



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Influencia de la 5-Aza-2'-desoxicitidina sobre la inducción de citocromo P450
1A1 (CYP1A1) por 7, 12-Dimetilbenz[a]antraceno.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Alexis Hernández Magaña

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. María Elena Ibarra Rubio
Facultad de Química

Ciudad de México. Septiembre, 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

- Agradezco al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre por dirigir este trabajo de maestría, por sus oportunos comentarios y su atención.
- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida para llevar a cabo los estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas, número de becario: 329408.
- Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico recibido para asistir al curso “Transducción de señales extracelulares”, realizado en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (2016).

Lista de abreviaturas

5AzadC	5-aza-2'-desoxicitidina
AHR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
ARNT	Translocador nuclear de AHR
BaP	Benzo[a]pireno
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P450 1A1
DMBA	7, 12-dimetilbenz[a]antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metil-transferasa
ERX	Elemento de respuesta a xenobióticos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Contenido

Agradecimientos.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
Índice de figuras.....	6
Resumen.....	7
1. Introducción.....	9
1.1 La superfamilia CYP.....	9
1.2 La isoforma CYP1A1.....	9
1.3 Regulación transcripcional de <i>CYP1A1</i>	10
1.3.1 Vía de señalización del receptor de hidrocarburos aromáticos (AHR).....	10
1.3.2 Otras vías de señalización involucradas en la regulación de CYP1A1.....	11
1.4 Metilación del DNA y 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC).....	11
2. Antecedentes.....	13
2.1 Islas CpG en el promotor de <i>CYP1A1</i>	13
2.2 Metilación del DNA y <i>CYP1A1</i>	15
3. Planteamiento del problema.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	18
– Objetivo general.....	18
– Objetivos particulares.....	18
6. Estrategia experimental.....	18
6.1 Tratamiento de ratas con 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC) y/o DMBA.....	18
6.2 Determinación de ARN mensajero.....	19
6.3 Obtención de la fracción microsomal.....	20

6.4 Inmunodetección	20
6.5 Determinación de la actividad enzimática de CYP1A1	21
6.6 Análisis estadístico	21
7. Resultados	22
7.1 Caracterización de la expresión basal y la inducción de <i>CYP1A1</i> por DMBA luego del tratamiento con 0.2 mg/kg de 5AzadC	22
7.2 Caracterización de la expresión basal y la inducción de <i>CYP1A1</i> por DMBA luego del tratamiento con 1 mg/kg de 5AzadC.....	25
7.3 Evaluación de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE).....	27
8. Discusión.....	29
9. Conclusiones.....	31
10. Perspectivas.....	32
11. Referencias	33

Índice de figuras

Figura 1. Islas CpG localizadas en el promotor de <i>CYP1A1</i> humano y de rata. ...	14
Figura 2. Efecto de la 5AzadC sobre la inducción de <i>CYP1A1</i> por HAPs en la línea celular de hepatocitos de rata C9.	16
Figura 3. Expresión relativa de ARNm de <i>CYP1A1</i> (0.2 mg/kg de 5AzadC).	22
Figura 4. Cantidad de proteína CYP1A1 (0.2 mg/kg de 5AzadC).	23
Figura 5. Actividad enzimática específica de CYP1A1 (0.2 mg/kg de 5AzadC). ...	24
Figura 6. Expresión relativa de ARNm de <i>CYP1A1</i> (1 mg/kg de 5AzadC).	25
Figura 7. Cantidad de proteína CYP1A1 (1 mg/kg de 5AzadC).	26
Figura 8. Actividad enzimática específica de CYP1A1 (1 mg/kg de 5AzadC).	27
Figura 9. Expresión de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina I (<i>ACE</i>) (0.2 mg/kg de 5AzadC)	28
Figura 10. Expresión de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina I (<i>ACE</i>) (1 mg/kg de 5azadC).	28

Resumen

La exposición a contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y los efectos a la salud que esto conlleva, hacen necesario realizar estudios que permitan entender mejor los factores y mecanismos implicados en el metabolismo de xenobióticos.

La superfamilia de hemoproteínas denominadas citocromo P450 (CYP), que participan en el metabolismo endógeno, también juegan un papel importante en la biotransformación de xenobióticos a compuestos polares de fácil excreción, y no menos relevante es su participación como activadoras de procarcinógenos; tal es el caso de la isoforma CYP1A1.

Una característica notable de *CYP1A1* es su inducción por HAPs, a través de la vía de señalización del receptor de hidrocarburos aromáticos (AHR). Luego que el AHR se une a un ligando en el citoplasma, éste se transloca al núcleo, donde se une con el translocador nuclear de AHR (ARNT), formando el complejo heterodimérico ligando-AHR-ARNT que interacciona con los elementos de respuesta a xenobióticos (ERX) y promueve la transcripción de sus genes blanco.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, empleando como modelo la línea celular hepática C9 de rata (no cancerosa), se demostró que la 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC), un agente hipometilante del ácido desoxirribonucleico (DNA), puede disminuir la expresión basal de *CYP1A1* pero también, potenciar la inducción de *CYP1A1* por HAPs, entre ellos el 7, 12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA). Esto aporta evidencias de que la regulación transcripcional de *CYP1A1* a través de AHR, puede ser modulada por el estado de la metilación global del DNA en hepatocitos y, considerando que el hígado es el principal órgano involucrado en la detoxificación, resulta interesante verificar si las observaciones realizadas en el modelo *in vitro* pueden presentarse también en un modelo *in vivo*.

En este estudio se evaluó los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm), concentración de proteína y actividad enzimática de CYP1A1, en hígado de ratas machos Wistar, previamente expuestas a 5AzadC y/o DMBA.

Las observaciones hechas en este trabajo sugieren que el tratamiento con 5AzadC no propicia un cambio significativo en la inducción de *CYP1A1* por DMBA en hígado de ratas, a diferencia de lo registrado *in vitro*, y que, aparentemente, tampoco tiene influencia sobre la expresión basal de *CYP1A1*.

1. Introducción

1.1 La superfamilia CYP

La superfamilia CYP está constituida por hemoproteínas con actividad monooxigenasa. En humanos, estas enzimas participan en el metabolismo de compuestos endógenos tales como el colesterol, sales biliares, prostaglandinas, hormonas sexuales, y además, están involucradas en la biotransformación de xenobióticos (fármacos, pesticidas, contaminantes ambientales, entre otros) a compuestos polares de fácil excreción (Fase I del metabolismo de xenobióticos) (Tamási *et al.*, 2003).

A pesar de la importancia de ciertas isoformas CYP en la detoxificación (CYP1A1, por ejemplo), algunos compuestos pueden ser metabólicamente activados por éstas, generándose intermediarios muy reactivos, con posibles efectos nocivos para las células (Tamási *et al.*, 2003).

1.2 La isoforma CYP1A1

La isoforma CYP1A1 es un miembro de la familia 1 de los CYPs que se encuentra anclada al retículo endoplásmico liso y a la membrana mitocondrial interna (Narayan *et al.*, 2011). En humanos adultos, se expresa en pulmón, páncreas, timo, próstata, intestino delgado, colon, útero, glándula mamaria; aunque también puede ser detectada en placenta, fetos y embriones. La expresión constitutiva de CYP1A1 es, generalmente, baja; sin embargo, esta enzima puede ser inducida por muchos de sus propios sustratos, particularmente los HAPs, presentes en la comida carbonizada o provenientes de la exposición laboral y ambiental, como benzo[a]pireno (BaP), 3-metilcolantreno (3-MC), 7,12-dimetil benz[a]antraceno

(DMBA), 2,3-benzofluoreno (BF), entre otros, a través de la vía de señalización de AHR (Walsh *et al.*, 2013).

Esta isoforma es una de las enzimas más notables en la bioactivación de procarcinógenos. El metabolismo de HAPs, mediado por CYP1A1, conduce a la formación de compuestos electrofílicos que pueden generar aductos con el DNA y contribuir a la mutagénesis (Wogan *et al.*, 2004; Rendic S. y Guengerich, 2012). Por otro lado, CYP1A1 también tiene una participación significativa en el metabolismo de fármacos (Williams *et al.*, 2004; Anwar *et al.*, 2009). Por lo anterior, realizar estudios relacionados con la regulación de la expresión de CYP1A1 resulta de suma importancia.

1.3 Regulación transcripcional de CYP1A1

1.3.1 Vía de señalización del receptor de hidrocarburos aromáticos (AHR)

La vía de AHR es la más estudiada y la que parece tener mayor influencia sobre la inducción de CYP1A1. El AHR es un factor de transcripción activado por diversos ligandos como HAPs, aminas heterocíclicas, bifenilos halogenados, entre otros; que se encuentra en el citoplasma asociado a dos proteínas de choque de calor de 90 kDa (hsp90), una proteína asociada X (XAP2) y una proteína chaperona de 23 kDa (p23). Luego de la unión de un agonista a AHR, se lleva a cabo ciertos cambios conformacionales y éste puede translocarse al núcleo, donde se disocia de las chaperonas y se une al ARNT. El complejo formado (AHR-ARNT) interacciona con los elementos de respuesta a xenobióticos (ERX) y recluta la maquinaria basal para que se active la transcripción de genes como CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, glutatión S-transferasa M1, aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1), entre otros (Ikuta *et al.*, 1998; Tsuji *et al.*, 2014). El represor de AHR

(AHRR) también es un gen blanco de AHR y se ha descrito como un regulador negativo de la vía (Haarmann-Stemmann y Abel, 2006).

1.3.2 Otras vías de señalización involucradas en la regulación de CYP1A1

Además de la vía de AHR se ha descrito la participación de otras vías en la regulación de *CYP1A1*. Tal es el caso de la vía de Wnt/B-catenina (Vaas *et al.*, 2014; Braeuning *et al.*, 2011; Schulthess *et al.*, 2015), del receptor constitutivo de androstano (CAR) (Yoshinari *et al.*, 2010), del receptor de hígado X (LXR) (Araki *et al.*, 2012), del receptor de ácido retinoico (RAR) (Vecchini *et al.*, 1994; Fallone *et al.*, 2004; Ohno *et al.*, 2012), del factor inducible por hipoxia (HIF) (Zhang *et al.*, 2007; Gradin *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 2005), del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR α) (Sérée *et al.*, 2004; Fallone *et al.*, 2005), entre otras.

En la búsqueda de comprender mejor los múltiples factores que regulan la activación transcripcional de *CYP1A1*, en este trabajo se exploró la influencia de la metilación global del DNA, a través de la administración de 5AzadC, sobre la expresión basal de *CYP1A1* y sobre la inducción de este gen por DMBA, *in vivo*.

1.4 Metilación del DNA y 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC)

La metilación del DNA en eucariontes es una modificación del DNA que ocurre en la posición 5 de los residuos de citosina, en el contexto de los dinucleótidos CpG; ha sido ampliamente estudiada por su papel clave en los procesos de regulación de la expresión genética, la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica y el silenciamiento de transposones. Se estima que los sitios CpG representan

alrededor del 1% de del total de nucleótidos y que el 80% de éstos, en el genoma humano, están metilados (Rothbart y Strahl, 2014).

La metilación del DNA en regiones regulatorias o promotores ha sido asociada con el silenciamiento de genes, a través de la obstrucción directa de la interacción de factores de transcripción con el DNA y, además, actuando como sitio de reconocimiento de proteínas “lectoras” de DNA metilado que reclutan remodeladores de la cromatina (Rothbart y Strahl, 2014).

En mamíferos, se ha identificado tres DNA metiltransferasas (enzimas que catalizan la transferencia de grupos metilo a los residuos de citosina del DNA): DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. DNMT1 es considerada la enzima que mantiene los patrones de metilación en las cadenas hijas después de la replicación del DNA, mientras que DNMT3A y DNMT3B están involucradas en la metilación *de novo*, durante la embriogénesis y la diferenciación celular (Itoh *et al.*, 2013).

La hipermetilación de ciertas regiones promotoras, y el subsecuente silenciamiento de algunos genes supresores de tumores, ha sido encontrada en diversos cánceres. Con base en esta observación, se ha desarrollado agentes hipometilantes (moléculas que disminuyen los niveles globales de metilación del DNA) para ser empleados en la terapia contra el cáncer. Tal es el caso de la 5AzadC (un análogo del nucleósido citidina), utilizada en el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS). La 5AzadC, luego de ser fosforilada en la célula, es incorporada al DNA, durante la replicación. En este contexto, DNMT1, que reconoce DNA hemimetilado, se une covalentemente a la 5AzadC y posteriormente se degrada. La disminución de los niveles de DNMT1, a su vez, ocasiona hipometilación y propicia la reexpresión de genes silenciados por hipermetilación de sus promotores (Wilson *et al.*, 1983; Itoh *et al.*, 2013). Por su efecto hipometilante, la 5AzadC también se utiliza en investigación para examinar cómo cambios globales en los patrones de metilación del DNA afectan la expresión de genes (Okino *et al.*, 2006; Riviere *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

2.1 Islas CpG en el promotor de *CYP1A1*

El DNA genómico de vertebrados presenta bajo contenido de sitios CpG. Sin embargo, hay regiones del DNA, llamadas islas CpG, que poseen un contenido elevado de C+G y una alta frecuencia de sitios CpGs con respecto a lo esperado ($(\text{número de CpGs} \times \text{número de pb}) / (\text{número de Cs} \times \text{número de Gs})$). Generalmente, se encuentran en la región codificante y en el promotor de genes (Illingworth y Bird, 2009; Ioshikhes y Zhang, 2000). Weber *et al.* han clasificado a los promotores en tres categorías, de acuerdo a la longitud de las islas CpG que poseen y a la abundancia de CpGs en éstas:

- Promotores con alto contenido de CpGs (HCPs): Tienen islas CpG con una longitud mayor a 500 pb, una frecuencia de CpGs mayor 0.75 y un contenido de CG mayor a 55%.
- Promotores con bajo contenido de CpGs (LCPs): Tienen islas CpG con una longitud menor a 500 pb y una frecuencia de CpGs mayor 0.48.
- Promotores con contenido intermedio de CpGs (ICPs): Tienen islas CpG con una longitud menor a 500 pb, una riqueza moderada de CpGs y/o un contenido de CGs menor a 55%. Son aquellos que no cumplen las características de los anteriores.

En fibroblastos humanos se ha demostrado que los LCPs están generalmente metilados, los HCPs están generalmente no metilados y los ICPs presentan una alta frecuencia de metilación. Además, se ha asociado principalmente a los ICPs como reguladores de la activación transcripcional por metilación del DNA (Weber *et al.*, 2007).

Utilizando la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para obtener las secuencias correspondientes de -10,000 a +1,000 nt con

respecto al sitio de inicio de la transcripción de *CYP1A1* y analizando esta región con un software libre denominado “*CpG Island Searcher*”, se encontraron dos islas CpG en el promotor de *CYP1A1* humano (Figura 1) con las siguientes características:

- Isla CpG 1: Longitud=1535 pb, frecuencia de CpGs=0.72, contenido de CGs=64.8%
- Isla CpG 2: Longitud=753 pb, frecuencia de CpGs=0.67, contenido de CGs=66.8%

También se localizaron dos islas CpGs en el promotor de *CYP1A1* de rata (Figura 1), con las siguientes características:

- Isla CpG 1: Longitud=210 pb, frecuencia de CpGs=0.66, contenido de CGs=56.7%
- Isla CpG 2: Longitud=283 pb, frecuencia de CpGs=0.65, contenido de CGs=61.5%

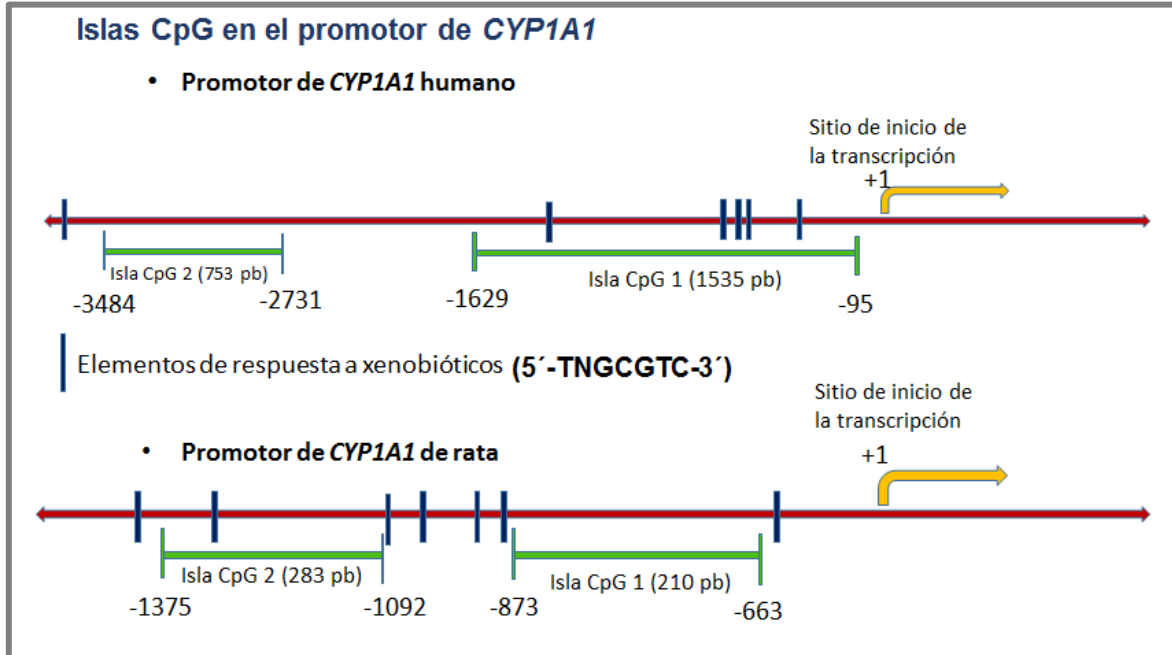


Figura 1. Islas CpG localizadas en el promotor de *CYP1A1* humano y de rata.

Dos islas CpG fueron encontradas en el promotor de *CYP1A1* humano en las posiciones -95, -1629 y -2731, -3484 pb, río arriba (5') del sitio de inicio de la transcripción (SIT) mientras que en el promotor de *CYP1A1* de rata fueron localizadas dos islas CpG en las posiciones -663, -873 y -1092, -1375 pb, río arriba (5') del SIT.

Con base en la clasificación de Weber *et al.* el promotor de *CYP1A1* humano es un HCP y el promotor de *CYP1A1* de rata un ICP.

Por otra parte, también se ha observado que 5 de los 12 ERX descritos (Nukaya y Bradfield, 2009), co-localizan con la isla CpG 1 en el promotor de *CYP1A1* humano, mientras que 1 de los 7 ERX encontrados en rata co-localizan con la isla CpG 2 del promotor de *CYP1A1*. La presencia de un sitio CpG en los ERX (5'-TNG**CG**TC-3') acentúa la importancia de esta co-localización, puesto que la metilación de dicho sitio podría evitar la unión del complejo AHR activado-ARNT.

2.2 Metilación del DNA y *CYP1A1*

Algunos estudios sugieren que el estado de la metilación del DNA podría influir en la inducción de *CYP1A1*, luego de exposición a HAPs. En 2003, se determinó la actividad enzimática específica y el estado de la metilación del promotor de *CYP1A1*, en 121 muestras de pulmón de individuos fumadores y no fumadores; y se observó que la carencia de metilación del promotor de *CYP1A1* estaba asociada a una mayor actividad enzimática en fumadores (Anttila *et al.*, 2003). En otro estudio, se ha visto que cambios en la metilación del DNA relacionados con cáncer suprimen la inducción de *CYP1A1* por 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). Utilizando tres líneas celulares de epitelio de próstata (PWR-1E, RWPE-1 y LNCaP), una de ellas cancerosa (LNCaP), se demostró que la hipermetilación del promotor de *CYP1A1* (observada por secuenciación con bisulfito) en LNCaP inhibe la inducción de *CYP1A1* por TCDD y que el tratamiento con 5AzadC restaura la activación transcripcional (Okino *et al.*, 2006). Sin embargo, en células

de hepatoma de ratón (Hepa-1c1c7) se ha informado que el tratamiento con 5AzadC no altera la inducción de *CYP1A1* por BaP (Schnekenburger *et al.*, 2007).

Por otro lado, en la línea celular de hepatocitos de rata C9 (no cancerosa), se observó la potenciación de la inducción de *CYP1A1* por DMBA, pero de forma sorpresiva se registró también una disminución en la expresión basal de *CYP1A1* por el tratamiento con 5AzadC (2.5 μ M) (Figura 2) (Olguín *et al.* Datos no publicados). Esto contradice lo descrito en cultivo primario de hepatocitos de rata, donde se observó un aumento dosis-dependiente de la expresión basal de *CYP1A1* luego del tratamiento con 5AzadC (1-50 μ M) (Fraczek *et al.*, 2012). De este modo, resulta importante generar datos en modelos *in vivo* para contrastarlos con lo observado en modelos *in vitro*.

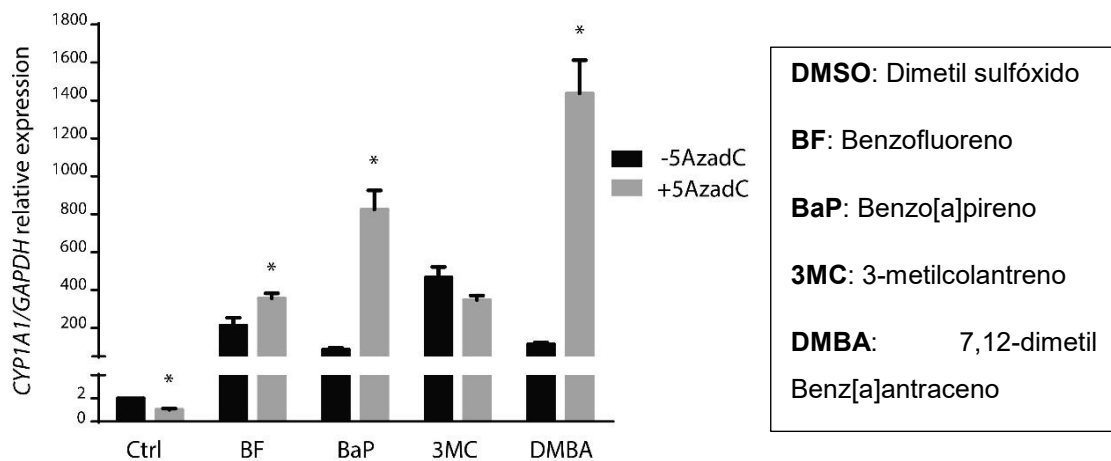


Figura 2. Efecto de la 5AzadC sobre la inducción de *CYP1A1* por HAPs en la línea celular de hepatocitos de rata C9. Las células se trataron con 5AzadC (2.5 μ M) durante 72 h y/o diferentes HAPs durante 48 h, antes de extraer el ARN total.

3. Planteamiento del problema

Debido a la relevante contribución de CYP1A1 en la activación de procarcinógenos y en el metabolismo de fármacos es necesario realizar estudios que permitan entender mejor los diversos factores que influyen en la regulación de su expresión.

Con el esfuerzo de varios grupos de investigación se ha descrito una serie de vías de señalización que están involucradas en la regulación de *CYP1A1*, sin embargo, hay mecanismos que se ha explorado menos, como es el caso de la metilación del DNA. Las observaciones presentadas en el apartado anterior evidencian la importancia del estado de la metilación del DNA en la regulación de *CYP1A1*, pero también ponen de manifiesto que no se cuenta con datos de experimentos en modelos *in vivo*, que nos acerquen más a lo que podría suceder en el hígado, donde *CYP1A1* participa de forma notable en la detoxificación.

4. Hipótesis

- El tratamiento con 5AzadC, un agente hipometilante, favorecerá la expresión de *CYP1A1* en hígado de rata como se ha observado en cultivo primario de hepatocitos.
- El tratamiento con 5AzadC potenciará la inducción *in vivo* de *CYP1A1* por DMBA en hígado como se ha visto en la línea celular de hepatocitos de rata C9.

5. Objetivos

– Objetivo general

Determinar el efecto *in vivo* de la 5AzadC sobre la expresión basal y la inducción de *CYP1A1* por DMBA.

– Objetivos particulares

- Caracterizar la influencia de la 5AzadC sobre la expresión basal y la inducción de *CYP1A1* a nivel de ARNm y proteína.
- Determinar si el tratamiento con 5AzadC cambia los niveles de actividad enzimática de *CYP1A1* en hígado.
- Determinar el efecto de la 5AzadC sobre el estado de la metilación global del DNA en hígado de rata.

6. Estrategia experimental

6.1 Tratamiento de ratas con 5-aza-2'-desoxicitidina (5AzadC) y/o DMBA

Primer experimento: Se clasificaron al azar 24 ratas macho Wistar, con un peso aproximado de 200 g, en 4 grupos de 6 ratas cada uno.

Segundo experimento: Se clasificaron al azar 16 ratas macho Wistar, con un peso aproximado de 200 g, en 4 grupos de 4 ratas cada uno.

Durante 5 días, las ratas recibieron los tratamientos presentados en la Tabla 1, variando sólo la dosis de 5AzadC entre el primer y segundo experimentos, 0.2 mg/kg (Pereira *et al.*, 2004) y 1 mg/kg (Riviere *et al.*, 2011), respectivamente. La

dosis de DMBA utilizada también fue escogida con base en reportes previos (Lin *et al.*, 2012; Boyland y Sydnor, 1962).

Tabla 1. Esquema de tratamiento de las ratas						
Grupos	1er. día	2do. día	3er. día	4to. día	5to. día	6to. día
Control (-)	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF 200 µl de AM	Eutanasia
5AzadC	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF 200 µl de AM	
DMBA	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF	100 µl de AF 50 mg/kg de DMBA en AM	
5AzadC-DMBA	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF	5AzadC en AF 50 mg/kg de DMBA en AM	

AF= Amortiguador de fosfatos pH 7.4

AM= Aceite de maíz

Los tratamientos se administraron vía intraperitoneal y, luego de 24 horas de la última administración, las ratas se eutanasiaron para extraer el hígado.

6.2 Determinación de ARN mensajero

Se realizó la extracción de ARN total con Trizol a partir de cada una de las muestras de hígado, conforme el fabricante lo recomienda. La síntesis de DNA complementario se llevó a cabo con 1 µg de ARN y con M-MVL Retrotranscriptasa (Invitrogen, Massachusetts, USA) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Posteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real con Taq Man Master Mix y sondas TaqMan para *CYP1A1* de rata (gen de interés) y gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*)(control endógeno). También se evaluó la expresión de ACE (Enzima convertidora de angiotensina I), cuyo nivel de ARNm aumenta luego del tratamiento con 5AzadC (Riviere *et al.*, 2011).

6.3 Obtención de la fracción microsomal

La fracción microsomal se obtuvo a partir del hígado de las ratas, de la siguiente manera. Primero, se realizó un homogenado de tejido de rata con solución de cloruro de potasio (KCl) 150 mM; se centrifugó el homogenado a 9000 g por 10 minutos y el sobrenadante resultante se sometió a centrifugación nuevamente a 100,000 g por 1 hora. El botón obtenido se resuspendió y se homogenizó en amortiguador de fosfatos pH=7.4, adicionado con sacarosa 250 mM. Posteriormente, se centrifugó, una vez más, a 100,000 g por 1 hora y el botón resultante se resuspendió en amortiguador de fosfatos pH=7.4, adicionado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 0.1 mM y glicerol 20% v/v. La fracción microsomal se almacenó a -70°C.

6.4 Inmunodetección

Luego de la cuantificación de proteína de las muestras microsomales por el método de Bradford, se realizó la separación de las proteínas mediante una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida. El gel separador fue utilizado a una concentración de 8.5% de acrilamida y el concentrador al 4%. Se colocaron 10 µg de proteína en cada carril del gel y se corrió la electroforesis a 100 voltios. Luego, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 100 voltios por 75 minutos a 4°C. La membrana se bloqueó con una solución de albúmina al 3% durante 3 h. Para realizar la inmunodetección se utilizaron anticuerpos anti CYP1A1 y GAPDH. Primero, se expusieron las membranas al anticuerpo primario correspondiente durante 24 h en una concentración 1:1000 para CYP1A1 y 1:2000 para GAPDH. Posteriormente, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos cada uno con amortiguador Tris-salino adicionado con Tween 20 (TTBS) 1x y se expusieron al anticuerpo secundario (1:500) correspondiente durante 75 minutos. A continuación, se

lavaron las membranas 2 veces con TTBS 1x durante 10 minutos y una vez con agua durante 10 minutos. Finalmente, las membranas se revelaron utilizando luminol (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) y se analizaron con el equipo Kodak Gel Logic 1500 Imaging System.

6.5 Determinación de la actividad enzimática de CYP1A1

La evaluación de la actividad enzimática se realizó mediante el registro de la O-dealquilación de la etoxiresorufina por CYP1A1. El sustrato utilizado (etoxiresorufina) es modificado por CYP1A1, obteniéndose el compuesto fluorescente, resorufina. La mezcla de reacción consiste en 80 µg de proteína microsomal en 150 µl amortiguador de pH=7.6 (Tris-base 50 mM y MgCl₂ 25 mM), 5 µl de etoxiresorufina (0.05 µM) y 40 µl NADPH (2.5 mM). La formación del producto (fluorescencia) se registró por 15 minutos, cada 20 segundos a 37°C, en el lector de placas Synergy HT a una longitud de onda de excitación de 530 nm y emisión de 590nm.

6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de expresión relativa de ARNm, cantidad de proteína y actividad enzimática específica se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 6.0. Para cada conjunto de datos se realizó la prueba de Bartlett para corroborar la homogeneidad de varianzas. En los casos en donde no hubo varianzas homogéneas se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los grupos y la prueba de Dunn como análisis post hoc. Para las comparaciones de dos grupos con varianzas homogéneas se utilizó la prueba t de student.

7. Resultados

7.1 Caracterización de la expresión basal y la inducción de *CYP1A1* por DMBA luego del tratamiento con 0.2 mg/kg de 5AzadC

Con la finalidad de evaluar la influencia del estado de la metilación global del DNA sobre la expresión basal de *CYP1A1* y sobre la inducción de este gen por DMBA, se trataron ratas macho Wistar con 5AzadC (0.2 mg/kg), según el esquema establecido en la estrategia experimental. A nivel de ARNm, no se observó un cambio significativo en la expresión de *CYP1A1* en el grupo tratado con 5AzadC con respecto al grupo control (Figura 3). El grupo que recibió tratamiento combinado de 5AzadC y DMBA tampoco presentó cambios significativos en los niveles de ARNm de *CYP1A1* con respecto al grupo tratado sólo con el inductor (Figura 3).

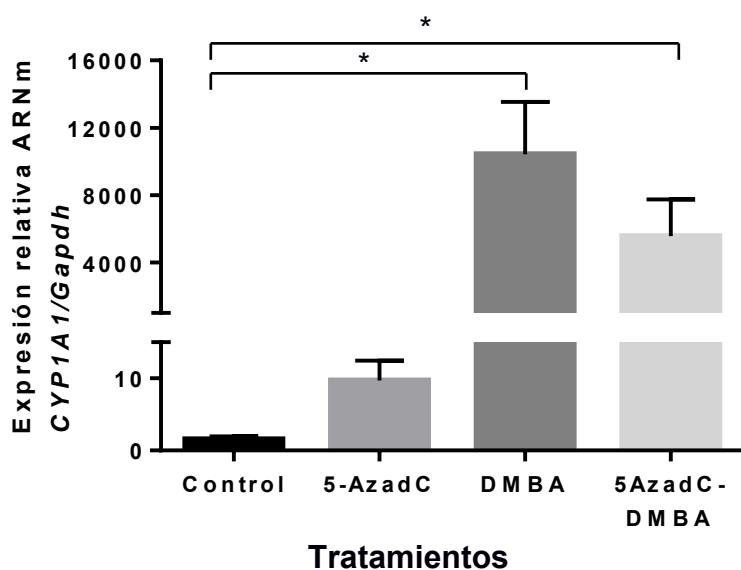


Figura 3. Expresión relativa de ARNm de *CYP1A1* (0.2 mg/kg de 5AzadC). No se observó un cambio significativo en la expresión de *CYP1A1* en el grupo tratado con 5AzadC comparado con el grupo control ni tampoco en el grupo que recibió tratamiento combinado con respecto al que fue tratado sólo con inductor. Las ratas macho Wistar se sometieron a tratamiento con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. Se utilizó *Gapdh* como control endógeno.

n=6 ± SEM. Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha < 0.05$, * Diferencia significativa.

Para observar si los resultados de ARNm de *CYP1A1* se reflejaban a nivel de proteína y actividad enzimática, se realizaron ensayos de inmunodetección (western blot) y se midió la actividad enzimática de *CYP1A1*. En la Figura 4 se observa un aumento no significativo de la cantidad de proteína de *CYP1A1* en el grupo que fue tratado con 5AzadC con respecto al control negativo. A nivel de actividad enzimática también se presenta un incremento (Figura 5). Por otra parte, tampoco se vieron cambios significativos entre los grupos tratados con DMBA y 5AzadC-DMBA a nivel de proteína ni de actividad enzimática. (Figura 4 y 5).

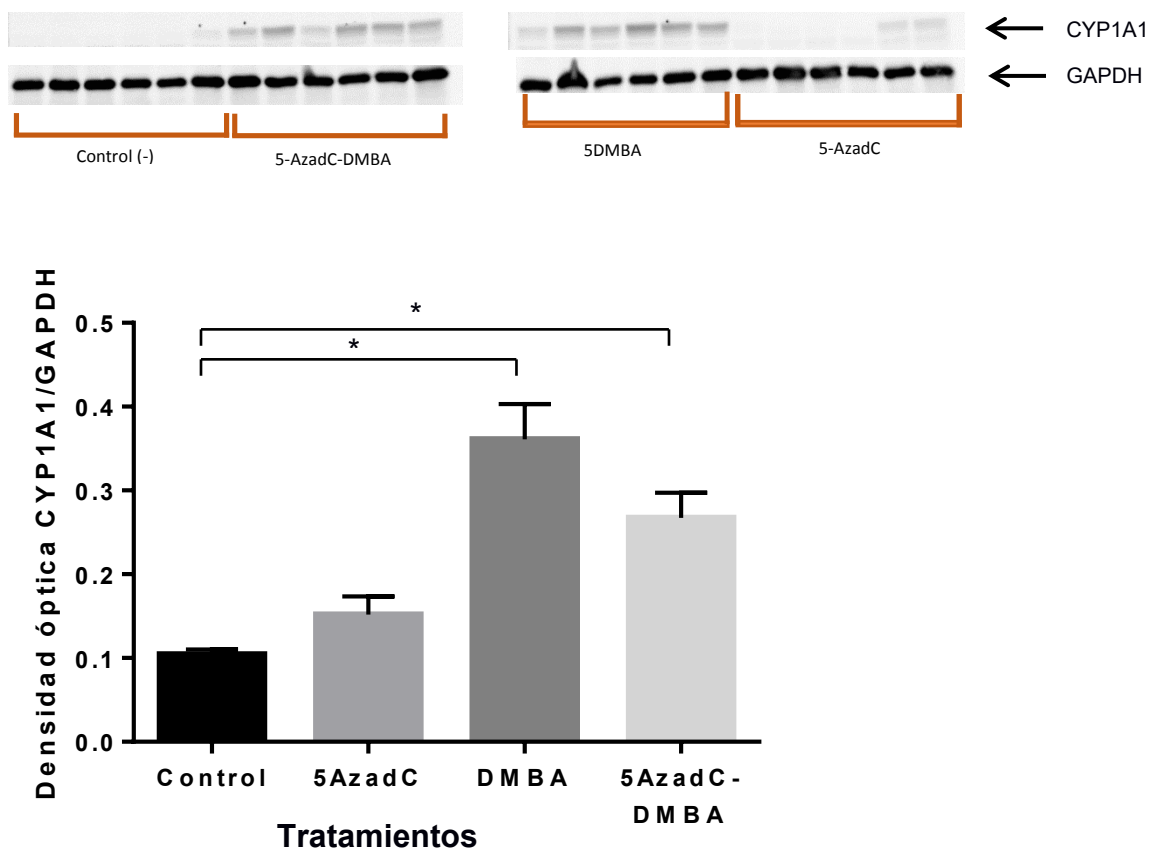


Figura 4. Cantidad de proteína *CYP1A1* (0.2 mg/kg de 5AzadC). No se observa diferencias significativas en la cantidad de *CYP1A1* del grupo tratado con 5AzadC comparado con

el grupo control ni tampoco en el grupo que recibió tratamiento combinado con respecto al que fue tratado sólo con inductor. Las ratas macho Wistar se sometieron a tratamiento con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. Se utilizó GAPDH como control de carga. $n=6 \pm$ SEM. Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha<0.05$, * Diferencia significativa.

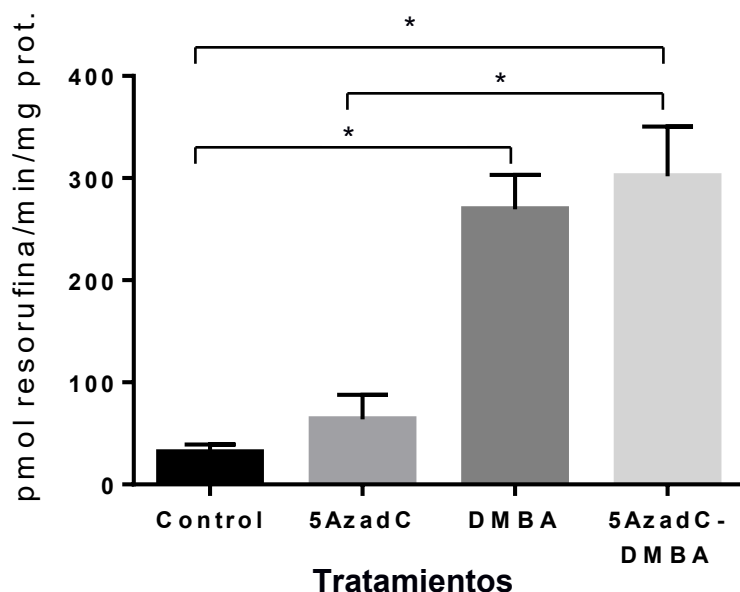


Figura 5. Actividad enzimática específica de CYP1A1 (0.2 mg/kg de 5AzadC).

Se observa un aumento no significativo de la actividad enzimática en el grupo tratado con 5AzadC comparado con el grupo control y un aumento en el grupo que recibió tratamiento combinado de 5AzadC-DMBA comparado con el grupo que sólo fue tratado con DMBA. Las ratas macho Wistar se sometieron a tratamiento con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 0.2 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. $n=6 \pm$ SEM. Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha<0.05$, * Diferencia significativa.

7.2 Caracterización de la expresión basal y la inducción de *CYP1A1* por DMBA luego del tratamiento con 1 mg/kg de 5AzadC

Luego de observar los resultados del primer experimento, donde se presentaron tendencias pero no cambios significativos en los grupos de interés y considerando que se ha descrito un efecto dosis-dependiente de 5AzadC sobre la metilación global del DNA en células embrionarias de ratón (Jones y Taylor, 1980) y en modelos *in vivo* (Wilson *et al.*, 1983; Riviere *et al.*, 2011), se decidió realizar otro experimento aumentando la dosis utilizada de 5AzadC a 1 mg/kg. Sin embargo, no se registraron cambios significativos a nivel de ARNm (Figura 6), cantidad de proteína ni de actividad enzimática (Figura 7 y 8) de *CYP1A1* entre el grupo tratado con 5AzadC y el control. De igual forma, no se observa un cambio significativo en la inducción de *CYP1A1*, es decir, entre los grupos tratados con DMBA y 5AzadC-DMBA (Figura 6, 7 y 8).

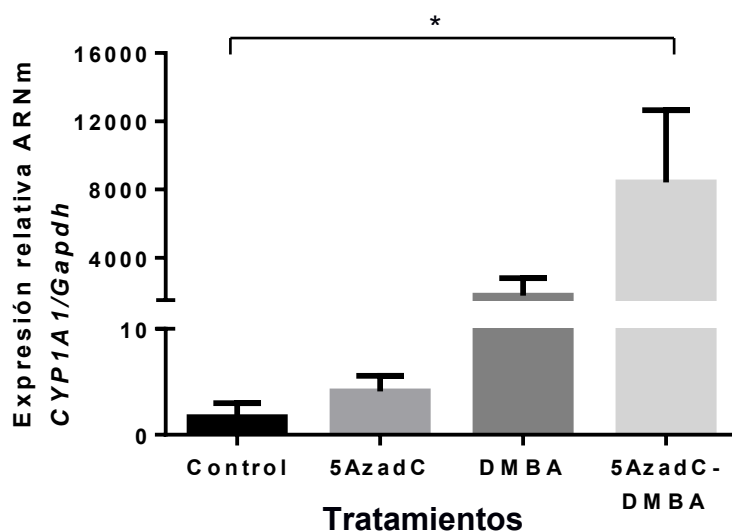


Figura 6. Expresión relativa de ARNm de *CYP1A1* (1 mg/kg de 5AzadC). Se observa un aumento no significativo en la expresión de *CYP1A1* del grupo tratado con 5AzadC comparado con el grupo control y un aumento en el grupo que recibió tratamiento combinado de 5AzadC-DMBA comparado con el grupo que sólo fue tratado con DMBA. Las ratas macho Wistar se trataron con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 1 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. n=4 ± SEM. Se empleó la prueba

no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha < 0.05$, * Diferencia significativa.

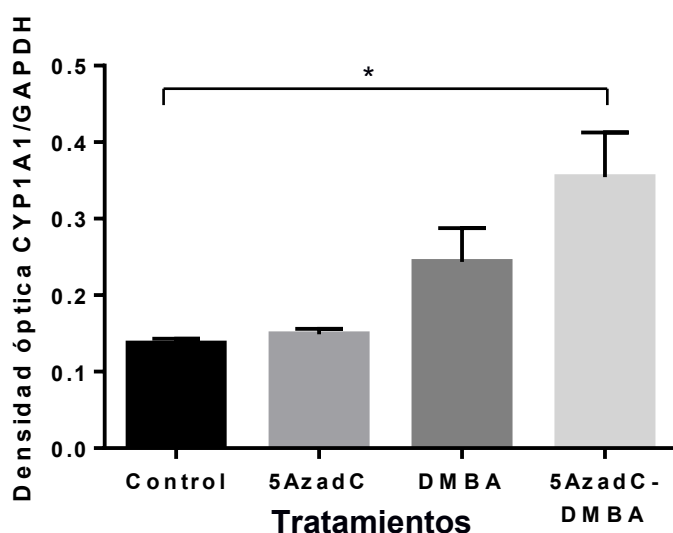
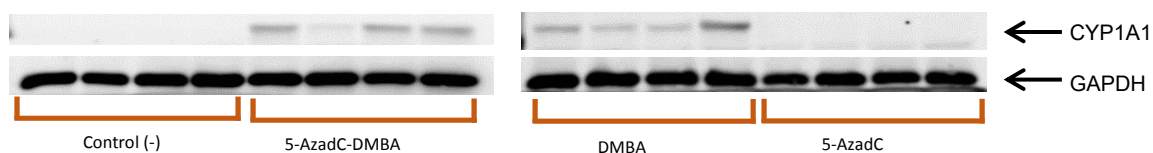


Figura 7. Cantidad de proteína CYP1A1 (1 mg/kg de 5AzadC). No se observa cambios significativos en la cantidad de CYP1A1 del grupo tratado con 5AzadC comparado con el grupo control ni en el grupo que recibió tratamiento combinado de 5AzadC-DMBA comparado con el grupo que sólo fue tratado con DMBA. Las ratas macho Wistar se trataron con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 1 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. $n=4 \pm$ SEM. Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha < 0.05$, * Diferencia significativa.

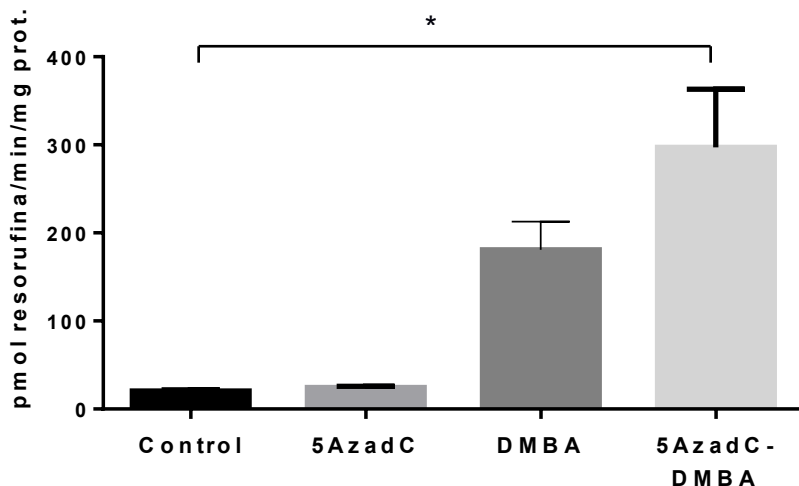


Figura 8. Actividad enzimática específica de CYP1A1 (1 mg/kg de 5AzadC). Se observa un aumento no significativo de la actividad enzimática en el grupo tratado con 5AzadC-DMBA comparado con el grupo tratado solo con DMBA. Las ratas macho Wistar se trataron con aceite de maíz, amortiguador de fosfatos, 1 mg/Kg de 5AzadC por 5 días y/o dosis única de 50 mg/Kg de DMBA, en los grupos correspondientes. $n=4 \pm$ SEM. Se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn para analizar las diferencias entre los grupos, $\alpha < 0.05$, * Diferencia significativa.

7.3 Evaluación de la expresión de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE)

El ARNm de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se evaluó con el propósito de aportar alguna evidencia, aunque fuera indirecta, de que el tratamiento con 5AzadC era funcional. El grupo de ratas tratadas con 0.2 mg/kg, inesperadamente, presentó una disminución del ARNm de ACE con respecto al grupo control (Figura 9). Sin embargo, como se ha informado (Riviere et al., 2011), la administración de 1 mg/kg de 5AzadC incrementó la expresión de ACE en hígado de rata (Figura 10).

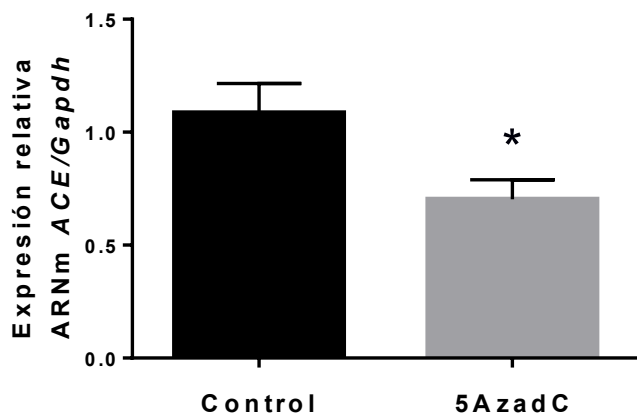


Figura 9. Expresión de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) (0.2 mg/kg de 5AzadC). Se observa una disminución significativa de la expresión de ACE del grupo tratado con 5AzadC. Las ratas macho Wistar se trataron con amortiguador de fosfatos o 0.2 mg/Kg de 5-azadC por 5 días. Se utilizó *Gapdh* como control endógeno. $n=6 \pm$ SEM. Se utilizó la prueba t de Student para analizar las diferencias entre los grupos, $P<0.05$, * Diferencia significativa.

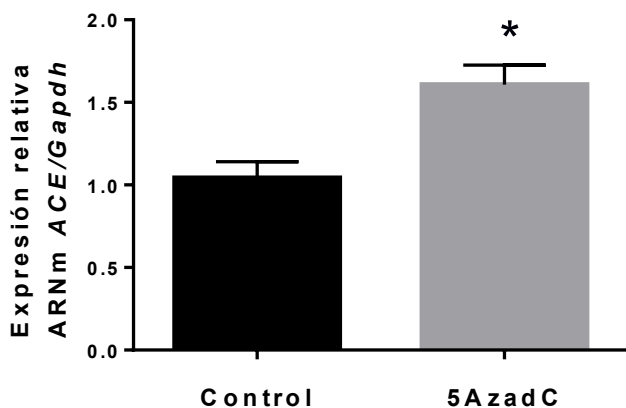


Figura 10. Expresión de ARNm de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) (1 mg/kg de 5azadC). Se observa un aumento significativo de la expresión de ACE. Las ratas macho Wistar se trataron con amortiguador de fosfatos o 1 mg/Kg de 5-azadC por 5 días. Se utilizó *Gapdh* como control endógeno no. $n=4 \pm$ SEM. Se utilizó la prueba t de Student para analizar las diferencias entre los grupos, $P<0.05$, * Diferencia significativa.

8. Discusión

Los resultados pueden resumirse de la siguiente manera:

- El tratamiento con 5AzadC (0.2 mg/kg y 1 mg/kg) no propicia un cambio significativo en la inducción de *CYP1A1*, entre el grupo de ratas tratadas sólo con DMBA y el grupo que recibió tratamiento combinado 5AzadC-DMBA.
- El tratamiento con 5AzadC (0.2 mg/kg y 1mg/kg) no ocasiona una diferencia significativa en la expresión basal de *CYP1A1* con respecto al grupo control en hígado de ratas.

A diferencia de lo que se había encontrado en la línea celular de hepatocitos de rata C9, en este estudio no se observó un cambio significativo en la inducción de *CYP1A1* por DMBA, cuando se trata previamente con 5AzadC, con ninguna de las dosis probadas. Una posible explicación es la presencia de diferentes patrones de metilación del DNA *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que el proceso de inmortalización de las líneas celulares produce modificaciones en la metilación global del DNA (Schütze *et al.*, 2015; Gordon *et al.*, 2014; Nestor *et al.*, 2015); de este modo, es posible que la línea celular C9 pueda tener patrones de metilación distintos de los presentes *in vivo*, que favorezcan la respuesta al tratamiento con 5AzadC. Se ha observado que reporteros de luciferasa “no metilados”, transfectados en células HepG2, no cambian su actividad por el tratamiento con 5AzadC. Sin embargo, cuando las construcciones son “metiladas artificialmente” antes de ser transfectadas, se registra un aumento de la actividad de luciferasa ocasionada por el tratamiento con 5AzadC. Lo anterior, destaca la importancia del contexto de metilación del DNA en la respuesta observada por el tratamiento con 5AzadC (Seenappa *et al.*, 2016). Otra posibilidad es que el tratamiento con 5AzadC no haya sido funcional debido a la alta expresión en hígado de la citidina deaminasa, enzima que puede degradar a 5AzadC (Ebrahim *et al.*, 2012). Además, hay que considerar que la acción de 5AzadC es dependiente de la

replicación del DNA y en el hígado la tasa de proliferación es baja (Williams y Iatropoulos, 2002).

Por otro lado, después de observar que el tratamiento con 5AzadC (0.2 mg/kg) generaba un aumento (estadísticamente, no significativo) en la expresión de *CYP1A1*, se quiso averiguar si con una dosis mayor de 5AzadC (1 mg/kg) se potenciaba este efecto, y si con esta dosis se producían cambios en la inducción de *CYP1A1*. Sin embargo, no hubo un cambio significativo en la expresión de *CYP1A1* con respecto al grupo control y tampoco en la inducción por DMBA. Así, surgió la duda de si las dosis utilizadas habían sido funcionales. Por ello se decidió, como evidencia indirecta, evaluar el ARNm del gen *ACE*, que se ha reportado aumenta su expresión por el tratamiento con 5AzadC (1 mg/kg), en ratas (Riviere *et al.*, 2011). Los resultados muestran que la dosis de 5AzadC (1 mg/kg) incrementa la expresión de *ACE*, lo que sugiere, tomado con mucha reserva, que esta dosis sí fue funcional. De forma interesante, la administración de 0.2 mg/kg de 5AzadC promueve la disminución del ARNm de *ACE*. Sin embargo, esto podría explicarse por efectos secundarios de 5AzadC y no por cambios en la metilación del DNA global. En varias líneas celulares cancerosas (H719, HCT116 (p53-/-), H1299, HCT116 (p53+/+), H23, y U2OS) se ha observado que el tratamiento con 5AzadC puede propiciar la degradación de proteínas y, además, activar la transcripción de genes como *RASFF1A* y *CDKN2D* sin modificar el patrón de metilación de los promotores de estos genes (Zheng *et al.*, 2012; Wozniak *et al.*, 2007). Por otra parte, en líneas celulares de cáncer de mama, se ha visto que la 5AzadC propicia la reactivación transcripcional de los genes *DSC3* y *MASPIN*, a través de la disminución de las marcas de metilación de la lisina 9 de la histona 3 (marca de represión) en el promotor de *DSC3* y *MASPIN*, sin cambiar el estado de metilación del DNA. Este efecto se asoció a una disminución de la cantidad de proteína, promovida por 5AzadC, de la metiltransferasa de histonas (G9A), enzima clave en el establecimiento de esta marca (Wosniak *et al.*, 2007).

9. Conclusiones

El tratamiento con 5AzadC no propicia un cambio significativo en la expresión basal ni en la inducción de *CYP1A1* por DMBA, a ninguna de las dosis probadas, en hígado de ratas. Por otra parte, se observó un aumento significativo de la expresión del gen *ACE* (Figura 8), en ratas tratadas con 1 mg/kg de 5AzadC, como se ha reportado (Riviere *et al.* 2011). Sin embargo, no se ha probado si el tratamiento con 5AzadC cambió efectivamente el estado de la metilación global del DNA.

10. Perspectivas

Ajustar la dosis de 5AzadC necesaria para generar hipometilación del DNA utilizando PCR específica de metilación.

Realizar secuenciación con bisulfito del promotor de *CYP1A1* en hígado de ratas y en la línea celular C9, con y sin tratamiento de 5AzadC, para comparar los patrones de metilación y la influencia del tratamiento sobre las marcas de metilación del DNA.

Realizar microarreglos de expresión para identificar los genes que se modulan por tratamiento con diferentes dosis de 5AzadC y que regulan a *CYP1A1*.

Realizar experimentos *in vivo* generando hipometilación global del DNA con dieta deficiente en donadores de grupos metilo (Niculescu y Zeisel, 2002) e inhibidores de DNMTs de la dieta (Choi y Friso, 2010), para observar si éstos pueden modular la expresión de *CYP1A1*.

11. Referencias

- Allen, J. W., Johnson, R. S., & Bhatia, S. N. (2005). Hypoxic inhibition of 3-methylcholanthrene-induced CYP1A1 expression is independent of HIF-1alpha. *Toxicology Letters*, 155(1), 151–159.
- Anttila, S., Hakkola, J., Tuominen, P., Elovaara, E., Husgafvel-Pursiainen, K., Karjalainen, A., ... Nurminen, T. (2003). Methylation of Cytochrome P4501A1 Promoter in the Lung Is Associated with Tobacco Smoking. *Cancer Research*, 63(24), 8623–8628.
- Anwar-Mohamed, A., Elbekai, R. H., & El Kadi, A. O. (2009). Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5(1744–7607), 501–521.
- Araki, K., Watanabe, K., Yamazoe, Y., & Yoshinari, K. (2012). Liver X receptor α bidirectionally transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 through two cis-elements common to both genes. *Toxicology Letters*, 215(1), 16–24.
- Avadhani, N. G., Sangar, M. C., Bansal, S., & Bajpai, P. (2011). Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: The concept of chimeric signals. *FEBS Journal*, 278(22), 4218–4229.
- Boyland, E., & Sydnor, K. L. (1962). The induction of mammary cancer in rats. *British Journal of Cancer*, 16, 731–9.
- Braeuning, A., Köhle, C., Buchmann, A., & Schwarz, M. (2011). Coordinate regulation of cytochrome P450 1a1 expression in mouse liver by the aryl hydrocarbon receptor and the beta-catenin pathway. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 122(1), 16–25.
- Choi, S.-W., & Friso, S. (2010). Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Advances in Nutrition*, 1(1), 8–16.

- Ebrahem, Q., Mahfouz, R. Z., Ng, K. P., & Sauntharajah, Y. (2012). High cytidine deaminase expression in the liver provides sanctuary for cancer cells from decitabine treatment effects. *Oncotarget*, 3(10), 1137–45.
- Fallone, F., Villard, P. H., Decome, L., Séréé, E., Méo, M. De, Chacon, C., ... Lacarelle, B. (2005). PPAR α activation potentiates AhR-induced CYP1A1 expression. *Toxicology*, 216(2–3), 122–128.
- Fallone, F., Villard, P. H., Séréé, E., Rimet, O., Nguyen, Q. B., Bourgarel-Rey, V., ... Lacarelle, B. (2004). Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(2), 551–556.
- Fraczek, J. E., Vinken, M., Tourwé, D., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2012). Synergetic effects of DNA demethylation and histone deacetylase inhibition in primary rat hepatocytes. *Investigational New Drugs*, 30(4), 1715–24.
- Gordon, K., Clouaire, T., Bao, X. X., Kemp, S. E., Xenophontos, M., De Las Heras, J. I., & Stancheva, I. (2014). Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Research*, 42(6), 3529–3541.
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R. H., Kvietikova, I., Fhitelaw, M. L., Toftgård, R., ... Poellinger, L. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5221–5231.
- Haarmann-Stemmann, T., & Abel, J. (2006). The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): Structure, expression, and function. *Biological Chemistry*, 387(9), 1195–1199.

- Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. (1998). Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2895–2904.
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - "A rough guide." *FEBS Letters*, 583(11), 1713–1720.
- Ioshikhes, I. P., & Zhang, M. Q. (2000). Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nature Genetics*, 26(1), 61–63.
- Itoh, Y., Suzuki, T., & Miyata, N. (2013). Small-molecular modulators of cancer-associated epigenetic mechanisms. *Molecular bioSystems*, 9(5), 873–96.
- Jones, P. A., & Taylor, S. M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20(1), 85–93.
- Lin, Y., Yao, Y., Liu, S., Wang, L., Moorthy, B., Xiong, D., ... Gu, J. (2012). Role of mammary epithelial and stromal P450 enzymes in the clearance and metabolic activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in mice. *Toxicology Letters*, 212(2), 97–105.
- Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reinhardt, D., Cruickshanks, H. A., Mjoseng, H. K., McPherson, R. C., ... Meehan, R. R. (2015). Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. *Genome Biology*, 16(1), 11.
- Niculescu, M. D., & Zeisel, S. H. (2002). Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2333S–2335S.
- Nukaya, M., & Bradfield, C. A. (2009). Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 654–659.

- Ohno, M., Ikenaka, Y., & Ishizuka, M. (2012). All-trans retinoic acid inhibits the recruitment of ARNT to DNA, resulting in the decrease of CYP1A1 mRNA expression in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 484–489.
- Okino, S. T., Pookot, D., Li, L. C., Zhao, H., Urakami, S., Shiina, H., ... Dahiya, R. (2006). Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive Cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer. *Cancer Research*, 66(15), 7420–7428.
- Pereira, M. A., Wang, W., Kramer, P. M., & Tao, L. (2004). DNA hypomethylation induced by non-genotoxic carcinogens in mouse and rat colon. *Cancer Letters*, 212(2), 145–151.
- Rendic, S., & Guengerich, F. P. (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1316–1383.
- Rivière, G., Lienhard, D., Andrieu, T., Vieau, D., Frey, B. M., & Frey, F. J. (2011). Epigenetic regulation of somatic angiotensin-converting enzyme by DNA methylation and histone acetylation. *Epigenetics*, 6(4), 479–490.
- Rothbart, S. B., & Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), 627–643.
- Schnekenburger, M., Talaska, G., & Puga, A. (2007). Chromium cross-links histone deacetylase 1-DNA methyltransferase 1 complexes to chromatin, inhibiting histone-remodeling marks critical for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7089–101.
- 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.

- Schütze, D. M., Kooter, J. M., Wilting, S. M., Meijer, C. J. L. M., Quint, W., Snijders, P. J. F., & Steenbergen, R. D. M. (2015). Longitudinal assessment of DNA methylation changes during HPVE6E7-induced immortalization of primary keratinocytes. *Epigenetics*, 10(1), 73–81.
- Seenappa, V., Das, B., Joshi, M. B., & Satyamoorthy, K. (2016). Context Dependent Regulation of Human Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Isoforms by DNA Promoter Methylation and ARN Stability. *Journal of Cellular Biochemistry*, 9999, 1–15.
- Sérée, E., Villard, P. H., Pascussi, J. M., Pineau, T., Maurel, P., Nguyen, Q. B., ... Barra, Y. (2004). Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR- α and 2 PPRE sites. *Gastroenterology*, 127(5), 1436–1445.
- Tamási, V., Vereczkey, L., Falus, A., & Monostory, K. (2003). Some aspects of interindividual variations in the metabolism of xenobiotics. *Inflammation Research*, 52(8), 322–333.
- Tsuji, N., Fukuda, K., Nagata, Y., Okada, H., Haga, A., Hatakeyama, S., ... Itoh, H. (2014). The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio*, 4, 796–803.
- Vaas, S., Kreft, L., Schwarz, M., & Braeuning, A. (2014). Cooperation of structurally different aryl hydrocarbon receptor agonists and β -catenin in the regulation of CYP1A expression. *Toxicology*, 325, 31–41.
- Vecchini F., Lenoir-Viale M.C., Cathelineau C., Magdalau J., Bernard B. A. & Shroot B. (1994). Presence of a retinoid responsive element in the promoter region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201(3), 1205-1212.

- Walsh, A. A., Szklarz, G. D., & Scott, E. E. (2013). Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12932–12943.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–66.
- Williams G. M. & Iatropoulos M.J. (2002). Distinguishing adverse from non-adverse effects In drug development. *Toxicologic pathology*, 30(1), 41–53.
- Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., ... Ball, S. E. (2004). Minireview, Drug–drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCI/AUC) ratios. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(11), 1201–1208.
- Wilson, V. L., Jones, P. A., & Momparler, R. L. (1983). Inhibition of DNA methylation in L1210 leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine as a possible mechanism of chemotherapeutic action. *Cancer Research*, 43(8), 3493–3496.
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473–486.
- Wozniak, R. J., Klimecki, W. T., Lau, S. S., Feinstein, Y., & Futscher, B. W. (2007). 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene*, 26(1), 77–90.
- Yoshinari, K., Yoda, N., Toriyabe, T., & Yamazoe, Y. (2010). Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and

CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 50-flanking region. *Biochemical Pharmacology*, 79(2), 261–269.

- Zhang N., Walker M.K. (2007). Crosstalk Between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia on the Constitutive Expression of Cytochrome P4501A1 mRNA. *Cardiovascular Toxicology*, 7(4), 282–290.
- Zheng, Z., Li, L., Liu, X., Wang, D., Tu, B., Wang, L., ... Zhu, W. G. (2012). 5-Aza-2'-deoxycytidine reactivates gene expression via degradation of pRb pocket proteins. *Faseb Journal*, 26(1), 449–459.