



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“EFECTO DE LA BERGAMOTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE CYP1A
DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

DIEGO ARTURO ORNELAS AYALA

TUTOR PRINCIPAL

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI FACULTAD DE QUÍMICA

JESÚS CHIMAL MONROY INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad de México, julio, 2016



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.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mis queridos padres, los cuales siempre me han apoyado incondicionalmente en todo lo que hago y no sólo en los aspectos académicos; gracias a ellos mi formación académica y personal ha sido sumamente satisfactoria, y es por ellos que hasta la fecha tengo lo que tengo y soy lo que soy, muchas gracias. También quiero agradecer a todo el personal del laboratorio C-206 por su buena compañía, sus asesorías técnicas y sus críticas en seminarios que hicieron en todos estos meses aumentar mi amor por la ciencia. Estoy eternamente agradecido, igualmente, con mi tutor el Dr. Espinosa, primero por aceptarme en su equipo de trabajo, así como por su paciencia por ayudarme en todos los aspectos en la realización de este proyecto. Debido a que este proyecto fue una colaboración con el Dr. Jesús Chimal Monroy, una gran parte del trabajo se realizó en su laboratorio y es por eso que quiero agradecer a todo su equipo del laboratorio que siempre me trataron como un miembro más, además de apoyarme en todos los aspectos profesionales y brindarme un enfoque diferente en cuanto a forma de pensar y de trabajar. Por otro lado quiero agradecer al CONACyT por otorgarme una beca que me ayudó a sobrevivir todo este tiempo, así como al PAEP (Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado) por otorgarme un apoyo que me permitió ir al XXX congreso nacional de la sociedad de bioquímica en Guadalajara, Jalisco, en donde pude presentar mi proyecto y asistir a lo último en investigación científica del país. Por último quiero agradecer a Sheila por hacer brillar mi mundo, creer en mi y apoyarme en todo lo que quiero y creo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
GLOSARIO.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Los citocromos P450.....	8
1.2 Estructura y mecanismo de acción.....	9
1.3 Expresión de los CYPs.....	11
1.4 Citocromo P450 en el desarrollo embrionario.....	14
1.5 CYP1A1 y su papel en el desarrollo.....	16
1.6 AHR y su papel en corazón.....	19
1.7 El pollo como un modelo del desarrollo.....	20
1.8 CYP1A en pollo.....	21
2 ANTECEDENTES.....	22
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4 HIPÓTESIS.....	23
5 OBJETIVOS.....	24
5.1Objetivos particulares.....	24
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Preparación de S9 y fracción microsomal.....	25
6.2 Tratamiento de embriones de pollo y clasificación.....	25
6.3 Estudios de inhibición de la actividad de CYP1A en microsomas.....	27
6.4 Histología.....	27
6.5 Hibridaciones <i>in situ</i>	28
6.6 Estadística.....	30
7 RESULTADOS.....	31
7.1 Inhibición de la actividad microsomal en hígados de pollo.....	31
7.2 Actividad microsomal en homogenados de embriones de pollo.....	32
7.3 Expresión de CYP1A en embriones de HH32.....	34
7.4 Expresión de CYP1A en diferentes etapas.....	36
7.5 Efectos de BG y NF en el desarrollo.....	39
8 DISCUSIÓN.....	43
8.1 Efecto de BG y NF sobre la actividad microsomal.....	43
8.2 Expresión de CYP1A en embriones de pollo.....	45
8.3 Efectos de BG y NF en el corazón.....	47
9 CONCLUSIONES.....	51
10 PERSPECTIVAS.....	52
11 BIBLIOGRAFÍA.....	53

RESUMEN

Los citocromos p450 (CYP) constituyen una superfamilia de monooxigenasas que tienen un papel crítico en el metabolismo de xenobióticos y se encuentran presentes en una alta variedad de especies vivas, desde bacterias hasta humanos. El citocromo P450 1A1 (CYP1A1) es un miembro de la subfamilia 1A, el cual participa en la bioactivación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) como el benzo(a) pireno; aunque también es capaz de metabolizar algunos compuestos endógenos, como el ácido araquidónico. La expresión constitutiva de CYP1A1 es extrahepática y generalmente baja en ausencia de inductor; sin embargo, existen reportes que demuestran que CYP1A1 se expresa de manera constitutiva en etapas tempranas del desarrollo embrionario de distintas especies animales como ratón, pollo, pez cebra y humano. Esta expresión constitutiva en el desarrollo sugiere que además del metabolismo de xenobióticos, CYP1A1, también podría tener una función endógena importante. Para estudiar la función de CYP1A en el desarrollo, se utilizó como estrategia experimental la administración de inhibidores enzimáticos durante el desarrollo embrionario utilizando como modelo al pollo (*Gallus gallus*). Los inhibidores utilizados en este trabajo fueron Bergamotina (BG), una furanocumarina presente en el jugo de toronja que recientemente se ha descrito como un inhibidor competitivo de la actividad de CYP1A1, y como control a α -naftoflavona (NF), el cuál es un compuesto sintético que se utiliza como inhibidor específico en la actividad de CYP1A1. En este trabajo se encontró que los compuestos BG y NF actúan como inhibidores competitivos sobre la actividad de CYP1A en microsomas de hígado de pollo, presentando una K_i de $32.37 \pm 2.033\text{nM}$ y $101.6 \pm 8.075\text{nM}$, respectivamente. Se midió la actividad enzimática basal en homogenados de embriones de diferentes etapas y se encontró una actividad basal a partir de la etapa HH26, la cual aumentó en etapas posteriores(HH28,HH30 y HH32). No se encontraron diferencias en la actividad enzimática basal con respecto a la obtenida de embriones tratados con los inhibidores, excepto en los embriones tratados con NF en la etapa HH28 y HH30, en donde disminuyó su actividad. Por otro lado, cuando se analizaron los fenotipos en embriones de etapa HH32 tratados con respecto a los no tratados, se observaron anomalías en el corazón, las cuales corresponden a un aumento en el

largo del ventrículo izquierdo, así como un aumento en el área del ventrículo derecho. A pesar de que los efectos ocurrieron en corazón, sólo fue posible detectar una expresión basal en otros órganos, como hígado y riñón. Tampoco se detectó actividad enzimática en corazón, lo que sugiere que el efecto de los inhibidores no es directo en este órgano. Aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual BG y NF afectan la morfología del corazón, este trabajo aporta información sobre la importancia que puede tener la exposición a inhibidores de CYP1A durante el desarrollo.

GLOSARIO

AHR: Receptor de aril hidrocarburos.

AHRR: Represor del receptor de aril-hidrocarburos.

ANF: Factor natriurético atrial.

ANG II: Angiotensina II

ANOVA: Analisis de varianza

ARNT: Translocador nuclear del receptor de aril-hidrocarburos.

BG: Bergamotina.

β-MHC: Cadena pesada de miosina beta.

BNF: Beta naftoflavona.

CTRL: Control. En este trabajo se refiere al grupo que no fue tratado con ningún reactivo.

CYP: Citocromo P450

DMSO: Dimetilsulfoxido

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EET: Ácido epoxieicosatetraenoico

EROD: Ethoxyresorfin O-deethylase. Ensayo para detectar actividad de CYP1A mediante la deetilación de etoxyresorufina que da como producto al compuesto fluorescente resorufina.

ET-1: Endotelina 1

HETE: Ácido hidroxieicosatetraenoicos

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

Ki: Constante de inhibición. Parámetro cinético que nos dice la concentración de inhibidor necesaria para lograr la mitad de la máxima inhibición.

Km: Constante de Michaelis-Menden. Concentración de sustrato a la cual la velocidad de una reacción enzimática alcanza la mitad del valor de la velocidad máxima. Entre más pequeño el valor, la enzima es más afín a su sustrato.

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, reducida.

NF: alfa naftoflavona.

NTMT: Buffer para fosfatasa alcalina (Tris-HCL 50mM pH9.5, MgCL₂ 50mM, NaCl 20 mM, Tween 20 1%)

PBT: Buffer de fosfatos + tris ()

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Q-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT PCR: Retrotranscripción de reacción en cadena de la polimerasa,

TBST: Buffer salino Tris y tritón (Tris-HCL 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCL 10mM, Tritón 1%)

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

Vmax: Velocidad máxima. Parámetro cinético que nos dice la velocidad de reacción más alto que puede alcanzar una reacción enzimática.

XRE: Elementos de respuesta a xenobióticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los Citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP), fueron descubiertos originalmente en microsomas de hígado de rata en 1958 por Klingenberg et al., como un pigmento desconocido que unía monóxido de carbono; pero no fue hasta 1964 que Omura y Sato descubrieron que se trataba de una hemoproteína que presentaba un pico de absorción de 450 nM (nombrado pico de Soret) al unirse con el monóxido de carbono, por lo que se les llamaron “citocromos P450”. A pesar de que los CYP450 fueron descubiertos en rata, estos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los organismos eucariontes, así como en algunos procariontes (Omura, 1999). Se han descrito más de 6000 diferentes isoformas de CYPs en los diferentes reinos y la cantidad de CYPs en el genoma varía según la especie de la que se trate. Mientras que el ser humano cuenta con 57 isoformas registradas de CYPs, otros mamíferos como el chimpancé y el ratón cuentan con 27 y 103 isoformas, respectivamente. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con sólo tres isoformas de CYPs, mientras que en *Escherichia coli* no se tiene registrada una sola isoforma de citocromos P450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html>).

Los CYPs están involucrados en una amplia gama de procesos ya que algunos de ellos son capaces de metabolizar tanto sustratos endógenos como sustratos exógenos. Por ejemplo, existen CYPs que participan en la hidroxilación de hormonas esteroides (Waterman, 1994) (Ogishima et al., 1989) (Omura y Morohashi, 1995), la biosíntesis de esteroides (Rozman et al., 1996), el metabolismo del ácido araquidónico (Rahman et al., 1997) y de la vitamina D3 (Sakaki et al., 1999), así como del ácido retinoico (White et al., 1996). Además de estas funciones, también se encuentran CYPs que son capaces de metabolizar compuestos xenobióticos, como son drogas (incluyendo antibióticos), procarcinógenos, antioxidantes, solventes orgánicos, anestésicos, colorantes, pesticidas, alcoholes, aromatizantes, saborizantes, hidrocarburos, etc (Coon et al., 1992).

Para su estudio, los citocromos P450 han sido clasificados en familias y subfamilias obedeciendo los criterios filogenéticos, esto es, basándose en la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de las diferentes enzimas. Los citocromos P450 se clasificaron con las siglas CYP, seguidas de un número que designa la familia, una letra que identifica la subfamilia y otro número que corresponde con el gen (p. e. *CYP1A1*, *CYP2C9*). En una misma familia se agrupan aquellas enzimas cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud de $\geq 36\%$, independientemente de la especie de procedencia; mientras que las enzimas con una similitud mayor al 55% pertenecerán a la misma subfamilia. Para que a dos enzimas se les considere diferentes isoformas, éstas deben diferir en su secuencia de aminoácidos en más del 3% (Nebert y Gonzalez, 1987).

1.2 Estructura y mecanismo de acción

Los citocromos P450 son cisteinato-hemo enzimas, que tienen un grupo prostético constituido de un Hierro (III) unido a un anillo de protoporfirina IX que a su vez se une covalentemente a una cisteína de la proteína por un átomo de sulfuro (Fig. 1).

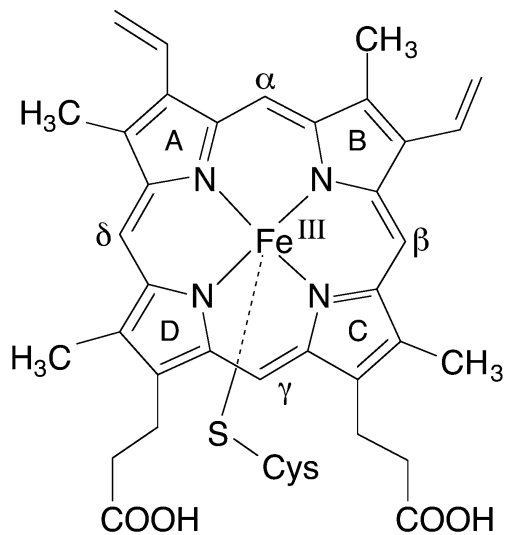
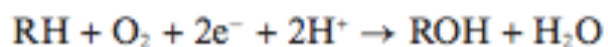


Fig. 1. Grupo prostético de los citocromos P450.

La reacción general catalizada por los CYPs es una hidroxilación que requiere 2 electrones y 2 protones, en donde R representa al sustrato:



En contraparte existen muchos datos experimentales que demuestran que los CYPs no sólo realizan hidroxilaciones, sino que también son capaces de catalizar otras múltiples reacciones, como son: dealquilaciones, oxidación de anillos aromáticos, deetilaciones, dehalogenaciones, oxidaciones, etc (Guengerich, 2001). A pesar de esto se ha descrito una vía general para los CYPs mostrada en la figura 2. En el primer paso, el sustrato se une cerca de la región distal del grupo hemo, desplazando a una molécula de agua. Esto provoca un cambio en el equilibrio del hierro, pasando de un estado de bajo spin a uno de alto spin, haciendo más positivo el potencial del hierro favoreciendo la transferencia de electrones del siguiente paso. En el paso 2 los electrones provienen del NADPH mediante la reacción de una flavoproteína accesoria llamada NADPH-P450 reductasa, haciendo que el grupo hemo cambie de estado férrico a ferroso. En el paso 3, el grupo ferroso une al O_2 , generando un intermediario oxoferroso (que es isoeléctrico a superóxido férrico). Posteriormente, en el paso 4, ocurre una segunda transferencia de un electrón, reduciendo al hierro a estado peroxiférrico. El electrón puede provenir de la NADPH-P450 reductasa, o del citocromo b_5 . Posteriormente, en el paso 5, se añade un protón, produciendo la forma hidroperoxo-férrico (también conocido como compuesto 0). En el paso 6, una segunda protonación rompe el enlace O-O, liberando una molécula de agua, generando una especie oxoferril con un radical de porfirina catiónica. A este compuesto se le conoce como compuesto I, y es el que realiza la oxidación en la mayoría de los CYPs. En el paso 7, el compuesto I ataca al sustrato haciendo una hidroxilación. La salida del producto hidroxilado (R-OH), en el paso 8, permite que una molécula de agua pueda unirse al anillo férrico y completar el ciclo. El ciclo puede no completarse debido a la posición inapropiada del sustrato, a la resistencia a un ataque oxidativo por parte del sustrato, o bien por la liberación de intermediarios en el ciclo. Por ejemplo, el compuesto oxoferroso puede regresar al estado férrico liberando oxígeno (paso 9); el compuesto 0 puede llevar el ciclo a la dirección contraria produciendo peróxido (paso 10); y por último el compuesto I puede unir protones y generar una molécula de agua, colapsando el ciclo (paso 11) (Munro et al., 2007).

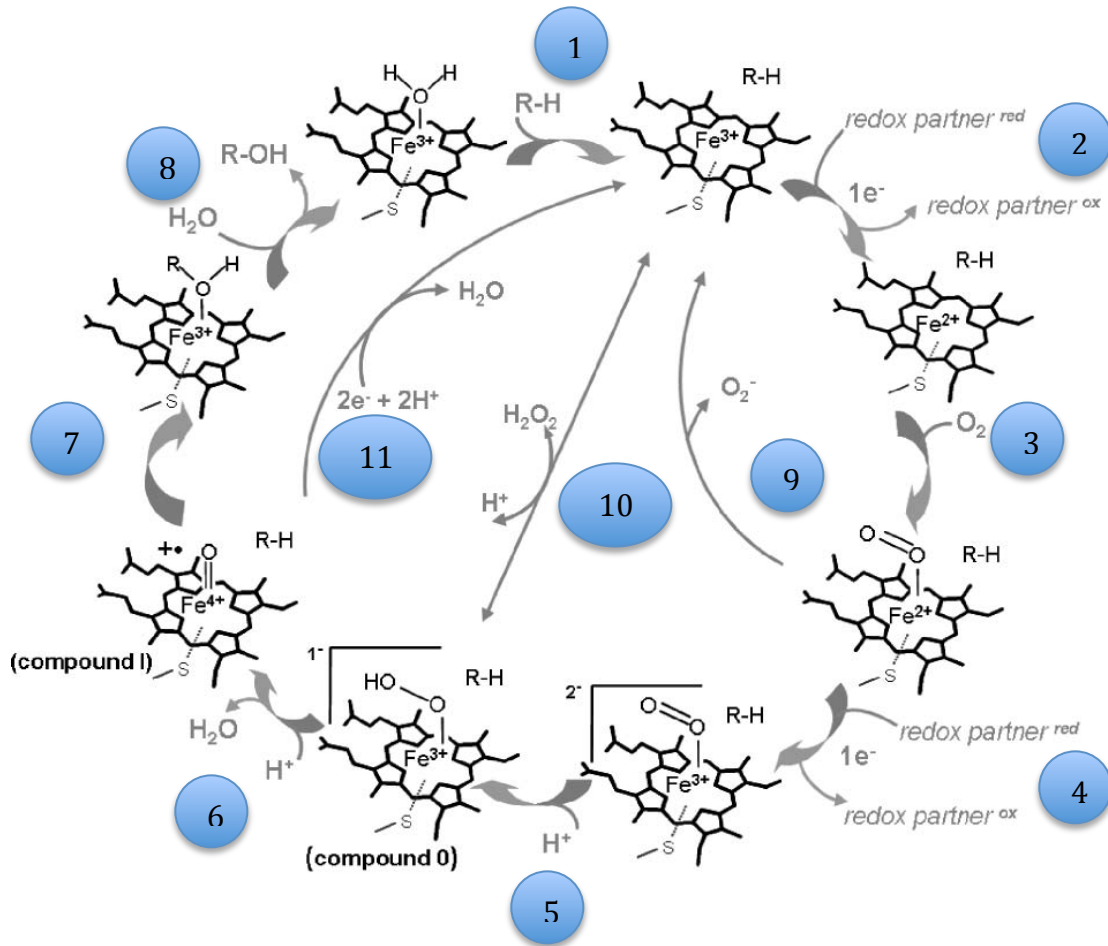


Fig. 2. Ciclo catalítico de los citocromos P450 (Munro et al., 2007).

1.3 Expresión de los CYPs

El órgano con mayor nivel de enzimas CYPs es el hígado. Se estima que aproximadamente el 70% de los CYPs hepáticos pertenecen a las familias 1, 2 y 3, del cuál el 30% está representado por la isoenzima CYP3A4. Estas tres familias son las principales responsables del metabolismo de compuestos xenobióticos (Shimada et al., 1994), es por eso que al hígado se le considera como el principal órgano en el metabolismo de sustratos exógenos. A pesar de que los CYPs se encuentran principalmente en hígado, estos se expresan en prácticamente todo el organismo. En tejidos extrahepáticos, por ejemplo en pulmón, se ha detectado la presencia de *CYP1A1*, *2B6*, *2E1*, *2F1*, *3A4*, *3A5*, *4B1*, *1A2*, *1B1*, *2A6*, *2A13*, *2C*, *2D6* y *2S1*. La mayoría de estas enzimas se expresan a niveles mucho menores con respecto a hígado, pero algunas enzimas como *CYP2A13*, *2F1*, *2S1*, *3A5* y

4B1 se expresan preferencialmente en el pulmón (Ding y Kaminsky 2003). En cerebro, en donde los niveles de CYP son muy bajos con respecto al hígado (0.5-1%), la inducción de la expresión de CYP2B por nicotina en neuronas de la corteza frontal de rata es tan alta que puede exceder, incluso, los niveles encontrados en hígado (Miksys et al., 2000). En un estudio realizado en tejidos de humano se encontró que los patrones de expresión de las diferentes isoformas de CYPs varían dependiendo del órgano y que estos patrones no son al azar. Por ejemplo, el CYP1A1 es capaz de metabolizar contaminantes ambientales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, y se expresa principalmente en pulmón y tráquea, mientras que el CYP3A4 (el cual metaboliza aproximadamente el 30% de los fármacos usados en la clínica) se expresa principalmente en hígado e intestino (Bieche et al., 2007). Además de lo anterior, la expresión de CYPs también puede estar influenciada por factores genéticos, fisiopatológicos y ambientales. Entre los factores genéticos se encuentran los polimorfismos. Se han encontrado una gran cantidad de polimorfismos en distintos citocromos P450, y no sólo en su secuencia codificantes, sino también en la región promotora del gen. Esta diferencia en alelos puede tener un impacto directo en los niveles de expresión, e incluso en la actividad de las enzimas (Zanger y Schwab, 2013). Por ejemplo, el polimorfismo CYP1A1*2A tiene una mutación en un aminoácido que provoca un incremento en su actividad, mientras que el polimorfismo CYP3A4*2 tiene una mutación en un aminoácido que disminuye su actividad (Preissner et al., 2013). De igual manera se han reportado numerosos estudios en donde ciertas patologías pueden modificar los niveles y la actividad de algunos CYPs. En ratas con diabetes tipo I, se ha encontrado un aumento de los niveles de las enzimas CYP1A2, 2A1, 2B1, 2E1 y en las subfamilias 2C y 4A; mientras que las enzimas 2A2, 2A11 y 2A13 se encuentran disminuidas (Nobuo, 1994). En humanos con patologías hepáticas como la cirrosis de origen colestásico o hepatocelular, los niveles de CYP2E1 y 1A2, así como las subfamilias 3A y 2C en el hígado se encuentran disminuidas entre un 20-80% (Farrel, 1998). En tejidos de pacientes con cáncer de mama se ha determinado un aumento en la expresión de *CYP1B1* conforme aumenta el grado de invasión del cáncer (McFadyen et al., 1999). Este aumento en la expresión de CYP1B1 también ha sido reportado en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Tsuchiya et al., 2004). Otro factor determinante en la expresión de

los CYPs, es el sexo. En un estudio realizado en hígados de 112 hombres y 112 mujeres se encontró que el *CYP1A2*, *3A4* y *7A1* se encuentran aumentados en mujeres, mientras que *CYP3A5* y *CYP27B1* se muestran preferencialmente en hombres (Zhang et al., 2011a). La diferencia de *CYP3A4* a nivel de proteína en hígado de mujeres con respecto a hombres es de casi el doble, lo cual tiene un impacto en el metabolismo de fármacos como antipirina, eritromicina, midazolam, entre otros (Cotreau et al., 2005). Otro factor importante es la edad; se ha observado que los niveles hepáticos de *CYP2C9* aumentan conforme a la edad, de la misma manera ocurre con *CYP1A2*, *2A6*, *2B6*, *2C8* y *3A4* (Yang et al., 2010). La expresión así como la actividad de CYPs no sólo está determinada por factores endógenos como los ya descritos, sino que la exposición a fármacos, contaminantes ambientales y componentes en la dieta también pueden modificarla. Contaminantes ambientales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorobifenilos, dibenzodioxinas, dibenzofuronas, entre otros son capaces de inducir la expresión de *CYP1A1*, y debido a ello se le ha propuesto como un buen biomarcador de contaminación ambiental (Bucheli y Fent 1995). *CYP2E1* puede ser inducido a nivel transcripcional por la exposición a alcohol, tabaco o el fármaco isoniazida (Ogu y Maxa, 2000). El resveratrol es una fitoalexina presente en diversas especies de plantas así como en el vino, la cuál actúa como un inhibidor transcripcional de *CYP1A1* y *CYP1A2*, así como inhibidor en la actividad enzimática de *CYP3A4*, *CYP2D6* y *CYP2C9* (Chow et al., 2010). Se ha descrito una gran cantidad de inhibidores naturales y sintéticos de la actividad de la isoforma *CYP1A1*, entre los que se encuentran flavonas, flavononas, cumarinas alcaloides etc. El jugo de toronja, por ejemplo, contiene compuestos como bergamotina (BG), naringenina y naringina, los cuales actúan como inhibidores de la actividad de *CYP1A* (Badala y Delgoda, 2014). Todo esto en conjunto nos indica que la expresión de CYPs puede variar dependiendo el tejido, el estado fisiológico del individuo, e incluso por variaciones alélicas, y que esto en su conjunto puede ser modificado por compuestos presentes en el medio ambiente y la dieta. Además de lo anterior, también se ha reportado que algunos citocromos se expresan de manera específica en algunos órganos durante el desarrollo embrionario. En ratón se tienen identificados CYPs que sólo se expresan en etapas específicas del desarrollo, así como CYPs que

muestran una expresión constitutiva en todas las etapas analizadas (Choudhary et al., 2005). No se conoce bien el papel de todos los citocromos en el desarrollo embrionario, sin embargo cada vez existe más evidencia de su importancia.

1.4 Citocromos P450 en el desarrollo embrionario

Además del metabolismo de drogas y otros xenobióticos muchos citocromos P450 tienen sustratos endógenos que forman intermediarios importantes para mantener el metabolismo y la homeostásis de diferentes tejidos. Entre los compuestos producidos por estos citocromos se encuentran esteroides, esteroides sexuales, compuestos derivados de lípidos como prostaciclínas y tromboxanos, así como ácidos biliares y algunas vitaminas. Un ejemplo es CYP51, lanosterol 14-ademetilasa, el cual cataliza la síntesis de lanosterol a partir de colesterol. CYP11A1 rompe un lado de la cadena del colesterol para la producción de esteroides. CYP7A1 hidroxila el colesterol en la posición 7, mandando al esteroide a la vía de síntesis de ácidos biliares, en la cual CYP8B1 participa realizando una hidroxilación. CYP27A1 y CYP27B1 activan a la vitamina D3 por una hidroxilación, además de que también participan en la hidroxilación del colesterol en la formación de ácidos biliares al igual que CYP46. Como otros ejemplos se ha reportado el papel de CYP8A1 en la formación de prostaciclinas, CYP5A1 en la formación de tromboxanos y CYP11B2 en la formación de aldosterona (Stoilov et al., 2001). Estos citocromos presentan una alta afinidad a su sustrato, por lo que se les ha llamado “*housekeeping*”, a diferencia de los miembros de las familias 1-3, los cuales presentan poca especificidad y por lo tanto una alta diversidad de sustratos para cada enzima. Tan sólo para el CYP3A4 se han reportado más de 50 diferentes sustratos (Zanger y Schwab, 2013).

Recientemente se ha discutido el papel de los citocromos P450 en el desarrollo embrionario. Tan importante es su función, que ratones knockout en la enzima citocromo P450 reductasa mueren en el día 9.5 post-coito, además de presentar defectos en extremidades, cerebro, así como una inhibición en la vascularización (Otto et al., 2003). Uno de los ejemplos más claros de la función de los CYPs, es el de CYP26. CYP26 es una enzima conservada presente en humano, rata, ratón, pez cebra, pollo e incluso en algunos hongos

(<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html>). Esta enzima es capaz de controlar los niveles de ácido retinoico (AR) a través de su hidroxilación a compuestos más polares como 4-OH-AR, 4-oxo-AR y 18 OH-AR. Se ha relacionado el papel del ácido retinoico en el desarrollo de extremidades y organogénesis (Cunningham y Duester, 2015). Embriones de ratón knockout de *Cyp26* muestran defectos en el desarrollo de la parte caudal del animal, así como defectos en vértebras y tubo neural (Sakai et al., 2001). Otro ejemplo claro de CYPs importantes para el desarrollo embrionario es el de CYP1B1. En 1997, se reportaron casos de glaucoma primario congénito en neonatos en tres familias diferentes, todos relacionados con mutaciones en el gen que codifica para la isoforma CYP1B1 (Stoilov et al., 1997). La enfermedad presenta una presión intraocular elevada, un desarrollo anormal de la red trabecular y defectos en el canal de Schlemm. A pesar de que se creía que los ratones knockout para *Cyp1b1* no presentaban fenotipo (Buters et al., 1999), estudios más detallados revelan que estos ratones presentan anomalías en la red ventricular, así como en el canal de Schlemm (Libby et al., 2003). Esto apunta, que CYP1B1 juega un papel importante en el desarrollo de la red trabecular, por lo tanto, esta enzima actúa ya sea degradando, o bien, formando algún compuesto necesario para el desarrollo de estas estructuras filtradoras. Sin embargo el mecanismo por el cual actúa CYP1B1 aún no es claro.

En un estudio hecho en embriones de ratón se cuantificó el mRNA de 40 isoformas de citocromos P450 encontrando que el 70% de estos se expresan constitutivamente en uno o más estados del desarrollo, además de que una tercera parte de estas enzimas pertenecieron a las familias 1-3. Algunos citocromos housekeeping como *Cyp8a1* (prostaglandina 12 sintasa), *Cyp21a1* (esteroide 21-hidroxilasa), *Cyp46* (colesterol 24-hidroxilasa), y *Cyp51* (lanosterol 14- α -demetilasa) se expresaron en todas las etapas analizadas (E7, E11 y E17), al igual que la isoforma *Cyp26a1*. En este estudio también se encontró una expresión constitutiva de 8 citocromos P450 a los cuales no se les conoce una función endógena, entre ellos a la isoforma *Cyp1a1* (Choudhary et al., 2005). La presencia de citocromos P450 en el desarrollo embrionario se ha asociado principalmente al metabolismo de xenobióticos como un posible mecanismo de defensa contra agentes tóxicos; sin embargo, también cabe la posibilidad de que

algunos de ellos tengan una función específica en el desarrollo, en especial los que están regulados de manera espacio-temporal. Es por eso que en el próximo apartado se hablará sobre la isoforma CYP1A1, que aunque se ha descrito principalmente como metabolizadora de contaminantes ambientales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, cada vez existe más evidencia de su posible rol endógeno.

1.5 CYP1A1 y su papel en el desarrollo

La familia de citocromos 1, se divide en dos subfamilias: 1A y 1B. Estas subfamilias incluyen, en mamíferos, a las isoenzimas CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html>). Estas tres isoformas son inducidas transcripcionalmente por el receptor citoplasmático AhR (aryl hydrocarbon receptor), el cual se encuentra formando un complejo en el citosol junto con las proteína Hsp-90 (heat-shock protein 90), p23 y XAP2 o AIP. Cuando un ligando, ya sea endógeno o exógeno, interacciona con AhR, el complejo se transloca al núcleo, donde se heterodimeriza con la proteína translocadora nuclear del receptor de arilos (ARNT). El heterodímero AHR/ARNT reconoce las secuencias consenso denominadas XRE (Xenobiotic response elements), las cuales se localizan cerca de la región promotora de los genes que codifican para los citocromos P450 de la familia 1, así como otros genes de enzimas pertenecientes al metabolismo de xenobióticos de fase II. La transcripción de estos genes puede ser reprimida por el represor de AhR (AhRR), el cuál regula la transcripción formando un dímero con AhR, impidiendo que se una a los sitios XRE (Fig. 3). Existe un gran número de proteínas que participan en este proceso, como el factor de transcripción Sp1, acetilasas de histonas como p300, el co-activador p/CIP, entre otras (Androutsopoulos et al., 2009)

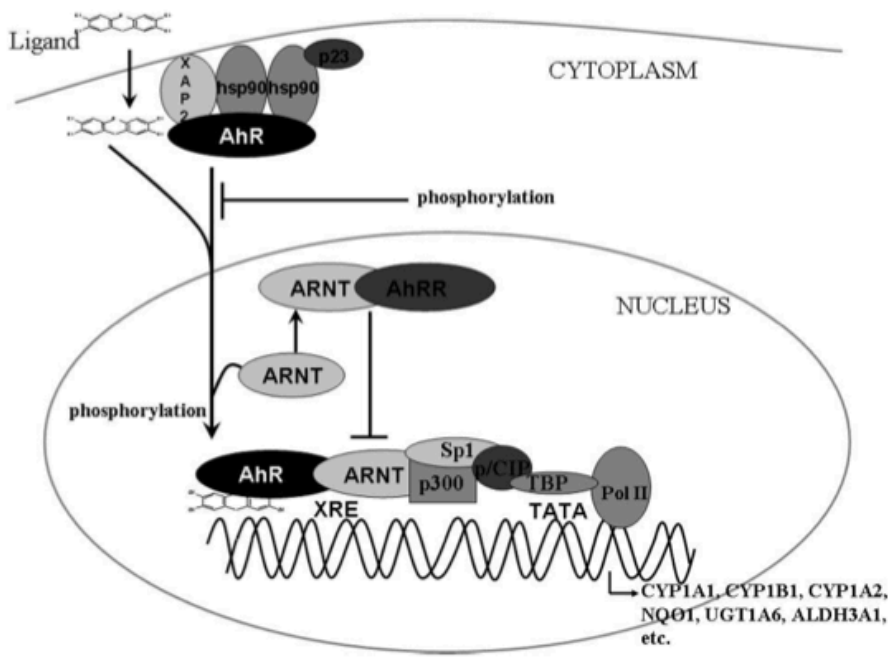


Fig. 3. Mecanismo de inducción de los CYP1 a través de AhR (Androutsopoulos et al., 2009).

Las enzimas de la familia CYP1, se han relacionado principalmente con el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos aromáticos. La subfamilia 1A está involucrada en la bioactivación de compuestos procarcinógenos para generar metabolitos reactivos que pueden formar aductos en el DNA. El ejemplo más conocido es el del Benzo[a]pireno, presente en el humo del cigarro, el cuál es biotransformado principalmente por CYP1A1 (aunque también CYP1A1 y CYP1B1 participan en este proceso) a epóxidos que forman aductos con el DNA y contribuyen a la mutagénesis y a la formación de tumores (Wogan et al., 2004). La enzima CYP1A1 se expresa principalmente en tejidos extrahepáticos, como pulmón, piel, tracto gastrointestinal, tráquea, músculo esquelético, etc. (Bieche et al., 2007). La expresión constitutiva de esta enzima es generalmente baja, pero puede ser altamente inducida con sus propios sustratos, principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, via AhR. Por ejemplo, a nivel de proteína CYP1A1 se encuentra altamente expresado en individuos fumadores comparado con no fumadores (16 contra 6.5 pmol/g de proteína microsomal, respetivamente) (Kim et al., 2004). A pesar de estar fuertemente relacionada con

el metabolismo exógeno, CYP1A1 también es capaz de metabolizar compuestos endógenos. Entre los descritos se encuentran: el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenóico (Schwarz et al., 2004), hormonas 17β - estradiol (Lee et al., 2004) y melatonina (Ma et al., 2005).

Recientemente se han hecho trabajos en los que se observan niveles constitutivos de expresión de CYP1A1 en el desarrollo embrionario de distintos modelos animales. En un trabajo reciente realizado por Gonzalez-Doncel y colaboradores en el 2015, utilizando como modelo al pez medaka (*Oryzias latipes*), se demuestra que la actividad de CYP1 (medida mediante la fluorescencia de un producto de la actividad de esta enzima, la resorufina) varía dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentre, además de que es específica a algunos órganos. En otro trabajo realizado en pez cebra por Otte y colaboradores en el 2010, se detectó actividad de CYP1 desde la etapa de gastrulación, y conforme los tejidos comenzaban a diferenciarse, la actividad se localizó principalmente en tejidos cardiovasculares como corazón, aorta dorsal, vena axial, así como en el tracto urinario y el sistema digestivo. En pez cebra no sólo se ha observado la actividad de CYP1, sino que también se ha medido la expresión de las 4 isoformas de CYP1 que tiene este pez: *CYP1A*, *CYP1B1*, *CYP1C1* y *CYP1C2*; encontrando que cada isoforma tiene un pico máximo de expresión temporal distinto, lo cuál nos indica que estas enzimas podrían tener un papel fisiológico en diferentes momentos del desarrollo (Jönsson et al., 2007, Bräunig et al., 2015). Campbell y colaboradores en el 2005 utilizando una línea transgénica de ratón con un reportero de *lacZ* asociado a un fragmento del promotor de *Cyp1a1* encontraron una expresión constitutiva estadio y órgano específica. Los niveles más intensos de *Cyp1a1*, coinciden con los periodos de diferenciación activa. Por ejemplo, en la organogénesis temprana se pudo localizar una alta expresión en corazón y riñón, la cual disminuía conforme avanzaba el desarrollo. En corazón se encontró una marca en ambos ventrículos, en la aorta y el seno venoso, siendo el ventrículo izquierdo la zona con una mayor marca.

Aunque exista evidencia de la expresión de CYP1A en el desarrollo de vertebrados, poco se sabe sobre cuál podría ser su papel endógeno, además de que la detección de estas enzimas principalmente se ha relacionado con el metabolismo xenobiótico, no prestando atención a su posible rol fisiológico en el

desarrollo. Ya que los CYP1s son monooxigenasas, estos podrían estar involucrados en la síntesis o degradación de algún morfógeno activo. Por lo anterior es importante estudiar más sobre el papel endógeno que juegan los citocromos P450 de la subfamilia CYP1A.

1.6 AHR y su papel en corazón

El receptor AHR, no sólo participa en la inducción de enzimas de fase 1 de metabolismo de xenobióticos, sino que también cumple funciones fisiológicas importantes. Se tiene reportado que ratones knockout de AHR $-/-$ tienen una baja en su peso corporal, un hígado más pequeño, así como defectos en el sistema vascular (Lahvis et al., 2000). El receptor AHR está íntimamente asociado con la morfología y la función cardíaca, ya que ratones knockout de AHR $-/-$ presentan un aumento en peso y tamaño del corazón, así como una disminución en la función cardíaca, es decir, una disminución en la presión, el flujo sanguíneo y la tasa de latidos por min (Vasquez et al., 2003). Se desconoce cuál es el mecanismo mediante el cuál AHR puede regular la función cardiovascular, pero ya se tiene caracterizados algunos marcadores de cardiotoxicidad que pudieran estar involucrados. Los ratones knockout para AHR $-/-$ tienen un aumento en VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), B-MHC (Cadena pesada de miosina beta), ANF (Factor natriurético atrial), ANG II (Angiotensina II) y ET-1 (endotelina 1) (Zhang, 2011b). La expresión de VEGF en el endotelio es indispensable en el desarrollo embrionario para promover la angiogénesis, ya que puede promover la migración, división y diferenciación celular de los cardiomiocitos (Madonna y Caterina, 2009). La isoforma β -MHC se utiliza como un marcador de cardiotoxicidad debido a que en cardiopatías e hipertrofias los niveles de la isoforma β -MHC sobre α -MHC aumentan como un mecanismo de ahorro de energía debido a que β -MHC tiene una menor actividad contráctil, además de que se ha demostrado, con ratones que sólo expresan la isoforma β -MHC, que β -MHC aumenta la sensibilidad a desarrollar una cardiopatía bajo un estrés crónico (Krenz y Robbins, 2004). En ratones knockout de AHR $-/-$ se observa un fenotipo de hipertensión e hipertrofia cardíaca, el cual disminuye al administrar el fármaco Captopril, el cuál es un inhibidor en la síntesis de ANG II (Lund et al., 2003). A

pesar de que ya se tiene descrito cuáles son las moléculas que modulan las cardiopatías en los ratones knockout de AHR, aún se desconoce cuál es el mecanismo molecular mediante el cual son inducidas, y si esta inducción es un efecto directo o indirecto del receptor AHR.

1.7 El pollo como un modelo del desarrollo.

El pollo (*Gallus gallus*) ha sido usado como modelo de biología del desarrollo por más de 100 años. En este modelo se han hecho numerosos aportes, como son: el patrón de desarrollo del eje anteroposterior en las extremidades, la demostración de que el sistema nervioso periférico proviene de la cresta neural, además de que en este modelo se descubrieron los primeros receptores de esteroides, sólo por mencionar algunos ejemplos (Bahr, 2008). Y no sólo eso, sino que el pollo también se utiliza como un buen modelo de toxicología debido a su sensibilidad y a su respuesta rápida a contaminantes ambientales. Las razones por las que nos pareció un buen modelo para estudiar el papel de CYP1A sobre el desarrollo del pollo son:

- El pollo presenta el mismo mecanismo de inducción de los citocromos P450 de la familia 1 (a través del receptor AHR), además de que presenta las 2 isoformas CYP1A4 y CYP1A5, las cuales son ortólogos de CYP1A1 y CYP1A2 de mamíferos, respectivamente.
- Es un modelo clásico para estudios de embriología, por lo que ya se encuentra caracterizado en etapas todo su desarrollo (46 etapas, Hamburger y Hamilton. 1951) , además de que ya se cuenta con su genoma completamente secuenciado.
- Cada huevo (embrión) puede ser tratado directamente a una concentración conocida.
- La ausencia de placenta permite estudiar el efecto directo del compuesto sobre el embrión.
- Los embriones de pollo tienen un costo y un periodo de gestación menor a los modelos mamíferos (Smith et al., 2012).

1.8 CYP1A en pollo

Gilday y colaboradores en 1996 clonaron y secuenciaron dos cDNAs de CYPs provenientes de embriones de pollo, los cuales responden a la inducción por TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), al igual que las enzimas de mamífero CYP1A1 y CYP1A2. Tras analizar la secuencia de aminoácidos de estas dos enzimas con otros CYPs, se encontró una similitud de 53-58% con CYP1A1, y una similitud de 53-61% con CYP1A2. Debido al criterio de clasificación de los CYPs (enzimas con un porcentaje de similitud de 46% o más en la secuencia de aminoácidos pertenecen a la misma familia), estas dos enzimas se incluyeron en la familia CYP1A. Debido a que ya se había descrito un CYP1A3 en algunas especies de trucha, se decidió nombrar a estas enzimas como CYP1A4 y CYP1A5, siendo ortólogas a CYP1A1 y CYP1A2 de mamíferos, respectivamente. A CYP1A4 se le ha detectado una actividad de hidroxilación de hidrocarburos aromáticos, mientras que CYP1A5 realiza epoxigenación del ácido araquidónico (Rifkind et al., 1994). La expresión constitutiva de CYP1A4 y CYP1A5 no ha sido completamente caracterizada durante el desarrollo embrionario del pollo. No obstante existen reportes en donde se detectan niveles constitutivos de expresión de estas dos enzimas, así como también existen reportes de actividad en algunas etapas del desarrollo (Annas et al., 1998; Heinrich-Hirsch et al., 1990; Goeger and Anderson, 1992)

2. ANTECEDENTES

Choudhary y colaboradores en el 2005 encontraron una expresión constitutiva de CYP1A en embriones de ratones en una etapa temprana del desarrollo. Así mismo en otro estudio hecho por Campbell y colaboradores en el 2005, encontraron que el CYP1A se expresa constitutivamente en la organogénesis temprana de ratón. Otro estudio, pero ahora realizado en humanos, demuestra mediante ensayos de actividad, que existe CYP1A funcional durante la organogénesis (Yang et al., 1995). Y esto no sólo está reportado en mamíferos, sino que en embriones de pez cebra (Otte et al., 2010) y pez medaka (González-Doncel et al., 2015) se ha detectado actividad basal mediante el ensayo fluorescencia EROD (ethoxyresorfin O-deethylase) órgano y estadio dependiente.

Ahora, hablando de nuestro modelo, en un estudio realizado en microsomas de embrión de pollo de diferentes etapas, se observó una actividad basal de CYP1A1 mediante la hidroxilación de hidrocarburos aromáticos (Hamilton et al., 1983); además, también se ha detectado una actividad constitutiva etapa dependiente de EROD en microsomas de embrión de pollo (Heinrich-Hirsch et al., 1990). En 1999 Mahajan y Rifkind encontraron niveles constitutivos de mRNA de *CYP1A4* y *CYP1A5* en hígados de pollo de embriones de 17 días de incubación.

En este trabajo también se observó que la expresión de *CYP1A4*, pero no la de *CYP1A5*, puede ser inducida en corazón utilizando al contaminante ambiental TCDD. En otro trabajo del 2000, en embriones de 15 días de incubación, también se encontró una expresión basal de *CYP1A4* y *CYP1A5* en hígado, pero nada de expresión basal para ninguno de los citocromos en corazón, sin embargo al inducir con TCDD se encontraron niveles de *CYP1A4* en corazón mediante hibridación in situ. Esta inducción también se vió reflejada en actividad en corazón, hígado y riñón (Gannon et al., 2000) (Gilday et al., 1996). Esto en conjunto nos sugiere que estas enzimas se expresan y pueden ser inducidas en etapas muy tempranas del desarrollo, incluso antes de la organogénesis, lo que nos indica que más allá del metabolismo de xenobióticos, los CYP1A podrían estar teniendo alguna función endógena.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Datos realizados en distintos modelos animales indican que existe una expresión basal órgano y tiempo dependiente de citocromos P450 pertenecientes a la subfamilia CYP1A, y que estos a su vez se encuentran funcionales, es decir, es posible detectar su actividad mediante ensayos con sustratos específicos para estas enzimas, como son etoxyresorufina, ácido araquidónico y benzo (a) pireno. Debido a que la expresión de los CYPs de la subfamilia 1A es inducible, esto sugiere que la expresión constitutiva de CYP1A en el desarrollo podría estar implicada en algún papel fisiológico, y que a su vez, esta actividad podría tener un impacto en el desarrollo normal. Para demostrar esto, la estrategia a seguir fue la administración de inhibidores conocidos de CYP1A a huevos fértiles de pollo y analizar los posibles efectos en su desarrollo. Los dos inhibidores enzimáticos de CYP1A elegidos fueron: bergamotina (BG), una furanocomurina presente en el jugo de toronja que se ha reportado como un inhibidor competitivo de la actividad de CYP1A1 (Olguín-Reyes et al., 2012); y como control se utilizó a alfa-naftoflavona (NF), un compuesto sintético reportado como un inhibidor clásico de la actividad de CYP1A1 (Yang et al., 2013).

4. HIPÓTESIS

La expresión constitutiva de CYP1A en la embriogénesis del pollo sugiere una función importante durante este proceso. Por lo tanto, su inhibición tendrá un efecto nocivo en el desarrollo normal.

5. OBJETIVOS

- Valorar malformaciones en los órganos internos del embrión de pollo causados por la inhibición del citocromo CYP1A con α -naftoflavona y bergamotina.
- Determinar la expresión de *CYP1A* en embrión de pollo mediante hibridación in situ.

5.1 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de medición de la actividad enzimática de CYP1A en hígado de pollo adulto.
- Caracterizar la inhibición de la actividad hepática de CYP1A por bergamotina y α -naftoflavona.
- Identificar la expresión de *CYP1A* en las diferentes etapas del desarrollo embrionario del pollo.
- Medir actividad enzimática de CYP1A en diferentes etapas del desarrollo embrionario del pollo.
- Caracterizar malformaciones en el embrión de pollo resultantes del tratamiento con bergamotina y α -naftoflavona.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

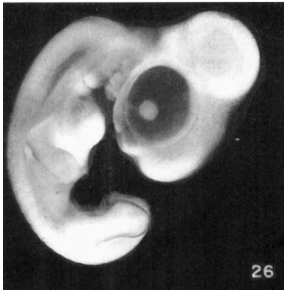
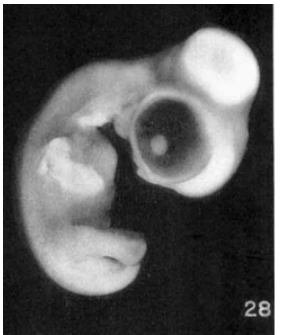
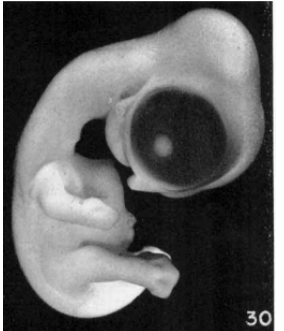

6.1 Preparación de S9 y fracción microsomal

La fracción S9 fue preparada de acuerdo al procedimiento descrito por Maron y Ames (1983). Los hígados fueron obtenidos de una gallina de 8 semanas de edad y lavados con una solución de KCl (0.15M) en una proporción de 3 ml por gramo de hígado. El hígado se homogenizó en la misma solución y se centrifugó a 9000g por 10 min para obtener la fracción S9. El sobrenadante y la fracción S9, se guardaron a -80 °C hasta su uso. Para obtener la fracción microsomal, el S9 fue centrifugado a 100 000g por 60 min; el pellet se resuspendió en un volumen inicial de amortiguador de fosfatos (0.1M, pH 7.4 y 0.25 M de sacarosa), y fue centrifugado a 100 000g por 60 min. El pellet obtenido (fracción microsomal) se resuspendió en amortiguador de fosfatos (0.1M, EDTA 1mM, DTT 0.1 mM y 20% v/v glicerol), y fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

6.2 Tratamiento de embriones de pollo y clasificación.

Antes de ser incubados a 37°C (Día 0) y 50% de humedad, 5 µl del vehículo control (DMSO) o 1 nmol de BG o NF en 5 µl de DMSO fueron inyectados en la yema de huevos de pollo fértiles. Los embriones controles y los tratados con BG o NF fueron colectados en diferentes días (día 5, 6, 7 y 8) y clasificados en la etapa correspondiente de acuerdo con Hamburger y Hamilton, 1951 (Tabla 1). Algunos embriones se fijaron en paraformaldehído 4% por 24 hrs a 4°C; mientras que otros se homogenizaron y se procesaron para obtener la fracción microsomal utilizando el mismo protocolo descrito arriba. La distinción entre corazones normales y deformes se realizó utilizando como base el atlas del desarrollo del pollo (Bellairs y Osmond, 2005), así como un atlas del desarrollo del corazón de pollo (Naieh y Happel, 2013).

Tabla 1. Etapas del desarrollo de pollo utilizadas en este proyecto de acuerdo a la clasificación de Hamburger y Hamilton, 1951.

Días de incubación	Etapa del desarrollo
4-5	<p>HH26</p> 
5-6	<p>HH28</p> 
6-7	<p>HH30</p> 
7-8	<p>HH32</p> 

6.3 Estudios de inhibición de la actividad de CYP1A en microsomas

La actividad de EROD (CYP1A ethoxyresorfin O-deethylase) se midió de acuerdo a Burke y col., 1994. La BG y la NF fueron disueltas en DMSO y se añadieron a la mezcla de incubación para el caso de los microsomas de hígado de pollo adulto. Un volumen igual de DMSO fue también añadido como control. La mezcla de incubación preparada con microsomas de hígado de pollo o de embriones, sustrato (Etoxyresorufina 5 μ M), amortiguador pH 7.6 (50 mM Tris-HCl y 25 mM de $MgCl_2$) y el inhibidor o vehículo fue incubada a 37°C por 3 min. Posteriormente se inició la reacción añadiendo NADPH (0.5mM) y se tomó la lectura de la señal de fluorescencia a 590 nm cada 20 s durante 25 min para el caso de los microsomas de hígado; y cada 2 min durante 1 hr para los microsomas de embrión. Las actividades fueron calculadas a partir de una curva estándar de resorufina (5-500 pmol).

6.4 Histología

Los corazones fijados en paraformaldehído 4% se deshidrataron pasándolos por baños sucesivos de metanol en PBT (25%, 50%, 75% y 100%) de 15 min cada uno. Estos corazones se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente las muestras se colocaron en xilol 2 hrs, después en una mezcla de xilol: parafina 1:1 a 65 °C durante 2 hrs, y finalmente se hicieron 2 baños más de parafina de 1 hr cada uno a 65 C para después incluir las muestras en bloques de parafina. Las muestras incluidas se guardaron a -4 °C hasta su utilización. Posteriormente se realizaron cortes transversales de 20 μ m en un microtomo y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina dejándolas en una plancha a 37°C toda la noche para que los cortes se adhirieran a los portaobjetos. Por último los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina siguiendo el protocolo de Cardiff et al., 2014.

6.5 Hibridación *in situ*

- **Clonación de *CYP1A***

Se tomó un pollo de 8 semanas de edad y se le extrajo el hígado para obtener DNA. El hígado fresco se homogeneizó en amortiguador TRIZOL durante 5 min dejando reposar 5 min. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó durante 15 min. Se dejó reposar por 3 min y se centrifugó 15 min a 10, 000 g a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 500µl de isopropanol. Se dejó reposar 10 min y se centrifugó a 10 000 g por 10 min. Se decantó el isopropanol y se le agregó 700µl de alcohol 70% a la pastilla y se centrifugó a 10 000 g por 5 min. Se hizo un spin final y se decantó el alcohol sobrante y se dejó secar. Se suspendió la pastilla en agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C hasta su utilización. Se realizó una RT-PCR para obtener cDNA, usando el protocolo establecido por la enzima M-MLV-RT (Promega®). Se realizó una PCR para amplificar a *CYP1A*. Los primers utilizados para *CYP1A* fueron: primer sentido, 5'-ACCTCCCCAGCCGCAACATGGA-3' y primer antisentido, 3'-TGGTCGTGCTGTGCGGGATGG-5'. La PCR se hizo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 8 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 61°C por 45 seg y 72°C por 45 seg. Una vez obtenido el producto de PCR se hizo una ligación con pGEM-easy vector System 1 (Promega®). Para confirmar que el fragmento de PCR de interés estuviera en el vector, se realizó una transformación por choque térmico en cepas DH5α quimiocompetentes (Life technologies®) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez transformada, la cepa con el fragmento ligado se seleccionó utilizando X-Gal (Sigma®), siendo las colonias que no presentaban actividad galactosidasa, es decir, las colonias blancas, positivas a la inserción del plásmido con fragmento. Para demostrar que la secuencia insertada al vector sea efectivamente un fragmento del mRNA de interés, se obtuvo una gran cantidad de plásmido utilizando el kit miniprep (qiagen®) siguiendo el protocolo del fabricante y se mandó a hacer una secuenciación didesoxi al Instituto de Fisiología Celular utilizando a la polimerasa T7, debido a que el vector contiene un promotor específico justo antes de la inserción del fragmento.

- **Preparación de la sonda**

A partir del plásmido con el fragmento del mRNA de *CYP1A*, se realizó una transcripción para generar la ribosonda sentido y antisentido utilizando el kit DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (NEB®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para generar la sonda sentido se linearizó el plásmido utilizando la enzima *NcoI* y hizo una transcripción con la RNA polimerasa SP6; para la sonda antisentido se hizo una digestión con la enzima *PstI* y se transcribió utilizando a la RNA polimerasa T7.

- **Procesamiento de los tejidos**

En el primer día se deshidrataron los órganos fijados en paraformaldehído 4% pasándolos por baños sucesivos de metanol en PBT (25%, 50%, 75% y 100%) de 15 min cada uno. Posteriormente se aclaró y permeabilizó el tejido con H₂O₂ 6%/PBT durante 1 hr, y se realizaron 3 lavados de 5 min con PBT. El tejido se incubó en PBT con proteinasa K a una concentración de 60 µg/ml a una temperatura de 20 °C durante 20 min. Inmediatamente se realizó un lavado con PFA 4%+ Glutaraldehído 0.2% durante 20 min a temperatura ambiente seguido por 2 lavados con PBT de 5 min. El tejido se prehibridó con buffer de hibridación (Formamida 50%, 10% Dextran, SSC 5X, tween 0.1%, tRNA 50 µg/ml, heparina 100 µg/ml, Denhardt's 1X, CHAPS 0.1%, EDTA 10 µM) a 65°C durante 3 hrs. Posteriormente se preparó la ribosonda sentido y antisentido a una concentración de 10 µg/ml en buffer de hibridación se desnaturalizaron a 95 °C por 2 min, e inmediatamente se colocó en hielo. El tejido se incubó con la sonda desnaturalizada a 65 °C ON. En el segundo día se realizaron 2 lavados con buffer 1 (Formamida 50%, SSC 4X, SDS 1%) precalentado a 60°C durante 1 hr. En seguida se realizó un lavado con buffer 1 y buffer 2 (NaCl 0.5 M, Tris 10 mM pH 7.4, Tween-20 0.1%) en proporción 1:1 de 10 min a 65°C, seguido por 2 lavados de buffer 2 de 30 min a 65% y posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer 3 (Formamida 50%, SSC 2X) de 30 min a 65 °C. Después se realizaron 3 lavados de 10 min con TBST+Levamisol 2 mM a temperatura ambiente, para posteriormente bloquear 3 hrs con una solución de suero de chivo al 10% en TBST+levamisol 2 mM a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó la muestra con el anticuerpo anti-DIG (Roche) ON a 4°C. En el tercer día, se realizaron 15

lavados de 10 min con TBST+levamisol 2mM, seguido por 2 lavados de 15 min de NTMT+levamisol 1mM. Posteriormente, se expone la muestra al revelador BM purple (Roche®) a temperatura ambiente hasta que la muestra presentó señal. Por último la reacción se detuvo con 2 lavados de NTMT de 15 min y 3 lavados con PBS, y se almacenó en Glicerol/PBS 1:1.

6.6 Estadística

Se realizaron análisis de ANOVA de un factor ($P=0.05$) y una prueba multicomparativa de Tukey para analizar los valores obtenidos de las actividades enzimáticas entre los distintos tratamientos. Para comparar las medidas realizadas en los tejidos se utilizó una prueba de ANOVA de un factor ($p=0.05$). Las diferencias entre las proporciones de los organismos que presentaron un efecto en corazón se analizaron mediante una prueba de X^2 ($p=0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron bajo la plataforma Graphpad Prism 6 ®.

7. RESULTADOS

7.1 Inhibición de la actividad microsomal en hígados de pollo.

Al realizar los ensayos de inhibición enzimática mediante la disminución en la resorufina liberada por los microsomas, se encontró que tanto BG como NF muestran una inhibición de tipo competitiva (Fig. 4 y 5). Los parámetros para BG fueron: $K_m = 0.3713 \pm 0.0277 \mu\text{M}$, $K_i = 32.37 \pm 2.033\text{nM}$ y $V_{\text{max}} = 17.68 \pm 0.4674 \text{ pmol/mg prot/ min}^{-1}$. Mientras que los parámetros para NF fueron $K_m = 0.3062 \pm 0.01874 \mu\text{M}$, $K_i = 101.6 \pm 8.075\text{nM}$ and $V_{\text{max}} = 17.60 \pm 0.3636 \text{ pmol/mg prot/ min}^{-1}$. Estos parámetros indican que BG tiene un efecto inhibitorio más potente sobre la actividad enzimática de microsomas de pollo adulto que NF.

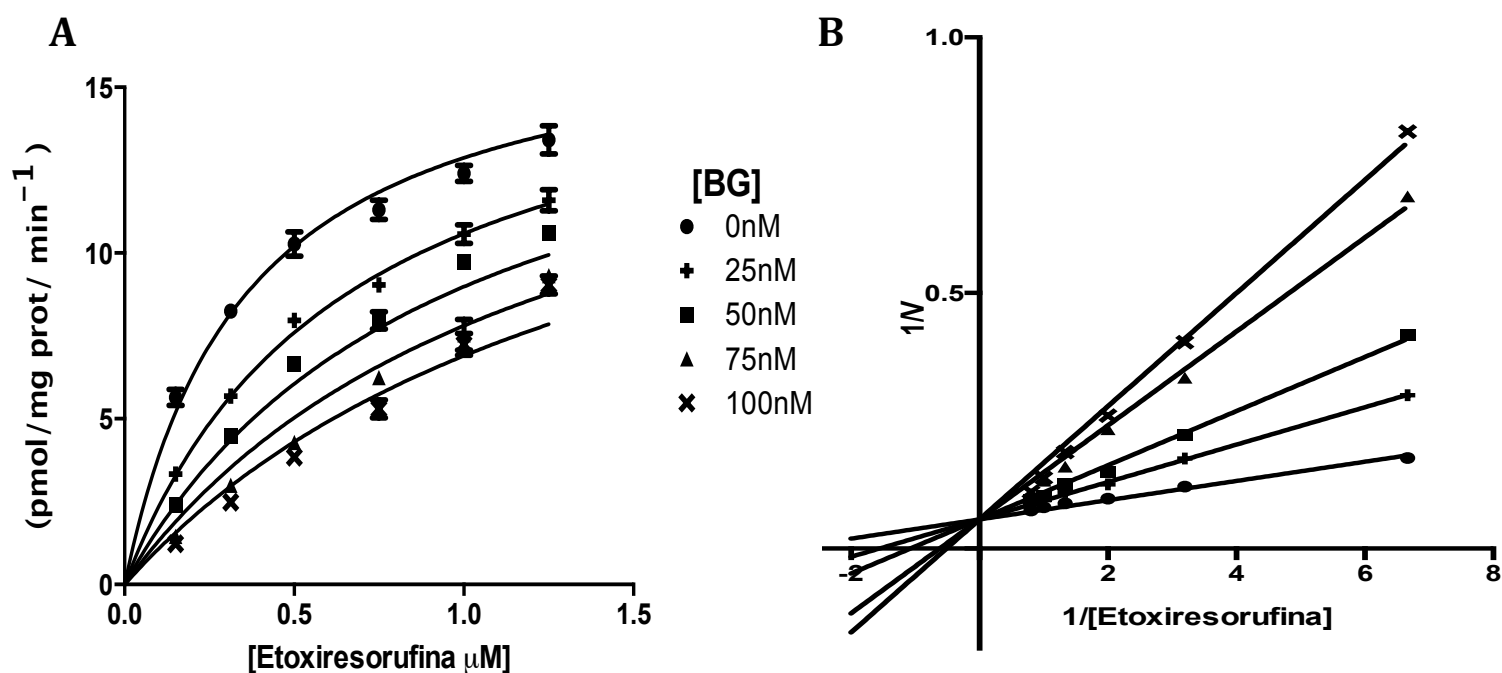


Fig. 4. Gráfico en A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de la inhibición de bergamotina (BG) en microsomas de pollo adulto

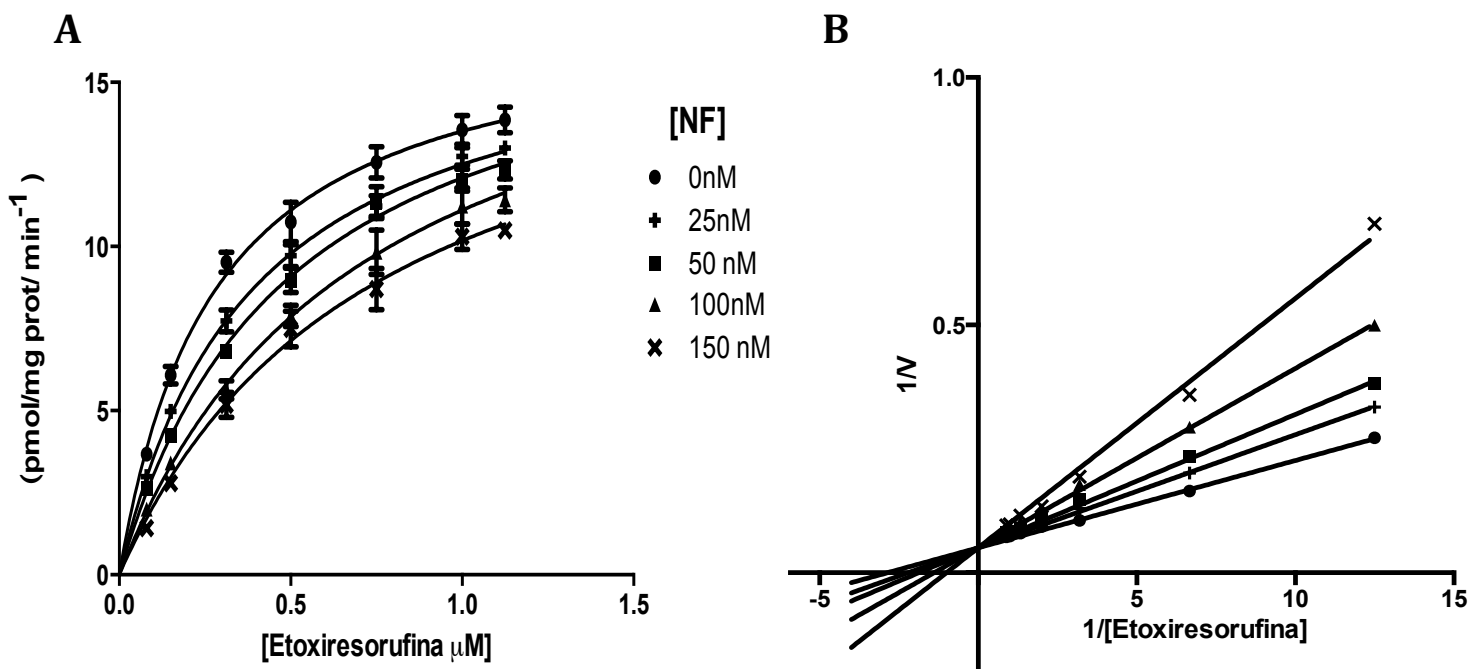


Fig. 5. Gráfico de A) Michaelis-Menten y B) Lineweaver-Burk de la inhibición de α -Naftoflavona (NF) en microsomas de pollo adulto.

7.2 Actividad microsomal en homogenados de embriones de pollo.

Se midió la actividad enzimática de microsomas obtenidos de un homogenado de embriones de etapa HH32 para correlacionar el fenotipo encontrado en corazones con la actividad de CYP1A. En el control se pudo detectar una actividad basal de 1.46 ± 0.47 pmol/mg prot min⁻¹, mientras que en los microsomas provenientes del homogenado de embriones tratados con BG y NF fue de 1.18 ± 0.37 y 1.45 ± 0.35 pmol/mg prot/ min⁻¹, respectivamente (Fig. 6). No se encontraron diferencias significativas entre la actividades obtenidas de los distintos tratamientos (ANOVA de 1 factor $p=0.01$ y prueba multicomparativa de Tukey).

Cuando se realizó el ensayo para detectar la actividad enzimática en los microsomas del homogenado de corazones de los mismos embriones, no se detectó actividad basal en ninguno de los tratamientos, incluyendo al control. Incluso se realizó una lectura por más de 4 hrs, para descartar la posibilidad de que en ese tejido la actividad fuera más lenta, sin embargo no se logró detectar actividad alguna (Datos no mostrados). Debido a que no sabíamos si la inhibición de la actividad observada en la etapa HH32 era consecuencia de una inhibición en

etapas más tempranas, se realizó un experimento en donde se midió la actividad con los diferentes tratamientos a diferentes etapas (Fig. 7). En la primera etapa analizada (HH24) no se pudo detectar actividad basal en ninguno de los grupos experimentales. En la etapa HH26, se detectó una actividad basal en los cuatro grupos, encontrando diferencias significativas entre el grupo tratado con DMSO y el tratado con NF (0.37 ± 0.01 VS 0.08 ± 0.01 pmol/mg prot/ min⁻¹), así como también diferencias entre el grupo tratado con DMSO con el control (0.37 ± 0.01 VS 0.11 ± 0.02 pmol/mg prot/ min⁻¹). En la etapa del desarrollo 30 se detectó una actividad más alta con respecto a la medida en la etapa HH28. En etapa HH30 se encontró una diferencia significativa ($p=0.0001$) entre los embriones tratados con DMSO y NF (1.51 ± 0.02 VS 1.01 ± 0.02 pmol/mg prot/ min⁻¹). En estos resultados se observa una anomalía, la cuál consiste que en las etapas 26 y 30 se observa un aumento significativo en la actividad de los embriones tratados con DMSO con respecto a los que no se les inyectó ningún compuesto (CTRL). En etapa HH28 se observa un comportamiento invertido, en donde la actividad en el grupo DMSO es menor al del grupo CTRL.

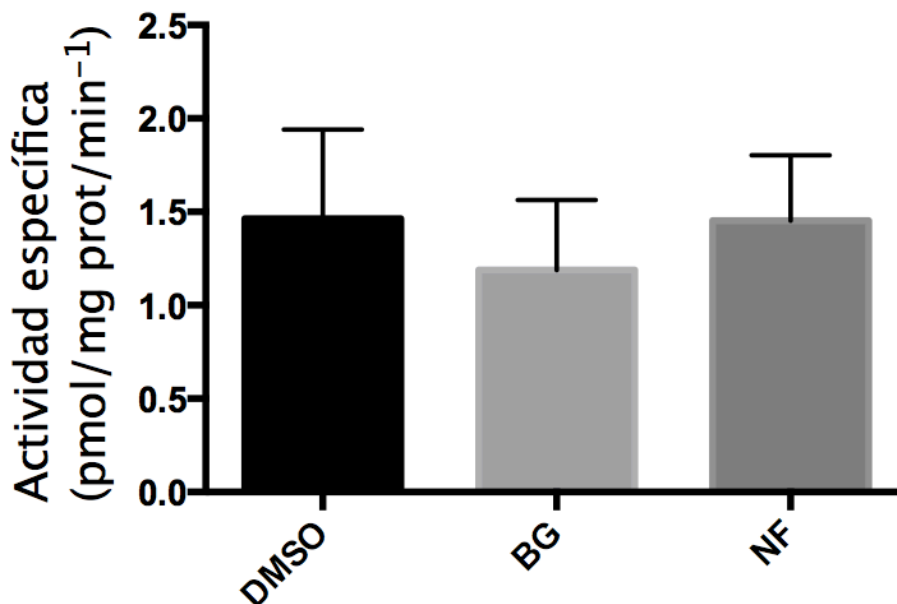


Fig. 6. Actividad enzimática obtenida de microsomas de homogenado de embrión de etapa HH32 tratados con DMSO, Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizando ANOVA de un factor ($p=0.01$).

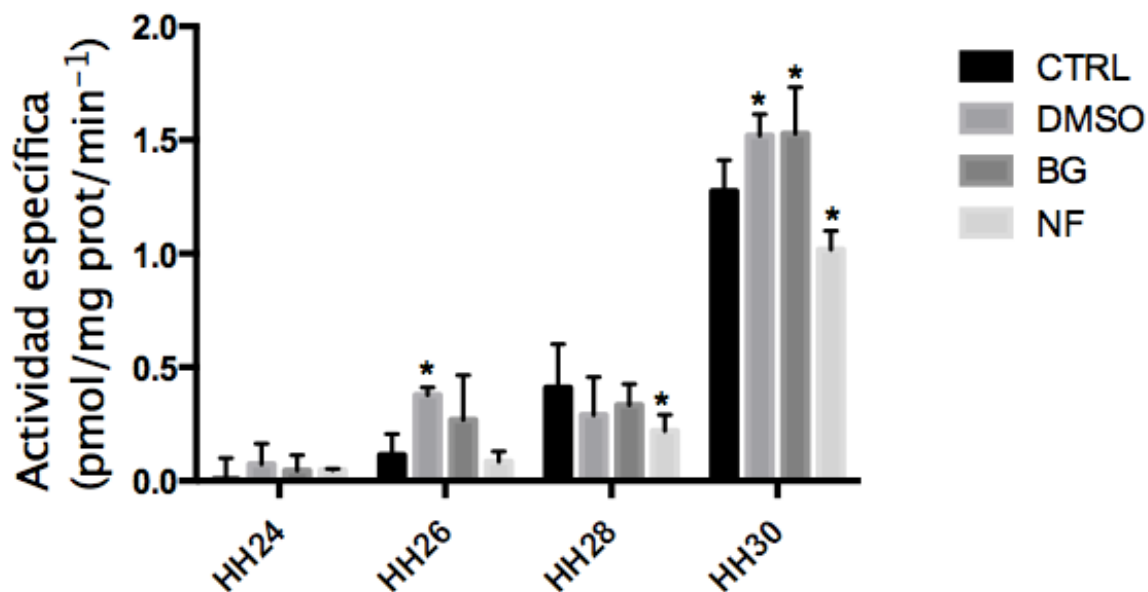


Fig. 7. Actividad enzimática obtenida de microsomas de homogenado de embrión de pollo de diferentes etapas sin tratamiento (CTRL), y tratados con DMSO, Bergamotina (BG) o α -naftoflavona (NF). *Diferencias significativas con respecto a CTRL de cada etapa utilizando ANOVA de un factor ($p=0.01$) y una prueba multicomparativa de Tukey.

7.3 Expresión de *CYP1A* en embriones de HH32

Como un control positivo para las hibridaciones *in situ* se trataron embriones de 7 días de incubación (HH30) con el compuesto β - Naftoflavona (BNF), el cuál ya se ha reportado como inductor de *CYP1A* en embriones de pollo (Nakai et al., 1992) y posteriormente se extrajeron 24 hrs después del tratamiento (HH32). En la figura 8 se observa una fuerte marca en el hígado expuesto a un tratamiento de 24 hrs con BNF, mientras que el hígado que fue tratado con el vehículo DMSO presenta una leve marca sólo en algunas partes del hígado, indicando que *CYP1A* presenta expresión basal en hígado.

Para corroborar que el aumento en la marca en hígado por hibridación *in situ* está dada por un aumento en la expresión de *CYP1A*, se realizó un ensayo de actividad enzimática de microsomas extraídos de los embriones tratados con BNF. En la figura 9 se muestra que, efectivamente, el tratamiento con BNF provocó un aumento en la actividad EROD de más de 15 veces con respecto al tratado con DMSO (22.09 ± 0.1 VS 1.34 ± 0.02 pmol/mg prot/ min⁻¹).

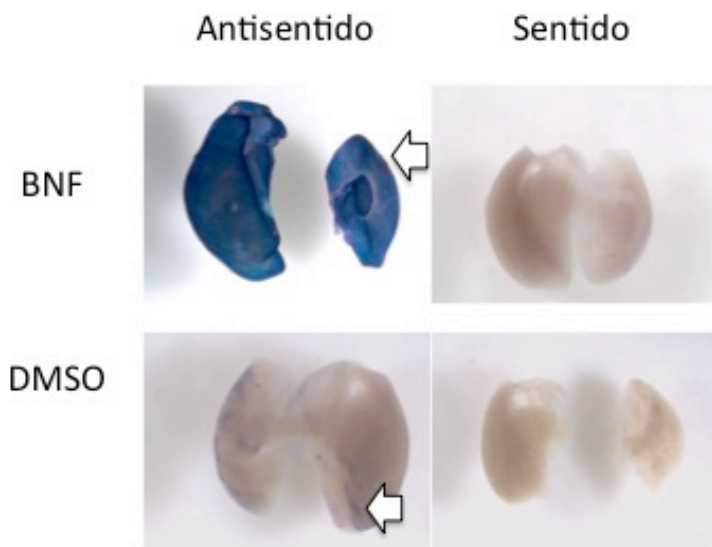


Fig. 8. Hibridación *in situ* de *CYP1A* en hígados de embriones de HH32 tratados con DMSO y β - Naftoflavona (BNF). Se utilizó como control negativo la sonda sentido. Las flechas blancas indican marca en los hígados expuestos a la sonda antisentido.

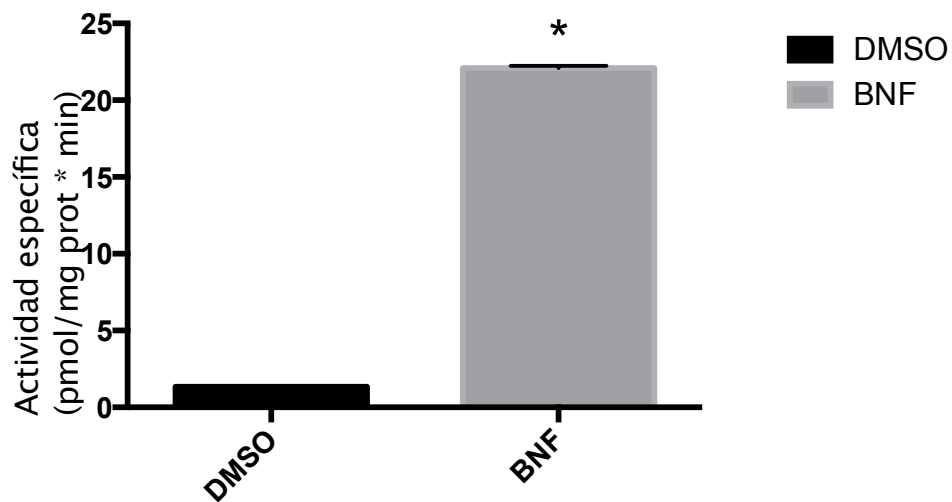


Fig. 9. Actividad enzimática obtenida de microsomas de embrión de pollo de HH32 tratados con DMSO y β - Naftoflavona (BNF). *Diferencias significativas con respecto a DMSO utilizando ANOVA de un factor ($p=0.0001$).

7.4 Expresión de *CYP1A* en diferentes etapas

Como un control negativo se utilizó la sonda sentido en órganos tratados con BNF durante 24hrs (Fig. 10).

Se analizó mediante ISH órganos de embriones tratados con el vehículo (DMSO), BG y NF. No se detectó expresión de *CYP1A* en corazón en ninguna de las etapas analizadas (Fig. 11). No obstante, se encontró una expresión basal de *CYP1A* en hígado, riñón y pulmón (Fig. 12, 13, 14). Cuando se realiza un aumento óptico en hígado y riñón se observa que la marca es específica, siendo en los lóbulos hepáticos y en los túbulos mesonéfricos, respectivamente (Fig. 15). Al ver la expresión basal en los órganos tratados con el control y compararla con los tratamientos, no se observan diferencias en la marca, salvo en los pulmones de etapa HH32, en donde el tratamiento con NF presenta una marca más intensa.

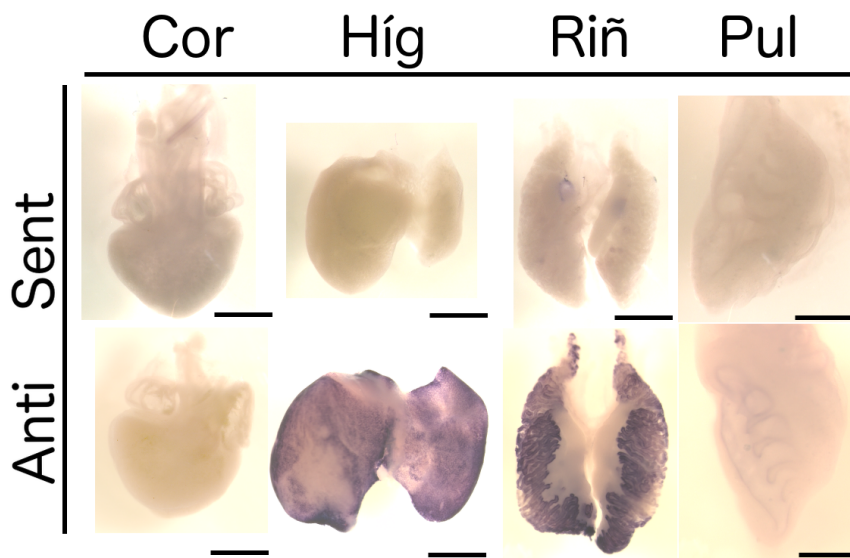


Fig. 10. Hibridaciones *in situ* en corazón (Cor), hígado (Híg), riñón (Riñ) y pulmón (Pul) de embrión de pollo de etapa HH32, tratados con β - Naftoflavona (BNF) utilizando la sonda sentido (sent) y la sonda antisentido (Anti). La línea inferior negra representa 1mm.

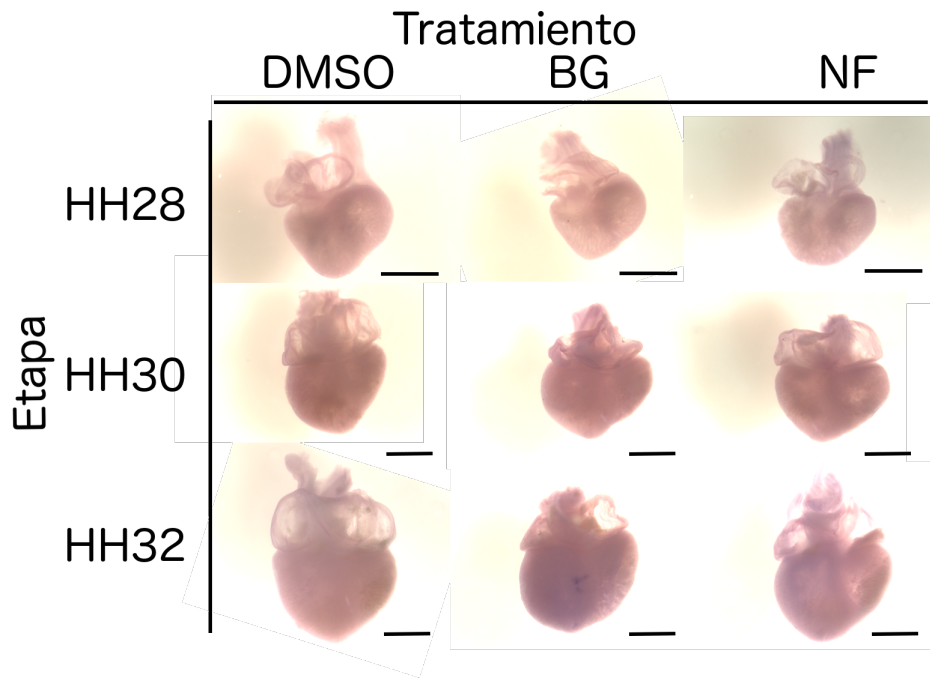


Fig. 11. Hibridaciones *in situ* de corazones de embrión de pollo de etapa HH28, HH30 y HH32 tratados con DMSO, Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF). La línea negra representa 1 mm.

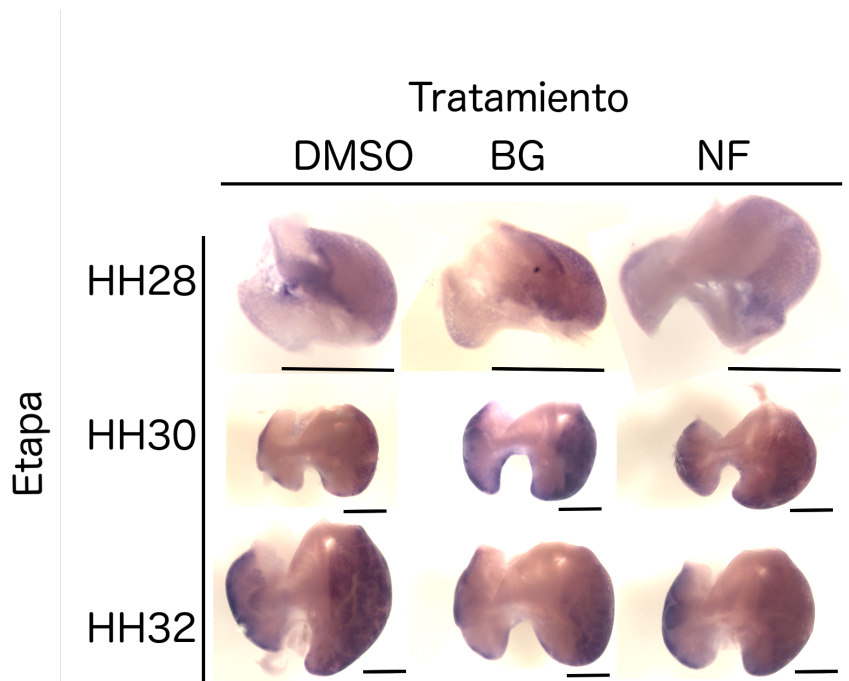


Fig. 12. Hibridaciones *in situ* de hígados de embrión de pollo de etapa HH28, HH30 y HH32 tratados con DMSO, Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF). La línea negra representa 1 mm.

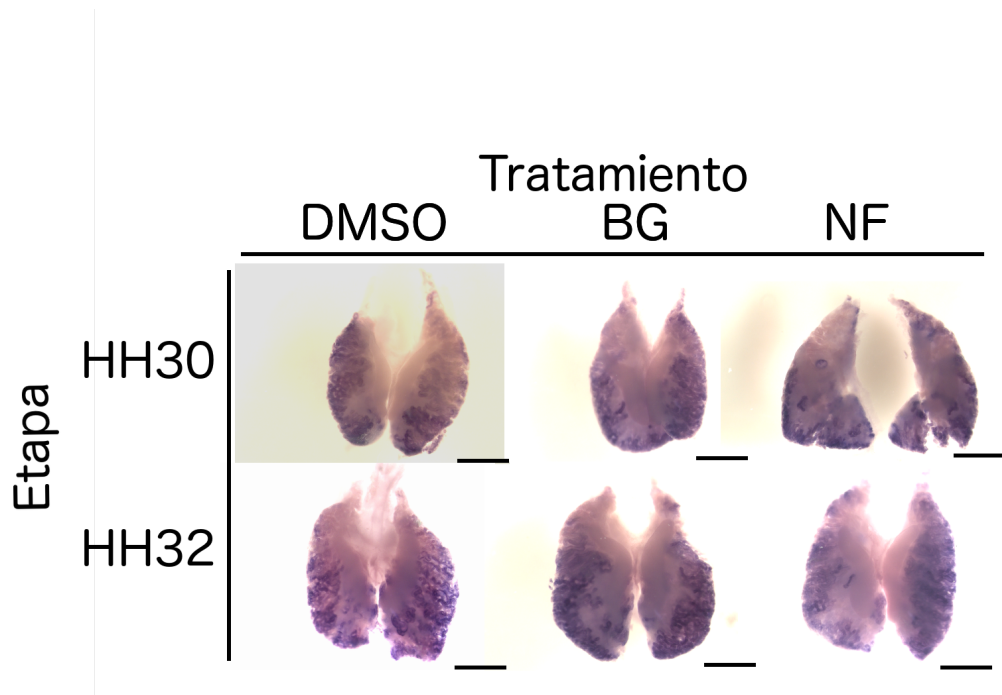


Fig. 13. Hibridaciones *in situ* de riñones de embrión de pollo de etapa HH28, HH30 y HH32 tratados con DMSO, Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF). La línea negra representa 1 mm.

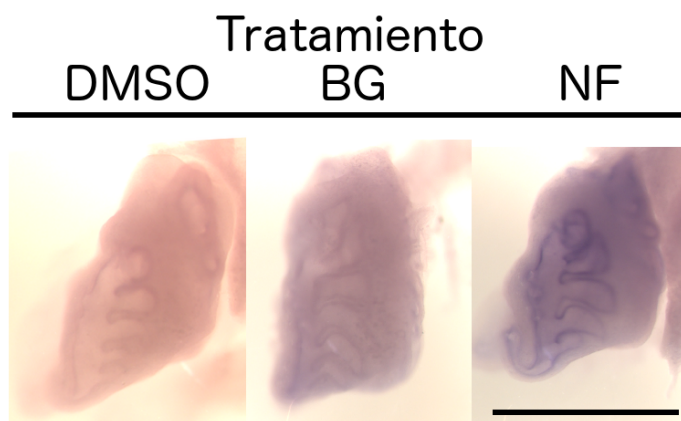


Fig. 14. Hibridaciones *in situ* en pulmones de embrión de pollo de etapa HH32, tratados con DMSO, Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF). La línea inferior negra representa 1mm.

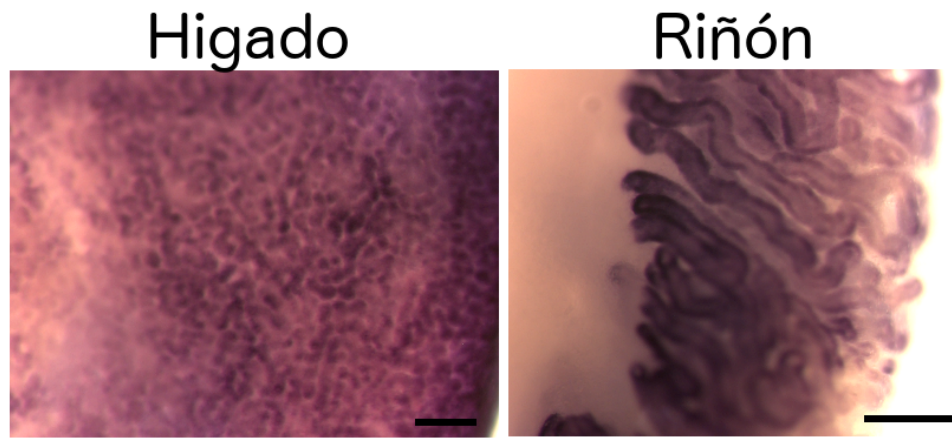


Fig. 15. Acercamiento de hibridaciones *in situ* de hígado y riñón de pollo de etapa HH32 tratados con DMSO. La línea negra representa 100 μ M.

7.5 Efectos de BG y NF en el desarrollo

Se extrajeron embriones de pollo en la etapa HH32 (Día 8) tratados con BG y NF en el día 0. El 47.3% de los embriones tratados con BG (n=36) presentaron alguna deformidad en el corazón, al igual que el 68.4% de los embriones tratados con NF (n=38). Utilizando una prueba de χ^2 se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de corazones con deformidad del grupo tratado con NF contra el grupo tratado con DMSO (n=12) (Fig. 16). También se analizó el resto del embrión, sin embargo no se encontró un fenotipo claro con ninguno de los tratamientos (Datos no mostrados). En los corazones de embriones tratados con BG y NF se observaron distintos fenotipos que se repetían a lo largo de experimentos independientes, por lo que, para su estudio, se agruparon en 4 diferentes categorías (Fig. 17). El fenotipo 0 corresponde a un corazón normal, el fenotipo 1 presenta un corazón más pequeño que el control; el fenotipo 2 muestra un corazón con ambos ventrículos aumentadas y un ápice menos pronunciado; el fenotipo 3 corresponde a un corazón con el ventrículo izquierdo alargado; mientras que el fenotipo 4 presenta un corazón en donde ambos ventrículos se encuentran alargados y el corazón ha perdido su forma original.

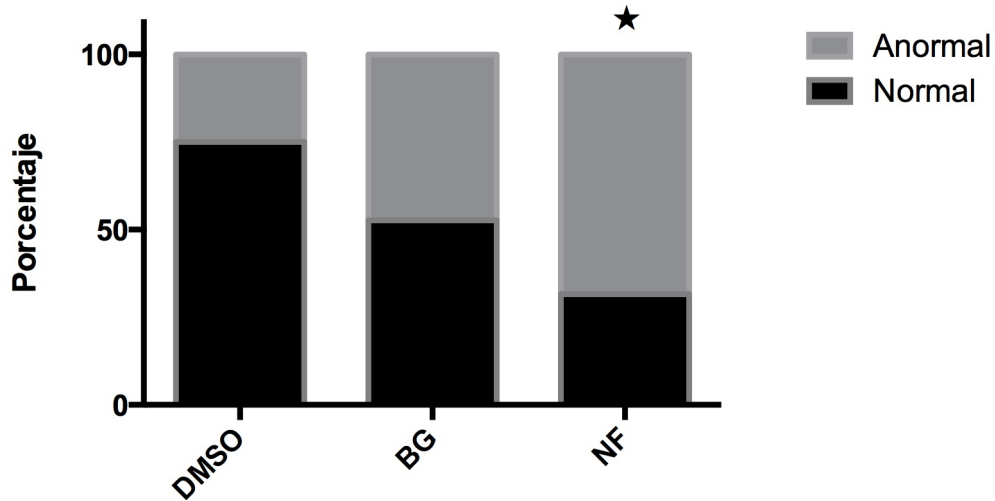


Fig. 16. Porcentajes de corazones normales y anormales de embriones de etapa HH32 tratados con el vehículo DMSO, bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF) (n=12; n=36; n=38; respectivamente). * Diferencias significativas con respecto al vehículo bajo una prueba partida de X^2 ($p= 0.05$); valor calculado $X^2= 7.05$, con respecto al valor de tablas, $X^2= 3.84$.

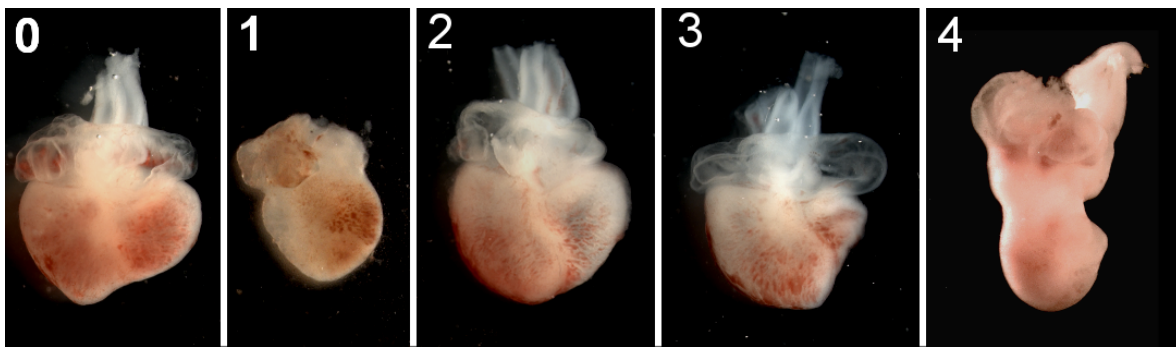


Fig. 17. Fenotipos encontrados en corazones de embriones de pollo HH32 de incubación tratados con Bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF) vistos en un plano dorsal. El 0 corresponde a un corazón con desarrollo normal, mientras que 1-4 muestra corazones con distintas anomalías.

De los fenotipos de corazones encontrados en los embriones tratados con los inhibidores, el que tuvo la mayor frecuencia fue el número 3, con un 41.7% para BG y un 52.5% para NF. El fenotipo 3 corresponde al corazón que presenta un aumento en la ventrículo izquierda. Aunque el efecto en el crecimiento ventricular varió entre los individuos tratados, este efecto fue persistente en 4 experimentos

independientes. Por su parte el fenotipo 4 sólo se presentó en los corazones de embriones tratados con NF con un 19% de incidencia (Fig. 18).

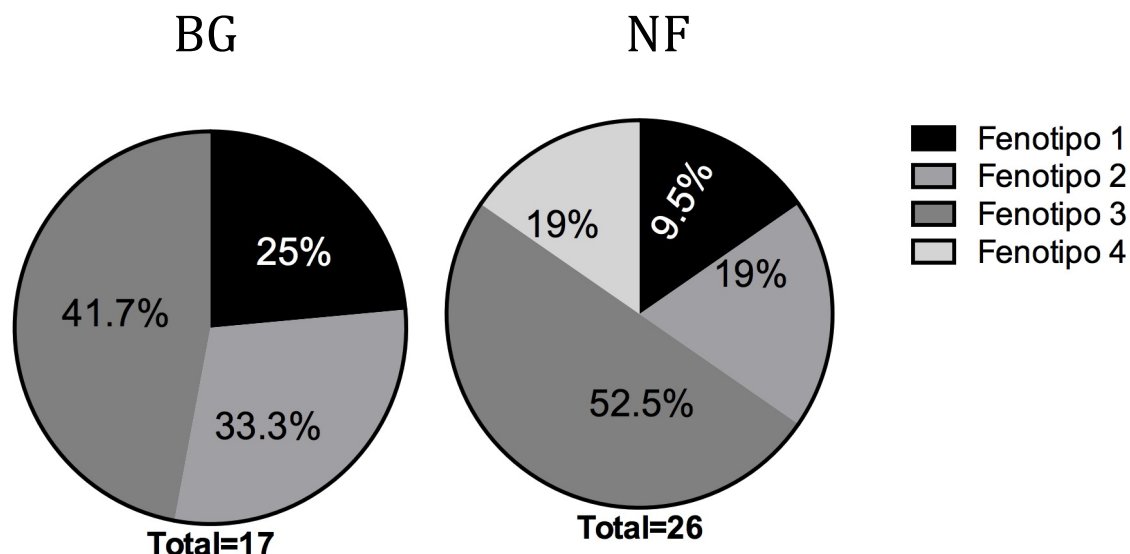


Fig. 18. Porcentajes de los diferentes fenotipos encontrados en los corazones de embriones tratados con bergamotina (BG) y α -naftoflavona (NF).

Para poder determinar el área ventricular de los corazones tratados con BG y NF, se realizaron cortes histológicos de manera transversal. En la figura 19 se muestran 3 cortes histológicos representativos de los diferentes tratamientos. Al momento de comparar los valores de las áreas ventriculares entre los tratamientos, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en las áreas calculadas del ventrículo derecho se observa un ligero aumento tanto para los corazones tratados con BG y NF, aunque este aumento no es significativo (Tabla 2). También se calculó el radio del corazón (Fujisawa et al., 2014) como un parámetro del cambio de la morfología, el cuál se calcula dividiendo el valor máximo del ancho del corazón pasando por el pico del ventrículo izquierdo entre el valor de una línea vertical trazada perpendicularmente hacia el ápice del corazón, por lo que un valor bajo en el radio indicaría un alargamiento ventricular (Tabla 1)(Fig. 20). Se encontraron diferencias significativas entre el ancho de los corazones tratados con BG con respecto al control, al igual que entre los radios de los corazones tratados con BG y NF con respecto a los tratados con DMSO, sugiriendo que los corazones tratados con los inhibidores tienden a tener una forma más alargada.



Fig. 19. Imagen representativa de cortes transversales teñidos con hematoxilina y eosina de corazones tratados con (A) DMSO , (B) BG y (C) NF. Note el aumento en el espacio ventricular. VD, ventrículo derecho; VI, ventrículo izquierdo.

Tabla 2. Valores del largo, ancho y radio de corazones de embriones en etapa HH32 tratados con DMSO BG y NF

Tratamiento	Ancho (mm)	Largo (mm)	Radio	Área ventrículo izquierda (mm ²)	Área ventrículo derecha (mm ²)
DMSO	1.25± 0.13	0.66± 0.09	1.91±0.16	0.20±0.08	0.27±0.1
BG	1.06±0.08*	0.63±0.04	1.67±0.11*	0.25±0.13	0.33±0.13
NF	1.2±0.12	0.71±0.09	1.68±0.09*	0.21±0.08	0.38±0.08

Los valores del área ventricular se obtuvieron a partir de los cortes histológicos de embriones tratados con DMSO(n=6), BG(n=10) y NF(n=10). *Diferencias significativas con respecto al control utilizando ANOVA de un factor (p=0.05).

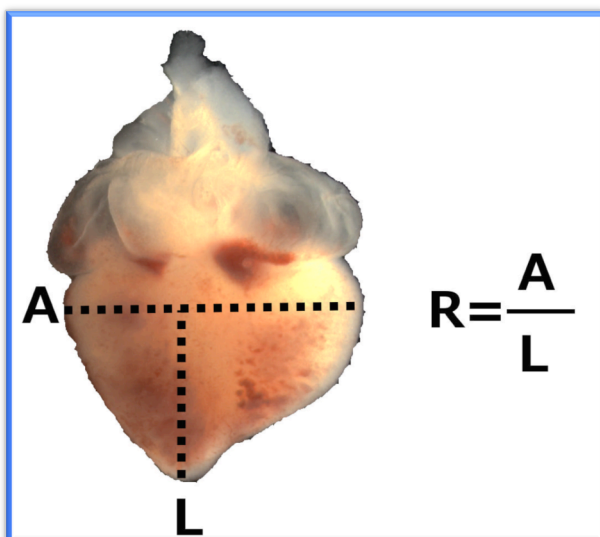


Fig. 20. Esquema de cómo se realizaron las medidas del largo y ancho de los corazones, y la fórmula para calcular el radio. La imagen corresponde a un corazón de embrión HH32 visto en un plano dorsal.

8 DISCUSIÓN

8.1 Efecto de BG y NF sobre la actividad microsomal

Se obtuvieron microsomas provenientes de hígado de un pollo adulto de 8 días y se realizaron los ensayos de actividad enzimática de EROD. Con esto se pudo determinar que BG y NF funcionan como inhibidores competitivos de la actividad de CYP1A. Los inhibidores competitivos se caracterizan por ser compuestos generalmente parecidos al sustrato original de la enzima, que se unen a su sitio catalítico impidiendo la entrada del sustrato y por consiguiente la catálisis. Experimentalmente, se puede demostrar que un inhibidor es de tipo competitivo realizando un gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk (Fig. 4B y 5B), en donde a diferentes concentraciones de inhibidor la intersección de la recta con el eje de las ordenadas, es decir la V_{max} , no presenta cambios, y lo único que cambia es la intersección con el eje de las abscisas (K_m), lo cuál nos indica que a concentraciones altas de sustrato el inhibidor es capaz de desplazar al sustrato del sitio activo de la enzima e inhibir su actividad, sin cambiar la velocidad de reacción. Ya se ha reportado anteriormente que BG se comporta como un inhibidor competitivo de CYP1A1 en rata, con una constante de inhibición (K_i) de 10.703nM (Olguín-Reyes et al., 2012), además de que también puede actuar inhibiendo la actividad de CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9 (Girenavar et al., 2007). Es de esperarse que el CYP1A4 se comporte de manera similar a CYP1A1 de rata, ya que comparte 62% de identidad en su secuencia de aminoácidos, además de que se ha descrito que ambos citocromos son ortólogos y tienen un origen evolutivo en común (Gilday et al., 1996). En este estudio se encontró una K_i de 32.37 ± 2.033 nM, lo cual nos indica que los microsomas de pollo son menos sensibles al efecto inhibitorio de la BG que los microsomas de rata. En cuanto a NF, en trabajos anteriores se ha reportado una K_i de 46.9 ± 19.8 nM en microsomas de embrión de pollo con 19 días de incubación (Goeger y Anderson, 1992) y una K_i de 10nM en microsomas de humano (Bourrie et al., 1996) mientras que en este trabajo se encontró una K_i de 101.6 ± 8.075 nM. Existen reportes hechos en diferentes especies de mamíferos que demuestran que la inducción e inhibición en la actividad de CYPs varía entre especies, siendo las subfamilias de

citocromos 1A, 2C, 2D y 3A las que muestran una mayor variación (Martignoni et al., 2006), por lo que no resulta extraño que existan diferencias entre lo reportado en humano con respecto a lo encontrado en este trabajo. Por otra parte, la diferencia entre la Ki reportada por Goeger y Anderson en 1992 y la encontrada en este trabajo, puede deberse a la metodología utilizada, ya que en este antecedente se utilizó como sustrato una cumarina y HPLC como método de detección; mientras que en el presente trabajo se utilizó etoxyresorufina como sustrato y un espectrofotómetro para medir el producto fluorescente de la reacción.

Ahora, en los microsomas de embriones de pollo de etapa HH32, se encontró una actividad de 1.46 ± 0.47 pmol/mg prot/ min⁻¹ en los controles con DMSO, lo cuál se asemeja a la actividad encontrada por Heinrich-Hirsch et al. en 1990 de 2.51 ± 0.01 pmol/mg prot/ min⁻¹ en homogenados de embriones de 7 días de incubación. Gannon y colaboradores en el 2000 encontraron una actividad basal de homogenados de hígado de pollo de 17 días de incubación de 35 ± 6 pmol/mg prot/ min⁻¹. Se ha descrito que la actividad EROD va cambiando a través del desarrollo y que esta tiende a aumentar en etapas cercanas a la eclosión en embriones de pollo (Heinrich-Hirsch et al., 1990). En los resultados obtenidos en este trabajo se observó una actividad basal a partir de la etapa HH26. Heinrich-Hirsch et al. en 1990 reportó una actividad de < 0.3 pmol/mg prot/ min⁻¹ en homogenados de embriones de pollo de menos de 5 días de incubación, que equivaldrían a este trabajo a embriones menores de etapa HH26, en donde se encontró una actividad similar. En la etapa HH30 se observó un aumento en la actividad basal, lo cuál concuerda con el aumento de la actividad reportado en el día 7 de incubación realizado por Heinrich-Hirsch.

Ahora bien, por el lado de la inhibición, en este trabajo se observó un decremento significativo en la actividad de los microsomas de homogenados de embriones de HH32 tratados con BG, pero no así con los tratados con NF. En la etapa HH26 y HH30 se observa una disminución significativa de la actividad EROD con el tratamiento de NF con respecto a los tratados con DMSO. Como ya se mencionó, se ha reportado actividad EROD en embrión de pez cebra y pez medaka (Otte et al., 2010; Gonzáles-Doncel et al., 2015), así como expresión de CYP1A en embriones de ratón (Choudhary et al., 2005), esto nos sugiere que la expresión

constitutiva de *CYP1A* durante el desarrollo está conservada en diferentes grupos de vertebrados. Sin embargo, no se conoce el papel específico que juega el *CYP1A* durante el desarrollo, pero tanto su actividad como su expresión indican que la enzima es funcional y puede expresarse independientemente de que haya o no algún inductor exógeno, contrario a lo que se tiene reportado de que el *CYP1A1* no tiene expresión constitutiva en etapa adulta. También resulta interesante que a pesar de que los inhibidores se administraron en los huevos antes de ser puestos a incubar, el efecto inhibitorio se ve reflejado aún en las etapas HH26, HH30 y HH32, las cuáles equivaldrían a los días 6, 7 y 8. En etapas anteriores no se logró establecer si existía una inhibición por dos posibles razones: No hay actividad basal en etapas tempranas; o bien, la actividad es tan baja que la técnica utilizada no es lo suficientemente sensible para detectar esta actividad y las posibles diferencias entre los tratamientos.

Por otra parte, no se pudo detectar actividad basal en microsomas preparados a partir de corazones de embrión en HH32 con ninguno de los tratamientos (DMSO, BG y NF) (datos no mostrados). Gannon y colaboradores en el 2000 midieron la actividad EROD en distintos órganos de embrión de pollo de 15 días de incubación, pero sólo encontraron actividad en corazones cuando eran tratados con TCDD. Annas y colaboradores en 1998 encontraron una actividad de corazón basal muy baja (0.04 ± 0.01 pmol/mg prot/ min⁻¹), que al ser inducida con BNF y 3,3,4,4,5-pentaclorobifenil aumentó 200 y 60 veces más, respectivamente. En este trabajo se indujeron embriones de pollo de etapa HH30 durante 24 hrs con BNF y se detectó un aumento de actividad en microsomas obtenidos de homogenados de embriones completos de 16 veces con respecto al control. Junto con esto, se detectó una inducción a nivel de mRNA en hígado mediante hibridación *in situ* lo cuál concuerda con la actividad enzimática aumentada.

8.2 Expresión de *CYP1A* en embriones de pollo

Por medio de hibridaciones *in situ* realizadas en embriones de pollo de diferentes etapas no se encontró una expresión basal en corazón, pero si en hígado, riñón y pulmón. Gannon y colaboradores en el 2000 reportaron en pollo que *CYP1A5* se expresa a niveles basales en los túbulos mesonéfricos del riñón, y no así en los

glomérulos; y que *CYP1A4* se expresa en las mismas zonas pero sólo de manera inducible. Esto concuerda con nuestros resultados en donde se encontró una expresión basal específica de *CYP1A* en los túbulos mesonéfricos. En este mismo antecedente no se logró detectar la expresión basal en hígado de *CYP1A4* y *CYP1A5*. Esto contrasta con nuestros resultados en donde encontramos una expresión basal de *CYP1A* en hígados de etapa HH28, HH30 y HH32. Esta diferencia puede deberse a la etapa en la cuál se realizó el experimento, ya que en el antecedente los embriones pertenecían a la etapa HH41. Esto nos puede sugerir que la expresión de *CYP1A* en hígado de pollo no ocurre durante todo el desarrollo.

En pollo también se ha detectado la presencia de *CYP1A* mediante la actividad basal de microsomas de embrión de pollo (Gannon et al., 2000; Annas et al., 1998; Heinrich-Hirsch et al., 1990; Goeger y Anderson, 1992). En humano, también se ha detectado la presencia de *CYP1A* a través de la medición de la actividad EROD y PCR en tejidos procedentes de hígado de embrión en etapas de organogénesis (50-60 días de gestación) (Yang et al., 1995). Otro trabajo realizado con tejidos de hígado embrionario de rata y humano, encuentran mediante PCR una expresión basal de *CYP1A1* en etapas tempranas específicas (Omiecinski et al., 1990).

En el presente trabajo se encontró que la expresión de *CYP1A* en hígado era específica en la parte central de los lóbulos hepáticos. Ya se ha reportado anteriormente que el patrón espacial de expresión de *CYP1A1* en hígado se da en la zona periférica a la vena central del lóbulo hepático, y no en la periferia donde se encuentra el tejido conectivo y los conductos biliares, haciendo coherencia con el resultado obtenido (Oinonen y Lindros, 1998; Schulthess et al., 2015).

El hecho de que no se haya detectado expresión de *CYP1A* en corazón, sugiere que el fenotipo observado en este trabajo no está dado por un efecto directo. En el 2014, Diani-Moore y colaboradores detectaron metabolitos del ácido araquidónico en corazón de embriones de pollo que eran producidos por el *CYP1A* presente en el hígado. Además de esto, se han encontrado metabolitos del ácido araquidónico productos de citocromos P450 en plasma, y que estos pueden aumentar tras la administración del inductor TCDD (Bui et al., 2012). Debido a que diferentes metabolitos producidos por *CYP1A* pueden viajar a través del torrente sanguíneo, es posible que los fenotipos encontrados en corazones tratados con BG y NF

estén dados por su efecto inhibitorio en otros órganos, que podría tener un impacto sobre los niveles normales de metabolitos endógenos importantes para el sistema cardiovascular.

8.3 Efectos de BG y NF en el corazón

En los embriones tratados con los inhibidores BG y NF se encontraron corazones con un aumento en la longitud del ventrículo derecho. El aumento ventricular se ha descrito como una adaptación fisiológica resultado del aumento en el trabajo ejercido por el corazón. Estos cambios estructurales implican formación de colágeno y fibroblastos, así como un remodelaje del miocardio que desencadena en un incremento del tejido fibroso (Kahan y Bergfeldt, 2005). En la actualidad no existen reportes sobre la cardiotoxicidad que podría ocasionar BG. Por su parte, se ha demostrado que NF puede causar malformaciones y edemas en corazones, además de una disminución en el ritmo cardíaco en embriones de peces teleósteos (Bozinovic, 2013; Mu et al., 2012; Wassenberg & Di Giulio, 2004; Yin et al., 2014).

A pesar de que en este trabajo se detectó un aumento en el área ventricular derecha en los corazones tratados con ambos inhibidores comparado con los tratados con el vehículo, este aumento no fue significativo. En pollo, se ha descrito que el TCDD, un inductor de CYP1A, puede provocar un aumento en el ventrículo izquierdo (Fujisawa et al., 2014; Walker et al., 2000), lo cuál se asemeja al efecto causado por los inhibidores.

Aunque no se detectó expresión basal de *CYP1A* en corazones de diferentes etapas del desarrollo, se tiene reportado que en pacientes humanos sanos *CYP1A1* se expresa sólo en el ventrículo izquierdo, mientras que en pacientes con cardiomiopatía, la expresión también puede ser detectada mediante inmunohistoquímica en el ventrículo derecho, en la aorta pulmonar y en la aurícula derecha (Thum y Borlak, 2000a). En el antecedente anterior no se detectó a *CYP1A2*; sin embargo, Minamiyama y colaboradores en 1999, detectaron la presencia de la enzima mediante inmunohistoquímica en el endocardio, y los vasos coronarios. La expresión de *CYP1A1* también puede ser detectada *in vitro* en cultivos de cardiomiocitos de rata adulta (Thum y Borlak, 2000b).

La expresión de muchas enzimas CYP se ve alterada en enfermedades cardiovasculares, y por lo tanto la producción de metabolitos endógenos también se ve afectada. Se propone que el incremento de *CYP1A5* puede llevar al aumento en el metabolismo del ácido araquidónico a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), o a ácidos monohidroxicosotetraenoicos (HETEs), los cuales están relacionados con cardiotoxicidad (Toraason et al., 1995). También se han relacionado a los EETs con efectos benéficos para el corazón, incrementando el flujo vascular y mejorando la respuesta inflamatoria, mientras que los HETEs están más asociados a hipertensión y a la vasoconstrucción arteriolar (Roman, 2002). En un trabajo hecho por Dunn y colaboradores en el 2005 encontraron que el incremento en EETS en embrión de pollo puede generar hiperemia y sangrados en la membrana corioalantoidea, poniendo en evidencia la importancia sobre el control del metabolismo del ácido araquidónico en el desarrollo embrionario. Es posible que la inhibición del *CYP1A5* ocasionada por BG y NF en este trabajo disminuya la producción de EETs, y por lo tanto provoque un aumento en la presión y el flujo de sangre hacia el embrión, desencadenando un aumento en el tamaño en los ventrículos como un efecto compensatorio. No obstante, los metabolitos del ácido araquidónico pueden no ser los únicos responsables de las hipertrofias cardiacas mediadas por CYPs. Thum y Borlak en el 2002 encontraron que en ratas con hipertrofia cardiaca, el metabolismo de testosterona se encontraba aumentado en comparación con ratas normales, y que este aumento era dependiente de diferentes CYPs, incluyendo a *CYP1A1*.

En contraste, se han reportado líneas de ratones transgénicos knockout para *Cyp1a1* (-/-) que no presentan ningún fenotipo aparente (Dalton et al., 2000), sugiriendo que este citocromo no participa de manera esencial en el desarrollo embrionario. Aún así, esta ausencia de fenotipo se puede explicar por la redundancia que existe entre *CYP1A2* y *CYP1A1* hacia los mismos sustratos, por lo que la pérdida de *CYP1A1* puede ser compensada por la actividad de *CYP1A2*. Contrario a esto, en un trabajo más dirigido hecho por Agbor en el 2012, se determinó que los ratones knockout para *Cyp1a1* presentan hipertensión y una disminución en el ritmo cardiaco comparados con ratones *wild type*. Esto nos habla de la importancia que tiene *CYP1A* sobre el control de la morfofisiología cardiaca, por lo que es posible que los efectos observados en corazón en este

trabajo estén dados por un cambio en el metabolismo normal de los citocromos sobre sus sustratos endógenos durante el desarrollo. Se conoce poco sobre los sustratos endógenos de CYP1A1 como son el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico (Schwarz et al., 2004), hormonas 17β - estradiol (Lee et al., 2004), melatonina (Ma et al., 2005), así como metabolitos derivados de triptófano (Wei et al., 2000). Por otro lado, existen trabajos que demuestran que CYP1A1 es capaz de metabolizar algunos sustratos que a su vez pueden actuar como ligandos del receptor AhR, controlando así su propia expresión y la de otros genes (Wei et al., 2000; Chiaro et al., 2007).

El receptor AHR, al igual que CYP1A, juega un papel importante en la fisiología del corazón. En ratones AhR-null se observa una hipertrofia cardiaca, la cual se le adjudica al aumento de la expresión de *VEGF* y β -*MHC*, ambos marcadores de hipertrofia cardiaca (Thackaberry et al., 2002). En otro trabajo hecho por Lund et al. en el 2003 se determinó que la cardiopatía observada en los ratones *Ahr*-null estaba determinada en parte también por el aumento en plasma de *ANG II* y *ET-1*. La *ANG II* es una hormona que participa en la homeostasis cardiovascular, regulando la contracción de las células del músculo liso, además de que también promueve el crecimiento celular, la diferenciación celular y la síntesis de proteínas, por lo que está asociada con infartos, hipertensión y remodelaje en la anatomía cardiaca (Taubman, 2003). *ET-1* es un péptido vasoconstrictor, que al igual que *ANG II*, se le ha propuesto como un marcador de cardiopatías debido a que puede inducir hipertrofia miocárdial (Miyachi y Masaki, 1999). En otro trabajo realizado por Lund et al. en el 2006 en ratones *AhR*-null se encontró un aumento de marcadores de hipertrofia: β -*MHC*, *ET-1* y *ANF*, además de que también se observó un aumento en tamaño y masa del ventrículo izquierdo. No existen trabajos en pollo en donde se abata por completo la expresión de *AHR* y se observen diferencias en marcadores de hipertrofia cardiaca, sin embargo hay reportes en donde la administración de un agonista de AHR como TCDD conlleva a un aumento en el tamaño del corazón (Walker et al., 1997; Walker y Catron, 2000; Heid et al., 2001). En un trabajo reciente realizado por Fujisawa et al. en el 2014 en embriones de pollo tratados con TCDD se encontró, además del aumento de tamaño en corazón, un aumento en la expresión de *ANF*, así como un aumento en la β -*MHC* y *VEGF*. Esto, en conjunto, sugiere que tanto la inducción, o la falta

de CYP1A, puede llevar a diferentes cardiopatías que, en parte, pueden estar reguladas por metabolitos de CYP1A que puedan modular la homeóstasis cardiovascular, o bien, por el receptor AHR, el cual regula los niveles de algunos factores involucrados en cardiotoxicidad como son *ET-1*, *ANG II*, *VEGF* y *ANF*.

Es por eso que para explicar los efectos de BG y NF se propone el modelo de la figura 21: Existen ligandos endógenos que inducen una expresión basal de CYP1A, el cuál a su vez regula su propia expresión degradando estos ligandos. A la par, el CYP1A metaboliza el ácido araquidónico a EETs, modulando el flujo vascular. Cuando se administran los inhibidores BG y NF, ocurre un menor metabolismo de los ligandos endógenos, provocando una acumulación de ligando endógeno que tiene como consecuencia una activación del receptor AhR, modificando los niveles de moléculas como ANG II, ET-1, ANF y VEGF, las cuales están relacionadas con hipertensión e hipertrofia cardiaca. Debido a que también se ha reportado un aumento en estos marcadores de cardiotoxicidad en ausencia del receptor AHR, es posible que el mecanismo de acción de los inhibidores esté río arriba, es decir, que estos inhibidores estén actuando como antagonistas del receptor, impidiendo la inducción basal de CYP1A, y por lo tanto modificando los niveles de sus metabolitos.

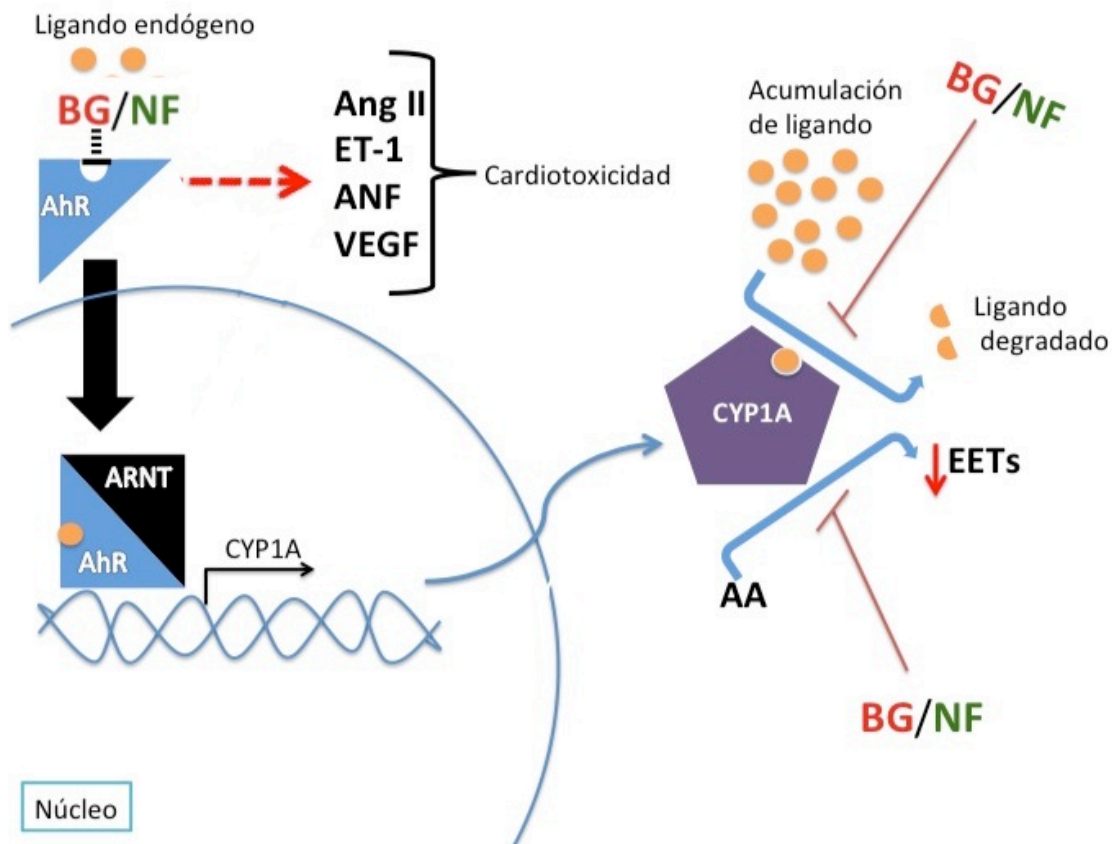


Fig. 21. Esquema del posible mecanismo de inducción de cardiotoxicidad mediada por los inhibidores BG y NF. Las línea punteada señala una inducción de moléculas relacionadas con caridotoxicidad, pero que no se conoce su mecanismo.

9 CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo se tiene como primera conclusión que la furanocumarina BG se comporta como un inhibidor de tipo competitivo para la actividad EROD en microsomas de pollo adulto. La Ki calculada fue al menos tres veces mayor a la calculada en microsomas de rata por Olgúin-Reyes et al. en el 2012.

Existe una actividad EROD basal en el embrión de pollo, y esta va cambiando a través del desarrollo. Debido a que en este trabajo la actividad se realizó utilizando un homogenado de embriones completos, no se tiene claro cuáles son los órganos

que participan más en la actividad y si estos cambios en la actividad pueden estar enmascarados por proteína provenientes de órganos que no presenten CYP1A. En este trabajo se realizaron hibridaciones *in situ* en diferentes órganos del embrión de pollo, detectando expresión en hígado, riñón y pulmón, sugiriendo que la actividad detectada está dada por la proteína expresada en estos órganos. La administración de los inhibidores de CYP1A: BG y NF, provocan fenotipos similares en corazones de embrión de pollo. Los fenotipos de los corazones variaron, pero los más frecuentes se caracterizaron por ser más alargados y tener un aumento en el espacio ventricular derecho. Debido a que no se detectó actividad (ensayos EROD) ni expresión (ISH) en corazones, es probable que el efecto en corazón ocasionado por los inhibidores no es directo, sino que sea una consecuencia de la inhibición de CYP1A en otros órganos.

10 PERSPECTIVAS

No se tiene claro cuál es el mecanismo involucrado en el aumento ventricular causado por los inhibidores usados en este trabajo. Sin embargo, sería interesante medir los niveles de EETs, para ver si estos cambian con el uso de inhibidores. Por otro lado, los niveles de genes marcadores de cardiotoxicidad como *ANG II*, *ET-1*, *ANF* y *VEGF* en ratones knockout de *Ahr*, así como en pollos tratados con inductores como el TCDD, sugieren que estos podrían estar involucrados en nuestro fenómeno por lo que sería interesante medir su expresión bajo los tratamientos de BG y NF. También sería interesante identificar la expresión de *CYP1A* en los diferentes órganos con un método más sensible, como una Q-PCR, a través de las diferentes etapas.

La falta de actividad en etapas tempranas deja como interrogante que si el efecto en el corazón es producto de la inhibición en etapas tempranas en donde la actividad es tan baja que no se puede detectar, o bien, si es consecuencia de la inhibición en los puntos máximos de actividad que se analizaron, por lo que sería interesante ver si los fenotipos se mantienen aplicando los inhibidores justo antes de la etapa HH30, que es donde ocurre un aumento importante en la actividad.

11 BIBLIOGRAFÍA

Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. a. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9, 187.

Agbor LN, Walsh MT, Boberg JR, Walker MK. (2012). Elevated blood pressure in cytochrome P4501A1 knockout mice is associated with reduced vasodilation to omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 264: 351–360.

Annas A, Brunström B, Brandt I, Brittebo EB. (1998). Induction of ethoxyresoruEne O-deethylase (EROD) and endothelial activation of the heterocyclic amine Trp-P-1 in bird embryo hearts. *Arch Toxicol*. 72: 402±410

Badala S & Delgoda R. (2014). Role of the modulation of CYP1A1 expression and activity in chemoprevention. *J. Appl. Toxicol.*34: 743–753

Bahr JM. (2008). The Chicken as a Model Organism. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. 2008, pp 161-167.

Bellairs, R., & Osmond, M. (2005). *Atlas of chick development*. Academic Press,

Bieche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., ... & Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP) 1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(9), 731-742.

Bourrié, M., Meunier, V., Berger, Y., & Fabre, G. (1996). Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(1), 321-332.

Bozinovic, G., Sit, T. L., Di Giulio, R., Wills, L. F., & Oleksiak, M. F. (2013). Genomic and physiological responses to strong selective pressure during late organogenesis: few gene expression changes found despite striking morphological differences. *BMC genomics*, 14(1), 779.

Bräunig J, Schiwy S, Broedel O, Müller Y, Frohme M, Hollert H, Keiter SH. (2015). Time-dependent expression and activity of cytochrome P450 1s in early life-stages of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Pollut Res*

Bucheli TB & Fent K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environm. Sci. Technol.*, 25, 201-268.

Bui P, Solaimani P, Wu X, and Hankinson O. (2012). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment alters eicosanoid levels in several organs of the mouse in an aryl hydrocarbon receptor-dependent fashion. *Toxicol Appl Pharmacol* 259:143–151.

Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R., & Mayers, R. T. (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical pharmacology*, 48(5), 923-936.

Buters, J. T., Sakai, S., Richter, T., Pineau, T., Alexander, D. L., Savas, U., ... & Gonzalez, F. J. (1999). Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5), 1977-1982.

Campbell SJ, Henderson SJ, Anthony DC, Davidson D, Clark AJ, Wolf CR. (2005). The Murine Cyp1a1 Gene Is Expressed in a Restricted Spatial and Temporal Pattern during Embryonic Development. *Vol. 280, No. 7, pp. 5828–5835.*

Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(6), pdb-prot073411.

Chiaro CR, Patel RD, Marcus CB, Perdew GH. (2007). Evidence for an Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Cytochrome P450 Autoregulatory Pathway. *Mol Pharmacol* 72:1369–1379.

Choudhary, D., Jansson, I., Stoilov, I., Sarfarazi, M., & Schenkman, J. B. (2005). Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1–4) during development and in different adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(1), 50-61.

Chaudhary KR, Batchu SN, Seubert JM. (2009). Cytochrome P450 Enzymes and the Heart *IUBMB Life*, 61(10): 954–960.

Chow HH, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, Perloff M, Crowell JA, Alberts D. (2010). Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res.* 3:1168–1175.

Coon, M. J., Ding, X. X., Pernecky, S. J., & Vaz, A. D. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *The FASEB journal*, 6(2), 669-673.

Cotreau MM, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. (2005). The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates. *Clin Pharmacokinet* 44, 33–60.

Cunningham TJ & Duyster G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16 110–123.

Dalton TP, Dieter MZ, Matlib RS, Childs NL, Shertzer HG, Genter MB, and Nebert DW (2000) Targeted knockout of Cyp1a1 gene does not alter hepatic constitutive expression of other genes in the mouse [Ah] battery. *Biochem Biophys Res Commun* 267:184–189.

Diani-Moore, S., Ma, Y., Gross, S. S., & Rifkind, A. B. (2014). Increases in levels of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids (EETs and DHETs) in liver and heart in vivo by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD) and in hepatic EET:DHET ratios by cotreatment with TCDD and the soluble epoxide hydrolase. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(2), 294–300.

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*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43(1), 149-173.

Dunn, L. K., Gruenloh, S. K., Dunn, B. E., Reddy, D. S., Falck, J. R., Jacobs, E. R., & Medhora, M. (2005). Chick chorioallantoic membrane as an in vivo model to study vasoreactivity: Characterization of development - dependent hyperemia induced by epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 285(2), 771-780.

Farrell, G. (1998). Effects of disease on expression and regulation of CYPs. *Molecular aspects of medicine*, 20(1-2), 55-70.

Fujisawa, N., Nakayama, S. M., Ikenaka, Y., & Ishizuka, M. (2014). TCDD-induced chick cardiotoxicity is abolished by a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398. *Archives of toxicology*, 88(9), 1739-1748.

Gannon, M., Gilday, D., & Rifkind, a B. (2000). TCDD induces CYP1A4 and CYP1A5 in chick liver and kidney and only CYP1A4, an enzyme lacking arachidonic acid epoxygenase activity, in myocardium and vascular endothelium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(1), 24–37.

Goeger DE & Anderson KE. (1992). Biochemical characterization of coumarin 7-hydroxylase activity in chick embryo liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 43(2):363-9.

González-Doncel, M., Carbonell, G., San Segundo, L., Sastre, S., Beltrán, E. M., & Fernández-Torija, C. (2015). Stage-dependent ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in vivo activity in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Chemosphere*, 135, 108-115.

Gilday, D., Gannon, M., Yutzey, K., Bader, D., and Rifkind, A. B. (1996). Molecular cloning and expression of two novel avian cytochrome P450 1A enzymes induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Biol. Chem.* 271, 33054–33059.

Girenavar, B., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2007). Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. *Journal of food science*, 72(8), C417-C421.

Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, 14(6), 611-650.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 1992;195:231–72. [32]

Hamilton JW, Denison MS, Bloom SE. (1983). Developmental Biology Development of basal and induced aryl hydrocarbon embryo in ovo (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity in the chicken. *Proc. NatL Acad. Sci. USA* Vol. 80, pp. 3372-3376.

Heid, S. E., Walker, M. K., & Swanson, H. I. (2001). Correlation of cardiotoxicity mediated by halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicological Sciences*, 61(1), 187-196.

Heinrich-Hirsch B, Hofmann D, Webb J, Neubert D. (1990). Activity of aldrin epoxidase, 7-ethoxycoumarin-O-deethylase and 7-ethoxyresorufin-O-deethylase during the development of chick embryos in ovo. *Arch Toxicol* 64:128–134.

Jönsson ME, Orrego R, Woodin BR, Goldstone JV, Stegeman JJ (2007) Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:29–41

Kahan T & Bergfeldt L. (2005). Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. *Heart* 91:250–256.

Kim, J. H., Sherman, M. E., Curriero, F. C., Guengerich, F. P., Strickland, P. T., & Sutter, T. R. (2004). Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicology and applied pharmacology*, 199(3), 210-219.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 75(2), 376-386.

Krenz M & Robbins R. (2004). Impact of Beta-Myosin Heavy Chain Expression on Cardiac Function During Stress. *Journal of the American College of Cardiology*. (44):12

Lahvis, G.P., Lindell, S.L., Thomas, R.S., McCuskey, R.S., Murphy, C., Glover, E., Bentz M, Southard J, Bradfield CA. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in arylhydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10442-10447.

Lee, A. J., Sowell, J. W., Cotham, W. E., & Zhu, B. T. (2004). Chemical synthesis of two novel diaryl ether dimers of estradiol-17 β . *Steroids*, 69(1), 61-65.

Libby, R. T., Smith, R. S., Savinova, O. V., Zabaleta, A., Martin, J. E., Gonzalez, F. J., & John, S. W. (2003). Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science*, 299(5612), 1578-1581.

Lund AK, Goens MB, Nuñez BA, Walker MK. (2006). Characterizing the role of endothelin-1 in the progression of cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor (AhR) null mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 127 – 135.

Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, Walker MK. (2003). Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1;193(2):177-87.

Lund, A.K., Goens, M.B., Kanagy, N.L., Walker, M.K., 2003. Cardiac hypertrophy in Aryl hydrocarbon null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1 and mean arterial blood pressure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193, 177 – 187.

Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. (2005). Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug metabolism and disposition*, 33(4), 489-494.

Madonna R & Caterina RD. (2009). VEGF receptor switching in heart development and disease. *Cardiovascular Research* 84: 4-6.

Mahajan SS & Rifkind AB. (1999). Transcriptional Activation of Avian CYP1A4 and CYP1A5 by 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Differences in Gene Expression and Regulation Compared to Mammalian CYP1A1 and CYP1A2. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 155, 96–106.

Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3), 173-215.

Martignoni M , Groothuis GM & Kanter R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2(8): 75-894.

McFadyen, M. C., Breeman, S., Payne, S., Stirk, C., Miller, I. D., Melvin, W. T., & Murray, G. I. (1999). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(11), 1457-1464.

Miksys, S., Hoffmann, E., & Tyndale, R. F. (2000). Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment. *Biochemical pharmacology*, 59(12), 1501-1511.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y., et al. (1999). Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett* 3, 165!169.

- Miyauchi & Masaki, (1999). Pathophysiology Of Endothelin In The Cardiovascular System. *Annu. Rev. Physiol.* 61:391–415.
- Mu J, Wang X, Jin F, Wang J, Hong H. (2012). The role of cytochrome P4501A activity inhibition in three- to five-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons embryotoxicity of marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Marine Pollution Bulletin.* 64: 1445–1451.
- Munro, A. W., Girvan, H. M., & McLean, K. J. (2007). Variations on a (t) heme—novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural product reports*, 24(3), 585-609.
- Naieb A, Happel C, Yelbuz,T. (2013). A detailed atlas of chick heart development in vivo. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 195(4), 324-341.
- Nakai K, Wards AM, Gannons M, Rifkind AB. (1992). 6-Naphthoflavone Induction of a Cytochrome P-450 Arachidonic Acid Epoxygenase in Chick Embryo Liver Distinct from the Aryl Hydrocarbon Hydroxylase and from Phenobarbital-induced Arachidonate Epoxygenase. *The JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 267: (27) 19503-19512.
- Nebert, D. W., & Gonzalez, F. J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual review of biochemistry*, 56(1), 945-993.
- Nobuo, S. (1994). Cytochrome P450 changes in rats with streptozocin-induced diabetes. *International journal of biochemistry*, 26(10), 1261-1268.
- Ogishima, T., Mitani, F., & Ishimura, Y. (1989). Isolation of aldosterone synthase cytochrome P-450 from zona glomerulosa mitochondria of rat adrenal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 264(19), 10935-10938.
- Ogu CC & Maxa, RJ. (2000). Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent).*13(4): 421–423.
- Olguín-Reyes S, Camacho-Carranza R, Hernández-Ojeda S, Elinos-Baez M, Espinosa-Aguirre JJ.(2012). Bergamottin is a competitive inhibitor of CYP1A1 and is antimutagenic in the Ames test.*Food Chem Toxicol.* 2012 Sep; 50(9):3094-9.
- Omiecinski CJ, Redlich CA and Costa P. (1990). Induction and developmental expression of cytochrome P4501A1 messenger RNA in rat and human tissue: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 50: 4315- 4321
- Omura, T. 1999. Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266, 690–698.
- Omura, T., & Morohashi, K. I. (1995). Gene regulation of steroidogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 53(1), 19-25.

- Oinonen T. & Lindros O. K. (1998). Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J.* 329: 17–35.
- Otte, J. C., Schmidt, A. D., Hollert, H., & Braunbeck, T. (2010). Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 100(1), 38–50. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.006>
- Otto DME, Henderson CJ, Carrie D, Davey M, Gundersen TE, Blomhoff R, Adams RH, Tickle C, Wolf CR. (2003). Identification of novel roles of the cytochrome P450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6103-6116.
- Preissner, S. C., Hoffmann, M. F., Preissner, R., Dunkel, M., Gewiess, A., & Preissner, S. (2013). Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PloS one*, 8(12), e82562.
- Rahman, M., Wright, J. T., & Douglas, J. G. (1997). The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *American journal of hypertension*, 10(3), 356-365.
- Rifkind, A. B., Kanetoshi, A., Orlinick, J., Capdevila, J. H., & Lee, C. (1994). Purification and biochemical characterization of two major cytochrome P-450 isoforms induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chick embryo liver. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3387-3396.
- Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological reviews*, 82(1), 131-185.
- Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, Rossant J, Hamada H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.* 15(2):213-25.
- Sakaki, T., Sawada, N., Nonaka, Y., Ohyama, Y., & Inouye, K. (1999). Metabolic studies using recombinant *Escherichia coli* cells producing rat mitochondrial CYP24. *European journal of biochemistry*, 262(1), 43-48.
- Schulthess P, Löffler A, Vetter S, Kreft L, Schwarz M, Braeuning A, Blüthgen N. (2015). Signal integration by the CYP1A1 promoter — a quantitative study. *Nucleic Acids Research*, 43(11): 5318–5330.
- Schwarz, D., Kisselev, P., Ericksen, S. S., Szklarz, G. D., Chernogolov, A., Honeck, H., ... & Roots, I. (2004). Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17 (R), 18 (S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochemical pharmacology*, 67(8), 1445-1457.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., & Guengerich, F. P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes

- of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(1), 414-423.
- Smith SM, Flentke GR, Garic A. (2012). Avian Models in Teratology and Developmental Toxicology. *Developmental Toxicology. Methods in Molecular Biology* Volume 889, 2012, pp 85-103
- Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. (1997). Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet*. 6(4):641-7.
- Stoilov I, Jansson I, Sarfarazi M, Schenkman JB. (2001). Roles of cytochrome P450 in development. *Drug Metabol Drug Interact*. 18(1):33-55.
- Taubman MB. (2003). Angiotensin II A Vasoactive Hormone With Ever-Increasing Biological Roles. *Circulation Research*. 92: 9-11
- Thackaberry, E.A., Gabaldon, D.M., Walker, M.K., Smith, S.M., (2002). Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc. Toxicol*. 2, 263–274.
- Thum, T., & Borlak, J. (2000a). Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* 9208, 979!983.
- Thum, T., & Borlak, J. (2000b). Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol* 8, 1745!1752.
- Thum, T., & Borlak, J. (2002). Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J*. 12:1537-1549.
- Toraason, M., Wey, H., Woolery, M., Plews, P., & Hoffmann, P. (1995). Arachidonic acid supplementation enhances hydrogen peroxide induced oxidative injury of neonatal rat cardiac myocytes. *Cardiovascular research*, 29(5), 624-628.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Kyo, S., Kanaya, T., Inoue, M., & Yokoi, T. (2004). Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Research*, 64(9), 3119-3125.
- Vasquez A, Atallah-Yunes N, Smith FC, You X, Chase SE, Silverstone AE, Vikstrom KL. (2003). A Role for the Aryl Hydrocarbon Receptor in Cardiac Physiology and Function as Demonstrated by AhR Knockout Mice. *Cardiovascular Toxicology*. 03 153–163.
- Walker, M. K., Pollenz, R. S., & Smith, S. M. (1997). Expression of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator during chick

cardiogenesis is consistent with 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced heart defects. *Toxicology and applied pharmacology*, 143(2), 407-419.

Walker, M. K., & Catron, T. F. (2000). Characterization of cardiotoxicity induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related chemicals during early chick embryo development. *Toxicology and applied pharmacology*, 167(3), 210-221.

Wassenberg, D. M., & Di Giulio, R. T. (2004). Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environmental health perspectives*, 1658-1664.

Waterman, M. R. (1994). Biochemical diversity of cAMP-dependent transcription of steroid hydroxylase genes in the adrenal cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 27783-27783.

Wei Y., Bergander L., Rannug U., Rannug A. (2000). Regulation of CYP1A1 Transcription via the Metabolism of the Tryptophan-Derived 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 383(1): 99–107.

White, J. A., Guo, Y. D., Baetz, K., Beckett-Jones, B., Bonasoro, J., Hsu, K. E., ... & Petkovich, M. (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), 29922-29927.

Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004, December). Environmental and chemical carcinogenesis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 14, No. 6, pp. 473-486). Academic Press.

Yang, H-YL, Namkung MJ, Juchau MR. (1995). Expression of functional cytochrome P4501A1 in human embryonic hepatic tissues during organogenesis. *Biochem Pharmacol* 49:717–726.

Yang J, An J, Li M, Hou X, Qiu X. (2013). Characterization of chicken cytochrome P450 1A4 and 1A5: inter-paralog comparisons of substrate preference and inhibitor selectivity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2013 May; 157(4):337-43.

Yang X, Zhang B, Molony C, Chudin E, Hao K, Zhu J. (2010). Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res* 2010, 1020–1036.

Yin J, Yang J, Zhang F, Miao P, Lin Y, Chen M. (2014). Individual and joint toxic effects of cadmium sulfate and α -naphthoflavone on the development of zebrafish embryo. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. 15(9):766-775

Rozman, D., Strömstedt, M., Tsui, L. C., Scherer, S. W., & Waterman, M. R. (1996). Structure and mapping of the human lanosterol 14 α -demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis; comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics*, 38(3), 371-381.

Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), 103-141.

Zhang Y, Klein K, Sugathan A, Nassery N, Dombkowski A, Zanger UM. (2011a). Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One* 6, e23506.
individual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals :studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270: 414- 423.

Zhang N. (2011b). The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *J Cardiovasc Dis Res.* 2:91-5