graph Pad InStat. Los valores de absorbancia de las muestras se interpolan a partir de la curva patrón de albúmina para calcular la concentración de proteína.

6.3 Electroforesis

Se ajustó la cantidad de proteína a 45 µg por carril para cada muestra. A cada volumen se le agregó amortiguador de aplicación (500 µl: 253 µl de agua desionizada; 63 µl de Tris-HCl (pH 6.8); 53 µl de glicerol; 105 µl de SDS al 10%; 26 µl Azul de Bromofenol (0.1%) y 25 µl de β-mercaptoetanol.) se desnaturalizaron durante 2 minutos a 95°C. Posteriormente las muestras se colocaron en geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se utilizó un gel separador al 10% y un gel concentrador al 4%. En cada electroforesis se utilizó un control positivo de CYP1A1 de humano (GENTEST) y un marcador de peso molecular preteñido (Invitrogen Life Technologies). Se corrieron las muestras durante 95 minutos a 100 v. Una vez terminada la electroforesis se realizó la inmunotransferencia que se describe a continuación

6.4 Inmunotransferencia

Este proceso consta de varios pasos, la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL), durante 90 minutos a 100 V, después se tratan a las proteínas transferidas con una solución bloqueadora (apéndice) durante toda la noche, con agitación moderada y en frío (4°C). El segundo paso es la incubación de la membrana con los anticuerpos específicos para la proteína que deseamos revelar, en este caso se utilizaron anticuerpos primarios policlonales anti-CYP1A1 humanos (CHEMICON International). La membrana se incubó durante 60 minutos a una dilución 1: 3000 en PBS con 1% de leche en polvo y 1% de BSA. Posteriormente para revelar la presencia del complejo, se incubó la membrana con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa durante 60 minutos a una dilución 1:500 en PBS con 1% de leche en polvo y 1% de BSA. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 al 0.1% y un último lavado con TBS.

6.5 Revelado

La presencia de la proteína se reveló con 10mg de diaminobenzidina DAB (BIORAD) en 20ml de PBS y 2µl de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie durante 120 minutos y se destiñó con una solución de metanol al 30%, 50% de agua y 20% de ácido acético hasta que las bandas fueron visibles.

6.6 Análisis

Las membranas se analizaron con el software Quantity One para PC Windows 95/98/2000. Se tomó como parámetro de medición las densidades ópticas por milímetro cuadrado (D.O./mm²). Se obtuvo el porcentaje de proteína presente mediante lo siguiente, D.O. del control positivo entre D.O. de cada muestra multiplicado por cien. $(\frac{D.O_c +}{D.O_{muestra}} (100))$. Los valores obtenidos en los fumadores y no fumadores fueron comparados mediante pruebas no paramétricas como la U de Mann-Whitney (fumadores y no fumadores). La correlación entre la presencia del CYP1A1 y la cantidad de cigarrillos consumidos se investigó mediante un análisis de correlación de Spearman.

7. Resultados

En las siguientes figuras se observan la inmunodetección del CYP1A1 de los 33 lisados celulares de epitelio nasal de fumadores y no fumadores. Podemos observar una mayor expresión de la proteína en las muestras de fumadores, con excepción de algunas muestras como 18F(Fig.6 A), 22F(Fig.7 A) y 31F(Fig. 8 A). Sin embargo, en las muestras de los no fumadores se observa una menor expresión de la proteína, comparada con los fumadores a excepción de las muestras 27N y 29N (Fig.11 A). Esto se corrobora con el análisis densitométrico de cada una de las muestras.

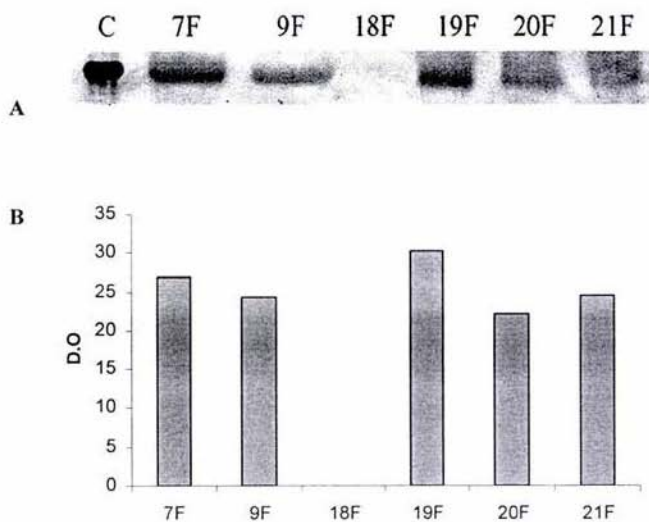


Figura 6. A) Inmunodetección del CYP1A1 de fumadores; C = control positivo, F= fumador: B) Gráfico de Densidades ópticas.

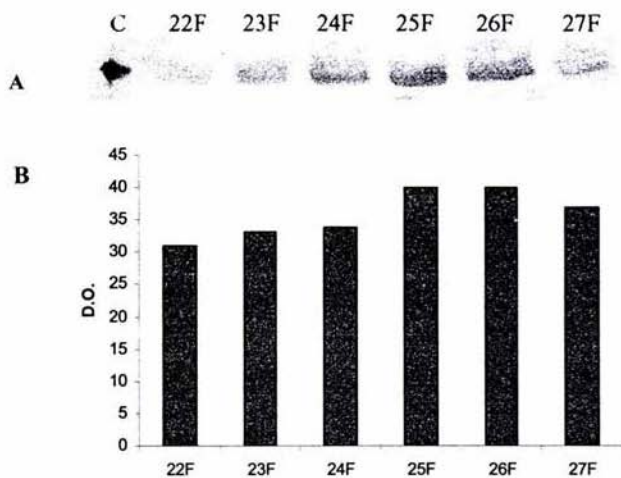


Figura 7. A) Inmunodetección del CYP1A1 de fumadores; C = control positivo, F = fumador: B) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado.

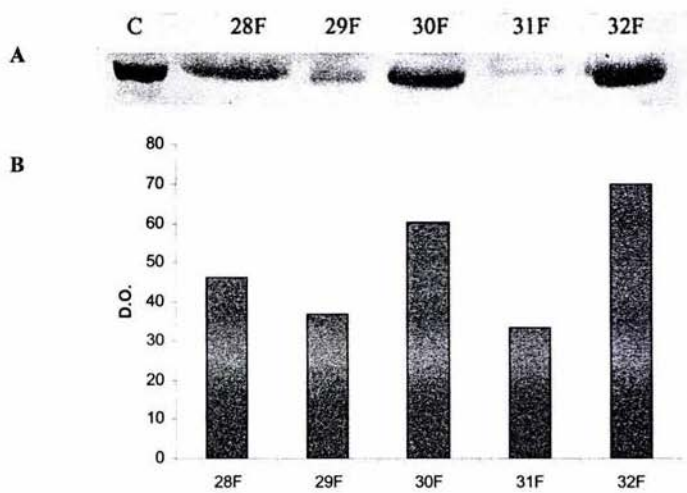


Figura 8. A) Inmunodetección del CYP1A1 de fumadores; C = control positivo, F = fumador: B) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado.

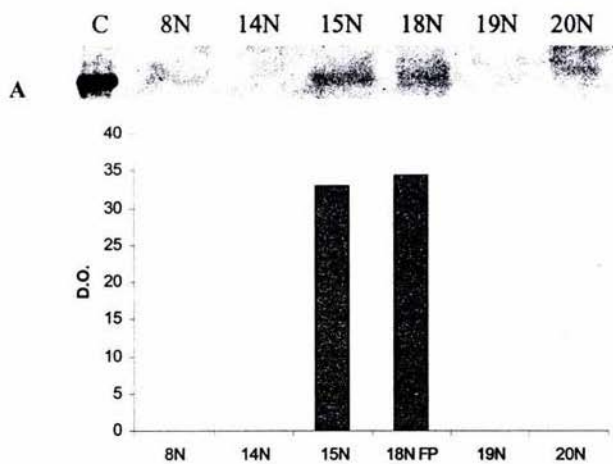


Figura 9. A) Inmunodetección del CYP1A1 de No fumadores; C = control positivo, N = no fumador: B) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado.

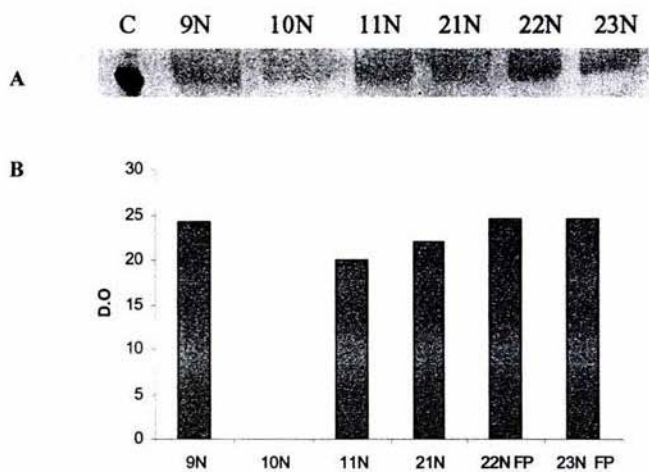


Figura 10. A) Inmunodetección del CYP1A1 de No fumadores; C = control positivo, N = no fumador: B) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado.

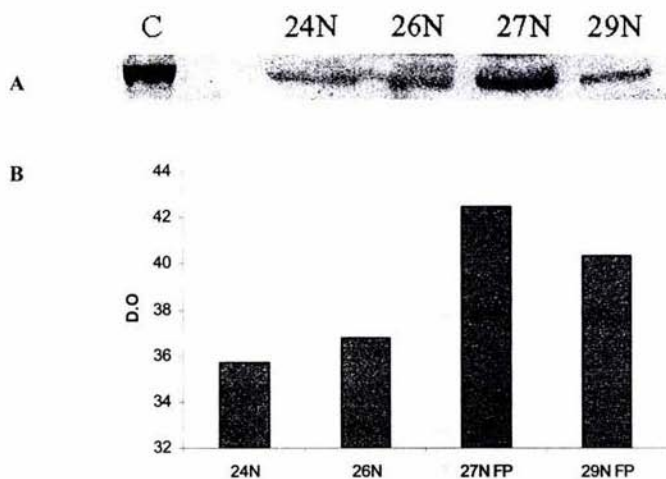


Figura 11. A) Inmunodetección del CYP1A1 de No fumadores; C = control positivo, N = no fumador;
 B) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado.

La expresión del CYP1A1 es mayor después de fumar el primer cigarrillo del día ya que se observa mayor expresión comparando las muestras 30Fa y 32Fa tomadas antes de fumar con respecto a las muestras 30Fb y 32Fb respectivamente después de haber fumado.(Fig. 12 A). Al igual con la muestra del fumador 18F (Fig.6A) donde no hubo inmunodetección de proteína comparándola con la muestra 18F(Fig. 12A) que fue tomada después de fumar. La figura 12 B muestra el gel de electroforesis teñido con azul de Cumassie mostrando el control de carga para cada muestra.

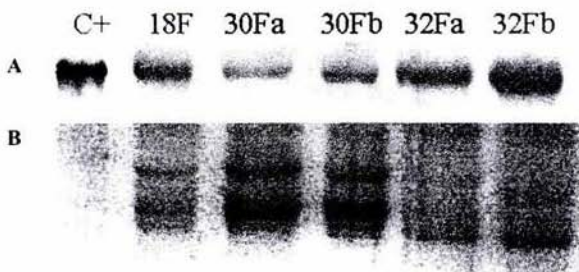


Figura 12. A) Muestras de epitelio nasal de fumadores. Fa muestra antes de fumar; Fb muestra después de fumar. B) Gel teñido con Azul de Cumassie.

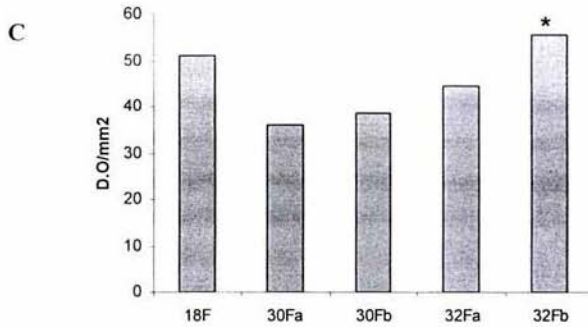


Figura 12. C) Gráfico del análisis en densidades ópticas por milímetro cuadrado, de las muestras 18F, 30F y 32F, antes y después de fumar

Una prueba de Mann-Whitney demostró una diferencia significativa en la expresión del CYP1A1 medida por densitometría en el epitelio nasal de fumadores (n =17) con respecto a no fumadores (n =11) ($p = 0.0026$; Fig.13).

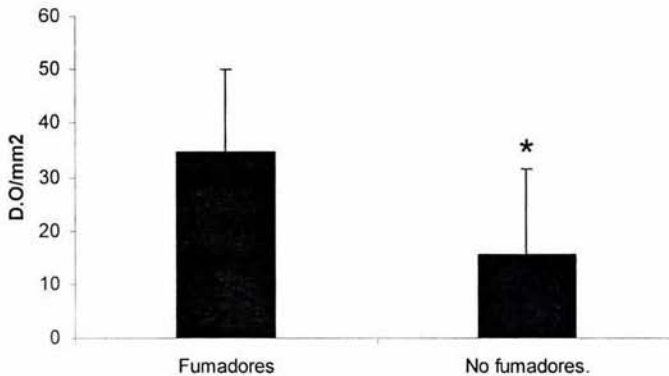


Figura 13. Promedio de densidades ópticas de Fumadores y No Fumadores.* Diferencia significativa $p = 0.0026$.

Además la expresión de CYP1A1 en epitelio nasal de mujeres fumadoras (n =8) con respecto a la expresión de CYP1A1 en epitelio nasal de mujeres no fumadoras (n =6) presentan diferencias significativas con una $p = 0.0023$ (Fig.14). Sin embargo, no hay diferencias significativas

entre la expresión de CYP1A1 en muestras de hombres fumadores (n =9) y la expresión de esta proteína presente en muestras de hombres no fumadores (n =5) con una $p = 0.1427$ (Fig.14).

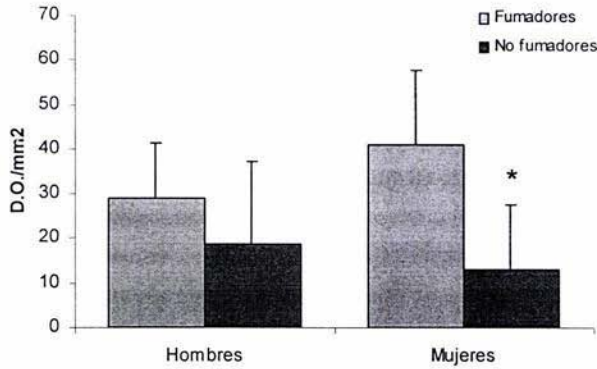


Figura 14. Promedio de densidades ópticas entre Fumadores y No Fumadores, Hombres y Mujeres. * Diferencia significativa $p = 0.0023$.

El análisis de correlación de Spearman, entre el logaritmo del número de cigarrillos fumados por día contra las densidades ópticas del CYP1A1 de cada uno de los voluntarios se obtuvo una $r_s=0.4269$ y una $p=0.0235$, considerada significativa. (Fig. 15) Esta prueba nos indica que el 42% de la expresión de la enzima se debería al número de cigarrillos fumados por día

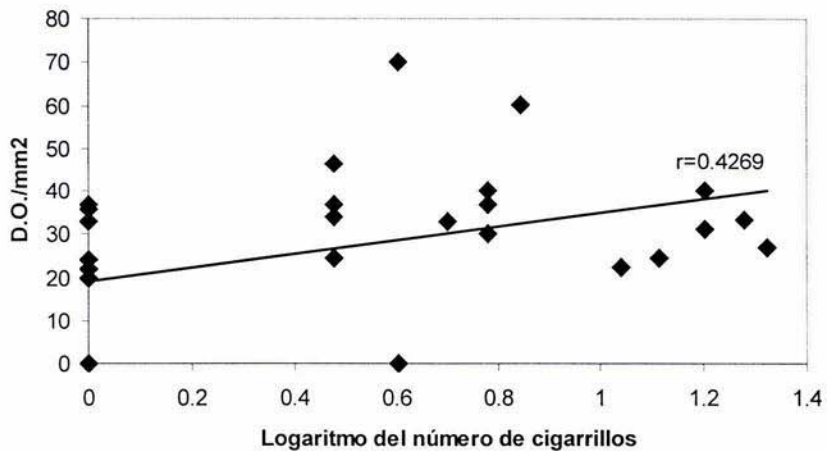


Figura 15. Logaritmo del numero de cigarrillos fumados por día contra densidades ópticas de cada muestra. $r_s = 0.4269$ con una $p = 0.0235$.

En la Tabla 1 muestra en forma resumida el número total de personas fumadoras que presentaron inducción de CYP1A1 así como las personas que no presentaron, al igual personas no fumadoras que llegaron a presentar dicha inducción. En la revisión de cuestionarios se encontró que algunas personas no fumadoras caen en la categoría de fumadores pasivos, ya que conviven con fumadores y éstas presentaron expresión del CYP1A1 como las muestras 18N(Fig. 9 A), 22N, 23N(Fig.10 A), 27N y 29N (Fig. 11 A).

	Fumadores Inducción / muestras	No fumadores Inducción / muestras	Fumadores Pasivos Inducción / muestras
Mujeres	8/8	3/6	1
Hombres	8/9	3/5	4
Total	16/17	6/11	5

Tabla 1. Inducción de CYP1A1 en muestras de epitelio nasal de humanos.

La expresión del CYP1A1 en epitelio nasal fue variable de 0 a 69.9 DO/mm² entre fumadores con una media de 34.7 DO/mm² (Fig. 6B,7B,8B). En no fumadores se encuentra una variación de 0 a 42.5 DO/mm² con una media de 21.13 DO/mm² (Fig. 9B,10B,11B). Dichos datos se resumen en la Tabla 2.

FUMADORES						NO FUMADORES					
muestra	D.O/mm ²	Edad	# cig/día	sexo	Fumadores en casa	muestra	D.O/mm ²	Edad	# cig/día	sexo	Fumadores en casa
7F	26.8	27	20	M	1	8N	0	26	0	M	0
9F	24.4	29	13	M	2	9N	24.2	23	0	F	0
18F	0	27	3	M	2	10N	0	23	0	F	0
19F	30.2	24	5	M	2	11N	19.9	26	0	F	0
20F	22.2	25	12	F	4	14N	0	17	0	F	0
21F	24.5	22	2	F	4	15N	33.0	49	0	F	0
22F	31.0	23	15	M	1	18N FP	34.5	20	0	F	3
23F	33.0	25	4	M	2	19N	0	23	0	F	0
24F	33.9	23	2	F	2	20N	0	23	0	M	0
25F	40.1	32	15	M	1	21N	21.9	22	0	M	0
26F	39.9	26	5	M	2	22N FP	24.6	22	0	M	2
27F	36.8	27	5	M	1	23N FP	24.5	27	0	M	3
28F	46.3	22	2	F	3	24N	35.7	24	0	M	0
29F	36.9	23	2	F	2	26N	36.7	35	0	M	0
30F	60.3	19	6	F	1	27N FP	42.4	22	0	M	2
31F	33.3	22	20	F	1	29N FP	40.3	22	0	M	2
32F	69.9	23	3	F	1						
media	34.7	24.6	7.8		1.8	media	21.1	25.25	0		0.75

Tabla 2. Datos de los cuestionarios aplicados a los voluntarios

En la figura 16 se muestra el CYP1A1 identificado por anticuerpos en células de epitelio nasal de fumadores, principalmente se observan células pseudoestratificadas ciliadas (A , B). En no fumadores la inmunoreactividad del CYP1A1 fue menor (C) . Las células planas (D) abundantes del epitelio respiratorio fueron poco reactivas para el CYP1A1.

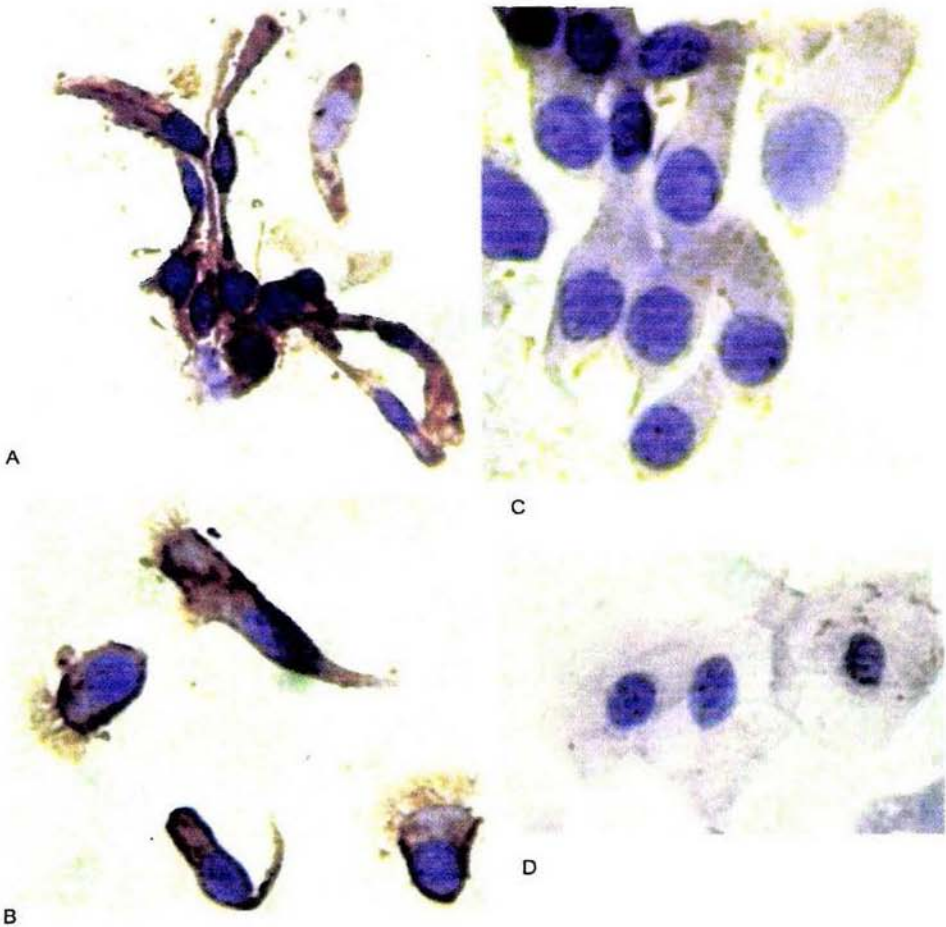


Figura 16. Inmunohistoquímica de células del epitelio nasal. A y B) células pseudoestratificadas ciliadas de fumador; C)células pseudoestratificadas ciliadas de no fumador D)células planas.

8. Discusión

El epitelio de las cavidades nasales tiene una gran variedad de tipos celulares como son células ciliadas, no ciliadas, células globulares, cuboidales y basales. Sin embargo, en nuestro estudio y como se observa en la Figura 16, las células examinadas fueron fundamentalmente las del epitelio plano y las células pseudoestratificadas ciliadas. En estas últimas fue donde se observó una mayor inmunoreactividad para el CYP1A1. Dichas células pertenecen a la mucosa respiratoria, donde ya se habían reportado actividad de citocromos P450 en humanos (Gervasi et al., 1991).

La inducción observada de la enzima CYP1A1 en el epitelio nasal es probablemente debida al hábito de fumar y al número de cigarrillos que las personas consumen por día (Fig. 15).

Otro hallazgo interesante de este trabajo fue la mayor inmunorreactividad para el CYP1A1 después de fumar (Fig.12). Esto nos habla de la posibilidad de demostrar la inducción de esta enzima en un tejido blanco en un plazo muy breve. Esta observación es importante no sólo desde el punto de vista mecanístico, sino que también podría servir para identificar a sujetos expuestos involuntariamente a sustratos de este citocromo. Trabajos posteriores para investigar la relación temporal de la inducción ayudarán a aclarar este punto.

La expresión elevada de la enzima en algunos individuos que se reportaron como no fumadores (Fig.10 y 11) en algunos casos bien establecidos, se debió probablemente a una exposición pasiva (fumadores pasivos), ya que conviven en su mayor tiempo con fumadores; esto es, en el lugar de trabajo o por la asociación estrecha con fumadores (Tabla 2). En otros casos no se pudo establecer con seguridad que se tratase de fumadores pasivos. Además los datos, revelan que hubo un mayor número de hombres que son fumadores pasivos, ya que no existen diferencias entre la expresión del CYP1A1 entre hombres fumadores y no fumadores. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas entre mujeres fumadoras y no fumadoras con una $p=0.0023$ (Fig. 14).

Las diferencias en la expresión de CYP1A1 dentro de un mismo grupo (fumadores o no fumadores) se pueden deber a la existencia de polimorfismos genéticos del citocromo o a polimorfismos de las proteínas implicadas en la inducción del CYP1A1 cascada arriba como Ahr y Arnt (Garte et al., 1999). Sin embargo, otra posibilidad podría ser la mencionada por Anttila y colaboradores (2001) quienes encontraron que la variación interindividual en los niveles de CYP1A1 en las muestras de tejido pulmonar de fumadores, no se atribuye al polimorfismo genético del CYP ni del Ahr, sino a la cantidad de cigarrillos fumados por día.

La variación en expresión de CYP1A1 observada se puede deber además a la edad, al género, así como al estilo de vida y a la exposición a contaminantes ambientales las cuales podrían jugar un papel importante en las variaciones en actividades enzimáticas del epitelio nasal (Dahl y

Lewis, 1993) Para descartar estas influencias es necesario realizar estudios con un mayor número de individuos.

Por lo limitado de la cantidad de muestra que se obtiene con el cepillo citológico, no se pudo medir la actividad de la enzima por el ensayo EROD. Sin embargo, Gervasi (1991) determinó la actividad EROD en biopsias de epitelio respiratorio de humano con un promedio de 25 pmol/ mg, lo que representa el 5% de la actividad que se observa en el hígado humano. Esto podría explicar por qué no pudimos obtener suficiente cantidad de proteína para medir actividad con el cepillo citológico.

Comparando con el cáncer de pulmón, existe una baja incidencia de cáncer nasal en humanos (1% de todos los cánceres) (Thornton y Dahl, 1997) probablemente porque, como ya mencionamos, la actividad del CYP1A1 en la nariz es muy baja como para generar suficiente cantidad de metabolitos que se unan al ADN como ocurriría en las células del pulmón en donde sí podrían darse las mutaciones asociadas a la exposición a HAP observadas en tumores (McLemore et al., 1990; Witschi et al., 1997).

Se ha reportado la existencia de individuos que son más sensibles a ciertos xenobióticos que otros, debido a las diferencias en su capacidad metabólica, ya que el fenotipo (expresión y actividad de la enzima) no sólo depende del genotipo (la información genética, en este caso las variantes alélicas de la enzima) sino también de la exposición a compuestos como moduladores en la expresión de la enzima (Autrup, 2000) en este caso a la intensidad de fumar y el tiempo que se tiene fumando, así como al estado nutricional, el sitio en donde vive, en este caso la ciudad de México, entre otros.

El encontrar dichas variaciones de niveles enzimáticos en humanos es crucial ya que pueden ayudar a demostrar la susceptibilidad individual a ciertos efectos tóxicos o xenobióticos. Como podría ser el caso de fumadores como 22F, 29F y 31F, en los que la expresión del CYP1A1 no es igual a lo encontrado en el resto de fumadores, o el caso de no fumadores como 15N, 24N y 26N (Fig. 9A y 11A), que presentan inducción del citocromo a pesar de no ser considerados fumadores pasivos (Tabla 2)

El CYP1A1 expresado en epitelio nasal de fumadores, prueba que el tejido nasal es capaz de responder a los xenobióticos inhalados al sistema respiratorio (Calderón et al., 1998) aquí es donde se inicia su biotransformación. Aunque este trabajo representa el primer reporte a este respecto, realizado en humanos, las respuestas resultan similares a las encontradas en el epitelio nasal de ratas expuestas al humo de cigarro (Dahl et al., 1993; Wardlaw, et al., 1998).

Es importante investigar la capacidad metabólica del tejido nasal ya que es el primer contacto de los xenobióticos inhalados que muchas veces se encuentran muy concentrados, y

podrían ser metabolizados en este órgano; además la inducción de carcinogenesis nasal en fumadores podría explicarse por la actividad enzimática observada en este trabajo.

La metodología desarrollada en este trabajo se puede utilizar como un método de monitoreo individual de exposición a HAP, puesto que se trata de un ensayo no invasivo, de fácil implementación y bajo costo de operación. Es una prueba ideal para el monitoreo de grandes grupos.

9. CONCLUSIONES

- ✓ Los fumadores presentan mayor expresión del CYP1A1 en epitelio nasal.
- ✓ La inducción de la enzima guarda relación con el número de cigarrillos fumados por día.
- ✓ La inmunorreactividad aumenta en la muestra 32F inmediatamente después de fumar.
- ✓ Es posible obtener información relevante con respecto a la exposición a xenobióticos, como los HAP, en muestras de epitelio nasal obtenidas con un cepillo citológico.

10. PERSPECTIVAS

Sería importante implementar la determinación de la actividad enzimática y los niveles de RNAm en estas muestras nasales, así como correlacionar la cantidad de enzima presente con la variante alélica del CYP1A1 en estas muestras, para observar si existe una relación entre la inducción, el polimorfismo y la cantidad de cigarrillos fumados por día.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Anttila, S., Tuominen, P., Hirvonen, A., Nurminen, M., Karjalainen, A., Hankinson, O., Elovaara, E. 2001. CYP1A1 levels in lung tissue of tobacco smokers and polymorphisms of CYP1A1 and aromatic hydrocarbon receptor. *Pharmacogenetics* 11:501-509.
2. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58:737-747.
3. Autrup, H. 2000. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research*. 464:65-76.
4. Baker, R.R., Massey, E.D., Smith G. 2004. An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 42S: S53-S83.
5. Boström, C., Almén, J., Steen, B., Westerholm, R. 1994. Human Exposure to Urban Air Pollution. *Environmental Health Perspectives*. 102:39-47.
6. Brennan, P., Buffler, P.A., Reynolds, P., Wu, A.H., Wichmann, H.E., Agudo, A., Pershagen, G., Jöckel, K., Benhamou, S., Greenberg, R.S., Merletti, F., Winck, C., Fhontham, E.T.H., Kreuzer, M., Darby, S.C., Forastiere, F., Simonato, L., Boffetta, P. 2004. Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: a pooled analysis of two large studies. *Int. J. Cancer*. 109:124-131.
7. Brittebo, E.B. 1997. Metabolism-dependent activation and toxicity of chemicals in nasal glands. *Mutation Research* 380: 61-75.
8. Calderón, L., Rodríguez, A., Villarreal, A., Lyght, O., Janszen, D., Morgan, K.T. 1998. Nasal Epithelium as a Sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicological Sciences* 46:352-364.
9. Costas Ioannides. 1996. Cytochromes P450, Metabolic and Toxicological aspects. CRC Press, Nueva York. EUA. Pag. 411.
10. Dahl A.R., Lewis J.L. 1993. Respiratory tract uptake of inhalants and metabolism of xenobiotics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33:383-407.
11. Dauterman W.C. 1994. "Metabolism of Toxicants: Phase II Reactions". Pp 113-132. En *Introduction to Biochemical Toxicology*, second edition, Appleton and Lange, EUA.

12. Ding, X., Kaminsky, L.S. 2003. Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*,43:149-173.
13. Donald deBethizy, J., Hayes, J.R.1994. Chapter 3. Metabolism a determinant of Toxicity.Pp 59-97. En Hayes, W.A. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. Raven Press, New York, USA.
14. Escobar – García, D. M.2003. “La mezcla del ciclohexanol y el albendazol como inductora de los citocromos P450 en hígado de roedores”. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México, pag.77.
15. Flanders, W.D., Lally, C.A., Zhu, B-P., Henley, J., Thun, M.J. 2003. Lung Cancer Mortality in Relation to Age, Duration of Smoking, and Daily Cigarette Consumption: Results from Cancer Prevention Study II. *Cancer Research* 63:6556-6552.
16. Frye, R.E., Schwartz, B.S., Doty, R.L. 1990. Dose- Related Effects of Cigarette Smoking on Olfactory Function.*JAMA*. 263:1233-1236.
17. Garte, S., Sogawa, K.1999.Chapter 14. Ah receptor gene polymorphisms and human cancer susceptibility. Pp. 149-157. En Ryder W. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
18. Gayton, A., Hall, J. 2001. “Ventilación pulmonar”. Pp.525-538. En Tratado de Fisiología Médica. Décima edición, McGraw-Hill Interamericana, México.
19. Gelboin, H.V. 1980. Benzo[a]pyrene Metabolism, Activation, and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes.*Physiological Reviews*. 60:1107-1165.
20. Gershoni, J.M., Palade, G.E.1982. Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to a Positively Charged Membrane Filter.*Analytical Biochemistry* 124:396-405.
21. Gervasi, P. G., Longo, V., Naldi, F., Panattoni, G., Ursino, F. 1991. Xenobiotic-Metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. *Biochemical Pharmacology*. 41:177-184.
22. Gibson, G.G., Skett, P. 1994. Induction, Regulation and Inhibition. En Introduction to drug metabolism, second edition, Hall London. Pag 169-208.
23. Gonzalez, F. J., Nebert, D.W. 1990. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant “warfare”, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Reviews* 6:6.

24. Gonsebatt, M.E., Guzmán P. Blas J. 2000. Cytogenetic and cytotoxic damage in exfoliated cells as indicators of effects. en: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change* vol II, F.Butterworth, A. Gunatilaka y M.E. Gonsebatt editores. Kluwer/Plenum Press. 2000. pp 317-332.
25. Ham, A.W.1986. Tratado de Histología, octava edición, Nueva Edición Interamericana, México, DF. Pág. 814- 820.
26. Haschek, W. M.,Rousseaux, C.G. 1998. Fundamentals of Toxicologic Pathology. Academic Press, Nueva York, EUA. Pp. 91-126.
27. Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K.1991. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450III_{E1} gene.*J Biochem* 110:559-565.
28. Hemminki, K., Pershagen, G.1994.Cancer Risk of Air Pollution: Epidemiological Evidence. *Environ. Health Perspect.*102(suppl 4):187-192.
29. Hodgson, E., Levi, P.1994. "Metabolism of Toxicants: Phase I Reactions".Pp 75-85. En Introduction to Biochemical Toxicology, second edition, Appleton and Lange, EUA.
30. Jones, N., 2001. The nose and paranasal sinuses physiology and anatomy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 51:5-19.
31. Kawajiri, K., Hayashi, S-i.1996. The CYP1 Family. Pp.77-91. En Ioannides, C. Cytochromes P450 metabolic and Toxicological aspects.CRC Press, Nueva York. EUA
32. Kawajiri, K.1999. Chapter 15: CYP1A1.Pp. 159-172.En Ryder W. Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
33. Kim, J.H., Sherman, M.E., Curriero, F.C., Guengerich, F.P., Strickland, P.T., Sutter, T.R.,2004. Expression of cytochromes P450 1A1and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers.*Toxicology and Applied Pharmacology*. Article in press.
34. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685.
35. Landi, M.T., Bertazzi, P.A., Shields, P.G., Clark, G., Lucier, G. W., Garte, S. J., et al. 1994. Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans.*Pharmacogenetics*. 4:242-246.

36. Lang, J.D., McArdle, P.J., O'Reilly, P.J., Matalon, S. 2002. Oxidant-Antioxidant Balance in Acute Lung Injury. *CHEST* 122:314S-320S.
37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. 265-275.
38. McLemore, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, C., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., Eggleston, J.C., Boyd, M.R., Hines, R.N. 1990. Expression of CYP1A1 Gene in Patients With Lung Cancer: Evidence for Cigarette Smoke-Induced Gene Expression in Normal Lung in Primary Pulmonary Carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 82:1333-1339.
39. Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1619:263-268.
40. Omura, T., Ishimura, Y., Fuji-Kumiyama, Y. 1993. Cytochrome P450, second edition. Kodansha. pag. 1-15.
41. Omura, T. 1999. Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 266:690-698.
42. Park, J.-Y.K., Shigenaga, M.K., Ames, B.N. 1996. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2322-2327.
43. Pelkonen, O., Nebert D.W. 1982. Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Etiologic Role in Carcinogenesis. *Pharmacological Reviews.* 34:189-222.
44. Persson E., Larsson, P., Tjälve, H. 2002. Cellular activation and neuronal transport of intranasally instilled benzo(a)pyrene in the olfactory system of rats. *Toxicology Letters* 133:211-219.
45. Piipari, R., Savela, K., Nurminen, T., Hukkanen, J., Raunio, H., Hakkola, J., Mäntylä, T., Beaune, P., Edwards, R.J., Boobis, A.R., Anttila, S. 2000. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *Int. J. Cancer.* 86:610-616.
46. Ross, M.H.; Romrell, L.J., Kaye, and Gordon, I. 1998. Histología: Texto y Atlas a color, 3ª edición. Medica Panamericana, México DF; Pág. 528-532.
47. Smart, J., Daly, A.L. 2000. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 10:11-24.

48. Smith, L.E., Denissenko, M.F., Bennett, W.P., Li, H., Amin, S., Tang, M., Pfeifer, G.P. 2000. Targeting of Lung Cancer Mutational Hotspots by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst*.92:803-811.
49. Taioli, E., Ford, J., Trachman, J., Li, Y., Demopoulos, R., Garte, S.1998. Lung cancer risk and CYP1A1 genotype in African Americans. *Carcinogenesis*. 19:813-817.
50. Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R. 1997. Metabolic capacity of nasal tissue interspecies comparisons of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Mutation Research*, 380:43-59.
51. Wardlaw, S. A., Nikula, K.J., Kracko, D.A., Finch, G.L., Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R. 1998.Effect of cigarette smoke on CYP1A1,CYP1A2 and CYP2B1/2 of nasal mucosae in F344 rats.*Carcinogenesis*. 19:655-662.
52. Whitlock, J.P., Denison, M.S. 1995. Induccion of Cytochrome P450 Enzymes that Metabolize Xenebiotics Pp 367- 390. En Ortiz P.R. Cytochrome P450, structure, mechanism and biochemistry, segunda edición, Plenam Press. Nueva York. EUA.
53. Witschi, H., Espiritu I., Peake, J.L., Wu, K., Maronpot, R.R., Pinkerton, K.E. 1997. The carcinogenicity of environmental tobacco smoke.*Carcinogenesis*.18:575-586.
54. Wong, L.S., Green, H.M., Feugate, J.E., Yadav, M., Nothnagel, E.A., Martins-Green, M. 2004. Effects of "second-hand" smoke on structure and function of fibroblasts, cells that are critical for tissue repair and remodelling. *BCM Cell Biology* ,5:13.

12. APÉNDICE

Cuantificación de proteínas con Lowry D_c

El "Bio- Rad D_c protein Assay" (Lowry et al., 1951) es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de proteínas en muestras que estén solubilizadas en un detergente. La reacción es similar al ensayo Lowry con algunas modificaciones, se desarrolla en 15 minutos.

El ensayo se basa en la reacción de la proteína con la solución de tartrato de cobre alcalino y el reactivo de Folin. Se desarrolla el color por los aminoácidos tirosina y triptofano, el efecto en las proteínas es la reducción y el reactivo de Folin pierde 1, 2 o 3 átomos de oxígeno, con eso la producción de uno o más posibles diferentes especies reductoras originan el color azul el cual se lee a una absorbancia máxima de 750nm y una absorbancia mínima de 405 nm.

1. Preparación de reactivos:
 - Adicionar 20 µl del reactivo S a cada mililitro del reactivo A (preparar al instante) * Las muestras que no contengan detergente omitir este paso.
2. Preparar de 3-5 diluciones que contengan la proteína estándar de 0.2mg/ml a 1.5mg/ml (para concentraciones bajas 5µg/ml a 250 µg/ml).
3. Pipetear 100 µl de las muestras y colocarlos en tubos de prueba.
4. Agregar 100 µl del reactivo A' y agitar.
5. Adicionar 800 µl del reactivo B a cada tubo y agitar inmediatamente.
6. Esperar 15 minutos, y leer a una absorbancia de 750nm. La reacción es estable durante una hora.

Buffer de lisis Single-Detergent 100 ml

- 0.785g de Tris- HCl, pH 8 (50mM)
- 0.87g de NaCl (150mM)
- 0.2g de Azida de Sodio 0.02%
- 0.01g de PMSF, diluir en 1ml de Isopropanol (100 µg/ml)
- 1 µg/ml de Aprotinina
- 1% de Tritón X-100

Electroforesis

La técnica de electroforesis separa proteínas principalmente por el peso molecular (Laemmli, 1970). El SDS se une a lo largo del polipéptido formando un complejo SDS-proteína que es proporcional al peso molecular. La muestra se alicuota en un amortiguador de aplicación el cual contiene β-mercaptoetanol donde su función es romper los puentes disulfuro de las proteínas.

Soluciones:

Stock de Archilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%

- Para 100 ml se pesa 29.2g de acrilamida
- 0.8g de bis-acrilamida
- Se agrega 100ml de agua bidestilada y se filtra, se guarda en oscuridad a 4°C.

Amortiguador de electroforesis 1000 ml

- 3g Tris- Base (25mM)
- 14.4g de Glicina (192mM)

- 1g de SDS (0.1%)
- Aforar a 1000 ml con agua bidestilada, no ajustar pH y guardar a 4°C.
- Amortiguador Tris-HCl pH 8.8 (1.5M) 100 ml
- 18.15g de Tris- Base
- Aforar a 100 ml, ajustar pH y guardar a 4°C.
- Amortiguador Tris-HCl pH 6.8 (0.5M) 100 ml
- 6 g de Tris- base

- Aforar a 100 ml ajustar pH a 6.8 y guardar a 4°C.
- Persulfato de Amonio 10%
- Pesar 0.2 g y disolver en 1 ml de agua desionizada, guardar a 4°C.
- Dodecil Sulfato de Sodio SDS al 10%
- Pesar 10g, agregar 90 ml de agua desionizada, aforar a 100 ml y guardar a 4°C.

Amortiguador de Aplicación 500µl

- 253 µl de agua desionizada
- 63 µl de Tris-HCl (pH 6.8)
- 53 µl de glicerol
- 105 µl de SDS al 10%
- 26 µl Azul de Bromofenol (0.1%)
- 25 µl de β-mercaptoetanol

Inmunotransferencia

Una vez que las proteínas fueron separadas en SDS-PAGE, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa previamente humedecida en amortiguador de transferencia (Gherhoni and Palade, 1982). Las proteínas transferidas son antígenos que se pueden detectar con anticuerpos específicos formando el complejo antígeno-anticuerpo, este complejo se puede identificar con la peroxidasa de rábano picante acoplado con un anticuerpo secundario, revelarse con DAB y peróxido de hidrógeno.

Amortiguador de transferencia 1 l

- 3.03g de Tris -Base
- 14.4g de Glicina
- 200 ml de metanol
- Aforar a 1000ml con

agua desionizada y guardar a 4°C.

Solución Bloqueadora 10ml

- 0.2g de leche descremada (2%)
- 0.5g de BSA (0.5%)
- 10ml de TBS

Tris Buffer Saline TBS pH 7.6 1l

- 2.4g de Tris -base
- 8.0g de NaCl
- Aforar a 1000 ml con

agua desionizada, ajustar pH y almacenar a 4°C.

Solución TBS - Tween 20 al 0.1%

- Agregar 500µl de Tween 20 a 500 ml de TBS.

Anti- CYP1A1 dilución 1:3000

- 15 ml de PBS

- 0.15g de leche descremada (1%)

- 0.15g de BSA (1%)
- 5µl de anticuerpo

Cabra anti-conejo dilución 1:500

- 15 ml de PBS
- 0.15g de leche descremada (1%)

- 0.15g de BSA (1%)
- 30 µl de anticuerpo

Solución de Coomassie 1000 ml

- 1.0g de Coomassie Blue R-250
- 450 ml de metanol
- 450ml de agua
- 100ml de ácido acético

Solución desteñidora 1000ml

- 100ml de metanol
- 100ml de ácido acético

- 800 ml de agua.