



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM
POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL
CITOCROMO P450 1A POR α -NAFTOFLAVONA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA)
P R E S E N T A:
MARIANA FLORES TORRES



TUTOR: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CITOCROMO P450 1A POR α -NAFTOFLAVONA”

RECONOCIMIENTOS

Esta Tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. J. Javier Espinosa Aguirre en el laboratorio de Toxicología Ambiental, del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutor que asesoró el desarrollo de esta Tesis estuvo formado por:

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Mahara Angélica Valverde Rodríguez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se agradece la asesoría técnica de la Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda para el manejo de los animales y en los experimentos realizados en este trabajo.

Esta Tesis fue defendida en examen presentado el día _____

Los estudios de maestría se realizaron con una beca otorgada por CONACYT

El Jurado estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
VOCAL	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
SECRETARIO	Dra. Ma. Brenda Valderrama Blanco	Instituto de Biotecnología, UNAM
SUPLENTE	Dra. Mahara Angélica Valverde Rodríguez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
SUPLENTE	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. Mis papás, Carmen y Alfonso, por ser el mejor apoyo, porque esto es el resultado de su trabajo y lo que dejan en mí. A Gabi, por todo lo que eres y como eres y todo tu apoyo, te quiero!

Al Dr. Espinosa por permitirme ser parte de su laboratorio y crecer en él, adentrarme en el mundo de la ciencia y el CYP, por compartir sus conocimientos y curiosidades. Pero principalmente por su confianza, paciencia y guía a través de esta gran experiencia.

Al Comité Tutor y al Jurando de examen por sus comentarios, observaciones y preguntas para el enriquecimiento de este trabajo.

Puchis, gracias por todo (bueno o malo) por estar ahí, las risas, pláticas, comidas, viajes, música, plantas, tazas de té, experiencias. Por ayudarme a conocer aspectos de mí que no pensé que existieran, pero sobre todo a crecer, te quiero mucho! Mua!

A Sandra, por ser como eres, por tu apoyo y confianza. Mil gracias!

A mis compañeritos de carrera, Sittlali, Lalo, Cyn M, Cyn P. e Isma por los buenos momentos de risas, discusiones y compañía, los quiero!

A todos mis compañeros del laboratorio, por todo aquello que hemos compartido académico y no académico ☺, les deseo lo mejor a todos. Pero en especial a Ana y a Sittlali, por brindarme su apoyo y gran amistad, por los viajes, risas y largas pláticas llenas de cosas interesantes, las quiero!

CONTENIDO

1. RESUMEN	6
2. ABREVIATURAS	8
3. INTRODUCCIÓN	
3.1 Citocromo P450	9
3.1.1 El ciclo catalítico del Citocromo P450	11
3.2 Citocromo P4501A	13
3.2.1 Inducción del CYP1A por xenobióticos	14
3.2.2 Inducción del CYP1A por benzimidazoles	17
3.3 La interacción de la α -Naftoflavona y el CYP1A	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos particulares	20
7. METODOLOGÍA	
7.1 Reactivos	21
7.2 Experimento 1. Curva dosis-respuesta de la expresión del CYP1A con α -NF	21
7.3 Experimento 2. Efecto del tratamiento con una dosis baja de α -NF (5 mg/Kg) en la expresión del CYP1A	21
7.4 Experimento 3. Efecto del tratamiento con una dosis media de α -NF (100 mg/Kg) en la expresión del CYP1A	22
7.5 Experimento 4. Efecto del tratamiento con una dosis alta de α -NF (40 mg/Kg) en la expresión del CYP1A	22
7.6 Obtención de la fracción microsomal	22
7.7 Electroforesis e inmunodetección del CYP1A	23

7.8	Determinación de la actividad enzimática del CYP1A	24
7.9	Efecto de la α -NF en la actividad enzimática <i>in vitro</i> del CYP1A1	24
7.10	Análisis estadístico	25
8.	RESULTADOS	
8.1	Experimento 1. Curva dosis-respuesta de la expresión del CYP1A con α -NF	26
8.2	Experimento 2. Efecto del tratamiento con una dosis baja de α -NF (5 mg/Kg) en la expresión del CYP1A.	28
8.3	Experimento 3. Efecto del tratamiento con una dosis media de α -NF (100 mg/Kg) en la expresión del CYP1A	30
8.4	Experimento 4. Efecto del tratamiento con una dosis alta de α -NF (40 mg/Kg) en la expresión del CYP1A	33
8.5	Efecto de la α -NF en la actividad enzimática <i>in vitro</i> del CYP1A1	36
9.	DISCUSIÓN	37
10.	CONCLUSIONES	43
11.	REFERENCIAS	44

1. RESUMEN.

El citocromo P450 (CYP) pertenece a una numerosa familia de enzimas integrales bien conservadas que se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplásmico liso en donde se encargan del metabolismo de compuestos tanto endógenos como exógenos.

La subfamilia CYP1A juega un papel muy importante en la bioactivación y biotransformación de compuestos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). Su inducción está regulada por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), el cual, al estar en contacto con algún PAH se mueve del citosol al núcleo, su unión al traslocador nuclear ARNT forma el heterodímero, AhR/ARNT. Este heterodímero se une a secuencias consenso del DNA conocidas como elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), lo que permite la transactivación de los genes controlados por AhR, entre los que se encuentran CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1.

De los inductores del CYP1A y agonistas del AhR mejor conocidos se encuentran los inductores clásicos: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), benzo(a)pireno (B(a)P) y 3-metilcolantreno (3-MC). También se han descrito otro tipo de moléculas con diferencias estructurales capaces de inducir al CYP1A, llamadas inductores no clásicos. Entre ellos se encuentran los benzimidazoles como el tiabendazol, omeprazol y albendazol (ABZ).

En estudios *in vitro* se ha observado que la α -naftoflavona (α -NF) puede inhibir la inducción del CYP1A por inductores clásicos, como el TCDD. Sin embargo, no existen evidencias que puedan corroborar este mismo efecto en condiciones *in vivo*. El objetivo de este trabajo es explorar el efecto *in vivo* de la α -NF en la modulación del CYP1A por inductores clásicos (3-MC y B(a)P) e inductores no clásicos (ABZ).

La estrategia experimental consistió en la exposición de ratas macho Wistar a dosis únicas de α -NF (5, 10 y 40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg) o en combinación con la α -NF: α -NF & ABZ, α -NF & B(a)P, α -NF & 3-MC. Cuando se dieron los tratamientos combinados, la α -NF se administró 1 hora antes que el inductor. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la administración del inductor. Se extirpó el hígado con el que se obtuvo la fracción microsomal, a partir de esta se

realizaron las siguientes determinaciones: inmunodetección del CYP1A1, actividad etoxiresorufin-O-deetilasa y metoxiresorufin-O-demetilasa como indicadores de las actividades de CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente.

Se encontró que la α -NF y el ABZ son inductores del CYP1A, y que éste último tiene un potencial inductor de la expresión del CYP1A parecido al de los inductores clásicos como 3-MC y B(a)P. Comparada con los otros, la α -NF parece ser un inductor débil, pero cuando se administra en combinación con los inductores, el resultado depende de la dosis. A dosis altas de α -NF (40 mg/Kg) se observa un efecto aditivo de inducción con el ABZ, el 3-MC y el B(a)P, mientras que en dosis bajas de α -NF (5 mg/Kg) el efecto aditivo sólo se observa con ABZ y no con 3-MC. Estos resultados nos permiten concluir que en el modelo *in vivo*, la α -NF modula la expresión del CYP1A comportándose como un inductor de la proteína y la actividad enzimática, aún en tratamientos combinados.

2. ABREVIATURAS.

α -NF	α -Naftoflavona
3-MC	3-Metilcolantreno
ABZ	Albendazol
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
ARNT	Traslador nuclear del receptor Ah
B(a)P	Benzo(a)pireno
CYP	Citocromo P450
CYP1A	Citocromo P40 1A
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
CYP1A2	Citocromo P450 1A2
CYP1B1	Citocromo P450 1B1
CYP2B1	Citocromo P450 2B1
CYP2B2	Citocromo P450 2B2
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EROD	Etoxiresorufin-O-deetilasa
mRNA	Mensajero del ácido ribonucleico
MROD	Metoxiresorufin-O-demetilasa
NADPH	Nicotinamida adenina nucleótido fosfato reducido
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
S9	Fracción postmitocondrial
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
XRE	Elemento de respuesta a xenobióticos

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Citocromo P450

El citocromo P450 (CYP) pertenece a una numerosa familia de enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo oxidante de gran variedad de compuestos tanto endógenos como exógenos [1-3]. Algunos genes de las familias del CYP pueden ser inducidos por su sustrato, lo que permite a las células adaptarse rápidamente a cambios químicos en su ambiente [4].

El CYP contiene un grupo hemo, en el que el hierro se encuentra unido de forma no covalente a una cadena polipeptídica [5] a través del tiol de un residuo de cisteína [6]. Fue identificado originalmente por Omura y Sato [7]; quienes determinaron la naturaleza hemoproteica de un pigmento presente en microsomas hepáticos de diferentes especies, el cual era capaz de unirse a monóxido de carbono después de ser reducido con NADPH o ditionita de sodio y además presentaba un pico máximo de absorción del grupo hemo (pico de Soret) a 450 nm, típico de hemoproteínas.

La importancia de este grupo de enzimas radica en la versatilidad que tienen para participar en diferentes reacciones de oxidación como el procesamiento de fuentes de carbono en algunas bacterias, mecanismos de defensa en algunas variedades de plantas (síntesis de metabolitos secundarios), metabolismo de eicosanoides, metabolismo del colesterol y ácidos biliares, síntesis y metabolismo de hormonas esteroideas, aminas biogénicas, vitamina D₃ e hidroxilación del ácido retinoico [2].

Además, juegan un papel esencial en el metabolismo [3] y biotransformación de medicamentos y otros xenobioticos (compuestos químicos exógenos) [1], al igual que en procesos de desintoxicación. Biotransforman a más del 90% de los xenobióticos que ingresan al organismo, desde medicamentos, cosméticos, tintes, componentes de la dieta, compuestos carcinógenos y contaminantes ambientales [2].

Por otro lado, también participan en procesos de activación de compuestos contribuyendo a la aparición de efectos tóxicos o carcinogénesis [5]. Como parte de su actividad metabólica producen cantidades importantes de especies reactivas de oxígeno (ERO) en

la célula, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido (O_2^-) los cuales participan en la regulación del ciclo celular y en transducción de señales; pero cuando se producen en exceso, pueden actuar como mutágenos y carcinógenos [8].

En humanos se han descrito 12 subfamilias de CYPs (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 y 3A5) como las más importantes en la biotransformación de xenobióticos [5]. Además, el CYP se encuentra localizado en casi todos los tejidos y órganos como intestino, pulmón, riñón, cerebro, glándulas adrenales, gónadas, corazón, mucosa traqueal y bronquial y piel [9] pero no en el músculo esquelético y eritrocitos maduros [10]. En el hígado, se encuentran presentes la mayor cantidad y número de isoformas del CYP, las cuales corresponden al 2% del contenido de proteína microsomal en este órgano [9].

Las enzimas del CYP pueden encontrarse solubles en el citoplasma o asociadas a membranas. Las formas solubles se encuentran en bacterias, mientras que las formas asociadas a membranas en levaduras y en organismos superiores [6]. En estos se encuentran acopladas a la membrana del retículo endoplásmico liso o a la membrana interna mitocondrial, junto con otras enzimas encargadas de la transferencia de electrones como: la citocromo P450 reductasa, el citocromo b5, y en caso de la mitocondria, la ferredoxina reductasa [11].

Se conocen varias clases de sistemas funcionales del CYP [6]:

Clase 1: Este sistema involucra un complejo ternario formado por el CYP (soluble o unido a membranas), la flavoproteína reductasa y una proteína hierro-azufre. Dentro de esta clase se encuentran los CYPs bacterianos y los CYPs localizados en mitocondrias de mamíferos.

Clase 2: Involucra un complejo binario entre el CYP y la flavoproteína reductasa, ambos unidos a membranas. A esta clase pertenecen los CYPs unidos al retículo endoplásmico en células eucariontes.

Clase 3: En este sistema, en la misma cadena polipeptídica están contenidos el dominio hemo del CYP y el dominio flavin de la reductasa. Algunos ejemplos de esta clase se han encontrado en bacterias, mamíferos y plantas.

Clase 4: Para esta clase, en la misma cadena polipeptídica están contenidos los dominios para la flavin reductasa, el cluster hierro-azufre y al CYP (hemo).

Para oxidar a un sustrato, el CYP requiere de oxígeno molecular y NADPH. Lleva a cabo reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado a la molécula del sustrato, mientras que el otro átomo es reducido hasta agua. A las enzimas que catalizan este tipo de reacciones se les conoce como monooxigenasas u oxidasas de función mixta [11].

Entre las oxidaciones catalizadas por el CYP se incluyen las hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, epoxidaciones, desaminaciones, desulfuraciones, azoreducción, nitroreducción [12].

3.1.1 El ciclo catalítico del CYP

El centro catalítico del CYP está integrado por un átomo de hierro hexacoordinado: con los 4 anillos de la protoporfirina IX, con el grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica y con una molécula de agua [11].

La **primer etapa** del proceso catalítico (Figura 1) consiste en la unión del sustrato y el desplazamiento de un ligando, que regularmente es agua en la sexta posición de coordinación del átomo de hierro. Como consecuencia de ello se originan cambios en el estado de spin del átomo de hierro y por lo tanto en su potencial redox y en el máximo de absorbencia de la hemoproteína.

En la **segundo etapa**, se produce la reducción del complejo hemoproteína-sustrato al estado ferroso ($Fe^{II} \rightarrow Fe^{II}$) gracias al aporte de un electrón y al aumento en el potencial redox originado en el paso anterior. En eucariontes, el electrón proviene de la oxidación de una molécula de NADPH, lo cual es realizado por la NADPH citocromo P450 reductasa.

3.2 Citocromo P450 1A

La subfamilia 1A del citocromo P450 está formada por las isoformas CYP1A1 y CYP1A2, las cuales están involucradas en el metabolismo de algunos procarcinógenos y de una gran cantidad de medicamentos de importancia clínica [14]. La inducción de isoformas de esta subfamilia puede tener implicaciones en la etiología de algunos tipos de cáncer y en la alteración de la eficacia terapéutica de algunos medicamentos [15].

El **citocromo P450 1A1** (CYP1A1) juega un papel importante en la toxicidad, mutagenicidad y/o carcinogenicidad de algunos compuestos químicos en el ambiente como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). Su expresión constitutiva es muy baja pero altamente inducible en el hígado, piel, riñón y pulmones [16]. La inducción de esta isoforma está mediada a través de un receptor citosólico llamado receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) [3]. Además de que es altamente inducible por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) y por hidrocarburos aromáticos planos como el 3-metilcolantreno (3-MC) o el benzo(a)pireno (B(a)P) [17]. La función principal del CYP1A1 es la de oxidar a los PAH hidrófobos para así facilitar su eliminación [5].

El **citocromo P450 1A2** (CYP1A2) participa fundamentalmente en la activación de nitrosaminas, aflatoxina B1 y aminas aromáticas [11]. Su expresión parece estar restringida al hígado, donde constituye aproximadamente el 10% del contenido total de CYP [2]. En humanos, el CYP1A2 tiene una identidad del 80% de la secuencia de aminoácidos con el CYP1A1 y cerca del 40% con el CYP1B1 [18].

3.2.1 Inducción del CYP1A por xenobióticos

De manera clásica, la inducción del CYP1A (Figura 2) puede ser mediada a través del AhR el cual es un factor transcripcional activado por ligando mediante una serie de eventos que se describen a continuación.

El AhR está localizado en el citosol, en donde se encuentra formando un complejo con un dímero de Hsp90 y las co-chaperonas XAP2 y p23, las cuales están relacionadas con el plegamiento y la estabilización del receptor [18-19]. XAP2 interactúa con el C-terminal de la Hsp90 y se une a la secuencia de localización en el núcleo del AhR, evitando que el receptor se traslade al núcleo. El dímero de Hsp90 junto con p23 protegen al AhR de proteólisis, lo que permite que tenga una conformación receptiva para la unión de un ligando y evitar la unión prematura con el traslocador nuclear de receptor Ah (ARNT) [18].

Cuando un xenobiótico, principalmente PAHs, se une al AhR forman el complejo ligando-receptor (AhR-xenobiótico), que es liberado de las proteínas co-chaperonas y se mueve al núcleo donde se une al ARNT formando el heterodímero, AhR/ARNT, liberándose del dímero de la proteína Hsp90. En el núcleo el heterodímero AhR/ARNT se une a secuencias consenso del DNA conocidas como elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) (5'-TNGCGTG-3'), las cuales se encuentran localizadas río arriba del promotor del gen del *CYP1A1*. Lo que ocasiona un cambio conformacional en la estructura de la cromatina del DNA. El heterodímero AhR/ARNT interactúa con Sp1, otro factor transcripcional y juntos elevan la expresión del *CYP1A1*. La actividad del heterodímero es transmitida a factores generales de transcripción (GFTs) a través de la interacción del ARNT con CBP/p300 y del AhR con R1PI40 y SRC-1. Todo esto ocasiona la transactivación de los genes controlados por el AhR [17, 19-22].

Entre los genes controlados por el AhR se encuentran enzimas de Fase I como: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y enzimas de Fase II como: NADPH-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y aldehído deshidrogenasa (ALDH3A1), entre otros [2, 20].

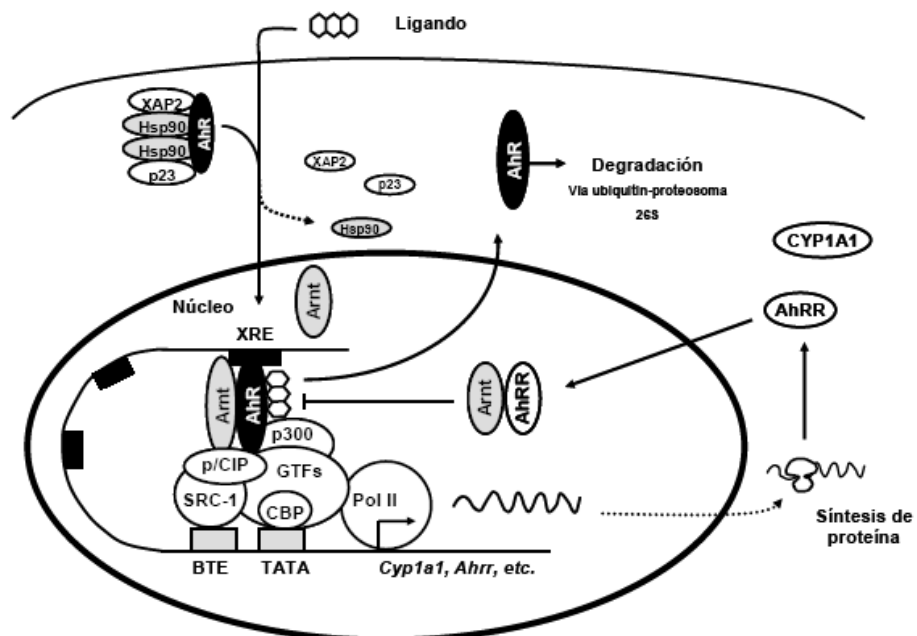
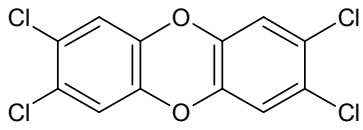


Figura 2. Modelo general de la inducción del CYP1A1. El AhR es una proteína localizada en el citosol, en donde se encuentra formando un complejo con las proteínas chaperonas Hsp90, XAP2 y p23. Cuando es activada por la unión de algún xenobiótico, principalmente PAHs, es traslocada al núcleo en donde se une al ARNT. Con el que forma una heterodímero (AhR/ARNT), este heterodímero se une a secuencias consenso del DNA, conocidas como XRE. Lo que ocasiona la transactivación de los genes controlados por el AhR, entre los que se encuentran CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1.[22].

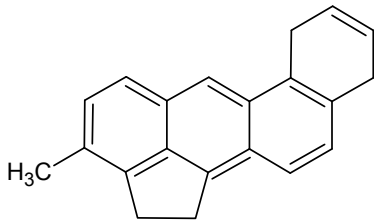
Entre los inductores clásicos del CYP1A1 y agonistas del AhR (Figura 3) se encuentran el TCDD, 3-MC y B(a)P [2, 11, 21].

Todos estos compuestos comparten diversas características estructurales, entre ellas: son hidrofóbicos, son moléculas planas o coplanares con una estructura policíclica, cuyo tamaño les permite entrar en una cavidad de 6.8 x 13.7 Å que corresponde al sitio de acción del AhR [21, 23].

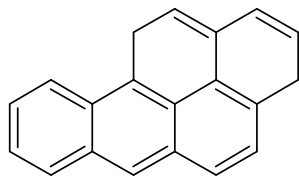
Inductores clásicos



2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD)

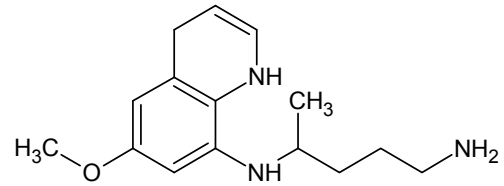


3-metilcolantreno (3-MC)

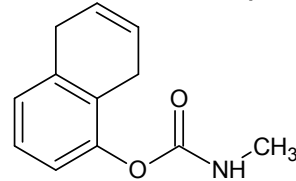


Benzo(a)pireno (B(a)P)

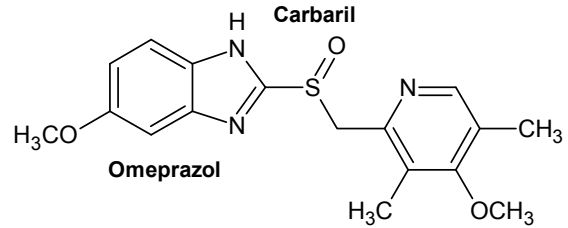
Inductores no clásicos



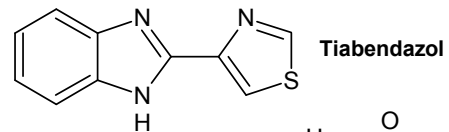
Primaquina



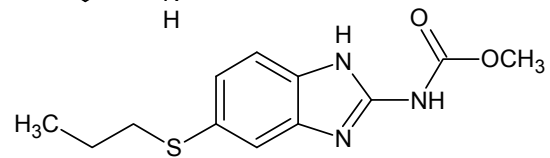
Carbaril



Omeprazol



Tiabendazol



Albendazol (ABZ)

Figura 3. Estructuras de Inductores clásicos y no clásicos del CYP1A [2, 11, 15-16, 21, 24-25].

3.2.2 Inducción de la expresión del CYP1A por benzimidazoles independiente de AhR

Se han encontrado moléculas que no cumplen con las características de los inductores clásicos del CYP1A1 [21] al no ser policíclicos ni planos y que a pesar de esto, tienen la capacidad de inducirlo. Estos compuestos pertenecen a diferentes familias químicas por lo que no se encuentran relacionados estructuralmente. Entre ellos están los benzimidazoles (omeprazol, tiabendazol, lanzoprazol y albendazol) [15-16, 24-25], los carotenoides (precursor de los retinoides), carbamatos (como el carbaril) [15, 26] y las aminoquinolinas (primaquina). A estos inductores se les ha denominado inductores no clásicos [21]. La Figura 3 muestra algunos ejemplos de estos inductores.

Existen estudios en los que se han realizado ensayos de competencia entre un inductor clásico de alta afinidad como el TCDD e inductores no clásicos como el omeprazol o el tiabendazol con la finalidad de demostrar la independencia de estos últimos hacia el AhR. Se ha demostrado que los inductores no clásicos carecen de la capacidad de desplazar al $[H^3]$ TCDD cuando se encuentra unido al receptor [16].

La estimulación de la actividad del AhR por los benzimidazoles puede ser específica de la especie, pues en un estudio comparativo se demostró que el omeprazol, tiabendazol y lanzoprazol no fueron capaces de activar al AhR en la línea celular de ratón, Hepa1c1c7. Sin embargo, esta activación si se observó en las células humanas HepG2. Estas diferencias en la activación del AhR ocasionan finalmente diferencias en la inducción de la expresión del CYP1A [27-28].

3.3 La interacción de la α -Naftoflavona y el CYP1A

La α -Naftoflavona (α -NF) o 7,8-Benzoflavona (Figura 4) es un flavonoide que ha sido utilizado en el estudio del mecanismo de acción, ya sea biológico o bioquímico, de compuestos carcinogénicos [29], principalmente, su interacción con las isoformas del CYP. En esto se ha visto que la α -NF puede afectar directamente la actividad enzimática *in vitro* del CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8 y CYP2C9 en donde actúa como un inhibidor de la misma [30], sin embargo también puede actuar como un estimulador alostérico de la actividad enzimática del CYP3A4 [31].

Estudios muestran que el pre-tratamiento de líneas celulares [32-36] con α -NF tiene como efecto final una reducción en la expresión del CYP1A1, para determinar la manera en la que ocurre esta inhibición se han determinado lo siguiente. La α -NF compite con el TCDD por el sitio de unión al AhR [34, 37], interfiere en la formación de complejos ligando-receptor (AhR-xenobiótico) transcripcionalmente activos en citosoles de hígado de rata y en líneas celulares de diferentes especies [34, 37], los cuales pueden revertirse por el ligando pero no por un exceso de α -NF. Además puede modificar la conformación del AhR disminuyendo su afinidad por las secuencias del XRE en el DNA [36-37]. Estos efectos son dependientes de la concentración de α -NF utilizada, siendo mayor el efecto cuando la concentración aumentó. Finalmente, la α -NF también puede ocasionar una disminución, dependiente de la concentración, en la cantidad del mRNA y en la actividad EROD del CYP1A1 por el tratamiento con TCDD [32-36].

En estudios en peces, trucha arcoíris, α -NF disminuye la expresión del CYP1A por PAHs alquilados como el retén [38], que puede ser generado durante el tratamiento de desechos de celulosa. Se observó una disminución dependiente de la concentración en la actividad EROD del CYP1A1 al realizar tratamientos combinados de α -NF y retén [39].

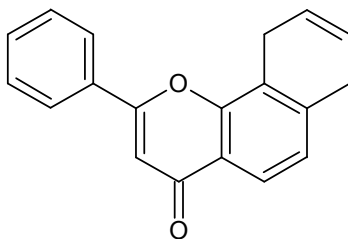


Figura 4. Estructura química de la α -NF.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Datos en la literatura muestran que la α -NF no puede inducir la expresión del CYP1A cuando se encuentra inducido por potentes inductores clásicos como el TCDD, el cual tiene una alta afinidad por el AhR [40].

En los experimentos realizados en líneas celulares humanas (HepG2) y de roedores (Hepa 1c1c7 y H-4II E), la inhibición por α -NF se determinó a diferentes niveles: tanto en la concentración del mRNA presente como en la actividad enzimática del CYP1A1 (EROD). En ambos casos se observó una disminución dependiente de la concentración, cuando se probaron co-tratamientos con diferentes concentraciones de α -NF y una sola concentración de TCDD [34].

Finalmente, se ha determinado que la α -NF puede inhibir la expresión del gen CYP1A1 cuando este se encuentra inducido por agonistas del AhR a través de interacciones competitivas por la unión al AhR [34, 41].

Toda la información presente en la literatura acerca de la inhibición del CYP1A por α -NF así como el mecanismo por medio del cual se lleva esto a cabo se ha obtenido a partir de experimentos en líneas celulares. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del efecto que puede tener la α -NF en animales completos.

5. HIPÓTESIS

La inducción de la expresión del CYP1A en animales por inductores tanto clásicos como no clásicos se afectará por el co-tratamiento con α -NF.

6. OBJETIVO

6.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo es explorar el efecto en animales de la α -NF en la modulación del CYP1A por inductores clásicos como 3-MC y B(a)P e inductores no clásicos como ABZ.

6.2 Objetivos particulares

- Obtener la fracción microsomal del hígado de ratas tratadas con α -NF (5, 10 y 40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), o en combinación con la α -NF: α -NF & ABZ, α -NF & B(a)P, α -NF & 3-MC.
- Detectar la proteína del CYP1A1 en microsomas hepáticos, mediante la inmunodetección con anticuerpos específicos.
- Determinar la actividad enzimática específica del CYP1A1 y del CYP1A2 en microsomas hepáticos.
- Determinar el efecto *in vitro* de la α -NF en la actividad enzimática específica del CYP1A1 en Supersoma®.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivos

El aceite de maíz, ABZ, α -NF, 3-MC, ditioneitol (DTT), resorufina, 7-etoxiresorufina, 7-metoxiresorufina, NADPH, 3,3'-diaminobencidina son de Sigma Aldrich, Saint Louis, MO EUA. El DMSO y H₂O₂ son de Merck, Alemania. La membrana de nitrocelulosa, Tween 20 y Bio Rad Protein Assay son de Bio Rad Laboratories Inc. Hercules, California EUA. Los anticuerpos utilizados para la inmunodetección son de Chemicon Millipore, Temecula, California EUA; y para el revelado con luminol se utilizó ECL Advanced Western Blotting Detection kit de Amersham, GE Healthcare UK. La proteína semipurificada del CYP1A1 de rata Supersoma es de BD, EUA.

7.2 Experimento 1. Curva dosis-respuesta de la expresión del CYP1A con α -NF

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar de 200 g de peso corporal. Se dividieron en 6 grupos (3 ratas), cada uno de trató con diferentes dosis de α -NF de la siguiente forma: 1) Aceite de maíz (vehículo), 2) 0.05 mg/Kg, 3) 0.5 mg/Kg, 4) 5 mg/Kg, 5) 50 mg/Kg, 6) 500 mg/Kg.

7.3 Experimento 2. Efecto del tratamiento con una dosis baja de α -NF (5 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

Se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de 200 g de peso corporal. Se dividieron en 6 grupos (5 ratas) y cada uno recibió un tratamiento diferente: 1) Aceite de maíz (vehículo), 2) α -NF (5 mg/Kg), 3) ABZ (50 mg/Kg), 4) 3-MC (40 mg/Kg), 5) α -NF & ABZ, 6) α -NF & 3-MC.

7.4 Experimento 3. Efecto del tratamiento con una dosis media de α -NF (10 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

Se utilizaron 18 ratas macho de la cepa Wistar, de 200 g de peso corporal. Se dividieron en 6 grupos (3 ratas) y cada uno recibió uno de los siguientes tratamientos: 1) Aceite de maíz (vehículo), 2) α -NF (10 mg/Kg), 3) ABZ (50 mg/Kg), 4) 3-MC (40 mg/Kg), 5) α -NF & ABZ, 6) α -NF & 3-MC.

7.5 Experimento 4. Efecto del tratamiento con una dosis alta de α -NF (40 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

Se utilizaron 40 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 g de peso corporal. Se dividieron en 8 grupos (5 ratas) y cada uno recibió un tratamiento diferente: 1) Aceite de maíz (vehículo), 2) α -NF (40 mg/Kg), 3) ABZ (50 mg/Kg), 4) 3-MC (40 mg/Kg) 5) B(a)P (50 mg/Kg), 6) α -NF & ABZ, 7) α -NF & 3-MC y 8) α -NF & B(a)P

Para todos los experimentos las dosis fueron únicas y se administraron vía i.p. Las ratas se sacrificaron por decapitación 24 horas después de la administración de los compuestos.

En aquellos experimentos en los que se administraron tratamientos combinados, la α -NF se administró una hora antes que los inductores (ABZ, 3-MC o B(a)P).

7.6 Obtención de la fracción microsomal

Una vez sacrificados los animales se obtuvo el hígado, que se cortó en pequeñas porciones y se homogenizó en una solución de KCl 150 mM en una proporción de 3 mL/g de peso de hígado. El homogeneizado se centrifugó a 9,000 g durante 10 minutos para obtener la fracción posmitocondrial (S9) [42], la cual se centrifugó a 100,000 g por 60 minutos a 4°C. Después, el botón obtenido se resuspendió en una solución de fosfatos 100 mM (pH 7.4) con sacarosa 0.32 M y nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones para la obtención de la fracción microsomal [43]. El botón final se

resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, DTT 1 mM y glicerol al 20%.

El volumen final se dividió en pequeñas alícuotas para guardarlas a -70°C hasta su uso.

La cuantificación de la proteína total se determinó por el método de Bradford [44] utilizando el protocolo descrito por el proveedor (BioRad) para microplaca.

7.7 Electroforesis e inmunodetección específica para el CYP1A

Se llevó a cabo una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) [45]. Se manejaron concentraciones de 4% para el gel concentrador y 7.5% para el gel separador.

La electroforesis se realizó a 60 volts hasta pasar el gen concentrador y a 100 volts hasta el borde del gel. La electrotransferencia [46] a la membrana de nitrocelulosa se realizó por 1 hora a 100 volts. Esta transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo de Ponceau.

Después, las membranas se bloquearon por una hora con una solución de leche Svelty® al 3% w/v en amortiguador de fosfatos (PBS), se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.3% y se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CYP1A1 en PBS-leche Svelty® al 0.1% a temperatura ambiente en agitación constante. Luego de un segundo lavado con PBS-Tween 20 al 0.3%, se incubó con el segundo anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (en PBS-leche Svelty® 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante.

Finalmente, el tercer lavado se hizo con PBS-Tween 20 al 0.3%, por último se enjuagan las membranas con PBS. Las membranas se revelaron con con luminol (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit) o con 3,3'-Diaminobencidina y H₂O₂ al 30%.

Las fotografías y el análisis densitométrico de las membranas se realizaron con el programa ID Kodak versión 3.6.3.

7.8 Determinación de la actividad enzimática.

Para cuantificar la actividad del CYP1A [47-48], se llevó a cabo la reacción de O-desalquilación de alcoxirresorufinas: la etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) para el CYP1A1 utilizando 7-etoxiresorufina como sustrato y la metoxiresorufin-O-demetilasa (MROD) para el CYP1A2 utilizando 7-metoxiresorufina como sustrato.

Para la determinación de la actividad de los CYPs se mezcló en una celda de plástico para fluorómetro: el amortiguador de Tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM (930-960 μL) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (10 μL de 7-etoxiresorufina 50 μM o 20 μL de 7-metoxiresorufina 0.5 mM) y NADPH 50 mM (10 μL) disuelto en el amortiguador. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 min. Una vez terminado este tiempo, se agregó el volumen equivalente a 200 μg de proteína microsomal hepática.

La cinética de aparición de la resorufina, el producto de la actividad EROD y MROD, se evaluó cada 15 segundos durante 3 minutos en un fluorómetro Versa Fluor™ de BioRad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530 nm y la de emisión de 590 nm.

7.9 Efecto de la α -NF en la actividad enzimática *in vitro* del CYP1A1.

Para determinar el efecto *in vitro* de la α -NF en la actividad enzimática del CYP1A1 [47-48], se utilizaron diferentes concentraciones de la α -NF (1000, 500, 100, 50, 10, 0.5, 0.1 nM) disuelta en acetona.

Se tomaron 10 μL de α -NF y los cuales se agregaron a la mezcla de reacción para la determinación de la actividad enzimática, la cual quedó de la siguiente forma: el amortiguador de Tris-base 50 mM y $MgCl_2$ 25 mM (930-960 μL) a pH 7.6, el sustrato disuelto en DMSO (10 μL de etoxiresorufina 50 μM), NADPH 50 mM (10 μL) disuelto en el amortiguador y 10 μL de α -NF disuelta en acetona. Todo esto se incubó a 37°C durante 3 min. Una vez terminado este tiempo se agregó el volumen equivalente a 2 pmoles de proteína semipurificada del CYP1A1 de rata (Supersoma®, BD USA).

La cinética de aparición de la resorufina se evaluó cada 15 segundos durante 3 minutos en un fluorómetro Versa Fluor™ de BioRad. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 530 nm y la de emisión de 590 nm.

7.10 Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistics, versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar de la media (E.E.).

Cuando los datos obtenidos no siguieron una distribución normal, los valores se transformaron (transformación logarítmica) para la homogeneidad de las varianzas. Se utilizó un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía como prueba estadística y las pruebas *post hoc* de Tukey (para diferencias entre tratamientos), una $p < 0.05$ se consideró significativa.

8. RESULTADOS

8.1 EXPERIMENTO 1. Curva dosis-respuesta de la expresión del CYP1A con α -NF

Se realizó una curva dosis-respuesta para determinar la respuesta del CYP1A debido al tratamiento con diferentes dosis de α -NF.

Para esto se les administró a las ratas, diferentes dosis de α -NF (0.05, 0.5, 5, 50 y 500 mg/Kg) utilizando aceite de maíz como vehículo. Se realizó la inmunodetección del CYP1A1 (Figura 5) y su densitometría (Figura 6), además se determinó la actividad EROD del CYP1A1 y MROD del CYP1A2 en microsomas hepáticos obtenidos de las ratas tratadas (Figura 7).

8.1.1 Inmunodetección del CYP1A



Figura 5. Efecto del tratamiento con diferentes dosis de α -NF (0.05, 0.5, 5, 50 y 500 mg/Kg) en la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata. Cada carril corresponde a un animal diferente del grupo ($n=3$), se colocó el volumen equivalente a 25 μ g de proteína microsomal hepática.

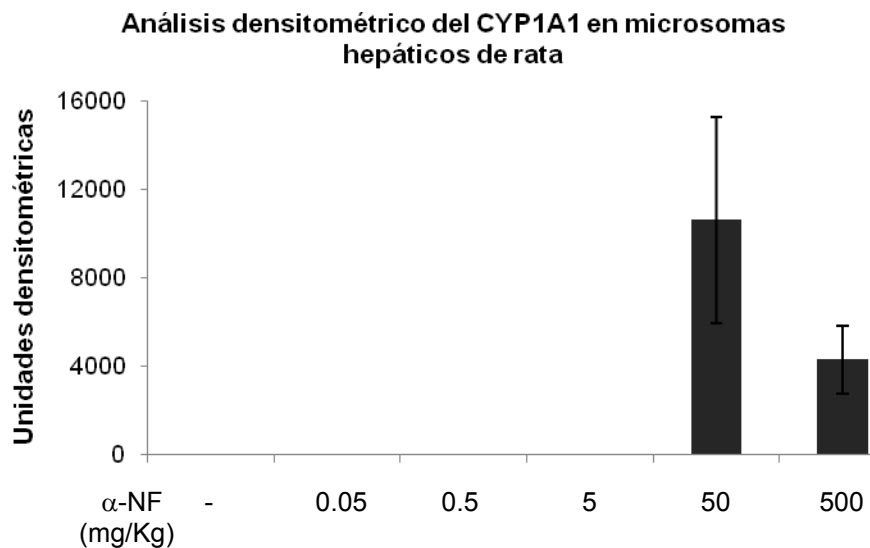


Figura 6. Análisis densitométrico de la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con diferentes dosis de α -NF (0.05, 0.5, 5, 50 y 500 mg/Kg). Cada barra en la gráfica corresponde el promedio del grupo \pm E.E de cada tratamiento, n=3.

8.1.2 Actividad enzimática de CYP1A

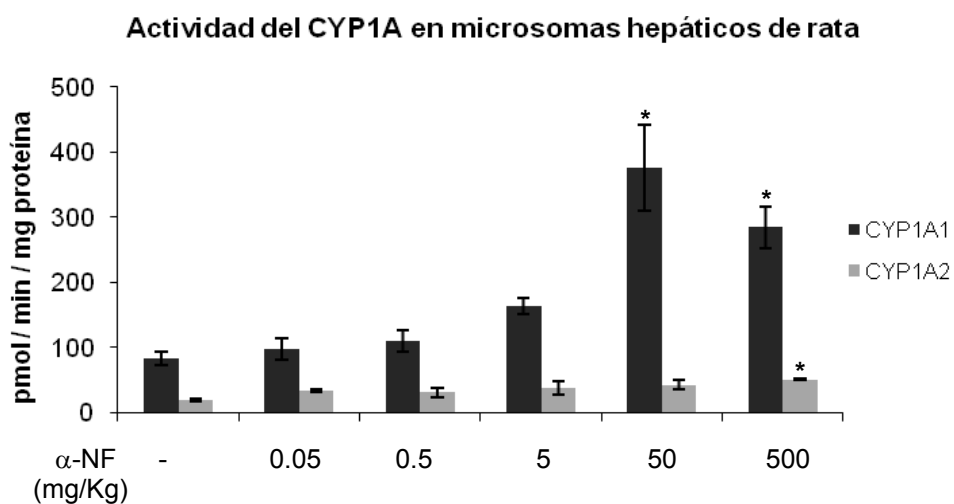


Figura 7. Efecto del tratamiento con aceite de maíz y α -NF a diferentes dosis (0.05, 0.5, 5, 50 y 500 mg/Kg) en la actividad EROD (rojo) del CYP1A1 y MROD (azul) del CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio del grupo \pm E.E, n=3. * p < vs. Aceite de maíz.

Las dosis bajas de α -NF (0.05 - 5 mg/Kg) no provocaron cambios en la actividad enzimática del CYP1A1 (Figura 7) con respecto al control con aceite de maíz. Sin embargo, las dosis altas de α -NF (50 y 500 mg/Kg) ocasionaron un aumento en la actividad, siendo mayor para la dosis de 50 mg/Kg. En cuanto a la actividad del CYP1A2, sólo se encontraron diferencias significativas en cuanto a un aumento de la actividad en la dosis más alta administrada, 500 mg/Kg.

8.2 EXPERIMENTO 2. Efecto del tratamiento con una dosis baja de α -NF (5 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

Se administró ratas con una dosis baja de α -NF (5 mg/Kg) sola o en combinación con los inductores [ABZ (50 mg/Kg) y 3-MC (40 mg/Kg)]. Se determinó la presencia de la proteína a través de la inmunodetección (Figura 8 y 9), la actividad enzimática específica EROD del CYP1A1 y MROD del CYP1A2 de las ratas tratadas (Figura 10).

8.2.1 Inmunodetección del CYP1A

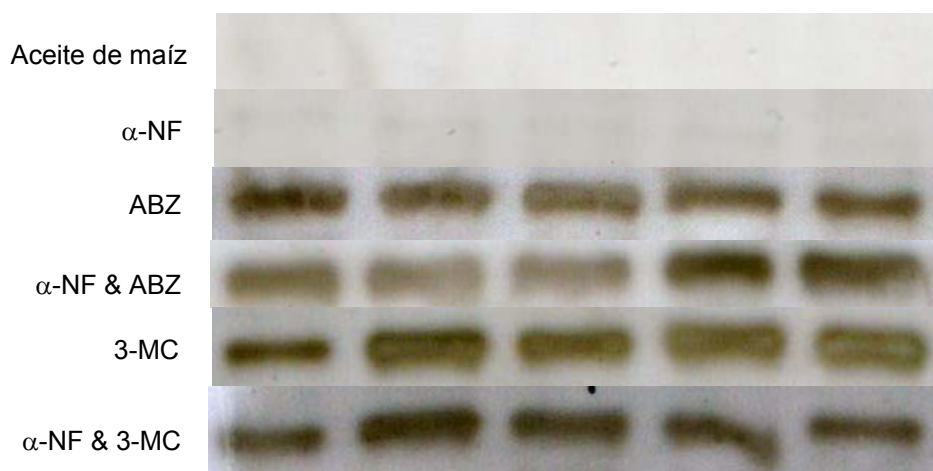


Figura 8. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (5 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC en la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata. Cada carril corresponde a un animal diferente del grupo (n=5), se colocó el volumen equivalente a 5 μ g de proteína microsomal hepática.

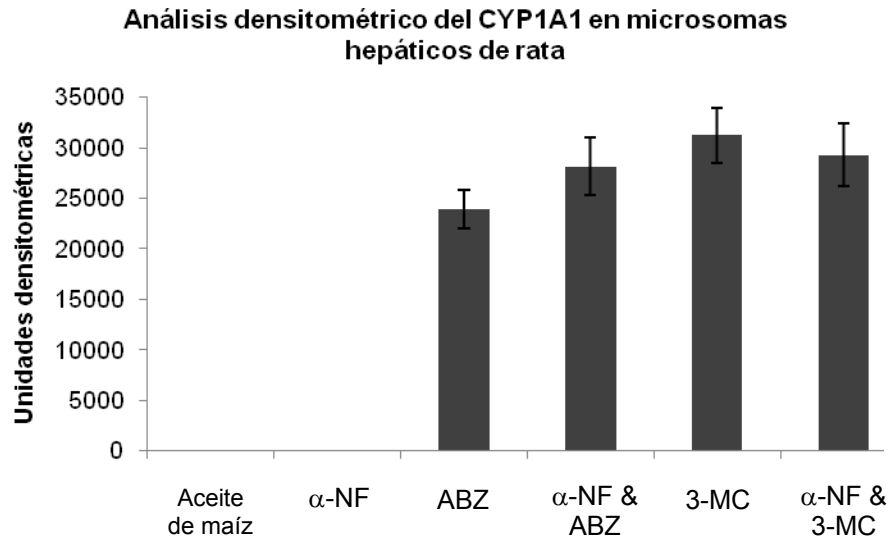


Figura 9. Análisis densitométrico de la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con aceite de maíz, α -NF (5 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC. Cada barra en la gráfica corresponde el promedio del grupo \pm E.E de cada tratamiento. n=5.

8.2.2 Actividad enzimática del CYP1A

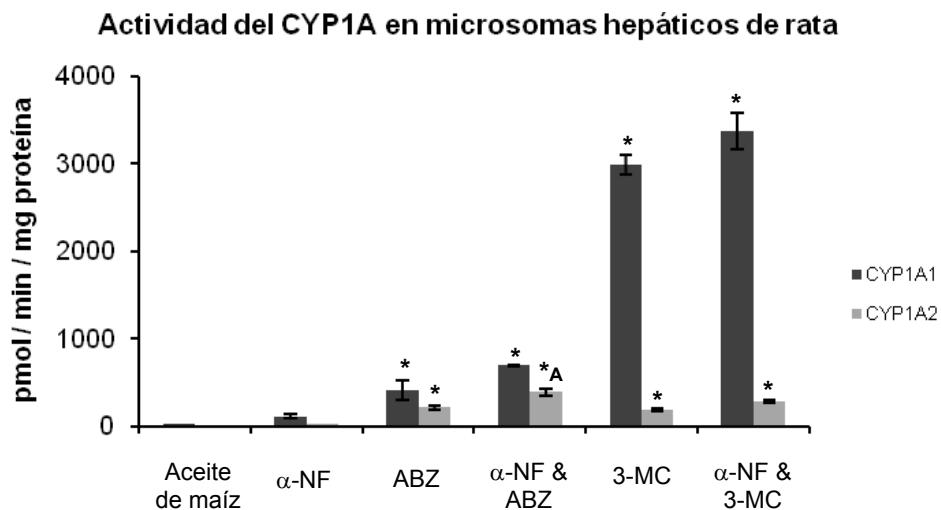


Figura 10. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (5 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC, en la actividad EROD (rojo) del CYP1A1 y MROD (azul) del CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio del grupo \pm E.E., n=5. * $p < 0.05$ vs. α -NF, ^A $p < 0.05$ vs. ABZ.

En la Figura 10 se observa un aumento en la actividad del CYP1A1 con las dosis administradas. Para esta actividad y la del CYP1A2, se observan diferencias significativas de los tratamientos con respecto a la dosis de 5 mg/Kg de α -NF. Además, también se observa que la actividad MROD del CYP1A2 del α -NF & ABZ es diferente a la del ABZ, lo cual no se observa para el 3-MC y α -NF & 3-MC.

En la inmunodetección, no fue posible detectar al CYP1A1 en las muestras provenientes de las ratas tratadas con aceite de maíz o α -NF. El análisis densitométrico del resto de los tratamientos no revela diferencias entre el tratamiento con el inductor sólo o combinado.

8.3 EXPERIMENTO 3. Efecto del tratamiento con una dosis media de α -NF (10 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

Se probó una dosis media de α -NF de 10 mg/Kg sólo o en combinación con los inductores. Las Figuras 11 y 12 presentan el resultado de la inmunodetección del CYP1A1 en los microsomas hepáticos de las ratas tratadas y la Figura 13 muestra el efecto del tratamiento en la actividad enzimática del CYP1A1 y del CYP1A2.

8.3.1 Inmunodetección del CYP1A

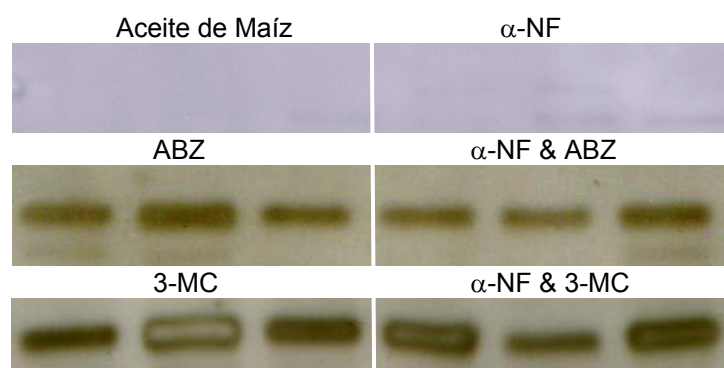


Figura 11. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (10 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC en la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata. Cada carril corresponde a un animal del grupo (n=3), se colocó el volumen equivalente a 5 μ g de proteína microsomal hepática.

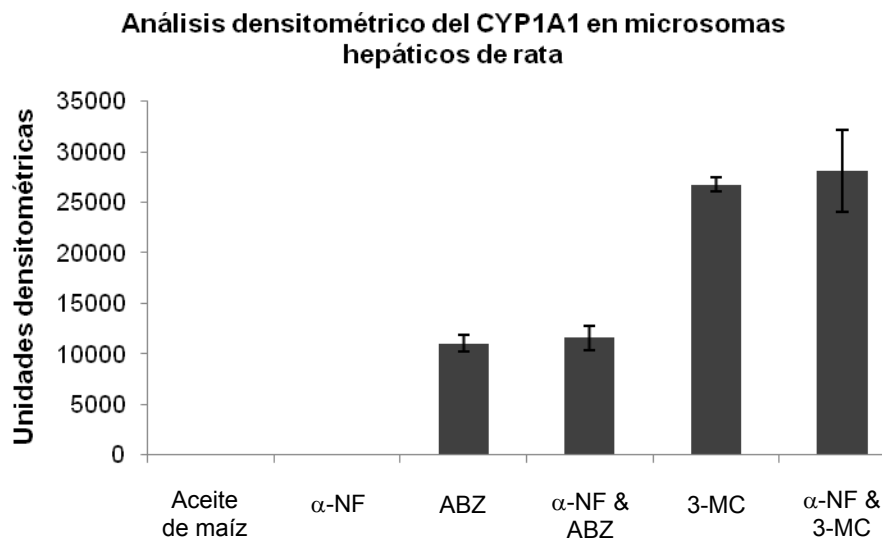


Figura 12. Análisis densitométrico de la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de ratas tratadas con aceite de maíz, α -NF (10 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF& ABZ, α -NF & 3-MC. Cada barra en la gráfica corresponde el promedio del grupo \pm E.E de cada tratamiento, n=3.

8.3.2 Actividad enzimática de CYP1A

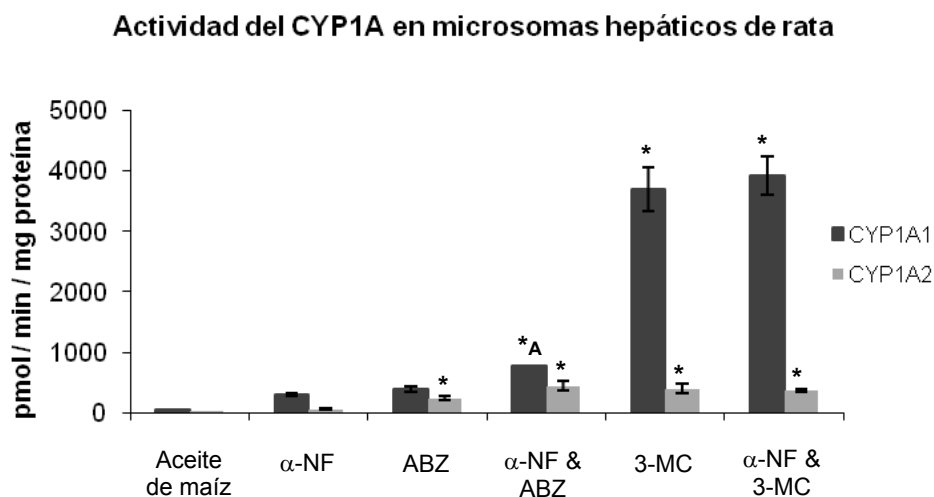


Figura 13. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (10 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC, en la actividad EROD (rojo) del CYP1A1 y MROD (azul) del CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio del grupo \pm E.E., n = 5. * $p < 0.05$ vs α -NF, ^A $p < 0.05$ vs ABZ.

Se encontraron diferencias significativas en las actividades del CYP1A1 y CYP1A2 comparando con la α -NF. Se observó un efecto aditivo al comparar los valores de la actividad de la α -NF y ABZ con los valores del α -NF & ABZ (Figura 13), que además mostraron una diferencia significativa entre ellos, para el CYP1A1. Sin embargo, este efecto aditivo no se observa en las actividades del CYP1A1 del 3-MC y α -NF & 3-MC.

8.4 EXPERIMENTO 4. Efecto del tratamiento con una dosis alta de α -NF (40 mg/Kg) en la expresión del CYP1A

La Figura 14 muestra la inmunodetección del CYP1A1 y su densitometría (Figura 15) en microsomas hepáticos de ratas tratadas con α -NF (40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg) y en tratamientos combinados con α -NF. En la Figura 16 se observa el resultado del efecto del tratamiento en la actividad del CYP1A1 (EROD) y del CYP1A2 (MROD).

8.4.1 Inmunodetección del CYP1A1

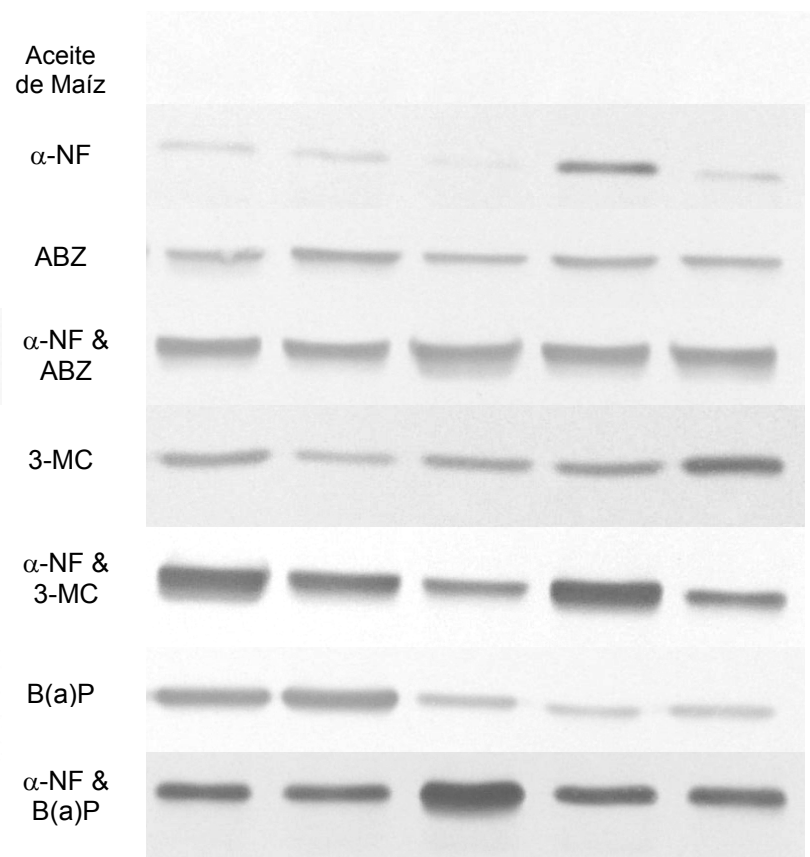


Figura 14. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC y α -NF & B(a)P en la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de ratas. Cada carril corresponde a un animal del grupo (n=5) se colocó el volumen equivalente a 5 μ g de proteína microsomal hepática.

Análisis densitométrico del CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata

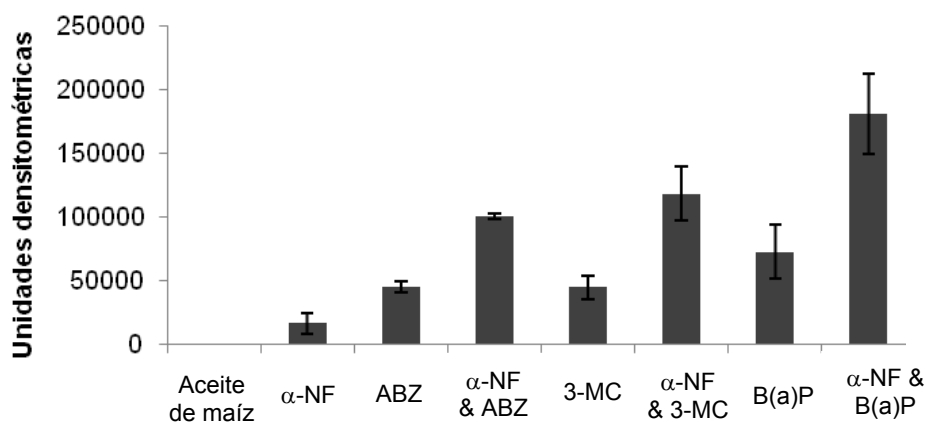


Figura 15. Análisis densitométrico de la inmunodetección del CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata tratadas con aceite de maíz, α -NF (40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC y α -NF & B(a)P. Cada barra en la gráfica corresponde el promedio del grupo \pm E.E de cada tratamiento, n=5.

8.4.2 Actividad enzimática de CYP1A

Actividad del CYP1A en microsomas hepáticos de rata

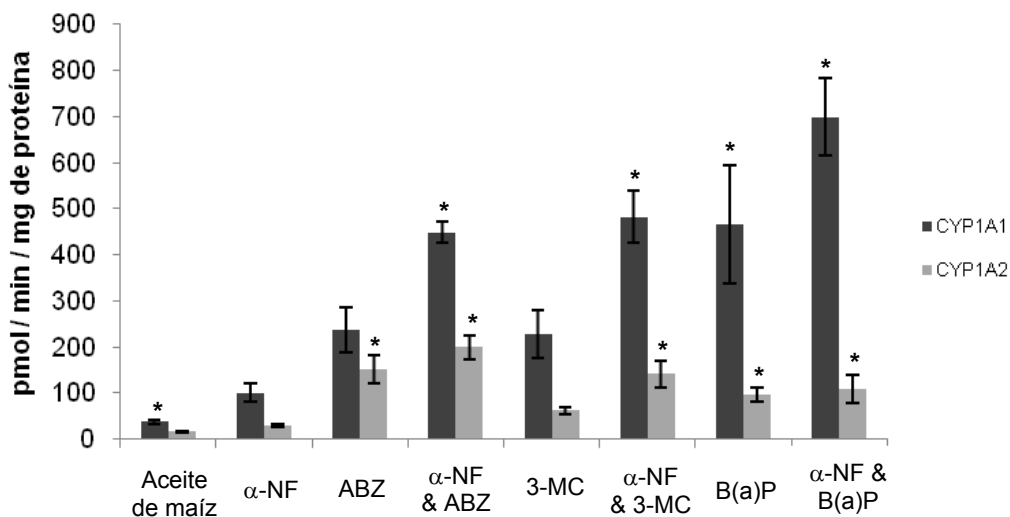


Figura 16. Efecto del tratamiento con aceite de maíz, α -NF (40 mg/Kg), ABZ (50 mg/Kg), 3-MC (40 mg/Kg), B(a)P (50 mg/Kg), α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC y α -NF & B(a)P en la actividad EROD

(rojo) del CYP1A1 y MROD (azul) del CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata. Cada barra en la gráfica corresponde al promedio del grupo \pm E.E, n=5. * p < 0.05 vs. α -NF.

En las ratas control tratadas con aceite de maíz no se detectó la presencia del CYP1A1 mediante la inmunodetección (Figuras 14 y 15). En general, en los tratamientos combinados (α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC y α -NF & B(a)P) se observó un aumento tanto en la actividad enzimática del CYP1A1 (Figura 16) como en su inmunodetección (Figuras 14 y 15). Este incremento parece ser aditivo con respecto a los animales en los que sólo se administró α -NF; sin embargo, no se observó diferencia significativa al comparar estos tratamientos con respecto al inductor sólo, es decir, ABZ vs. α -NF & ABZ, 3-MC vs. α -NF & 3-MC y B(a)P vs. α -NF & B(a)P.

Pero sí se observaron diferencias significativas de α -NF & ABZ, α -NF & 3-MC, B(a)P, α -NF & B(a)P para el CYP1A1 y CYP1A2 con respecto a la α -NF, y ABZ para el CYP1A2.

8.5 Efecto de la α -NF en la actividad enzimática *in vitro* del CYP1A1.

Se determinó el efecto que tiene la α -NF en la actividad EROD del CYP1A1 *in vitro*, utilizando diferentes concentraciones de la misma y una concentración final de proteína de 2 pmoles (Figura 17).

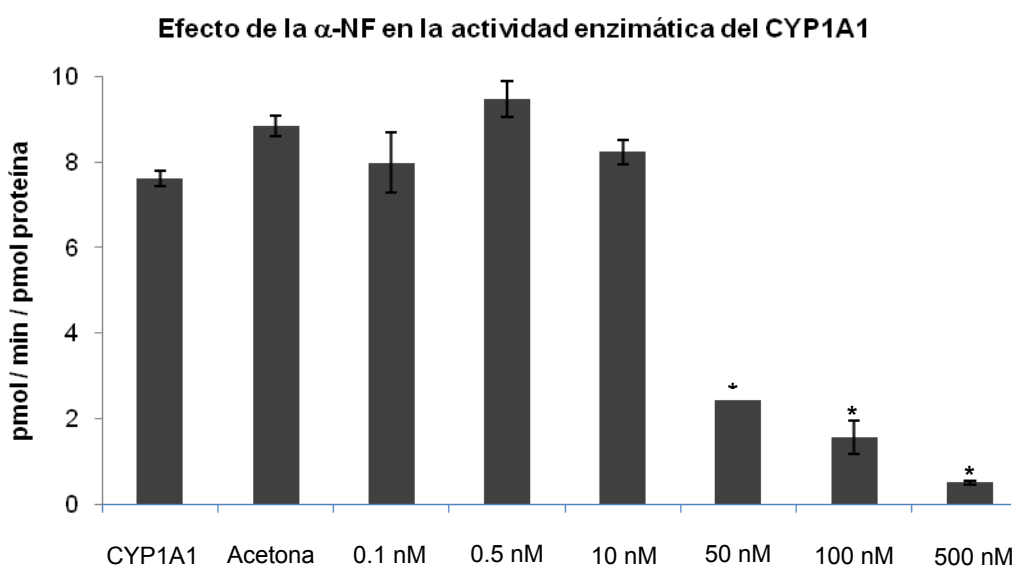


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de α -NF (1000, 500, 100, 50, 10, 0.5, 0.1 nM) en la actividad EROD *in vitro* del CYP1A1 en supersomas® (2 pmol/mL). Cada barra en la gráfica corresponde al promedio de la concentración de α -NF \pm D.E. * $p < 0.05$ vs. CYP1A1.

Concentraciones altas de α -NF como 50-500 nM tuvieron un potente efecto inhibitor sobre la actividad EROD *in vitro* del CYP1A1, ya que como lo muestra la Figura 17, esta disminuyó 3 veces para 50 nM, 5 y 15 veces para 100 nM y 500 nM, respectivamente. Además estas tres concentraciones presentan diferencias significativas al compararlas contra la actividad del CYP1A1 solo.

9. DISCUSIÓN

Respecto al efecto que puede tener la α -NF sobre la modulación del CYP1A se ha estudiado su efecto inhibitorio en líneas celulares, principalmente.

Se ha determinado que la inhibición de la expresión del CYP1A por α -NF puede ocurrir a diferentes niveles. Se ha observado una competencia con el TCDD (un potente inductor del CYP1A1 y ligando de alta afinidad del AhR) por el sitio de unión al AhR [34, 37], a pesar de que la α -NF parece tener una baja afinidad por el receptor [23, 32]. Es debido a esta afinidad que se cree deriva su efecto antagonista. Además, se ha dicho que la unión de la α -NF al AhR modifica la conformación del último, de tal manera que disminuye su afinidad por la secuencia del XRE en el DNA [36-37].

Por otra parte, la α -NF puede intervenir en la formación de los complejos ligando-receptor (TCDD-AhR) en citosoles obtenidos a partir de hígados de rata [37] o en líneas celulares de diferentes especies [34], los cuales pueden revertirse por el inductor (TCDD) pero no por un exceso α -NF; además, la formación de estos complejos depende de la concentración de α -NF utilizada, pues al aumentar la concentración la cantidad de complejos ligando-receptor disminuyó en comparación con las concentraciones menores. Es por ello que se ha dicho que la α -NF bloquea la formación entre el AhR y el TCDD de un complejo nuclear transcripcionalmente activo [34].

En otros estudios [32-36], el pre-tratamiento de líneas celulares de diferentes especies: ratón (Hepa 1c1c7), rata (H-4-II) y humano (HepG2 [34] y MCF-7 [35]) con concentraciones crecientes de α -NF, ocasionó una disminución en la cantidad del mRNA y la actividad EROD del CYP1A1 por el tratamiento con TCDD. Este fenómeno también se mostró dependiente de la concentración.

Además, Kikuchi *et al.* [33], observaron que el pre-tratamiento de células HepG2 con α -NF ocasiona una disminución dependiente de la concentración en el mRNA del CYP1A1 por TCDD. Sin embargo, cuando el tratamiento se llevó a cabo con α -NF y omeprazol, otro inductor del CYP1A, no se observaron cambios en la cantidad del mRNA del CYP1A1.

Existen pocas referencias en cuanto a la modulación del CYP1A por α -NF en el modelo de animal completo. En cuanto a esto, se sabe que en peces, como la trucha arcoíris, la α -NF tiene un efecto inhibitorio sobre la inducción del CYP1A por PAHs alquilados como el reten [38]. Además, se observó una disminución dependiente de la concentración en la actividad EROD del CYP1A1 en tratamientos combinados de α -NF y reten [39]. Por el contrario, también se ha observado un efecto sinergista en la mortalidad de los peces y un efecto aditivo en la cuantificación del daño a larvas de la trucha arcoíris por estos tratamientos [39].

Nuestro primer objetivo fue el determinar el efecto que tiene la α -NF en la modulación del CYP1A1. En primer lugar se realizó una curva dosis respuesta de α -NF (Experimento 1) para determinar si este compuesto tiene la capacidad de inducir la expresión del CYP1A. Para esto, se administraron ratas con diferentes dosis de α -NF. A partir de los microsomas hepáticos obtenidos buscamos a la proteína del CYP1A1 mediante inmunodetección y determinamos la actividad enzimática específica para la dos isoformas que forman parte a la subfamilia 1A del CYP: CYP1A1 y CYP1A2.

La actividad enzimática incremento de una forma dependiente de la dosis. A dosis bajas de α -NF, 0.05-5 mg/Kg, no se observaron cambios importantes en la actividad enzimática de las dos isoformas con respecto al control con aceite de maíz. Sin embargo, se observó un aumento en la actividad a 50 mg/Kg, el cual fue del doble en comparación con las dosis bajas, a pesar de este incremento en la actividad, en la dosis más alta probada (500 mg/Kg) se observó una disminución en comparación con la obtenida a 50 mg/Kg, pero sin llegar a los valores de las primeras dosis (Figura 7). Existe reportes con resultados similares en la fracción S9 hepática de truchas arcoíris jóvenes [39], en las cuales la exposición a diferentes concentraciones de α -NF (3.2, 10, 32, 100 y 320 μ g/L) provocó un aumento de la actividad enzimática dependiente de la concentración, teniendo un pico a 32 μ g/L; al igual que en los resultados presentados, en las concentraciones más altas (100 y 320 μ g/L) se reportó una disminución en la actividad EROD.

Al igual que en la actividad enzimática, en la inmunodetección se detectó un aumento dependiente de la dosis en la cantidad de proteína del CYP1A1 observada, la cual no se detectó en el aceite de maíz ni a dosis bajas, pero aumentó a 50 y 500 mg/Kg. Otros grupos [38, 49] también han observado un aumento, en la cantidad proteína del CYP1A1,

dependiente de la concentración de α -NF con la que se trataron a hepatocitos de trucha arcoíris.

Dado que determinamos mediante la curva dosis-respuesta que la α -NF puede inducir al CYP1A en el animal completo decidimos continuar probando tres diferentes dosis de α -NF: baja (5 mg/Kg), media (10 mg/Kg) y alta (40 mg/Kg) sola y en co-tratamiento con inductores conocidos del CYP1A como 3-MC y ABZ.

En la dosis más baja administrada (5 mg/Kg, Experimento 2) se observaron diferencias significativas del tratamiento con α -NF con respecto a los inductores (ABZ o 3-MC) o en combinación con la misma (α -NF & ABZ o α -NF & 3-MC). Sin embargo, no se detectaron diferencias entre el inductor y el tratamiento combinado para ambas isoformas. A excepción de la actividad MROD (CYP1A2) del ABZ con respecto a α -NF & ABZ, entre los cuales sí se encontraron diferencias significativas, ya que en el tratamiento combinado se encontró un incremento de la actividad. En este caso parece que la α -NF tiene un efecto aditivo en el CYP1A2 cuando se administra en co-tratamiento con ABZ.

La inmunodetección (Figura 8) no detectó al CYP1A1 en los microsomas hepáticos de las ratas tratadas con aceite de maíz y la α -NF a esta dosis. Sin embargo, no se observaron diferencias en la cantidad de proteína detectada entre los inductores y el co-tratamiento con α -NF.

Posteriormente, se utilizó una dosis media de α -NF, 10 mg/Kg (Experimento 3), a partir de la cual nuevamente se determinó la actividad enzimática para ambas isoformas y se realizó la inmunodetección del CYP1A1. La actividad enzimática obtenida con α -NF, en ambas isoformas, fue del doble con respecto a la obtenida con la dosis de 5 mg/Kg. Al comparar a los inductores con los co-tratamientos, se observó un aumento significativo en el valor de la actividad EROD del CYP1A1 entre el ABZ y α -NF & ABZ, el cual no se observó para el CYP1A2 ni para el 3-MC (Figura 13).

Nuevamente, en la inmunodetección (Figura 11) no fue posible detectar al CYP1A1 en los microsomas obtenidos de las ratas tratadas con aceite de maíz y α -NF, a pesar del aumento en las actividades enzimáticas para la segunda. Al comparar a los inductores

con los co-tratamientos tampoco se encontraron diferencias significativas en la cantidad del CYP1A1 detectada.

Al administrar una dosis alta de α -NF, como 40 mg/Kg (Experimento 4), se observó un incremento de las actividades enzimáticas en los co-tratamientos (Figura 16) aunque estos aumentos no fueron significativamente diferentes. A pesar de esto se puede observar una tendencia aditiva al comparar los valores obtenidos de la suma de la α -NF más el inductor (por ejemplo, α -NF + ABZ) con el co-tratamiento de ese inductor (α -NF & ABZ)

A diferencia de las dosis de 5 y 10 mg/Kg, a 40 mg/Kg sí fue posible detectar al CYP1A1 mediante la inmunodetección (Figura 14). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la curva dosis respuesta (Figura 5), pues en esta a dosis bajas no fue posible detectar a esta isoforma pero al aumentar la dosis a 50 mg/Kg sí lo fue. Además, se observaron diferencias entre los inductores y los co-tratamientos, pues en estos últimos se observa un aumento en la densitometría de las bandas obtenidas (Figura 15).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la inmunodetección del CYP1A1 con las dosis baja y media de α -NF en combinación con los inductores, Aluru *et al.* [49] tampoco observaron diferencias en la cantidad del CYP1A1, encontrado al co-tratar hepatocitos de trucha arcoíris con diferentes concentraciones de α -NF y una única concentración de β -NF, siendo estas cantidades similares a las obtenidas sólo con el inductor como en nuestro caso.

Los datos reportados en animales en relación a la modulación del CYP por α -NF resultan contradictorios, pues en algunas casos se repite lo observado en el modelo *in vitro*, es decir la inhibición del CYP1A [38] y en otros casos se presenta el efecto contrario [38]. Nuestros resultados sugieren que cuando se administran ratas con α -NF, esta se comporta como un inductor débil del CYP1A. Esta inducción es dependiente de la dosis administrada y se ve reflejada tanto en la cantidad de proteína detectada como en la actividad enzimática obtenida de la misma. En un estudio en que se utilizaron microarreglos, se observó que α -NF solo induce al CYP1A1 y al CYP1A2 [50].

Aunque vimos que la α -NF también induce al CYP1A, no lo hace al mismo nivel que el 3-MC. Wilhelmsson *et al* [36] utilizaron en líneas celulares concentraciones de α -NF hasta 50,000 veces más altas en comparación a la concentración utilizada de TCDD sin lograr activar por completo al receptor.

Además, en los co-tratamientos no se observan diferencias entre los inductores utilizados. A pesar de que todos son inductores del CYP1A1, el ABZ se ha clasificado como un inductor no clásico del CYP1A [24] pues aún no se conoce bien el mecanismo mediante el cual puede llevar a cabo esta inducción mientras que el 3-MC o B(a)P son inductores clásicos, de los cuales se sabe llevan a cabo la inducción del CYP1A a través del AhR [2, 11, 21].

Ambos tipos de inductores utilizados indujeron al CYP1A (proteína y actividad) aún en los co-tratamientos con α -NF. Si la α -NF se comportara un antagonista del AhR no hubiéramos esperado obtener respuesta en aquellos co-tratamientos con los inductores clásicos (3-MC o B(a)P) pero sí una respuesta en el co-tratamiento con ABZ, si es que este último sigue una vía de señalización distinta a la del AhR para promover la inducción del CYP1A1.

Sin embargo, nuestros resultados indican todo lo contrario, pues se observa una tendencia aditiva en el co-tratamiento utilizando dosis altas de α -NF (Figura 16).

Una vez determinado el efecto que tiene la α -NF en la modulación del CYP1A, en el modelo *in vivo* decidimos determinar su efecto directo en la actividad EROD del CYP1A1. Para esto se probaron diferentes concentraciones de α -NF (500, 100, 50, 10, 0.5 y 0.1 nM) en la actividad de la CYP1A1 sobreexpresado (Supersomas®). Encontramos que la α -NF tiene un potente efecto inhibitor sobre la actividad enzimática *in vitro* del CYP1A1, la cual es dependiente de la concentración utilizada, observándose una disminución de 3 veces a 50 nM, 5 veces a 100 nM y 15 veces a 500 nM, respecto al control (Figura 17).

Existen evidencias que confirman los resultados obtenidos y que muestran que la α -NF puede afectar la actividad de otras isoformas además del CYP1A1 como el CYP2C8 y CYP2C9, en los cuales también se observó una disminución de la actividad enzimática [30]. Dhawan *et al.* [51] no solo determinaron el efecto inhibitor de la α -NF en la actividad *in vitro* del CYP1A1 sino que encontraron que la actividad del CYP2B1

(PROD) y CYP2B2 (BROD) no se afecta por la presencia de este compuesto en la mezcla de reacción.

Además de ser un inhibidor, la α -NF puede actuar como estimulador alostérico de la actividad enzimática de otras isoformas del CYP, como el CYP3A4. En el cual al unirse la α -NF a un sitio diferente al del inductor, lo que causa un cambio conformacional en la proteína promoviendo la unión y biotransformación de un inductor como el B(a)P [31].

En cuanto a la inhibición directa del CYP1A1 *in vitro* por α -NF se sabe que este es un inhibidor competitivo [9, 31, 52]. También se reportó lo mismo para el CYP1A2 de humano, para el cual se determinó una K_i de 1-50 nM [53-54]. La cristalografía del CYP1A2 con α -NF reveló que la α -NF se coloca en una orientación determinada en la cavidad del sitio catalítico de la enzima, en la cual el grupo fenilo es el más próximo al hierro del grupo hemo de la enzima. Además, las interacciones entre la α -NF y los residuos 125 y 226 de fenilalanina y la presencia de una molécula de agua cerca del grupo carbonilo de la α -NF, contribuyen a la alta afinidad en esta unión [55].

De acuerdo a los resultados obtenidos la α -NF en ratas se comporta como un inductor de la proteína y la actividad del CYP1A. Este efecto parece ser dependiente de la dosis teniendo un máximo a 50 mg/Kg. Cuando la α -NF se administra en combinación con otros inductores el resultado también depende de la dosis, pues a dosis altas (40 mg/Kg) se observa un efecto aditivo en la inducción con los tres inductores utilizados, mientras que a dosis bajas (5 mg/Kg); este efecto aditivo sólo se observa con el ABZ.

Además *in vitro* la α -NF es un inhibidor de la actividad enzimática del CYP1A1, al encontrarse en contacto con la enzima, este efecto también es dependiente de la concentración utilizada y es mayor a 500 nM.

Es importante considerar que nos encontramos expuestos constantemente a este tipo de compuestos pues son contaminantes ambientales y dado que poseen la capacidad de modular a enzimas, como el CYP 1A, esto nos hace más susceptibles a los efectos tóxicos de otros contaminantes ambientales o xenobióticos como los fármacos.

10. CONCLUSIONES

En el animal completo, la α -NF modula la expresión del CYP1A comportándose como un inductor de esta en la proteína y la actividad enzimática, aún en tratamientos combinados. Además la α -NF es un inhibidor directo *in vitro* de la actividad enzimática del CYP1A1. A pesar de los antecedentes, que apuntan a la α -NF como un inhibidor en líneas celulares del CYP1A, estos resultados no son extrapolables al modelo de animal completo, ya que la α -NF se comporta de diferente manera en cada modelo.

11 REFERENCIAS

1. Boobis, A.R., Sesardic, D., Murray, B.P., Edwards, R.J., Singleton, A.M., Rinch, K.J., Murray, S., De la Torres, R., Segura, J., Pelkonen, O., Pasanen, M., Kobayashi, S., Zhi-Guang, T., Davies, D.S., *SPECIES VARIATION IN THE RESPONSE OF THE CYTOCHROME P450-DEPENDENT MONOOXYGENASE SYSTEM TO INDUCERS AND INHIBITORS*. *Xenobiotica*, 1990. **20**: p. 1139-1161.
2. Ortiz de Montellano, P., *CYTOCHROME P450: STRUCTURE, MECHANISM AND BIOCHEMISTRY*. Chapter 1- Models and mechanisms of Cytochrome P450 action, Chapter 6- Substrate oxidation by Cytochrome p450 enzymes. 2005, New York: Plenum Publishers.
3. Tompkins, L., Wallace, A., *MECHANISMS OF CYTOCHROME P450 INDUCTION*. *J Biochem Molec Toxicol*, 2007. **21**: p. 176-181.
4. Denison, M.S., Whilock, J.P., *XENOBIOTIC INDUCIBLE TRANSCRIPTION OF CYTOCHROME P450 GENES*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: p. 18175-18178.
5. Goodman, G., *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*. 11th ed, ed. L.L. Brunton. 2006, USA: Mc Graw Hill.
6. Lee, J.S., R.S. Obach, and M.B. Fisher, *DRUG METABOLIZING ENZYMES: CYTOCHROME P450 AND OTHER ENZYMES IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT*. 2003, Lausanne, Switzerland New York: FontisMedia SA ; Marcel Dekker. xx, 588 p.
7. Omura, T., Sato, R., *THE CARBON MONOXIDE-BINDING PIGMENT OF LIVER MICROSOMES. I- EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE*. *J Biol Chem*, 1964. **239**: p. 2370-2378.
8. Zangar, R.C., D.D.R., Verma, S., *MECHANISM THAT REGULATE THE PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES BY CYTOCHROME P450*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004. **199**(316-331).
9. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H., *INHIBITION AND INDUCTION OF HUMAN CYTOCHROME P450 ENZYMES: CURRENT STATUS*. *Arch Toxicol*, 2008. **82**(10): p. 667-715.
10. Myasoedova, K.N., *NEW FINDINGS IN STUDIES OF CYTOCHROMES P450*. *Biochemistry (Mosc)*, 2008. **73**(9): p. 965-9.

11. Donato, M.T. *¿QUÉ ES EL CITOCROMO P450 Y CÓMO FUNCIONA?* 2000. www.uv.es/jcastell/citocromo_P450.pdf, Universidad de Valencia, España.
12. Hodgson, E., *A TEXT BOOK OF MODERN TOXICOLOGY. Chapter 7- Metabolism of toxicants.* 2006: John Wiley & sons Inc.
13. Guengerich, F., *RATE-LIMITING STEPS IN CYTOCHROME P450 CATALYSIS.* Bio Chem, 2000. **383**: p. 1553-1564.
14. González, F.J., Gelboin, H.V., *ROLE OF HUMAN CYTOCHROME P450 IN THE METABOLIC ACTIVATION OF CHEMICAL CARCINOGENS AND TOXINS.* Drug Metab Rev, 1994. **26**: p. 165-183.
15. Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M., Hines, R., Gidrol, X., Rahmani, R., *INDUCTION OF CYTOCHROME P450 1A1 GENE EXPRESSION , OXIDATIVE STRESS, AND GENOTOXICITY BY CARBARYL AND THIABENDAZOLE IN TRANSFECTED HUMAN HepG2 AND LYMPHOBLASTOID CELLS.* Biochem Pharmacol, 2001. **61**: p. 399-407.
16. Lemaire, G., Delescluse, C., Pralavorio, M., Ledirac, N., Lesca, P., Rahmani, R., *THE ROLE OF PROTEIN TYROSINE KINASES IN CYP1A1 INDUCTION BY OMEPRAZOLE AND THIABENDAZOLE IN RAT HEPATOCYTES.* Life Science, 2004. **74**: p. 2265-2278.
17. Whitlock, J.P., *INDUCTION OF CYTOCHROME P4501A1.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999. **39**: p. 103-125.
18. Zhou, S.F., Chan, E., Zhou, Z. W., Xue, C. C., Lai, X., Duan, W., *INSIGHTS INTO THE STRUCTURE, FUNCTION, AND REGULATION OF HUMAN CYTOCHROME P450 1A2.* Curr Drug Metab, 2009. **10**(7): p. 713-29.
19. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama, *FUNCTIONAL ROLE OF AHR IN THE EXPRESSION OF TOXIC EFFECTS BY TCDD.* Biochim Biophys Acta, 2003. **1619**(3): p. 263-8.
20. Brauze, D., Widerak, M., Cwykiel, J., Szyfter, K., Baer-Dubowska, W., *THE EFFECT OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR ON AhR, AhRR, ARNT, Hif1a, CYP1A1, AND NQO1 GENES IN RAT LIVER.* Toxicol Letters, 2006. **167**: p. 212-220.
21. Delescluse, C., Lemaire, G., De Sousa, G., Rahmani, R., *IS CYP1A1 INDUCTION ALWAYS RELATED TO AhR SIGNALING PATHWAY?* Toxicol Letters, 2000. **153**: p. 73-82.

22. Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J., *MOLECULAR MECHANISM OF AhR FUNCTIONS IN THE REGULATION OF CYTOCHROME P450 GENES*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**: p. 311-317.
23. Gillner, M., Bergman, J., Cambillau, C., Fernström, B., Gustafsson, J., *INTERACTIONS OF INDOLES WITH SPECIFIC BINDING SITES FOR 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-p-DIOXIN IN RAT LIVER*. *Molec Pharmacol*, 1985. **28**: p. 357-363.
24. Asteinza, J., Camacho, R., Reyes, E., Dorado, V., Espinosa, J., *INDUCTION OF CYTOCHROME P450 ENZYMES BY ALBENDAZOLE TREATMENT IN THE RAT*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2000. **9**: p. 31-37.
25. Baloharová, V., Skálová, L., Maas, R.F.M., De Vrieze, G., Bull, S., Fink-Gremmels, J., *THE EFFECT OF BENZIMIDAZOLE ANTHELMINTICS ON P4501A IN RAT HEPATOCYTES AND HepG2 CELLS*. *Res Vet Sci*, 2003. **75**(61-69).
26. Denison, M.S., Phelan, D.G.M., Winter, G.M., Ziccardi, M.H., *CARBARYL, A CARBAMATE INSECTICIDE, IS A LIGAND FOR THE HEPATIC Ah (DIOXIN) RECEPTOR*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998. **152**: p. 406-414.
27. Kikuchi, H., et al., *DIFFERENCES IN INDUCIBILITY OF CYP1A1-mRNA BY BENZIMIDAZOLE COMPOUNDS BETWEEN HUMAN AND MOUSE CELLS: EVIDENCES OF A HUMAN-SPECIFIC SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY FOR CYP1A1 INDUCTION*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **334**(2): p. 235-40.
28. Shih, H., et al., *SPECIES DIFFERENCES IN HEPATOCYTE INDUCTION OF CYP1A1 AND CYP1A2 BY OMEPRAZOLE*. *Hum Exp Toxicol*, 1999. **18**(2): p. 95-105.
29. Nesnow, S. and H. Bergman, *METABOLISM OF ALPHA-NAPHTHOFLAVONE BY RAT LIVER MICROSOMES*. *Cancer Res*, 1981. **41**(7): p. 2621-6.
30. Chang, T., Gonzalez, F.J., Waxman, D.J., *EVALUATION OF TRIACETYLOLEANDOMYCIN, α -NAPHTHOFLAVONE AND DIETHYLDITHIOCARBAMATE AS SELECTIVE CHEMICAL PROBES FOR INHIBITION OF HUMAN CYTOCHROMES P450*. *Arch Biochem and Biophys*, 1994. **311**(2): p. 437-442.
31. Koley, A.P., Buters, J. T., Robinson, R. C., Markowitz, A., Friedman, F. K., *DIFFERENTIAL MECHANISMS OF CYTOCHROME P450 INHIBITION AND ACTIVATION BY ALPHA-NAPHTHOFLAVONE*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(6): p. 3149-52.

32. Blank, J., Tucker, A., Sweatlock, J., Gasiewicz, T., Luster, M., *α -NAPHTHOFLAVONE ANTAGONISM OF TCDD INDUCED MURINE LYMPHOCYTE EROD ACTIVITY AND IMMUNOSUPPRESSION*. Molec Pharmacol, 1987. **32**: p. 168-172.
33. Kikuchi, H., Hossain, A., Yoshida, H., Kobayashi, S., *INDUCTION OF CYTOCHROME P-450 1A1 BY OMEPRAZOLE IN HUMAN HepG2 CELLS IS PROTEIN TYROSINE KINASE-DEPENDENT IS NOT INHIBITED BY α -NAPHTHOFLAVONE*. Arch Biochem Biophys, 1998. **358**(2): p. 351-358.
34. Merchant, M., Morrison, V., Santostefano, M., Safe, S., *MECHANISM OF ACTION OF ARYL HYDROCARBON RECEPTOR ANTAGONISTS: INHIBITION OF 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-*p*-DIOXIN INDUCED CYP1A1 GENE EXPRESSION*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 389-394.
35. Merchant, M., Krishnan, V., Safe, S., *MECHANISM OF ACTION OF α -NAPHTHOFLAVONE AS AN Ah RECEPTOR ANTAGONIST IN MCF-7 HUMAN BREAST CANCER CELLS*. Toxicol Appl Pharmacol, 1993. **120**: p. 178-195.
36. Willhensson, A., Whitelaw, M., Gustafsson, J., Poellinger, L., *AGONISTIC AND ANTAGONISTIC EFFECTS OF α -NAPHTHOFLAVONE ON DIOXIN RECEPTOR FUNCTION*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 19028-19033.
37. Gasiewicz, T., Rucci, G., *α -NAPHTHOFLAVONE ACTS AS AN ANTAGONIST OF 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-*p*-DIOXIN BY FORMING AN INACTIVE COMPLEX WITH THE Ah RECEPTOR*. Molec Pharmacol, 1991. **40**(5): p. 607-612.
38. Hodson, P.V., Qureshi, K., Noble, C.A.J., Akhtar, P., Brown, R.S., *INHIBITION OF CYP1A ENZYMES BY α -NAPHTHOFLAVONE CAUSES BOTH SYNERGISM AND ANTAGONISM OF RETENE TOXICITY TO RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)*. Aquat Toxicol, 2007. **81**: p. 275-285.
39. Scott, J.A., Hodson, P.V., *EVIDENCE FOR MULTIPLE MECHANISMS OF TOXICITY IN LARVAL RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) CO-TREATED WITH RETENE*. Aquat Toxicol, 2008. **88**: p. 200-206.
40. Piskorska-Pliszczynska, J., Keys, B., Safe, S., Newman, M.S., *THE CYTOSOLIC RECEPTOR BINDING AFFINITIES AND AHH INDUCTION POTENCIES OF 29 POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS*. Toxicol Letters, 1986. **34**: p. 67-74.

41. Santostefano, M., Merchant, M., Arellano, L., Morrison, V., Dennison, M.S., Safe, S., *α -NAPHTHOFLAVONE-INDUCED CYP1A1 GENE EXPRESSION AND CYTOSOLIC ARYL HYDROCARBON RECEPTOR TRANSFORMATION*. *Molec Pharmacol*, 1993. **43**(2): p. 200-206.
42. Maron, D., Ames, B., *METHODS FOR THE Salmonella MUTAGENICITY TEST*. *Mutat Res*, 1983. **113**: p. 174-215.
43. Maines, M.D., *CURRENT PROTOCOLS IN TOXICOLOGY*. 1999, John Wiley: New York. p. v. (loose-leaf).
44. Bradford, M.M., *A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAMS OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING*. *Anal Biochem*, 1979. **72**: p. 248-254.
45. Laemmli, U.K., *CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
46. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., *ELECTROPHORETIC TRANSFER OF PROTEINS FROM POLYACRYLAMIDE GELS TO NITROCELLULOSE SHEETS: PROCEDURES AND SOME APPLICATIONS*. *Proc Natl Acad Sci*, 1979. **76**: p. 4350-4354.
47. Burke, D., Thompson, S., Weaver, R., Wolf, R., Mayers, R., *CYTOCHROME P450 SPECIFICITIES OF ALKOXYRESORUFIN-*o*-DEALKYLATION IN HUMAN AND RAT LIVER*. *Biochem Pharmacol*, 1994. **48**(923-936).
48. Rodrigues, A.D., Prough, R.A., *INDUCTION OF CYTOCHROME P4501A1 AND P4501A2 AND MEASUREMENT OF CATALYTIC ACTIVITIES*. *Meth Enzymol*, 1991. **26**: p. 423-413.
49. Aluru, N., Vuori, K., Vijayan, M., *MODULATION OF Ah RECEPTOR AND CYP1A1 EXPRESSION BY α -NAPHTHOFLAVONE IN RAINBOW TROUT HEPATOCYTES*. *Comp Biochem Phys, C*, 2005. **141**: p. 40-49.
50. Ishida, S., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ando, M., Ohno, Y., Ozawa, S., Shawada, J., *CHARACTERIZATION OF HUMAN CYP1A1/1A2 INDUCTION BY DNA MICROARRAY AND α -NAPHTHOFLAVONE*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**: p. 172-177.
51. Dhawan, A., Parmar, D., Dayal, M., Seth, P., *CYTOCHROME P450 (P450) ISOENZYME SPECIFIC DEALKYLATION OF ALKOXYRESORUFINS IN RAT BRAIN MICROSOMES*. *Molec Cellular Biochem*, 1999. **200**: p. 169-176.

52. Taura, K., Naito, E., Ishii, Y., Mori, M. A., Oguri, K., Yamada, H., *CYTOCHROME P450 1A1 (CYP1A1) INHIBITOR ALPHA-NAPHTHOFLAVONE INTERFERES WITH UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE (UGT) ACTIVITY IN INTACT BUT NOT IN PERMEABILIZED HEPATIC MICROSOMES FROM 3-METHYLCHOLANTHRENE-TREATED RATS: POSSIBLE INVOLVEMENT OF UGT-P450 INTERACTIONS*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(1): p. 56-60.
53. Cho, U.S., Park, E. Y., Dong, M. S., Park, B. S., Kim, K., Kim, K. H., *TIGHT-BINDING INHIBITION BY ALPHA-NAPHTHOFLAVONE OF HUMAN CYTOCHROME P450 1A2*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1648**(1-2): p. 195-202.
54. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., Guengerich, F. P., *SELECTIVITY OF POLYCYCLIC INHIBITORS FOR HUMAN CYTOCHROME P450S 1A1, 1A2, AND 1B1*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(9): p. 1048-56.
55. Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., Johnson, E. F., *ADAPTATIONS FOR THE OXIDATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS EXHIBITED BY THE STRUCTURE OF HUMAN P450 1A2*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14348-55.