



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ACTIVACIÓN DEL EJE AhR/Src/ERK EN LA INDUCCIÓN DE CYP1A1 Y
GENOTOXICIDAD MEDIADA POR BENZO[A]PIRENO EN CÉLULAS DE
EPITELIO PULMONAR HUMANO, BEAS-2B

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. GERARDO VÁZQUEZ GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
COMITÉ TUTOR:

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES (FES) IZTACALA

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2018



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.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Julieta Rubio Lightbourn. Agradezco el apoyo de la beca doctoral CONACyT No. 233838

A MIS PADRES y ABUELOS

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

A la Dra. Julieta Rubio Lightbourn

A mi comité tutorial, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Al Dr. Pavel Petrosyan

Al CONACyT

A todos los alumnos y compañeros del Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Índice

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	8
Benzo[a]pireno	10
Metabolismo del B[a]P	11
El receptor de hidrocarburos de arilo	12
Activación del AhR	14
Fase I del metabolismo d xenobióticos de xenobióticos	15
Fase II del metabolismo de xenobióticos	16
Regulación de la vía de AhR	17
Toxicidad del B[a]P dependiente de AhR	17
Interacción AhR /MAPK	18
Cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos	21
Planteamiento del problema	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Hipótesis	22
Materiales y métodos	23
Líneas celulares y condiciones de cultivo	23
Reactivos	23
Viabilidad celular y ensayos de inhibición	23
Evaluación de la expresión de CYP1A1 mediante RT-PCR semicuantitativo	24
Análisis de Western blot	24
Determinación de aductos en DNA	25
Análisis estadísticos	25
Resultados	26
AhR es expresado en células BEAS-2B	26
B[a]P activa la expresión de CYP1A1	27
La exposición a B[a]P induce la activación de las cinasas ERK 1/2	28
ERK 1/2 regula la expresión de CYP1A1 inducida por B[a]P	29
La cinasa Src modula la activación de ERK 1/2 y la inducción de la enzima CYP1A1 mediadas por B[a]P	30
La inhibición de la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 previene la formación de aductos B[a]P-N2-dG	31
La translocación nuclear de AhR es modulada por las cinasas Src y ERK 1/2	32
Discusión	33
Conclusión	35
Literatura citada	35

1. Resumen

El benzo[a]pireno, B[a]P es un hidrocarburo aromático policíclico producto de combustiones incompletas de materia orgánica. Es un carcinógeno presente en el humo de tabaco y está relacionado con la incidencia de cáncer de pulmón. La capacidad carcinogénica del B[a]P reside en su biotransformación, que conlleva la generación de metabolitos tóxicos capaces de interactuar y dañar a los componentes celulares. El B[a]P es metabolizado principalmente por el citocromo P450 1A1 que forma parte de la vía de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo, AhR. Algunos estudios sugieren que el AhR, además de mediar la respuesta a xenobióticos, es capaz de modular otros procesos celulares, tales como diferenciación, proliferación, adhesión y/o apoptosis. Esto mediante la activación de la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógenos, MAPK. Sin embargo, la participación de las MAPK en la activación metabólica del B[a]P y en la generación de daño celular en tejido pulmonar de humano no se conoce en su totalidad. En este estudio se usó una línea celular no transformada derivada de tejido bronco epitelial de humano, BEAS-2B para determinar la participación de las cinasas ERK 1/2 en la activación metabólica del B[a]P y en la producción de daño genotóxico. Los resultados indican que, a concentraciones relativamente bajas, el B[a]P no es citotóxico para la línea celular BEAS-2B, sin embargo induce la transcripción de *CYP1A1* y un aumento en la concentración de su proteína. Adicionalmente, promueve la fosforilación de las cinasas Src y ERK 1/2. Por otro lado, la inhibición de la fosforilación de la cinasa Src y ERK 1/2 bloquea la translocación del AhR al núcleo promovida por el B[a]P, teniendo como consecuencia una disminución en la producción de la enzima CYP1A1 y en la producción de aductos de B[a]P. Estos resultados sugieren que existe una intercomunicación de las vías AhR y MAPK mediada por la cinasa Src, en células pulmonares expuestas a B[a]P y que esta intercomunicación es importante para que se lleve a cabo la vía de señalización del AhR mediada por B[a]P.

Abstract

Benzo[a]pyrene (B[a]P), is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) produced by incomplete combustion of organic matter. B[a]P is the most extensively studied carcinogen in cigarette smoke and has been regarded as a critical promoter of lung cancer. It is known that B[a]P-mediated Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) activation stimulates the mitogen activated protein kinases (MAPK) signaling cascade in different cell models. MAPK pathway disturbances drive alterations in cellular processes *e.g.* differentiation, proliferation, apoptosis and it also may modify the AhR pathway itself. However, MAPK involvement in B[a]P metabolic activation and toxicity in human lung tissues is not well understood. Here we used a non transformed human bronchial epithelial lung cell line, BEAS-2B to study the participation of ERK 1/2 kinases in the metabolic activation of B[a]P and its related genotoxic effects. Our results suggest that at relatively low concentrations, B[a]P is not cytotoxic to BEAS-2B cells but it enhances *CYP1A1* gene transcription and protein induction. Additionally, B[a]P promotes Src and ERK 1/2 phosphorylation. Accordingly, inhibition of both Src and ERK 1/2 phosphorylation decreases AhR nuclear translocation, *CYP1A1* protein induction and production of B[a]P adducts. Together, these data suggest a crosstalk between AhR and MAPK pathways mediated by Src kinase that is necessary for adequate AhR signaling pathway mediate by B[a]P.

2. Introducción

Los humanos diariamente estamos expuestos a una gran cantidad de compuestos químicos presentes en el aire, agua o en la comida [1]. Estos compuestos pueden ser contaminantes tóxicos y causar efectos adversos a la salud de individuos o a las poblaciones expuestas. Uno de los principales contaminantes presentes en el ambiente son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés). Los PAH son compuestos químicos conformados estructuralmente por dos o más anillos aromáticos fusionados [2-4]. Son producto de combustiones incompletas de combustibles fósiles, madera, carbón y tabaco, entre otros. Son componentes importantes del material particulado de 2.5 micras y 10 micras de tamaño (PM 2.5 y PM 10, respectivamente) los cuales se han relacionado con alteraciones respiratorias [5-7]. El benzo[a]pireno (B[a]P) es un PAH, considerado como carcinógeno y está relacionado con la etiología de cáncer de pulmón [7]. Este compuesto es metabolizado mediante la vía de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) donde se generan compuestos altamente mutagénicos y carcinogénicos [8-10]. Los efectos carcinogénicos de B[a]P pueden ser explicados, en términos generales, por dos mecanismos: la vía genómica y la vía no genómica. La primera consiste en la inducción de genes blanco del AhR que codifican enzimas que participan en la bioactivación del B[a]P a metabolitos carcinogénicos. El segundo mecanismo tiene que ver con la participación del AhR en la estimulación, promoción y progresión de tumores, mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y con el sistema inmune, entre otras, como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés). Es probable que las vías genómica y no genómica participen coordinadamente en diversos procesos celulares incluido el metabolismo de B[a]P. Sin embargo, no es clara la función de las MAPK en estos procesos ni cómo el AhR es capaz de interactuar con otras vías de señalización. Las alteraciones celulares inducidas por B[a]P son complejas y pueden estar mediadas por más de una vía de señalización, por lo que es esencial saber qué vías están involucradas en el metabolismo de los PAH para una mejor comprensión de las bases moleculares de enfermedades relacionadas con la exposición a PAH como el cáncer de pulmón.

3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los PAH (Figura 1) son compuestos orgánicos de naturaleza lipofílica, su estructura está conformada por dos o más anillos aromáticos fusionados y su solubilidad en el agua disminuye conforme aumenta el número de anillos que los conforman [2-4]. Los PAH son uno de los contaminantes ambientales con mayor abundancia en el ambiente. Son formados durante procesos de pirólisis y combustiones incompletas de materia orgánica ya sea de origen antropogénico y/o natural. Estos contaminantes no se presentan en la naturaleza como compuestos individuales sino que se presentan en mezclas complejas, la composición y concentración de sus componentes dependerá del material quemado y de las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la combustión [11]. Las fuentes naturales incluyen incendios forestales y erupciones volcánicas. Cabe señalar que la emisión de PAH por fuentes naturales es completamente marginal. La principal fuente de emisiones proviene de procesos industriales relacionados con la quema de aceite o carbón, quema de combustibles fósiles y el humo de tabaco [12-13]. Los PAH han sido detectados en una gran variedad de muestras ambientales,

incluyendo el aire, suelo, sedimentos, agua, aceites, alquitrán y alimentos. La concentración de los PAH de manera individual en el aire de zonas urbanas puede oscilar entre 1-30 ng/m³. Sin embargo, la concentración puede aumentar en túneles carreteros o en ciudades donde se utiliza el carbón o biomasa como combustible para el calentamiento de las viviendas [14].

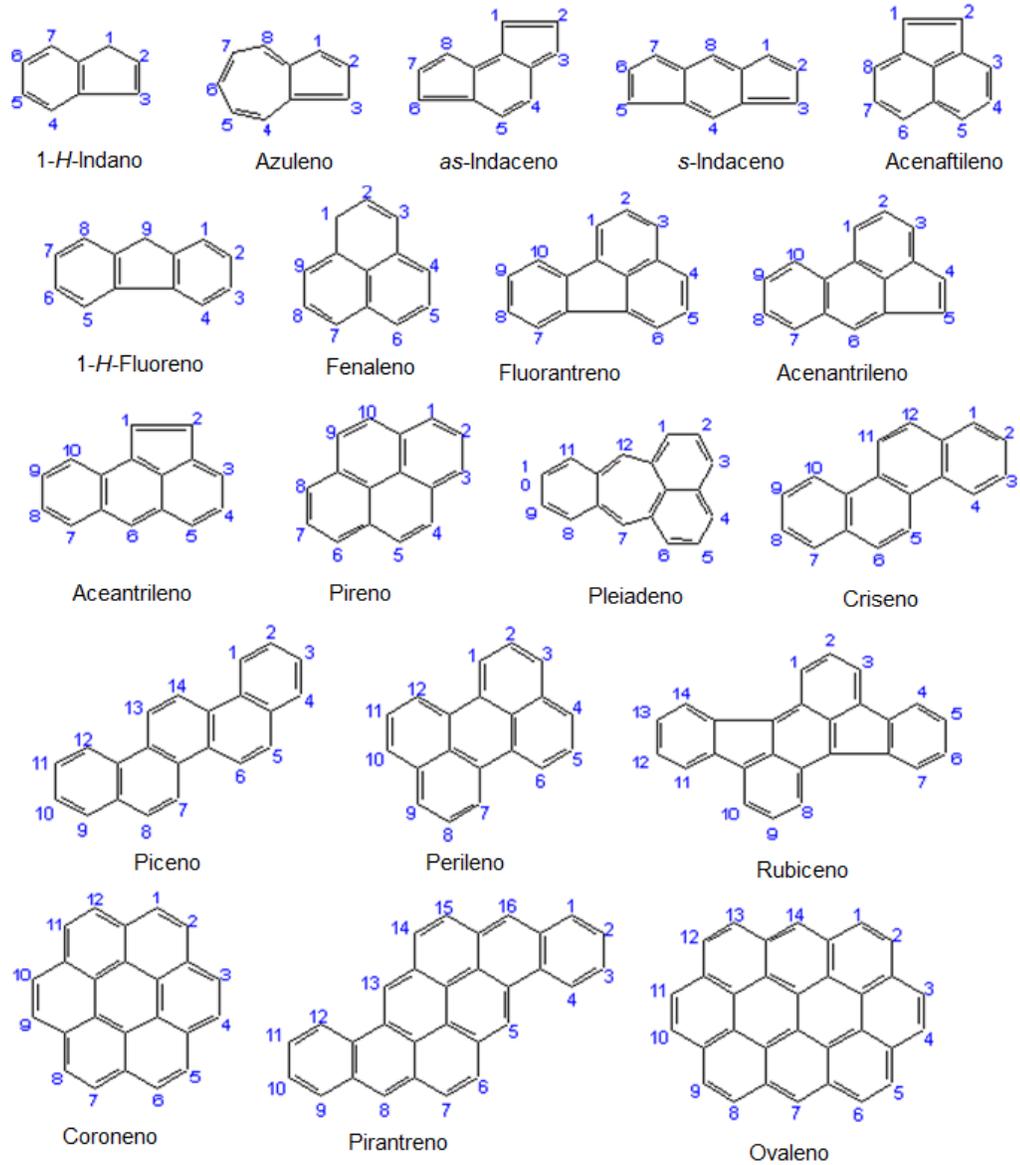


Figura 1. Estructuras química de algunos PAH

Por otro lado, las concentraciones de PAH que una persona puede ingerir en alimentos procesados en fuego, como la carne asada, pueden variar desde nanogramos hasta miligramos al día [14].

La exposición ocupacional a los PAH se da principalmente a través de la inhalación o el contacto con la piel. Los mayores niveles de exposición a PAH se han reportado en la industria de la producción de aluminio, donde las concentraciones de PAH pueden alcanzar los $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ [14-15]. Como contaminantes, los PAH son de gran importancia ya que algunos de estos compuestos han sido identificados como mutagénicos, teratogénicos y/o cancerígenos para los humanos.

4. Benzo[a]pireno

El B[a]P (Figura 2) es uno de los PAH más estudiados y discutidos, particularmente por sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Fue el primer carcinógeno identificado en el humo de tabaco [16]. Actualmente está catalogado dentro del grupo 1 (carcinógeno para humanos) por la Agencia Internacional para Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) [16].

El B[a]P es un contaminante persistente en el ambiente. Las principales vías de exposición son la absorción a través de la piel, la ingesta en alimentos y la inhalación; las dos primeras se estiman en 76 ng/día. Por otro lado, la concentración inhalada dependerá en gran medida del estilo de vida. Por ejemplo, se estima que por cada cigarrillo se inhalan en promedio 20-40 ng de B[a]P [17]. Después de ingresar al organismo, el B[a]P puede encontrarse en el hígado, riñón y el torrente sanguíneo [18-24]. Adicionalmente, se ha reportado que el B[a]P es capaz de atravesar la barrera transplacentaria y hematoencefálica [25]. La naturaleza lipofílica del B[a]P favorece su distribución y almacenamiento en tejidos grasos incluyendo tejido mamario y médula ósea. Estudios de fluorescencia muestran que el B[a]P es capaz de entrar rápidamente al interior de la célula mediante difusión y alcanzar un máximo después de 10 min. Una vez dentro de la célula, el B[a]P puede localizarse en diferentes organelos, por ejemplo, retículo endoplasmático, aparato de golgi, membrana plasmática y envoltura nuclear. Sin embargo, también se ha encontrado acumulado en lisosomas, matriz mitocondria y en el núcleo [26].

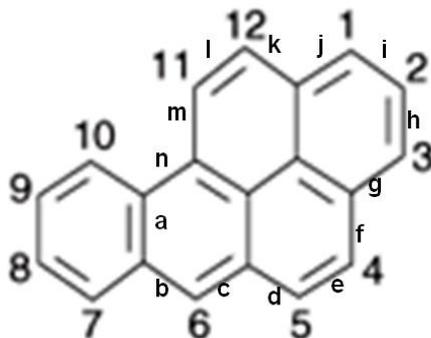


Figura 2. Estructura química del B[a]P

5. Metabolismo del B[a]P dependiente de AhR

El metabolismo de B[a]P (Figura 3) se lleva a cabo principalmente mediante la vía de señalización del Receptor de hidrocarburos de Arilo (AhR, por sus siglas en inglés) [8-10]. El AhR es un factor de transcripción citoplasmático que se activa por la unión de un ligando, en este caso el B[a]P. Una vez activado el AhR, es translocado al núcleo donde se une al Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos de Arilos (ARNT, por sus siglas en inglés). Esta unión da lugar a la formación de un factor de transcripción, el cual se une a una secuencia consenso en el DNA denominada elemento de respuesta a xenobióticos ((ERX) 5-GCGTGA-3). De esta manera inicia la vía de desintoxicación y/o bioactivación del B[a]P, la cual consta de dos fases, fase I y II del metabolismo de xenobióticos [27].

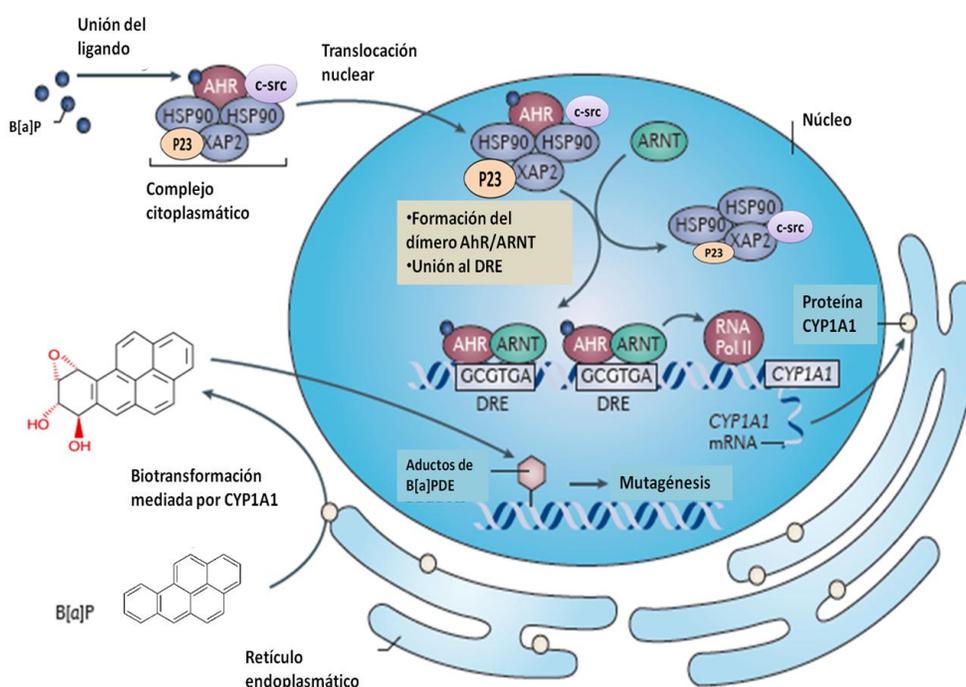


Figura 3. Metabolismo del B[a]P. El receptor en su forma inactiva (sin un ligando unido) se localiza en el citoplasma celular formando un complejo con un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (P23) y una proteína de interacción con AhR parecida a inmunofilina (AIP), también conocida como XAP2. Adicionalmente en algunos modelos celulares se ha descrito la presencia de una cinasa de tirosina (Src). Una vez unido su ligando, el complejo AhR se transloca al núcleo y forma un heterodímero con la proteína ARNT. Este heterodímero es capaz de unirse a los XRE (GCGTGA) y reclutar coactivadores y así favorecer la transcripción de sus genes blanco como el *CYP1A1*. Este citocromo metabolizará al B[a]P en intermediarios que pueden interactuar con el DNA para formar aductos iniciando así un proceso carcinogénico. Modificado de Murray *et al.*, 2014 [28].

6. El receptor de hidrocarburos de arilo

El AhR es un factor de transcripción citoplasmático perteneciente a la familia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (*basic helix loop helix*-PER ARNT-SIM) [29, 30]. Esta familia de proteínas desempeña un papel importante en diversos procesos celulares tales como desarrollo, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y metabolismo de xenobióticos ya que forman factores de transcripción que inducen genes involucrados en los procesos antes mencionados [31]. Estas proteínas se dividen en dos clases: Clase I (α) y clase II (β). La expresión de las proteínas de la clase I, generalmente está restringida a un tejido, como el cerebro, o es regulada por una señal y forman heterodímeros sólo con las proteínas de la clase II, mientras que las proteínas de la clase II, es ubicua o su expresión no está sometida a regulación y puede formar homodímeros con proteínas de su misma clase [32]. Por ejemplo, la expresión del AhR o el factor inducible por hipoxia alfa (HIF- α), en humano, es inducible. Esta proteína dimeriza con el translocador nuclear del receptor de arilos (ARNT) el cual, por lo general, es ubicuo o su expresión no está sometida a regulación (Figura 4). El AhR fue uno de los primeros factores de transcripción perteneciente a la familia bHLH en ser descubierto y estudiado. Su cDNA fue clonado por primera en el año 1992 [33, 34]. El gen fue caracterizado en 1993 [35] y desde entonces se han clonado homólogos de AhR de diferentes especies. El receptor AhR en mamíferos presenta tres dominios funcionales. Un dominio altamente conservado bHLH que consiste de 4 a 6 aminoácidos ácidos en el extremo amino terminal. Este dominio tiene la función de interacción con el DNA. El segundo dominio son dos repetidos de los dominios PAS (PAS A y PAS B) cada dominio está formado aproximadamente por 110 aminoácidos. Análisis estructurales, bioquímicos y de interacción de proteínas sugieren que el dominio PAS A está relacionado con la dimerización mientras que PAS B, funciona como dominio de señalización [30, 36] El tercer dominio (Q), es esencial en la transactivación. Es un dominio poco conservado y se localiza en el extremo carboxilo terminal [37] (Figura 5).

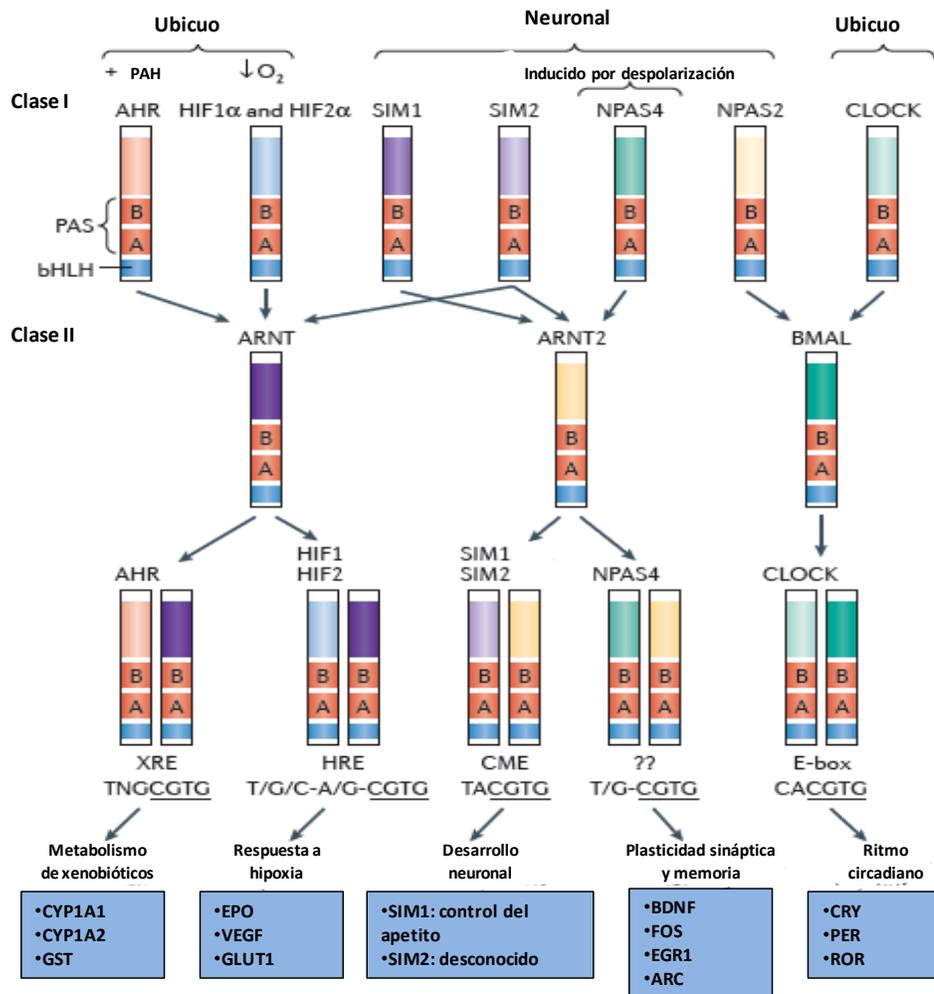


Figura. 4 Estructura y función de las proteínas de las clases I y II de la familia bHLH-PAS. Se muestran ejemplos de los factores de transcripción heterodiméricos bHLH-PAS. Los dímeros son formados por la interacción entre los factores de la clase I y los factores de la clase II (como lo indica las flechas). La expresión de los factores de la clase I posiblemente está restringida a un tejido (como la proteína neuronal con dominio PAS (NPAS)) o se active en respuesta a un estímulo, como el AhR. Los heterodímeros se unen a secuencias específicas en el DNA y regulan la expresión de genes blanco. De este modo, son capaces de controlar diversos procesos celulares en el desarrollo, homeostasis celular o en procesos celulares en respuesta a un estrés fisiológico. Los factores de transcripción pertenecientes a la clase II son capaces de formar dímeros con más de un factor de la clase I aunque algunas combinaciones pueden ser limitadas *in vivo*. Por ejemplo, la expresión del factor ARNT2 está restringida a neuronas y es funcional sólo cuando dimeriza con el factor SIM1. Otro ejemplo es el AhR, este factor unido a un ligando puede dimerizar con ARNT o ARNT2 *in vitro*. Sin embargo, sólo los dímeros AhR/ARNT pueden activar la transcripción de sus genes blanco [38]. ARC, proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad; BDNF, factor neurotrófico derivado de cerebro; CME, elemento central de la línea media; CLOCK, CRY, criptocromos; CYP1A1, citocromo P4501A1; EGR1, proteína de respuesta de crecimiento temprano 1; EPO, eritropoyetina; GLUT 1, transportador de glucosa 1; GST, glutatión S-transferasa; HRE, elemento de respuesta a hipoxia; PER,

proteína homóloga del ciclo circadiano; ROR, receptor huérfano relacionado al ácido retinoico; SIM proteína *single-minded*; VEGF, factor de crecimiento endotelio vascular; XRE, elemento de respuesta a xenobióticos [39].



Figura 5. Estructura del AhR de humano. Se muestran los dominios funcionales. A y B, secuencias de repetidos de nucleótidos presentes en el dominio PAS; bHLH, dominio con estructura básica de hélice-bucle-hélice; dominio de unión de proteína de choque térmico de 90 KDa HSP90; Q, dominio rico en glutamina; TAD, dominio de activación transcripcional; LBD, dominio de unión a ligando. los números representan los aminoácidos de la proteína [39].

6.1. Activación del AhR

El AhR en estado latente (sin un ligando unido) se localiza predominantemente anclado en el citoplasma de la célula como parte de un complejo heterodimérico 9S. Este complejo está formado por un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (p23) y una proteína de interacción con AhR parecida a inmunofilina (AIP), también conocida como XAP2 o Ara9. Adicionalmente, en diversos modelos, se ha descrito la presencia de otras proteínas citosólicas incluyendo la chaperona (Cdc37) y una cinasa de tirosina (Src) [40-42] (Figura 3). La activación del AhR está dada por la unión de un ligando. Estos ligandos generalmente son xenobióticos, de naturaleza hidrofóbica y estructura plana, pueden ser de origen natural, como los PAH o sintético como los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAH, por sus siglas en inglés). Además de unirse a xenobióticos, se ha reportado que el AhR es capaz de unir compuestos endógenos como la bilirrubina [42], lipoxina A4 [43] y derivados del triptófano [44].

La activación de AhR se caracteriza por su translocación al núcleo y la disociación del complejo al cual está unido en el citoplasma. Una vez en el núcleo, el AhR, forma un heterodímero con la proteína Translocador Nuclear del Receptor de Arilos (ARNT). Este heterodímero AhR/ARNT interacciona con proteínas acetil transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que resulta en la unión del complejo AhR/ARNT a una secuencia de DNA consenso (GCGTGA) conocida como elemento de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta a dioxinas (XRE, DRE). Esta secuencia está localizada aproximadamente a 1 Kb río arriba de sus genes blanco [44-45]. Dentro de estos genes blanco se incluyen aquéllos que codifican enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos, representada por los citocromos P450 de la familia 1 y genes que codifican enzimas de la fase II, la cual incluye a las GST.

La habilidad de AhR de unir xenobióticos y mediar una respuesta adaptativa que involucra la inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos puede ser una función exclusiva de vertebrados debido a que en invertebrados el AhR no es capaz de unir xenobióticos [46]. En estos últimos, el AhR participa en procesos de desarrollo, por ejemplo, en *D. melanogaster* es esencial para el correcto desarrollo de los segmentos distales de las antenas y alas [47] mientras que en *Caenorhabditis elegans*, el AhR participa en la diferenciación neuronal [48].

6.2. Fase I del metabolismo de xenobióticos activada por B[a]P

En la primera fase, el B[a]P es oxidado por citocromos P450 de la familia 1, principalmente por el CYP1A1. En este proceso de oxidación se generan los metabolitos (+) - y (-) -B[a]P- 7, 8-óxidos, con una tasa de conversión mucho más alta del enantiómero (+) -. Posteriormente, la epóxido hidrolasa (EH) hidroliza estos óxidos formando (-) - y (+) -b[a]p-7, 8-dioles, que son oxidados una vez más por CYP1A1, generando los últimos metabolitos de la vía (+) -b[a]p-7,8-diol-9, 10-epóxido(I), (-)-b[a]p-7,8-diol-9, 10-epóxido(II), (+)-b[a]p-7,8-diol-9, 10-epóxido(I) y (-)-b[a]p-7,8-diol-9, 10-epóxido(II) (BPDE) [49-50], como se muestra en la Figura 6.

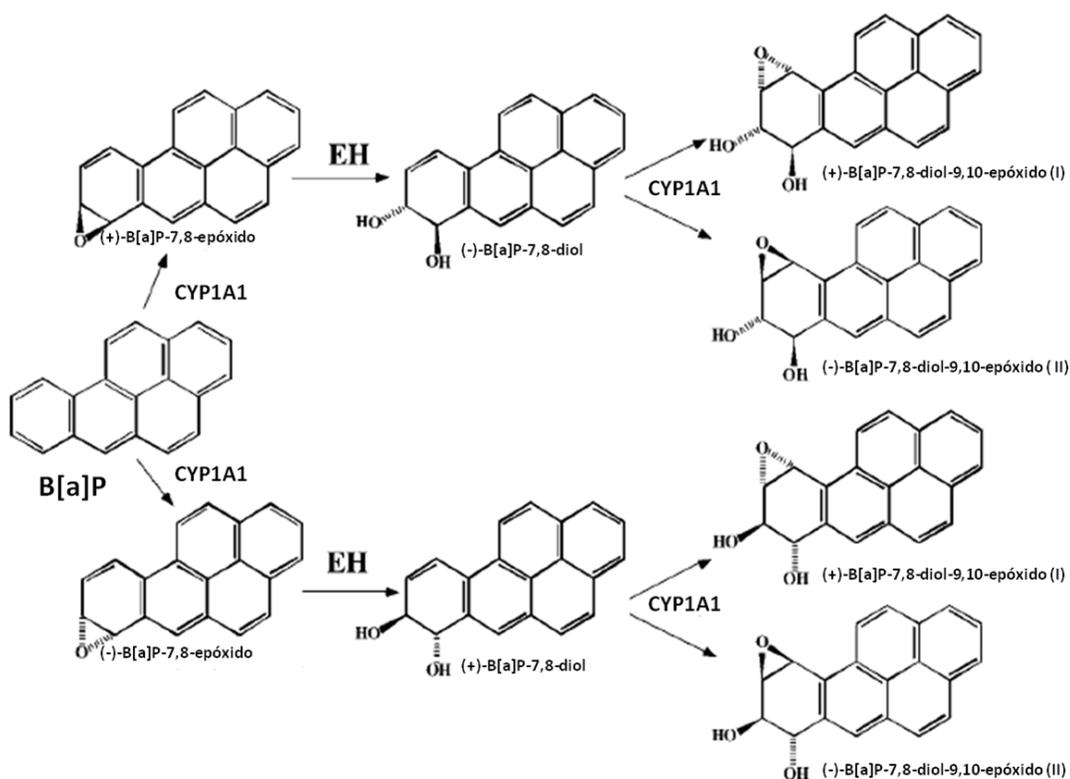


Figura 6. Generación de metabolitos de B[a]P en la fase I del metabolismo de xenobióticos [51].

6.3. Fase II del metabolismo de xenobióticos

La fase II consiste en la conjugación de los BPDE generados en la fase I con moléculas polares. (Figura 7). Las enzimas de la fase II que catalizan la conjugación tienen diferente especificidad por sus sustratos, el nivel de expresión depende del tipo de tejido y el estado de desarrollo del organismo y pueden ser inducibles o inhibidas por xenobióticos [52]. Se han descrito diversas enzimas que participan en la fase II, por ejemplo, sulfotransferasas (SULT) [53], UDP-glucuronosiltransferasas (UGT) [54], DT-diaforasas o NAD(P)H:quinona oxidoreductasas (NQO), NAD(P)H:menadiona reductasas (NMO) [55], epóxido hidrolasas (EH), glutatión S-transferasas (GST) [56] y *N*-acetiltransferasas (NAT) [57]. Sin embargo, las GST son las principales enzimas que participan en esta fase [58]. El patrón de distribución y expresión de las GST es complejo, de hecho, los diferentes tipos celulares presentes en un mismo tejido tienen distintos patrones de expresión. Adicionalmente, los patrones de distribución interindividual también pueden variar. Por ejemplo, en el humano los patrones de expresión de las GST en el pulmón pueden variar debido a la presencia de polimorfismos en genes que codifican a las enzimas [59]. Las GST catalizan la conjugación de glutatión (GSH) con BPDE lo que generalmente disminuye la hidrofobicidad de los BPDE, y por lo tanto, aumenta su excreción por medio de la bilis u orina [60]. Este mecanismo es considerado la vía de inactivación de BPDE más importante [61-62]. Las tres isoformas de GST mejor conocidas son GST μ , ψ y π ; las isoformas μ y π tienen múltiples sustratos que incluyen al BPDE, acroleína y otros carbonilos insaturados generados por peróxidos lipídicos y daño oxidante al DNA [63-65]. La isoforma GST μ presenta la mayor actividad enzimática en la conjugación de BPDE seguida de las isoformas π ψ [66-67].

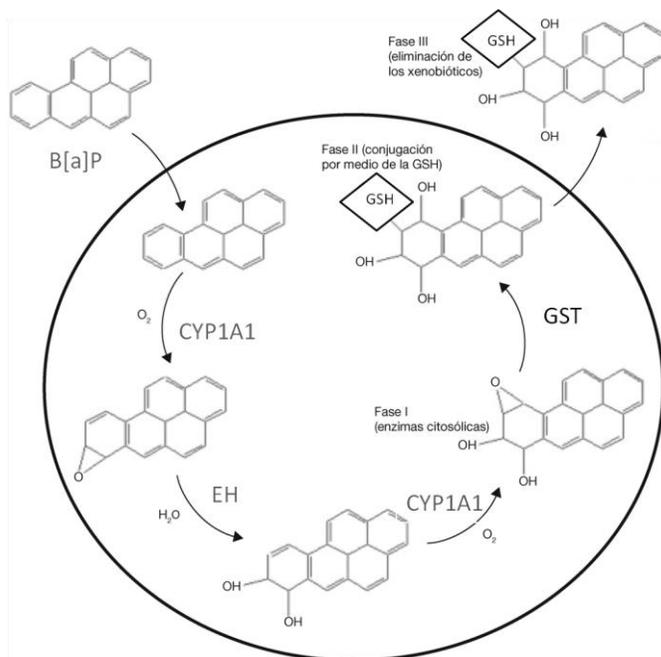


Figura 7. Fase II del metabolismo de xenobióticos. Conjugación de los metabolitos BPDE con glutatión mediante la acción de la enzima GST.

6.4. Regulación de la vía de AhR

Desde su descubrimiento en mamíferos, se pensó que la única función del AhR era la de participar en la respuesta adaptativa al estrés celular, actuando como un sensor de señales endógenas o inducidas por xenobióticos. Sin embargo, existe evidencia experimental que vincula a AhR con la alteración de diversos procesos celulares como proliferación celular, apoptosis, diferenciación, promoción de tumores, y procesos relacionados con la reproducción y respuesta inmune [68]. Esto sugiere que además de ser un sensor de xenobióticos, el AhR es esencial en la homeostasis celular. No obstante, los mecanismos por los cuales desempeña este último papel son poco conocidos. Adicionalmente, la capacidad de respuesta de AhR difiere entre especies y tipo celular, lo que puede ser un indicativo de la posible interacción con múltiples vías de señalización y de la complejidad de su papel. Debido a que AhR puede estar involucrado en diversos procesos celulares, su señalización debe ser estrictamente regulada. Para esto, las células han desarrollado diferentes estrategias para evitar una alteración en los procesos celulares debido a una sobreestimulación de la vía de señalización del AhR.

Al ser una señal (ligando) el factor regulador de su transcripción, el mecanismo más directo de regular la vía es la eliminación la señal de estimulación. Por ejemplo, la activación de AhR conlleva a una sobreexpresión de enzimas de las fases I y II del metabolismo de xenobióticos los cuales las cuales oxidan y forman derivados de los ligandos, facilitando su remoción por medio de transportadores de membrana dependientes de ATP [69]. Otro mecanismo por el cual la célula es capaz de disminuir la señalización de AhR es por medio de su degradación vía proteosoma 26 S [70]. La actividad de AhR también puede ser modulada por medio de la secuencia de exportación nuclear presente en AhR. Esta secuencia, al ser fosforilada, permite que el AhR, en su forma activa, pueda ser exportado del núcleo hacia el citoplasma y de esa manera evitar la inducción de la transcripción génica [71]. Por otro lado, la activación de AhR induce la transcripción del represor de AhR (AhRR). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual AhRR reprime la vía de AhR no es conocido, aunque se ha sugerido que el AhRR es capaz de competir directamente con AhR *in vitro*, formando un dímero con ARNT y de esta manera evitar la transcripción de sus genes blanco [72].

7. Toxicidad del B[a]P dependiente de AhR

El B[a]P es un compuesto inerte, sus efectos carcinogénicos pueden ser explicados, en términos generales, por dos mecanismos que están directamente relacionados con la activación del AhR. En el primer mecanismo se describe como una vía genómica y el segundo como una vía no genómica. La primera consiste en la inducción de genes blanco del AhR que codifican enzimas que participan en la biotransformación del B[a]P a metabolitos carcinogénicos como el BPDE, capaz de formar aductos en el DNA e inducir mutaciones en genes supresores de tumores como el gen *TP53* [73]. El segundo mecanismo tiene que ver con la estimulación, promoción y progresión de tumores, mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y el sistema inmune, como lo es, la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Sin embargo, este mecanismo no ha sido del todo estudiado y no es claro cómo se da la interacción entre la vía de señalización del AhR y la vía de las MAPK.

La capacidad mutagénica del B[a]P reside en su biotransformación a través de la vía de señalización del AhR en donde se induce la producción de la enzima CYP1A, la cual cataliza la conversión del B[a]P a BPDE (Figura 3). Los BPDE son considerados metabolitos carcinógenos debido a su capacidad de formar aductos al unirse covalentemente al DNA, específicamente en la posición N2 de la guanina (aductos B[a]P-N2-dG) [74] (Figura 8). Si estos aductos no son reparados adecuadamente se pueden generar mutaciones en la zona de la lesión y de esta manera conducir a una transformación celular. Un ejemplo clásico de ello son los aductos B[a]P-N2-dG que se han encontrado en sitios específicos dentro de la secuencia del gen supresor de tumores *TP53* [75].

Las actividades carcinogénica y mutagénica de los BPDE se atribuyen a la presencia del grupo epóxido en la posición C-9,10, también llamada región bahía [76-81].

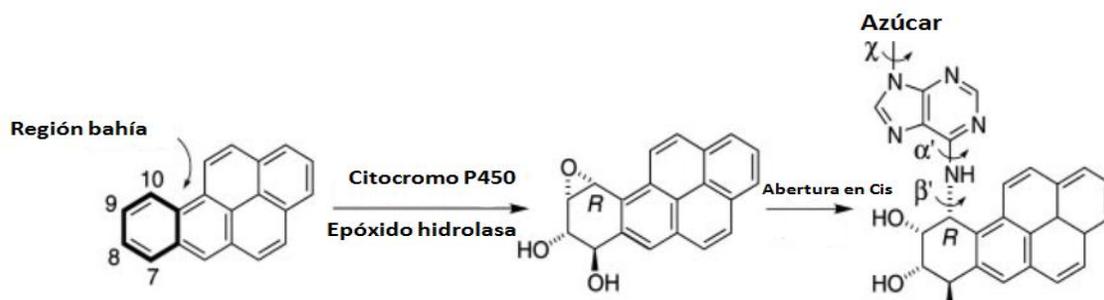


Figura 8. Estructura química del B[a]P y su biotransformación. Formación del metabolito BPDE por las enzimas CYP450 y epóxido hidrolasas, así como su unión a la adenina del DNA formando un aducto. Se muestra la apertura en *cis* del diol epóxido (DE) del B[a]P y su unión en la posición **N6 de la adenina** [82].

8. Interacción AhR/MAPK

Como se mencionó anteriormente, la activación de AhR por la unión de un ligando puede alterar procesos celulares como la proliferación, adhesión, diferenciación y/o muerte celular, y de esta manera, favorecer el proceso de iniciación y progresión de tumores. Evidencia experimental sugiere que la cascada de señalización de las MAPK es la mediadora de estas alteraciones [39]. Los modelos que se han propuesto sugieren que la unión de un ligando al AhR favorece que el complejo proteínico al cual se encuentra unido en el citoplasma se disocie, liberando así a la proteína tirosina de cinasas Src (Figura 9). Una vez libre, la cinasa Src, es capaz de fosforilar receptores en la membrana celular, independientemente de un ligando, como el factor de crecimiento epidermal (EGFR), el cual a su vez, activa la cascada de señalización de las MAPK y de esta manera inducir alteraciones en procesos celulares (Figura 10).

Además de la participación en la promoción de tumores, las MAPK inducidas mediante la activación de AhR, pueden ser capaces de regular el metabolismo de ciertos PAH. Sin embargo, esta función no ha sido estudiada en su totalidad y los mecanismos por los cuales se lleva a cabo no se conocen.

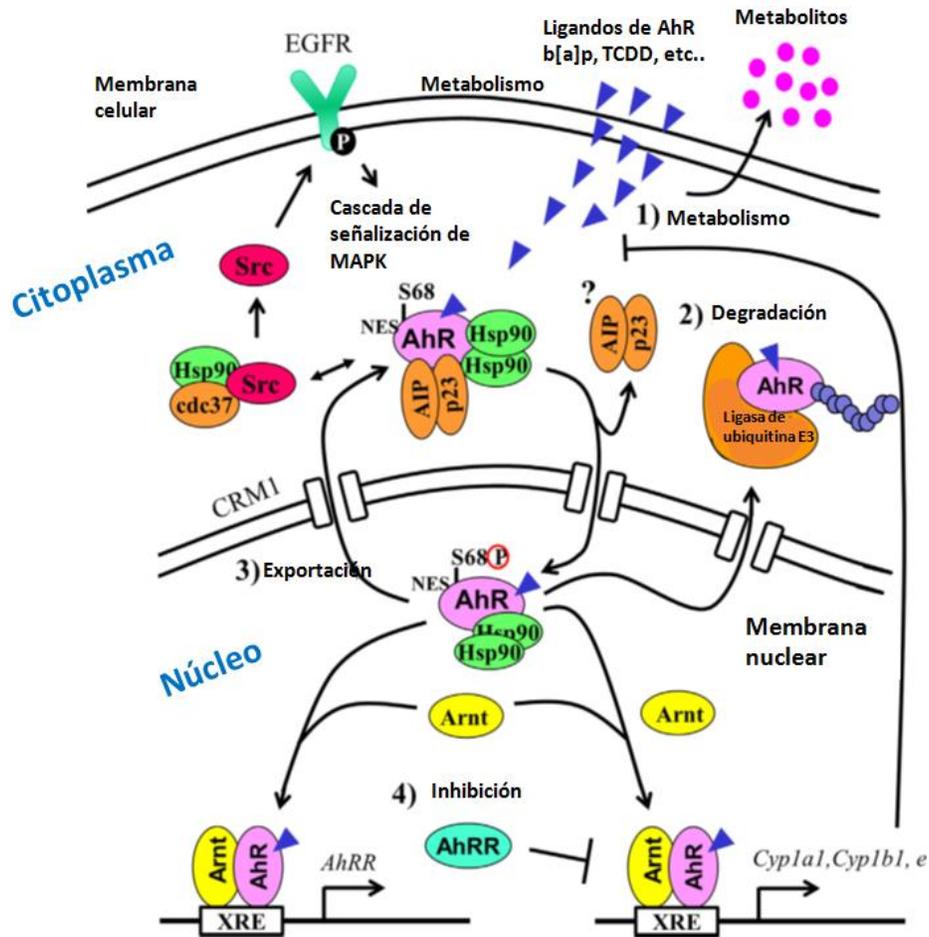
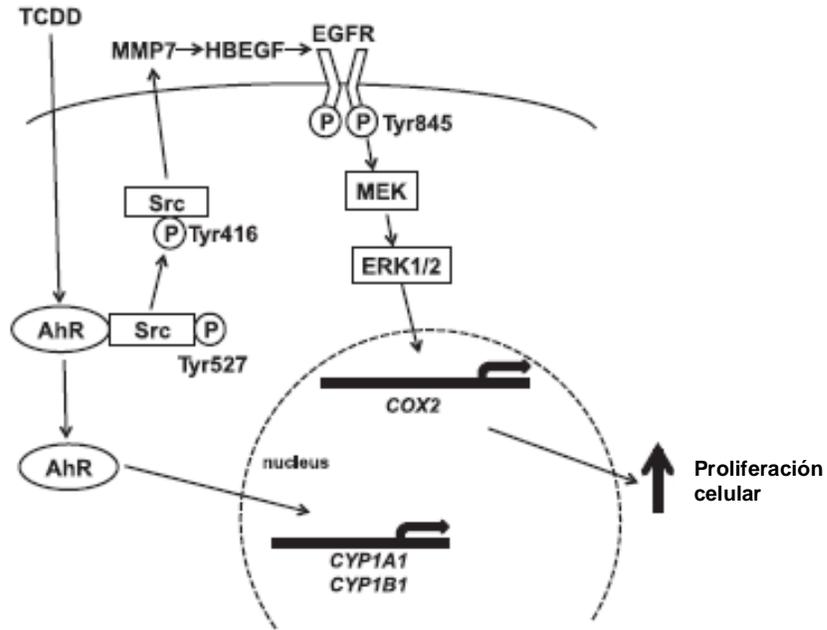


Figura 9. El AhR y su intercomunicación con el EGFR. La interacción entre el AhR y su ligando permite su translocación al núcleo y la liberación de las proteínas a las cuales se encontraba asociado. Ya en el núcleo, el AhR dimeriza con la proteína ARNT e induce la transcripción de genes blanco. Por su parte, la proteína Src fosforila al EGFR, iniciando así la cascada de señalización mediada por MAPK. La actividad de AhR es regulada por: (1) la biotransformación del ligando por medio de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, (2) la degradación del AhR dependiente del proteosoma 26S, (3) la exportación de AhR del núcleo, y (4) la inducción de la proteína represora AhRR. Elementos que se muestran en la figura: AhRR, represor del receptor de hidrocarburos de arilo; AIP, proteína integradora del receptor de hidrocarburos de arilo; Arnt, translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo; Cdc37, Proteína del ciclo de división celular 37; Cyp1A1, citocromo P4501A1; Hsp90, proteína de choque térmico de 90 KDa; MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; NES, señal de exportación nuclear; p23, proteína chaperona de Hsp90 de 23 KDa; S68, serina 68; Src, proteína cinasa de tirosinas Src; XRE, elemento de respuesta a xenobióticos [83].

a)



b)

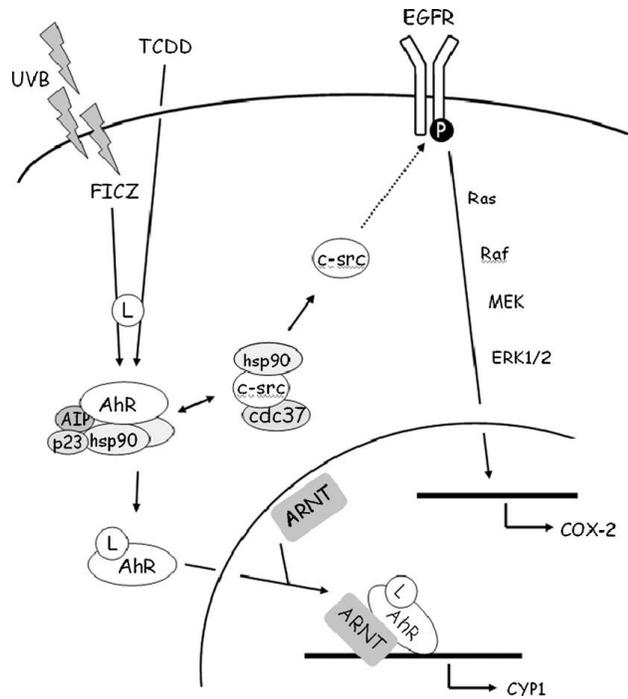


Figura 10. Modelos propuestos por los cuales algunos ligandos del AhR pueden inducir la proliferación celular. a) la activación AhR induce la fosforilación de la cinasa Src la cual favorece la inducción de un ligando del EGFR. b) la cinasa Src induce la fosforilación del EGFR independientemente de un ligando [84-85].

9. Cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos

Estas cascadas transmiten señales extracelulares hacia sus blancos en el interior de la célula, permitiendo así que se lleven a cabo diversos procesos como proliferación, diferenciación, desarrollo, respuesta a estrés y apoptosis. Cada una de estas cascadas de señalización consiste de tres a seis niveles de proteínas cinasas que secuencialmente se activan entre sí mediante la fosforilación de residuos específicos dentro de secuencia de aminoácidos. Son tres las cascadas MAP cinasas que mejor se conocen: (1) cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [86]; (2) cinasa c-jun N-terminal (JNK), también conocida como cinasa activada por estrés 1 (SAPK 1) [87,88] y (3) p38, también conocida como SAPK 2-4 [89]. Generalmente, ERK participa en procesos como diferenciación y/o proliferación, mientras que JNK y p38 participan en procesos de estrés celular y apoptosis (Figura 11). Algunas de las funciones de cada una de estas cascadas son célula específicas, además de presentarse en condiciones celulares específicas.

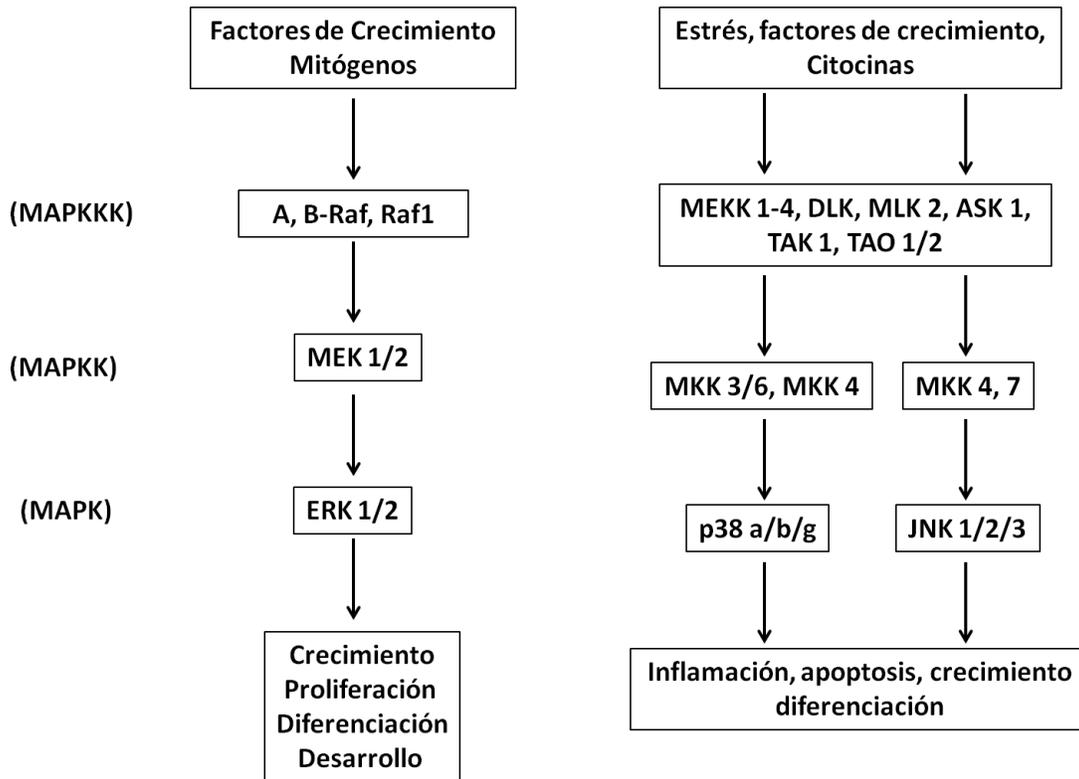


Figura 11. Representación de las tres vías de la cascada de señalización de MAP cinasas mejor conocidas. Se muestran sus inductores y su participación en procesos celular.

10. Planteamiento del problema

El metabolismo del B[a]P es particularmente importante debido a que sus efectos carcinógenos residen en su bioactivación para la formación de metabolitos que son capaces de interactuar con elementos celulares. La mayoría de los trabajos de investigación sobre la toxicidad de los PAH se basan en la vía genómica, es decir, la biotransformación y producción de metabolitos tóxicos capaces de dañar a los componentes celulares. Esto mediante la inducción de genes blanco del AhR que codifican enzimas metabolizadoras de PAH. Sin embargo, existe evidencia de la participación de otras vías de señalización en los procesos fisiológicos mediados por AhR, en particular de aquéllas mediadas por MAPK. No obstante, la participación de las MAPK en el proceso de bioactivación del B[a]P y la generación de toxicidad relacionada a su exposición en tejido pulmonar no se conoce en su totalidad. Es importante mencionar que el pulmón es el órgano blanco del B[a]P debido a que sus metabolitos se concentran exclusivamente en tejido bronco epitelial en humano[90, 91] y que la mayoría de los estudios sobre la toxicidad del B[a]P se han realizado en tejidos hepáticos o en modelos celulares derivados de cáncer. Por tal motivo, en este trabajo se estudió la participación de las cinasas ERK 1/2 en la bioactivación de B[a]P así como en la generación de daño genotóxico causado por su metabolito DPDE en la línea celular derivada de tejido bronquio epitelial de humano no transformada BEAS-2B.

11. Objetivo general:

Determinar la participación de las MAP cinasas ERK 1/2 en el metabolismo de B[a]P mediado por AhR .

12. Objetivos particulares:

Determinar la citotoxicidad de B[a]P en la línea celular BEAS-2B

Determinar la activación transcripcional del citocromo *CYP1A1* mediada por AhR en células expuestas a B[a]P.

Determinar si la exposición de células BEAS-2B a B[a]P activa a las MAP cinasas ERK 1/2

Determinar si la transcripción del gen *CYP1A1*, así como su proteína son modulados por la actividad de ERK 1/2.

Determinar la participación de la cinasa Src en la vía del AhR

Cuantificar marcadores de daño al DNA inducido por B[a]P

13. Hipótesis

En células BEAS-2B expuestas a B[a]P se activarán las MAP cinasas ERK 1/2, éstas a su vez modularán la expresión del gen blanco de la vía AhR, *CYP1A1*, así como la producción de su proteína y la generación de aductos en DNA.

14. Materiales y métodos

14.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular derivada de tejido broncoepitelial de humano BEAS-2B, la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano HepG2 y la línea celular derivada de neuroblastoma de humano SK-N-MC fueron adquiridas en ATCC (American Type Culture Collection). Las células BEAS-2B y HepG2 fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich Co. N.Y. USA). Las células SK-N-MC fueron cultivadas en medio MEM (Minimmun Essential Medium) (Sigma-Aldrich Co. N.Y. USA). Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm² en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), 100 IU/mL de penicilina y 0.1 mg/mL de estreptomina. Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂. Las células se sembraron al alcanzar el 90% de confluencia, eliminando el medio de cultivo, enjuagando con PBS (phosphate-buffered saline) 1 X y separando las células con tripsina al 0.025%.

14.2. Reactivos

B[a]P; el inhibidor de ERK 1/2, U0126; el inhibidor de AhR, CH223191; el inhibidor de Src, dasatinib; el inhibidor de CYP1A1, α -naftoflavona y el disolvente dimetil sulfóxido (DMSO) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co. (N.Y. USA). Las soluciones stock fueron diluidas en DMSO y almacenadas a 4 °C en oscuridad.

14.3. Viabilidad celular y ensayos de inhibición

Para evaluar el efecto citotóxico del B[a]P en la línea celular BEAS-2B, las células fueron sembradas por duplicado en placas de 96 pozos a una densidad de 35,000 cel./cm² en un volumen de 200 μ L de medio de cultivo por pozo. Después de 24 h las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de B[a]P en un rango de 1-50 μ M durante 12, 24 y 36 h. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo con B[a]P fue desechado y las células fueron lavadas con PBS. La viabilidad celular se evaluó incubando las células con 0.05 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en medio fresco. Los precipitados de formazán fueron solubilizados adicionando 100 μ L de isopropanol. La absorbancia se midió a 570 nm en un lector de placas (Biotek ELx800) la viabilidad celular relativa (%) respecto al control fue calculada por $[\text{DO}] \text{ muestra problema} / [\text{DO}] \text{ control} \times 100 \%$. Para los ensayos de inhibición, las células fueron cultivadas en placas de 20 mm hasta alcanzar el 70 % de confluencia. Una vez alcanzada esta confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo fresco sin SFB. Después de 24 h las células fueron expuestas a 20 μ M de U0126, 100 nM de dasatinib, 25 μ M de α -naftoflavona, 10 μ M de CH223191 y/o 1 μ M de B[a]P durante distintos tiempos dependiendo del ensayo como se indica en las leyendas de las figuras correspondientes. El disolvente DMSO fue usado como control. Posteriormente, se obtuvieron las proteínas totales y éstas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

14.4. Evaluación de la expresión de *CYP1A1* mediante RT-PCR semicuantitativo

Las células BEAS-2B y SK-N-MC fueron cultivadas en placas de 20 mm con medio suplementado hasta que alcanzaron el 70 % de confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio sin SFB e incubadas durante 24 horas. Al término de este tiempo, las células fueron expuestas a 1, 5, 10, 20, 30, 40 ó 50 μ M de B[a]P durante 24 h usando DMSO como control. El RNA total fue aislado con el kit RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. La síntesis y la amplificación del cDNA se realizaron usando 100 ng de RNA total con el kit OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación mediante PCR fueron: AhR Fw-TCAACAGCAACAGTCCTTGG Rev-TCCAATTTTCAAACATGCCA, *CYP1A1* Fw-CATCCCCACAGCACAACA Rev-CAGGGGTGAGAAACCGTTCA, *GAPDH* Fw-GAACGGGAAGCTCACTGGCATGG Rev-GCCCTCCGACGCCTGGTTCAC. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Co. (N.Y. USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Maxygen II, Axigen (Cornig, USA). El cDNA fue amplificado bajo las siguientes condiciones: desnaturalizado a 95 °C durante 1 min, 25-30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineación a 58 °C (*CYP1A1*), 58 °C (*GAPDH*) durante 30 s y extensión a 72 °C durante 60 s. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.5 %. Las imágenes de los productos de PCR fueron tomadas con un fotodocumentador Kodak Gel Logic 200 (USA) y analizadas con el software ImageJ.

14.5. Análisis de Western blot

Las células BEAS-2B y SK-N-MC fueron cultivadas en placas de 20 mm con medio suplementado hasta que alcanzaron el 70 % de confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio sin SFB e incubadas durante 24 h. Al término de este tiempo, las células fueron expuestas a diferentes tratamientos de acuerdo con el ensayo, como se indica en las leyendas de las figuras. Las células se lavaron con PBS frío y las proteínas totales fueron aisladas usando el buffer de extracción (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7.4, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sodio, 1 mM PMSF, 10 mM pirofosfato de sodio, 10 mM NaF) e inhibidores de proteasas 1X (Sigma-Aldrich Co. N.Y. USA). Para la separación de las proteínas citoplasmáticas y nucleares se usó el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. 40 μ g de proteínas totales fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 12 % y transferidas a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD, Alemania). Las proteínas de interés fueron identificadas usando el sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP (Millipore Cat. No. WBKLS0500, MA, USA). Los anticuerpos utilizados fueron: rabbit anti-AhR, rabbit anti-ERK 1/2, rabbit anti-phospho-ERK 1/2 (Thr202/Thr204), rabbit anti-Src, rabbit anti-phospho-Src (Tyr 416), HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG y HRP-conjugated goat anti-biotin (Cell Signaling Technology Inc. Beverly, MA, USA). Rabbit anti-CYP1A1, rabbit anti-GAPDH (Gene Tex, Inc. CA, USA). La proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) fue usada como control de carga.

14.6. Determinación de aductos en DNA

Las células BEAS-2B fueron cultivadas en placas de 20 mm hasta alcanzar el 70 % de confluencia. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio sin SFB e incubadas durante 24 horas. Las células fueron expuestas a 1 μM B[a]P, solo o en cotratamiento con 20 μM de U0126, 10 μM de CH223191 ó 25 μM de α -nafto flavona durante 24 h. Las células fueron colectadas y lavadas con PBS frío y almacenadas a -80 °C hasta su uso. La extracción y purificación de DNA se realizó usando fenol-cloroformo después de un tratamiento con RNAsas y proteinasa K. El DNA fue disuelto en agua estéril. La concentración de DNA fue determinada usando un espectrofotómetro a 260 nm. La calidad y pureza del DNA fue determinada mediante la ecuación A_{260}/A_{280} y A_{230}/A_{260} y por separación en geles de agarosa al 1.5 % respectivamente. Los niveles de aductos B[a]P-N2-dG se determinaron usando 4 μg de DNA enriquecido con NP1 por ensayo. Los productos marcados sometidos a una cromatografía multidireccional de capa fina en placas de PEI-celulosa (Macherey-Nagel, Germany) usando los siguientes disolventes: fosfato de sodio 1 M, pH 6.0; fosfato de litio 3.5 M, pH 3.5; urea 8.5 M y Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0; cloruro de litio 0.8 M, urea 8.5 M. después de realizar las autoradiografías las marcas radioactivas correspondientes a DNA B[a]P-N2-dG fueron cortadas y cuantificadas.

14.7. Análisis estadísticos

Todos los experimentos fueron realizados independientemente por lo menos tres veces. Los datos son expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y prueba *post-hoc* LSD de Fisher usando el programa GenStat 11. En todos los casos se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $P \leq 0.05$.

15. Resultados

15.1. AhR es expresado en células BEAS-2B

Se sabe que la expresión del AhR puede ser tejido y célula específico [83]. Por lo tanto, para evaluar la presencia de este receptor en células BEAS-2B sin tratamiento, se realizó un análisis de RT-PCR semicuantitativo y un análisis de Western blot. Para ello se usaron células HepG2 como control positivo de expresión de AhR [92] y células SK-N-MC como control negativo [93]. Como se muestra en la Figura 12a el gen de AhR se expresa en las células HepG2 y BEAS-2B. De la misma manera, en ambas líneas celulares, se encontró expresión de AhR a nivel de proteína (Figura 1b). En contraste, en células SK-N-MC no se encontró expresión de AhR a nivel de RNA mensajero ni a nivel de proteína (Figura 12a y 12b). Este análisis demuestra que las células BEAS-2B expresan el receptor AhR a niveles basales y que esta expresión es menor comparada con las células derivadas de hepatocarcinoma, HepG2.

Algunos estudios muestran que los PAH pueden ser tóxicos para algunos tipos celulares [94]. Por tal motivo, se evaluó la toxicidad de B[a]P en las células BEAS-2B a diferentes tiempos y concentraciones. Los resultados muestran que el B[a]P a concentraciones en un rango de 1-50 μM a 12, 24 o 36 h de exposición, no modifica la viabilidad celular (Figura 12c).

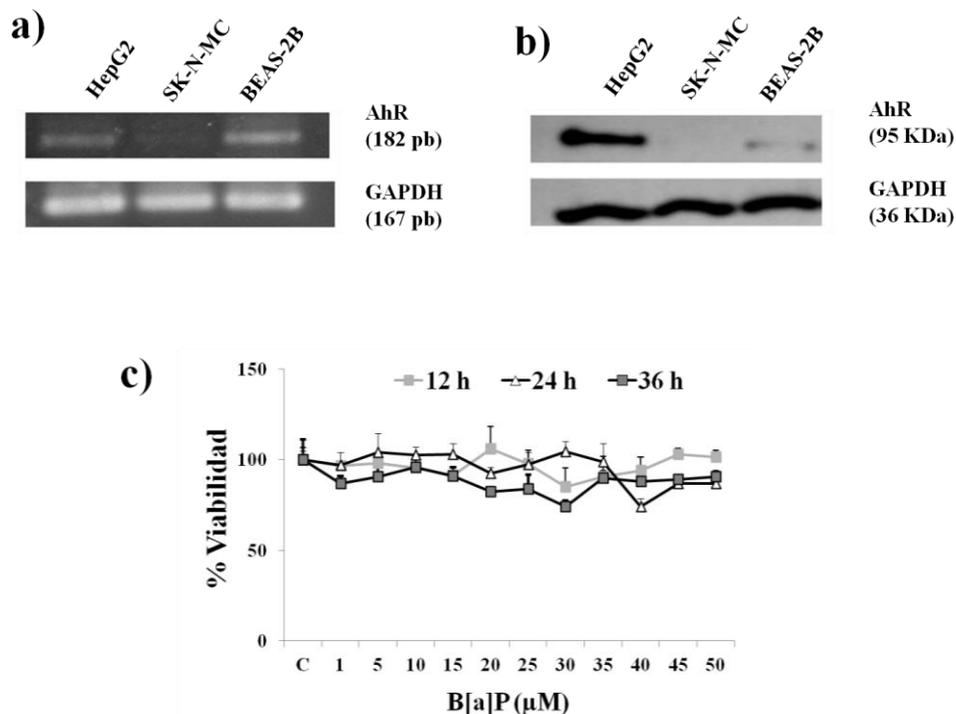


Figura 12. Expresión del receptor de AhR y el efecto de B[a]P sobre la viabilidad de células BEAS-2B. La expresión de AhR fue analizada mediante RT-PCR semicuantitativo (a) y por un análisis de Western blot (b). Las líneas celulares HepG2 y SK-N-MC fueron usadas como controles de expresión positivo y negativo, respectivamente. La expresión de GAPDH fue utilizada como control interno (c). Células BEAS-2B fueron incubadas con B[a]P en un rango de concentraciones de 1-50 μM o con el disolvente DMSO como control (C) durante 12, 24 y 36 h. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo MTT.

15.2. B[a]P activa la expresión de CYP1A1

Está documentado que la unión de un ligando a AhR puede inducir la activación transcripcional de genes blanco, sin embargo, la activación de estos genes dependerá de la naturaleza química del ligando, así como del tipo y de un contexto celular determinado [83]. Datos experimentales en distintos modelos, coinciden que el gen *CYP1A1* es comúnmente inducido después de la activación del AhR por un ligando. Por lo tanto, se determinó el efecto de B[a]P sobre la activación transcripcional de este citocromo en las células BEAS-2B y SK-N-MC. Como se muestra en la Figura 13a el B[a]P induce un aumento en la expresión del *CYP1A1* en células BEAS-2B en todas las concentraciones evaluadas. Por el contrario, sólo se detectó una expresión marginal en células SK-N-MC (Figura 13c). Los análisis de Western blot muestran que la enzima CYP1A1 está ausente en los extractos de células sin tratamiento y que la incubación con B[a]P induce un aumento en la cantidad de la enzima CYP1A1 en células BEAS-2B (Figura 13b). Por otro lado, y como era de esperarse, no se encontró un aumento de la proteína CYP1A1 en células SK-N-MC tratadas con B[a]P (Figura 13d)

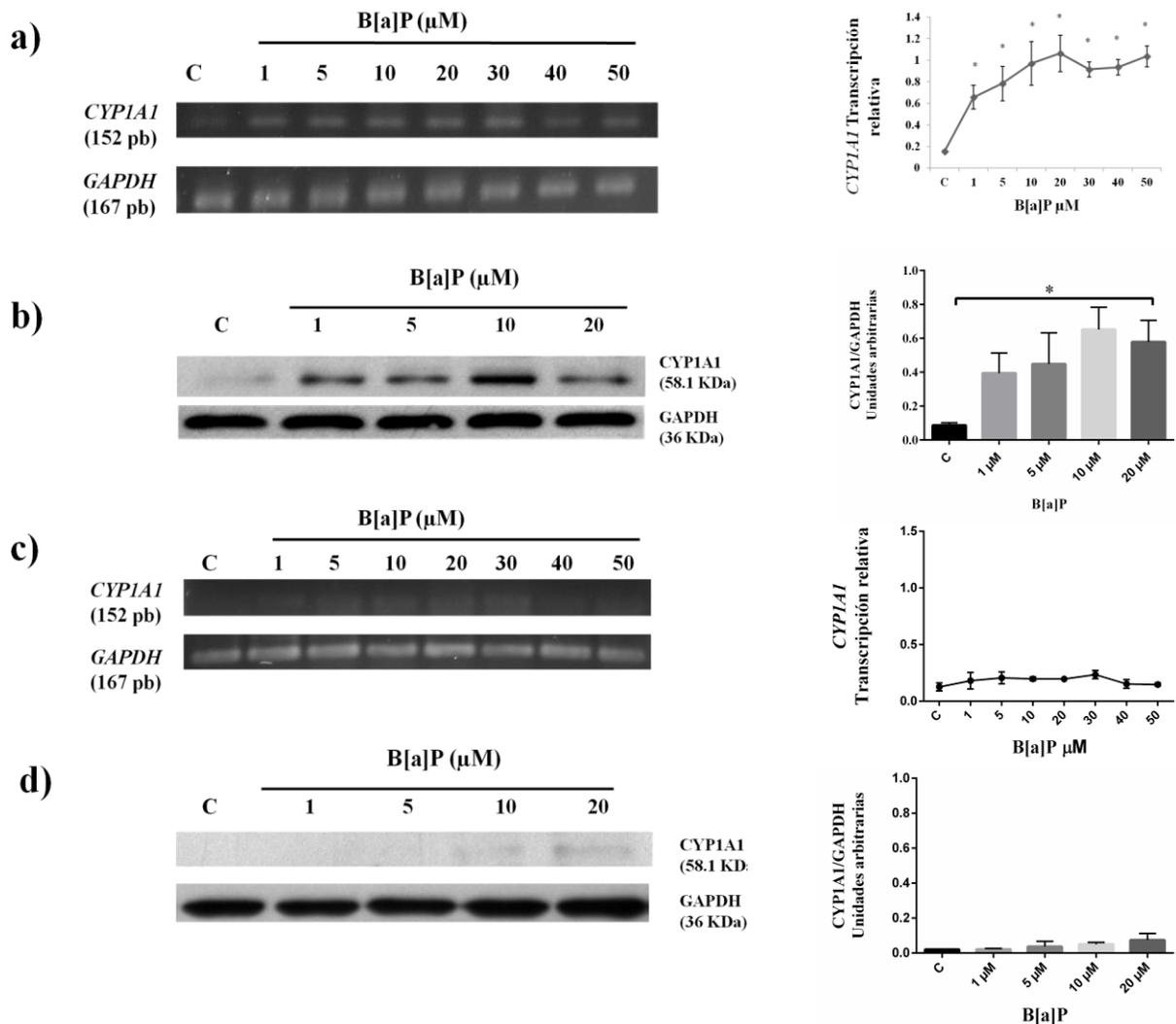


Figura 13. Regulación de la expresión de CYP1A1 por B[a]P. Células BEAS-2B (a) y SK-N-MC(c) fueron tratadas con 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM de B[a]P o con el disolvente DMSO como control negativo (C) durante 24h. La expresión de *CYP1A1* se analizó mediante RT-PCR semicuantitativo. La expresión del *GAPDH* se utilizó como control de expresión. 40 μg de proteínas totales de células BEAS-2B (b) y SK-N-MC (d) tratadas con 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM de B[a]P o con el vehículo DMSO (C) fueron analizadas mediante Western blot. La proteína GAPDH fue incluido como control de carga. Se muestra un análisis densitométrico. Los datos representan el promedio más desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control $P \leq 0.05$.

15.3. La exposición a B[a]P induce la activación de las cinasas ERK 1/2

Existen reportes que señalan que algunos ligandos de AhR pueden inducir la cascada de señalización de las MAPK [95-100]. Por lo tanto, para determinar si B[a]P es capaz de activar esta cascada de señalización en la línea celular BEAS-2B, se expusieron células a diferentes concentraciones de B[a]P y se determinó el estado de fosforilación de la cinasa ERK 1/2 mediante inmunoblots. Como se muestra en la Figura 14, en células sin tratamiento no se encontró fosforilación de la cinasa. Por el contrario, en células tratadas con B[a]P la fosforilación de la cinasa ERK 1/2 aumentó de manera dependiente de la concentración de B[a]P después de 5 min. de exposición, manteniéndose esta fosforilación activa hasta los 30 min. Este resultado indica que B[a]P no sólo induce la expresión de sus genes blanco, como es el caso del *CYP1A1*, sino que también es capaz de activar una vía no genómica representada por la fosforilación de las cinasas ERK 1/2.

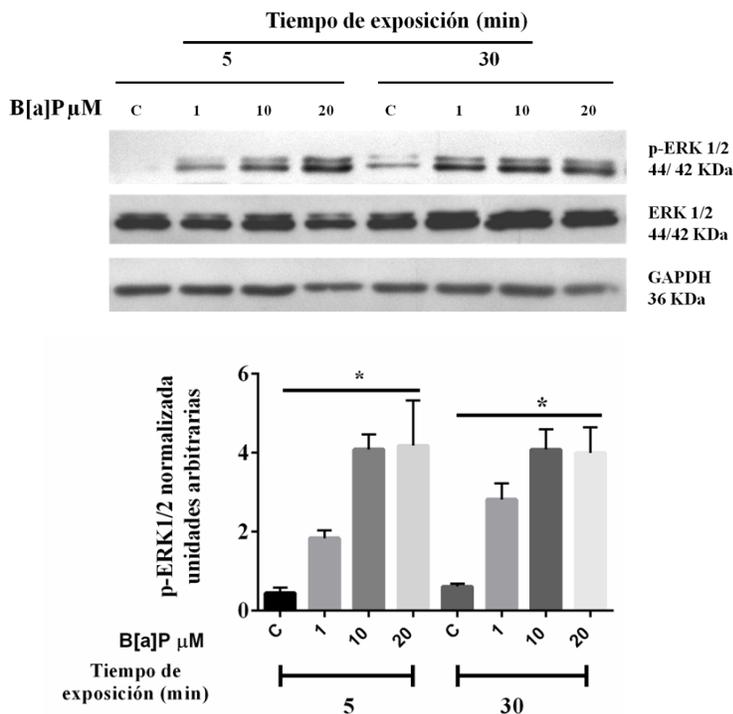


Figura 14. Inducción de la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 por B[a]P. 40 μg de proteínas totales de células tratadas con 1, 10 y 20 μM de B[a]P o con el vehículo DMSO como control (C) durante 5 ó 30 min. fueron analizadas por Western blot. La proteína GAPDH fue usada como control de carga. Se muestra un análisis densitométrico. Los datos representan el promedio más desviación estándar de tres experimentos independientes. El asterisco (*) denota las diferencias estadísticamente significativas respecto al control $P \leq 0.05$.

15.4. ERK 1/2 regula la expresión de CYP1A1 inducida por B[a]P

Como el resultado previo muestra que B[a]P induce la activación de la vía de señalización de las cinasas ERK 1/2, se analizó si esta cascada de señalización está involucrada en la regulación del CYP1A1. Para este fin, se usó un inhibidor específico de la fosforilación de MEK 1/2, U0126. Las cinasas MEK 1/2 son cinasas efectoras río arriba que fosforilan directamente a las cinasas ERK 1/2. Primero se investigó si U0126 era capaz de inhibir la fosforilación de las cinasa ERK 1/2 inducida por B[a]P. Como se muestra en la Figura 15a, la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 inducida por B[a]P se redujo drásticamente en cotratamientos con U0126. Posteriormente, se determinó si la inhibición de las cinasas ERK 1/2 afecta la expresión de CYP1A1 inducida por B[a]P. Como se indica en la Figura 15b la exposición de células durante 24 h a B[a]P incrementa la expresión de CYP1A1, mientras que, en células en cotratamiento con B[a]P y el inhibidor U0126 muestran una disminución significativa de la proteína CYP1A1 de manera dependiente del tiempo. En conjunto, estos resultados sugieren que las cinasas ERK 1/2 participan en la regulación de la expresión de la enzima CYP1A1 mediada por la exposición a B[a]P.

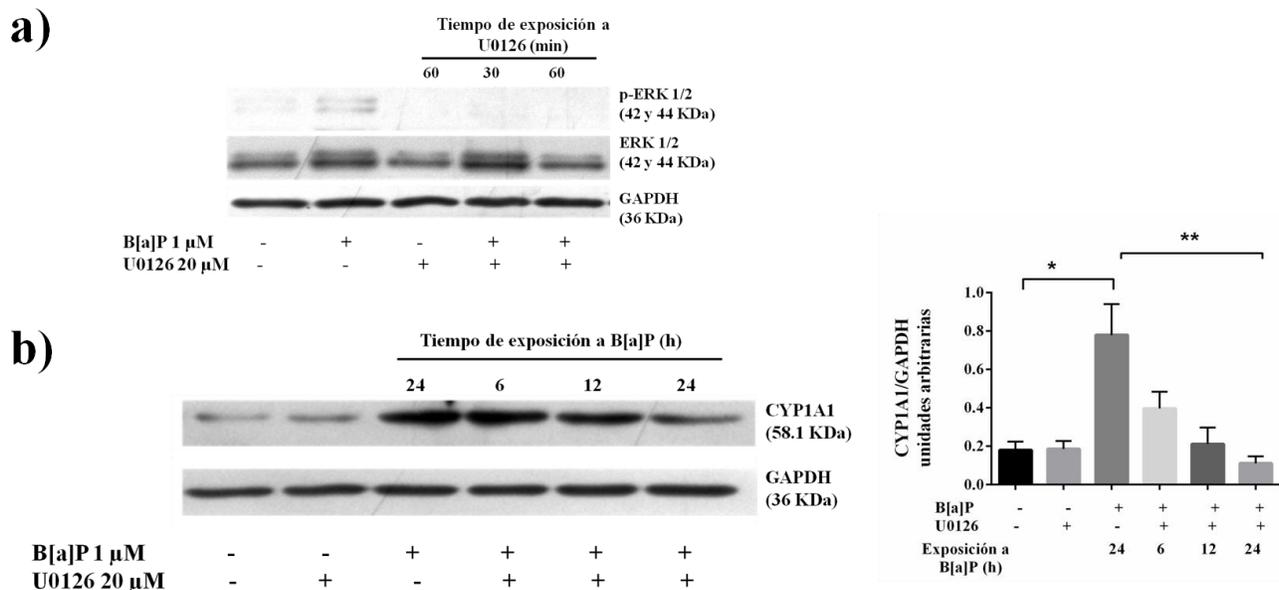


Figura 15. La inhibición de ERK 1/2 disminuye la expresión de CYP1A1 inducida por B[a]P. a) Las células fueron pretratadas con 20 μ M del inhibidor U0126 durante 30 ó 60 min y/o 1 μ M de B[a]P. 40 μ g de proteínas totales fueron analizadas mediante Western blot. La proteína GAPDH se usó como control de carga. b) Las células fueron pretratadas con 20 μ M del inhibidor U0126 durante 1 h y posteriormente expuestas a B[a]P durante 6, 12 y 24 h las proteínas totales fueron sometidas a un análisis de Western blot. La proteína GAPDH se usó como control de carga. Se muestra un análisis densitométrico. Los datos representan el promedio más la desviación estándar de tres experimentos independientes. Un asterisco (*) representa las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Dos asteriscos (**) representan diferencias estadísticamente significativa con respecto al B[a]P $P \leq 0.05$.

15.5. La cinasa Src modula la activación de ERK 1/2 y la inducción de la enzima CYP1A1 mediadas por B[a]P

Como mencionamos anteriormente, la inducción de CYP1A1 mediada por B[a]P está parcialmente regulada por las cinasas ERK1/2. Por otro lado, se ha evidenciado que la actividad de las cinasas ERK 1/2 puede estar mediada por las cinasas de tirosinas Src [92,101]. Esta cinasa Src, es liberada del complejo citoplasmático del AhR posterior a la unión de un ligando. Tomando en cuenta esta evidencia, se evaluó la participación de la cinasa Src en la fosforilación de ERK 1/2 mediada por B[a]P. Primero se determinó si B[a]P es capaz de inducir la fosforilación del residuo Tyr 416 de cinasa Src, el cual ha sido relacionado con un aumento en la actividad de esta enzima. Como se muestra en la Figura 16, las células expuestas a B[a]P presentan un aumento en la cantidad de Src fosforilada en el residuo Tyr 416. Este aumento en la fosforilación se correlaciona con un aumento en la cantidad de las cinasas ERK 1/2 fosforiladas. Posteriormente, se analizó si la fosforilación de ERK 1/2 depende de Src. Para esto, se trataron células con dasatinib, un inhibidor específico de la cinasa Src, previo a la administración de B[a]P. Como se describe en la Figura 16, el dasatinib inhibe la fosforilación de la cinasa Src en el residuo Tyr 416, así como una disminución en la fosforilación de las cinasas ERK 1/2. De la misma manera, se observa una disminución en la cantidad de la proteína CYP1A1. Este resultado sugiere que la cinasa Src puede actuar como una proteína intermediaria en la activación de una vía no canónica, representada por las cinasas Src y ERK 1/2, en el metabolismo de B[a]P dependiente de AhR.

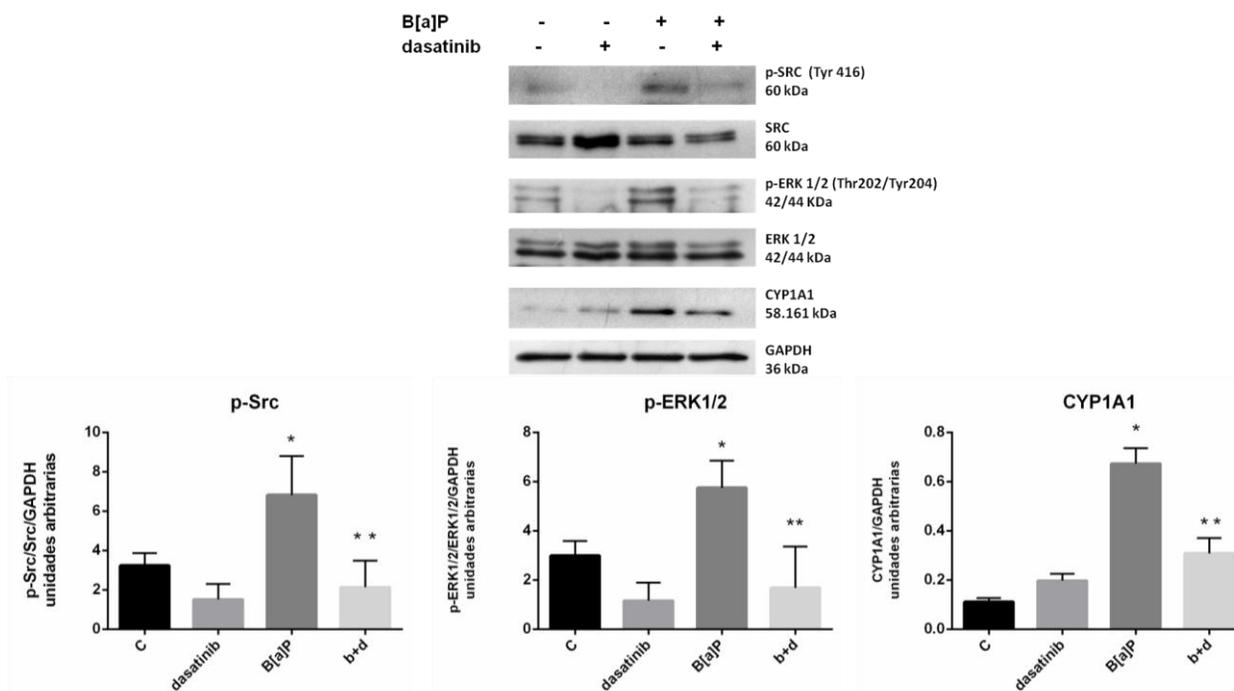


Figura 16. La inhibición de la fosforilación del residuo Tyr de la cinasa Src representa una disminución en la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 y en expresión de la enzima CYP1A1. Las células fueron tratadas con 1 μ M de B[a]P durante 6h. 100 nM del inhibidor dasatinib durante 6 h o cotratadas con 1 μ M de B[a]P y 100 nM del inhibidor dasatinib durante 6 h (b+d). El vehículo DMSO se usó como control. Se muestra un análisis densitométrico. Los datos representan el promedio más la desviación estándar de tres experimentos independientes. Un asterisco (*) representa las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los dos asteriscos (**) representan las diferencias estadísticamente significativas con respecto al B[a]P $P \leq 0.05$.

La inhibición de la fosforilación de las cinasas ERK 1/2 previene la formación de aductos B[a]P-N2-dG

Se sabe que durante un proceso de carcinogénesis mediada por B[a]P, la enzima CYP1A1 metaboliza el B[a]P a BPDE, y que este último es capaz de formar aductos B[a]P-N2-dG en el DNA, induciendo de esta manera genotoxicidad en células del epitelio bronquial [90-91, 102]. Los resultados previos muestran que la inducción de CYP1A1 puede ser regulada por las cinasas Src y ERK 1/2, y dado que la producción de los BPDE depende de la enzima CYP1A1, se determinó si la inhibición de las cinasas ERK 1/2 impacta de manera negativa en la formación de aductos B[a]P-N2-dG. Para este fin, se cuantificaron los aductos B[a]P-N2-dG en células tratadas con B[a]P y/o el inhibidor de las cinasas ERK1/2, U0126. Adicionalmente, se cuantificó el número de aductos de B[a]P en células pretratadas con el inhibidor del receptor AhR, CH223191 o con el inhibidor de CYP1A1, α -naftoflavona, como controles. Como se muestra en la Figura 17, los tratamientos con B[a]P inducen un aumento en la formación de aductos B[a]P-N2-dG. Por el contrario, la inhibición del AhR y de la enzima CYP1A1 inhiben completamente la formación de estos aductos, mientras que, en las células pretratadas con el inhibidos de ERK 1/2 se observa una disminución en el número de aductos B[a]P-N2-dG. Estos resultado sugieren la participación de la cascada de señalización de las cinasas ERK 1/2 en la producción de genotoxicidad por exposición a B[a]P.

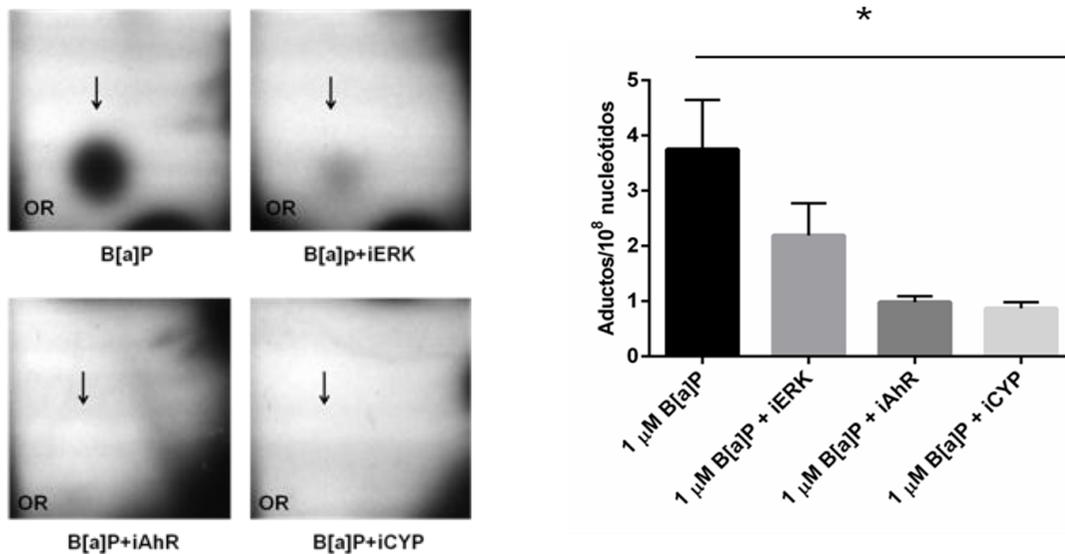


Figura 17. La inhibición de las cinasas ERK 1/2 previene la formación de aductos de B[a]P. las células fueron pretratadas con 10 μ M del inhibidor U0126 (iERK), 10 μ M el inhibidor de AhR, CH223191 (iAhR), 25 μ M del inhibidor de CYP1A1, α -naftoflavona (iCYP) durante 1 h. Posteriormente se les administró 1 μ M de B[a]P. Después de 24 h, 4 μ g de DNA de cada uno de los grupos experimentales fue sometido a un análisis de aductos mediante la técnica de posmarcaje con ³²P. Los datos representan el promedio más la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se muestra la autoradiografía de los aductos. Las flechas indican la marca radioactiva correspondiente a los aductos y OR indica el origen de la cromatografía. El asterisco (*) representa las diferencias estadísticamente significativas con respecto al B[a]P $P \leq 0.05$.

15.6. La translocación nuclear de AhR es modulada por las cinasas Src y ERK 1/2

Un paso fundamental en la vía de señalización del AhR es su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo el AhR se une con la proteína ARNT, juntos funcionan como factor de transcripción el cual es capaz de unirse a los promotores de genes blanco como el CYP1A1 e inducir su transcripción. Algunos estudios sugieren que procesos de fosforilación en diversos puntos a lo largo de la cascada de señalización de la vía de AhR son necesarios para que se lleve a cabo una correcta señalización [103-106]. Sin embargo, no es claro qué cinasa es la responsable de esta fosforilación, cuáles son los elementos que se fosforilan, ni el efecto específico sobre la vía de AhR de dicha fosforilación. En este trabajo se encontró que las cinasas Src y ERK 1/2 son importantes para que se lleve a cabo la inducción de CYP1A1 y la generación de daño genotóxico asociada a la exposición de B[a]P. Basados en la información antes mencionada nos preguntamos si la actividad de las cinasas Src y ERK 1/2 es necesaria para la translocación nuclear del AhR. Para este fin se incubaron células con el inhibidor de ERK, U0126; el inhibidor de Src, dasatinib; el inhibidor de AhR, CH223191; y el inhibidor de CYP1A1 alfa-naftoflavona. Como se muestra en la Figura 18, el B[a]P induce la translocación nuclear del AhR. Por el contrario, los inhibidores del AhR y de Src impiden completamente esta translocación (Figura 18a y 18c), mientras que el inhibidor de ERK 1/2 sólo induce una disminución marginal de la translocación (Figura 18d). Finalmente, y como se esperaba, el inhibidor de CYP1A1 no alteró la translocación nuclear del AhR (Figura 18b). Este resultado sugiere que la translocación nuclear del AhR inducida por B[a]P puede estar regulada por la actividad de la cinasa Src.

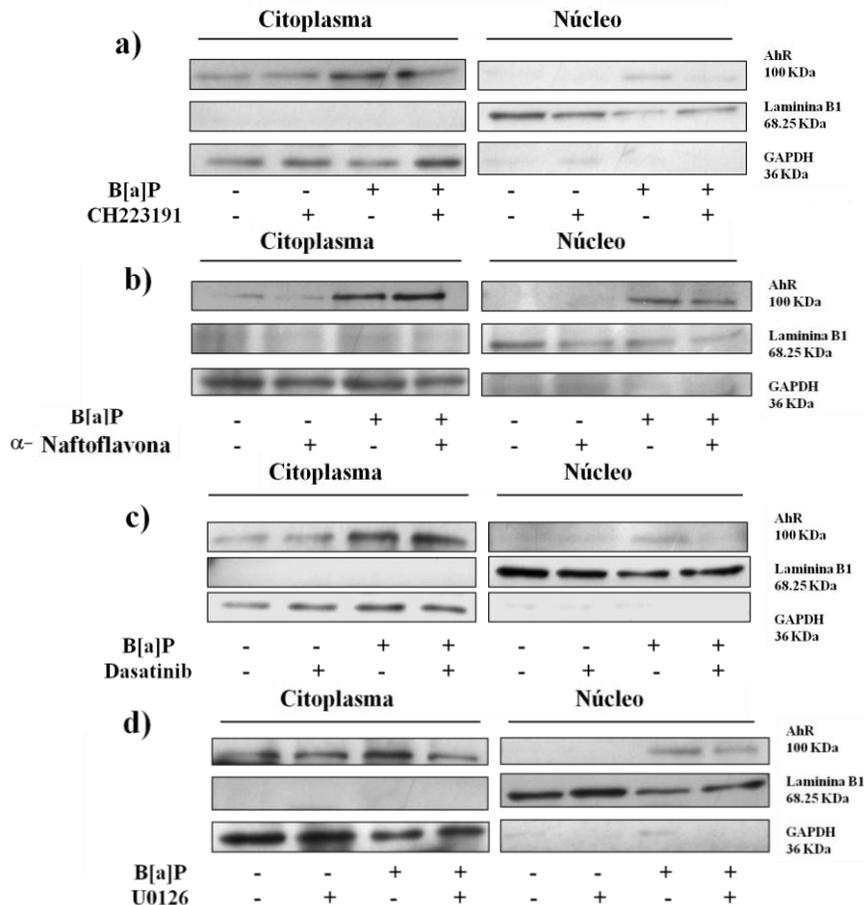


Figura 18. La inhibición de las cinasas SRC y ERK 1/2 inhiben la translocación nuclear de AhR. Células fueron tratadas con 10 μ M del inhibidor de AhR, CH223191(a); 25 μ M del inhibidor de CYP1A1, alfa naftoflavona (b); 100 nM del inhibidor de de la cinasa Src, dasatinib (c); 20 μ M del inhibidor de las cinasas ERK 1/2, U0126 (d) y/o 1 μ M de B[a]P durante 24 h. el vehículo DMSO se utilizó como control. 40 μ g de extracto de proteínas totales fueron analizados mediante Western blot. GAPDH y Lamina B1 fueron usados como controles de carga. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

16. Discusión

La exposición a B[a]P es un factor de riesgo para cáncer de pulmón debido a que los metabolitos que se generan durante su biotransformación pueden causar daño al DNA [8, 90-91]. Este daño está representado por la formación de aductos, principalmente en tejido bronquio epitelial [90-91]. Por lo tanto, la formación de aductos en DNA es considerado como un evento crítico en la tumorigénesis en pulmón. Adicionalmente, se ha demostrado que la activación del AhR, en algunos modelos, conlleva una alteración en la cascada de señalización de las MAPK. Esta alteración puede explicar la participación del AhR en procesos celulares distintos a la desintoxicación de xenobióticos, como la modulación del ciclo celular, proliferación y/o apoptosis. [95-97, 103-104]. Sin embargo, no se ha estudiado la participación de estas cinasas en el proceso de bioactivación y generación de daño causado por del B[a]P en tejido bronquio epitelial humano. Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en determinar si las cinasas ERK 1/2 están involucradas en el proceso de bioactivación del B[a]P así como en la formación de aductos en DNA en la línea celular no transformada derivada de epitelio de bronquial de humano, BEAS-2B.

La primera observación es que el B[a]P no es citotóxico para las células BEAS-2B en concentraciones relativamente bajas. Se encontró una disminución modesta, pero no significativa, en la viabilidad después de 36 h de exposición. Este resultado sugiere que los efectos tóxicos del B[a]P podrían presentarse en tiempos de exposición más largos, como se ha demostrado en trabajos recientes, en los que fibroblastos VH10 expuestos a BPDE durante 72 h incrementaron la frecuencia de apoptosis pero la competencia metabólica se vio disminuida después de 14 días de exposición [107].

Un efecto ampliamente documentado de la exposición a B[a]P es la inducción transcripcional de los genes de la familia *CYP1* [101, 108-112]. En concordancia con esto, se encontró un aumento en la transcripción del gen *CYP1A1* así como en la inducción de la proteína CYP1A1 en células BEAS-2B en todas las concentraciones de B[a]P usadas. Estudios previos, en diversos modelos biológicos, *in vitro*, indican que el B[a]P o sus metabolitos pueden activar la vía de las MAPK precediendo o coincidiendo con la activación de AhR, lo que conllevaría a una alteración en los procesos celulares dependientes de MAPK [97, 103-106]. A pesar de este conocimiento, no hay evidencia de la participación de las MAPK en el proceso de bioactivación del B[a]P ni en la generación de daño al DNA en células de pulmón de humano. En este trabajo se encontró que en células expuestas a B[a]P se da una rápida inducción de la fosforilación de las cinasas ERK 1/2. Esto indica el B[a]P es capaz de activar dos tipos de respuestas, una transcripcional mediada por la inducción de la transcripción de *CYP1A1* y otra no transcripcional mediada por la activación de las cinasas ERK 1/2. Existe evidencia que sugiere que las cinasas ERK 1/2 podrían estar involucradas en la modulación de la vía de AhR. Sin embargo, esto no ha sido esclarecido en su totalidad [103-105]. En este trabajo, usando el inhibidor químico de MEK 1/2, U0126, se encontró una reducción de la proteína CYP1A1 en células expuestas a B[a]P. Estos datos aluden a que las cinasas ERK 1/2 tienen un papel importante en la inducción de CYP1A1 en células de

pulmón expuestas a B[a]P. Cabe señalar que el inhibidor U0126 ha sido relacionado con la activación transcripcional mediada por la activación de AhR en modelos celulares no pulmonares [113]. A pesar de que no se encontró un incremento en la expresión de CYP1A1 en células tratadas con el U0126, es necesario realizar experimentos más robustos para impedir la activación de ERK 1/2, y demostrar así la participación de ERK 1/2 en la vía de AhR. Por ejemplo el uso de mutantes dominantes negativos de ERK1/2 o RNA de interferencia.

Existen datos experimentales en modelos celulares derivados de cáncer que muestran que la cinasa de tirosina Src, una vez liberada del complejo de AhR es capaz de mediar la activación de la cascada de señalización de las MAPK. Esto a través de la activación de receptores de membrana como el receptor de crecimiento epidermal (EGFR) en ausencia de un ligando [84, 114]. Con base en esta evidencia, surge la hipótesis de que la cinasa Src puede ser la molécula interlocutora que media la activación de las cinasas ERK 1/2 dependiente de AhR en células de pulmón expuestas a B[a]P. En este trabajo se demuestra que la inhibición de la cinasa Src conlleva una reducción en la cantidad de la proteína cinasa ERK 1/2, así como de la proteína CYP1A1 mediadas por la exposición a B[a]P. Esto indica que la tirosina de cinasa Src es un mediador río arriba de la activación de ERK 1/2 y de la consecuente inducción de CYP1A1 en células derivadas de epitelio de pulmón humano expuestas a B[a]P.

La producción de BPDE-N2-dG es un proceso clave en la carcinogénesis de pulmón y siempre ha estado asociada con la vía canónica de señalización B[a]P/AhR/CYP1A1. Sin embargo, en este trabajo se muestra que la inducción de CYP1A1 y la generación de daño genotóxico también dependen de la actividad de las cinasas Src y ERK 1/2 ya que inhibiendo estas cinasas se disminuye la inducción de CYP1A1 y la formación de aductos BPDE-N2-dG. Lo que significa que la vía no genómica activada por B[a]P es clave para la adecuada señalización del AhR. En concordancia con estos resultados, existen datos experimentales que sugieren que la inducción del CYP1A1 puede darse mediante vías no canónicas e inclusive independientemente del AhR [115]. Los resultados anteriormente descritos refieren que el metabolismo de B[a]P en células bronquio epiteliales depende de procesos de fosforilación y de inducción génica de los elementos que conforman la vía de señalización de AhR. Hasta la fecha no es clara la participación de una proteína cinasa específica, tampoco se sabe cómo es la interacción entre las posibles cinasas cinasas y el AhR ni qué nivel de la vía está modulado por procesos de fosforilación. Algunos reportes muestran que la fosforilación de residuos de tirosina del AhR puede regular la capacidad de su unión al DNA [116]. Adicionalmente, la fosforilación de la proteína chaperona HSP90 en residuos de serina o treonina puede modular la formación de un complejo de AhR funcional en el citoplasma [117]. Por otro lado, proteínas como PKC y PTK (proteína cinasa C y preteínas cinasas de tirosinas, respectivamente) pueden estar involucradas en la regulación de la actividad de AhR. En este trabajo se muestra que las cinasas Src y ERK 1/2 contribuyen en la vía de señalización del AhR. La cinasa ERK 1/2 participa principalmente en la inducción de CYP1A1, lo cual puede ser explicado por previos reportes que demuestran que las MAPK son capaces de inducir la transcripción de la proteína ARNT. ARNT junto con AhR forman un factor de transcripción que induce la transcripción de CYP1A1 [118]. Por su parte, Src regula la translocación del AhR del citoplasma al núcleo ya que en células tratadas con el inhibidor de Src se bloquea dicha translocación promovida por el B[a]P. En conjunto, los datos presentados revelan que la vía canónica de AhR es la principal vía involucrada en la formación de aductos relacionados con la exposición a B[a]P. Sin embargo, el inhibidor de ERK 1/2 fue capaz de disminuir la producción de aductos lo que indica que la vía de señalización de las cinasas ERK 1/2 contribuye en la activación metabólica del B[a]P.

17. Conclusión

Este estudio demuestra que la vía de señalización de las cinasas ERK 1/2 contribuye a la activación metabólica del B[a]P a través de la actividad enzimática del CYP1A1 adicionalmente también participa en la formación de los aductos BPDE-N2-dG en una línea celular derivada de epitelio pulmonar de humano no transformada, como se ejemplifica en la Figura 19.

Esta es la primera evidencia que sugiere que las cinasas ERK 1/2 participan en la producción de daño genotóxico por la exposición a B[a]P en un modelo pulmonar.

Nuestros resultados contribuyen a comprender los mecanismos moleculares de la transformación metabólica del B[a]P en tejidos de pulmón de humano y sugieren posibles estrategias de quimiopreención del daño celular asociado al cáncer pulmonar inducido por B[a]P.

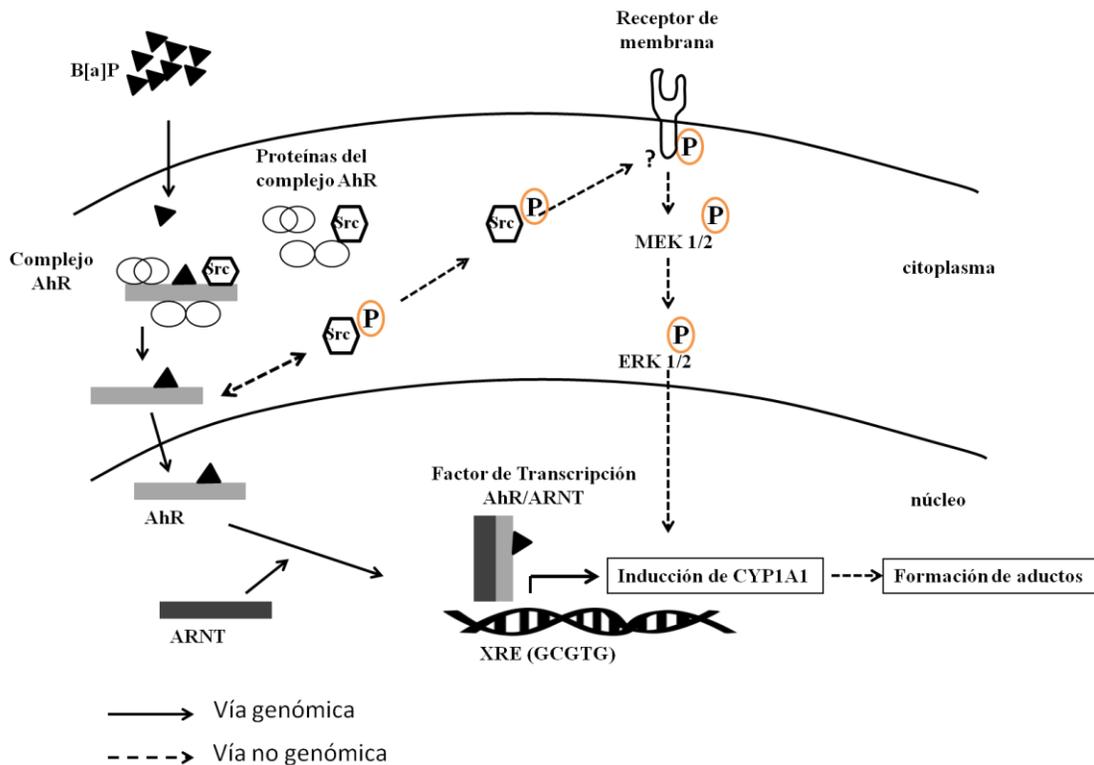


Figura 19. El B[a]P activa la vía genómica del receptor AhR a través de la inducción de una vía no genómica representada por la activación de las cinasas Src y ERK 1/2. La interacción entre estas dos vías es necesaria para la inducción de la enzima CYP1A1 y la formación de aductos B[a]P-N2-dG en DNA.

18. Literatura citada

- [1] Verma, N., Rettenmeier, A. and Schmitz-Spanke, S. 2011. Recent advances in the use of *Sus scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomics*. 11: 776-793.
- [2] Li, L. and Chen, H. 2002. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chemical Engineering Science*. 57: 2825-2835.
- [3] Wilson, C. and Jones, C. 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution* 88: 229-249.
- [4] Srogi, K. 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 5: 169-195.
- [5] Gelboin, H. 1980. Benzo[a]pyrene metabolism activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews*. 60: 1107-1166.
- [6] Phillips, D. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*. 443: 139-147.
- [7] Phillips, D. 2002. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*. 23: 1979-2004.
- [8] Hecht, S. 2002. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncology*. 3: 461-469.
- [9] Schmidt, J. and Bradfield, C. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 12: 55-89.
- [10] Fujii-Kuriyama, Y. and Mimura, J. 2005. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 338: 311-317.
- [11] Sapota, A. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Podstawy Metod Oceny Środowiska Pracy* 2: 179-208. [In Polish]
- [12] Klimaszewska, K. 1999. Properties, occurrence and transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Żywność, Żywnienie a Zdrowie* 4: 363-376. [In Polish]
- [13] Mielżyńska, D. 2008. Biological markers in assessment of occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. IMP, Lodz. ISBN-978-83-60818-05-3 [In Polish]
- [14] IARC. 2012. A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 100F: 111-144.

- [15] IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 92: 1-853.
- [16] IARC. 2016. On-line access <http://monographs.iarc.fr/>. [24.08.2017]
- [17] Rodgman, A., Smith, J. and Perfetti, A. 2000. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human and Experimental Toxicology*. 19: 573-595.
- [18] Yamazaki, H., Terada, M., Tsuboi, A., Matsubara, C. et al. 1987. Distribution and binding pattern of benzo(a)pyrene in rat liver, lung and kidney constituents after oral administration. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 15: 71-81.
- [19] Prough, R. A., Patrizi, V. W., Okita, R. T., Masters, B. S. S. et al. 1979. Characteristics of benzo(a)pyrene metabolism by kidney, liver, and lung microsomal fractions from rodents and humans. *Cancer Research*. 39: 1199-1206.
- [20] Hoffman, D., Schmeltz, I., Hecht, S. and Wynder, L. 1978. Tobacco carcinogenesis. In Gelboin, H. S., Ts'o, P. O. P. (Eds.), *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Academic Press, New York, pp. 85-117.
- [21] Douglas Rees, E., Mandelstam, P., Lowry, J. Q. and Lipscomb, H. 1971. A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo(a)pyrene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. 225: 96-107.
- [22] Sun, D., Wolff, K. and Kanapilly, M. 1982. Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo(a)pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 65: 231-244.
- [23] Sun, D., Wolff, K., Kanapilly, M. and McClellan, O. 1984. Lung retention and metabolic fate of inhaled benzo(a)pyrene associated with diesel exhaust particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 73: 48-59.
- [24] Verma, N., Pink, M., Petrat, F., Rettenmeier, W. and Schmitz-Spanke, S. 2012. Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration and biological response. *Archives of Toxicology*. 86: 1861-1871.
- [25] Kelman, B. and Springer, D. 1982. Movements of benzo[a]pyrene across the hemochorial placenta of the guinea pig. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 169: 58-62.
- [26] Sureau, F., Chinsky, L., Duquesne, M., Laigle, A. et al. 1990. Microspectrofluorimetric study of the kinetics of cellular uptake and metabolization of benzo(a)pyrene in human T 47 D mammary tumor cells: evidence for cytochrome P1450 induction. *European Biophysics Journal*. 18: 301-307.

- [27] Bersten, J., Sherry, A., Sterbinsky, J. P., Schwiebert, L. M., Bochner, B. S. y Schleimer, R. P. 1997. Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of adhesion molecules VCAM and ICAM-1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 17: 571-582.
- [28] Murray, I., Patterson, A and Perdew H. 2014. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nature Reviews Cancer*. 14: 801-14.
- [29] Hoffman, E., Reyes, H., Chu, F., Sander, F., Conley, L., Brooks, B, and Hankinson, O. 1991. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*. 252: 954-958.
- [30] Hogenesch, J., Chan, W., Jackiw, V., Brown, R., Gu, Y., Pray-Grant, M., Perdew, G. and Bradfield, C. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 8581-8593.
- [31] Gu, Y., Hogenesch, J. and Bradfield, C. 2000. The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40: 519-561.
- [32] Wu, D., Potluri, N., Kim, Y. and Rastinejad, F. 2013. Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Molecular Cell Biology*. 33: 4346-4356.
- [33] Ema, M., Sogawa, K., Watanabe ,N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. and Fuji-Kuriyama, Y. 1992. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 184: 246-253.
- [34] Burbach, K., Poland, A. and Bradfield, C. 1992. Cloning of the Ah receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 8185-8189.
- [35] Schmidt, J., Carver, L. and Bradfield, C. 1993. Molecular characterization of the murine Ahr gene. Organization, promoter analysis, and chromosomal assignment. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 22203-22209.
- [36] Hao, N., Whitelaw, M., Shearwin, K., Dodd, I. and Chapman-Smith, A. 2011. Identification of residues in the N terminal PAS domains important for dimerization of Arnt and AhR. *Nucleic Acids Research*. 39: 3695-3709.
- [37] Kewley, R., Whitelaw, M. and Chapman-Smith, A. 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 36: 189-204.

- [38] Hankinson, O. 1995. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 35: 307-340.
- [39] Bersten, D., Sullivan, A., Peet, D. and Whitelaw, M. 2013. bHLH-PAS proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 13: 827-841.
- [40] Enan, E. and Matsumura, F. 1995. Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochemical Pharmacology*. 49: 249-261.
- [41] Blankenship, A. and Matsumura, F. 1997. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system. *Molecular Pharmacology*. 52: 667-675.
- [42] Adachi, J., Mori, Y., Matsui, S., Takigami, H., Fujino, J., Kitagawa, H., Miller, C., Kato, T., Saeki, K. and Matsuda, T. 2001. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 31475-31478.
- [43] Schaldach, C., Riby, J. and Bjeldanes, L. 1999. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*. 38: 7594-7600.
- [44] Hao, N., Lee, K., Furness, S., Bosdotter, C., Poellinger, L. and Whitelaw INICIAL. 2012. Xenobiotics and loss of cell adhesion drive distinct transcriptional outcomes by aryl hydrocarbon receptor signaling. *Molecular Pharmacology*. 82: 1082-1093.
- [45] Kobayashi, A., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. 1996. Cooperative interaction between AhR-ARNT and SP1 for the drug- inducible expression of CYP1A1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 12310-12316.
- [46] Hahn, M. 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions*. 141: 131-160.
- [47] Emmons, R., Duncan, D., Estes, P., Kiefel, P., Mosher, J., Sonnenfeld, M., Ward, M., Duncan, I. and Crew, S. 1999. The spineless-aristopedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. *Development*. 126: 3937-3945.
- [48] Qin, H. and Powell-Coffman, J. 2004. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Developmental Biology*. 270: 64-75.
- [49] Kapitulnik, J., Wislocki, P., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D. and Conney, A. 1978. Tumorigenicity studies with diol-epoxides of benzo (a) pyrene which indicate that (+/-)-trans-7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha, 10 alpha-epoxy-7, 8, 8, 10- tetrahydrobenzo[a]pyrene is an ultimate carcinogen in newborn mice. *Cancer Research*. 38: 354-358.

- [50] Lavin, W., Wood, A., Yagi, H., Jerina, D. and Conney, A. 1976. (+/-)- trans-7,8-dihydroxy-7,8 dihydrobenzo[a]pyrene: a potent skin carcinogen when applied topically to mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 73: 3867-3871.
- [51] Shimada, T. 2006. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 21: 257-276.
- [52] Rushmore, T. and Kong, A. 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism*. 3: 481-490.
- [53] Weinshilboum, R., Otterness, D., Aksoy, I., Wood, T., Her, C. and Raftogianis, R. 1997. Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *The FASEB Journal*. 11: 3-14.
- [54] Mackenzie, P., Owens, I., Burchell, B., Bock, K., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J., Ritter, J., Schachter, H., Tephly, T., Tipton, K. and Nebert, D. 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*. 7: 255-269.
- [55] Jaiswal, A. 1994. Jun and Fos regulation of NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene expression. *Pharmacogenetics*. 4: 1-10.
- [56] Rushmore, T., Pickett, C. and Lu, A. 1994. Xenobiotic and antioxidant induction of the Ya subunit Gene. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 79-107.
- [57] Vatsis, K. P., Weber, W. W., Bell, D. A., Dupret, J. M., Evans, D. A., Grant, D. M., Hein, D. W., Lin, H. J., Meyer, U. A., Relling, M. V., Sim, E., Suzuki, T. and Yamazoe, Y. 1995. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*. 5: 1-17.
- [58] Weng, M., Hsiao, Y., Chiou, H., Yang, S., Hsieh, Y., Cheng, Y., Yang, C. and Ko, J. 2005. Alleviation of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-transferase M2. *DNA Repair*. 4: 493-502.
- [59] Sherratt, P. J., Pulford, D. J., Harrison, D. J., Green, T. and Hayes, J. D. 1997 Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochemical Journal*. 326: 837-846.
- [60] Danielle, M. and Kenneth Tew. 2003. The roll of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 22: 7369-7375.
- [61] Sundberg, K., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B. and Jernstrom, B. 1997. Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1. *Chemical Research Toxicology*. 10: 1221-1227.

- [62] Robertson, I., Guthenberg, C., Mannervik, B. and Jernstrom, B. 1986. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta, 8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Cancer Research*. 46: 2220-2224.
- [63] Hu, X., Ji, X., Srivastava, S., Xia, H., Awasthi, S., Nanduri, B., Awasthi, Y., Zimniak, P. and Singh, S. 1997. Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 345: 32-38.
- [64] Hayes, J. and Pulford, D. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 445-600.
- [65] Robertson, I., Jansson, H., Mannervik, B. and Jernstrom, B. 1986. Glutathione transferases in rat lung: the presence of transferase 7-7, highly efficient in the conjugation of glutathione with the carcinogenic (+)-7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*. 7: 295-299.
- [66] Mannervik, B. and Danielson, U. 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews Biochemistry*. 23: 283-337.
- [67] Sundberg, K., Johansson, A., Stenberg, G., Widersten, M., Seidel, A., Mannervik, B. and Jernstrom, B. 1998. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis*. 19: 433-436.
- [68] Kawajiri, K. and Fujii-Kuriyama, Y. 2007. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 464: 207-212.
- [69] König, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I. and Keppler D. 1999. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1461: 377-394.
- [70] Roberts, B. and Whitelaw, M. 1999. Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 36351-36356.
- [71] Berg, P. and Pongratz, I. 2001. Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 43231-43238.
- [72] Mimura, J., Ema, M, Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes and Development* 13: 20-25.

- [73] Dennissenko, M., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G. 1996. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hot spots in P53. *Science*. 274: 430-432.
- [74] Slaga, T., Bracken, W., Gleason, G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, M. and Conney, H. 1979. Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Research*. 39: 67-71.
- [75] Dennissenko, M., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G. 1996. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hot spots in P53. *Science*. 274: 430-432.
- [76] Phillips, D., Hewer, A., Seidel, A., Steinbrecher, T., Schrode, R., Oesch, F. and Phillips, D. 1991. Relationship between mutagenicity and DNA adduct formation in mammalian cells for fjord- and bay-region diolepoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemico-Biological Interactions*. 80: 177-186.
- [77] Gelboin, H. 1980. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixedfunction oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews*. 60: 1107-1166.
- [78] Cavalieri, E. and Rogan, E. 1992. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology and Therapeutics*. 55: 183-199.
- [79] Sullivan, P. 1985. Free radicals of benzo(a)pyrene and derivatives. *Environmental Health Perspectives*. 64: 283-295.
- [80] Wislocki, P., Wood, A., Chang, R., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Dansette, P., Herina, D. and Conney, A. 1976. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells. *Cancer Research*. 36: 3350-3357.
- [81] Zhu, H., Li, Y. and Trush, M. 1995. Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA/2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 130: 108-120.
- [82] Ling, H., Sayer, J., Plosky, B., Yagi, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., Jerina, D. and Yang, W. 2003. Crystal structure of a benzo[a]pyrene diol epoxide adduct in a ternary complex with a DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 2265-2269.
- [83] Hao, N. and Whitelaw, M. 2013. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical Pharmacology*. 86: 561-70.
- [84] Xie, G., Peng, Z. and Raufman, J. 2012. Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 302: 1006-1015.

- [85] Harman-Stemann, T., Bothe, H. and Abel, J. 2009. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*. 77: 508-520
- [86] Boulton, T., Nye, S. and Robbins, D. 1991. ERK's: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylates in response to insulin and NGF. *Cell*. 65: 663-675.
- [87] Derijad, B., Hibi, M. and Wu, I. 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*. 76: 1025-1027.
- [88] Kyriakis, J. M., Banerjee, P. and Nikolakaki, E. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinase. *Nature*. 369: 156-160.
- [89] Rouse, J., Cohen, P. and Trigon, S. 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock protein. *Cell*. 78: 1027-1037.
- [90] Rojas, M., Marie, B., Vignaud, J., Martinet, N., Siat, J., Grosdidier, G., Cascorbi, I. and Alexandrov, K. 2004. High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. *Cancer Letters*. 207: 157-163.
- [91] Alexandrov, K., Rojas, M. and Satarug, S. 2010. The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicology Letters*. 198: 63-68.
- [92] Wolff, S., Harper, P., Wong, J., Mostert, V., Wang, Y. and Abel, J. 2001. Cell-specific regulation of human aryl hydrocarbon receptor expression by transforming growth factor-beta(1). *Molecular Pharmacology*. 59: 716-724.
- [93] Akahoshi, E., Yoshimura, S. and Ishihara-Sugano, M. 2006. Over expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. *Environmental Health*. 7: 5-24.
- [94] Zhang, L., Bao, Y. and Li, J. 2011. Nuclear respiratory factor-1 is involved in mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in human bronchial epithelial cells. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 109: 115-122.
- [95] Perez, D., Handa, R., Yang, R. and Campain, J. 2008. Gene expression changes associated with altered growth and differentiation in benzo[a]pyrene or arsenic exposed normal human epidermal keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology*. 284: 491-508.

- [96] Chramostová, K., Vondráček, J., Sindlerová, L., Vojtesek, B., Kozubík, A. and Machala M. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate cell proliferation in rat hepatic epithelial stem-like WB-F344 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196: 136-148.
- [97] Andrysík, Z., Machala, M., Chramostová, K., Hofmanová, J., Kozubík, A. and Vondráček, J. 2006. Activation of ERK1/2 and p38 kinases by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells is associated with induction of apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 211: 198-208.
- [98] Denison, M. and Nagy, S. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 43: 309-334.
- [99] Li, J., Tang, M., Liu, B., Shi, X. and Huang, C. 2004. A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal C141 cells. *Oncogene*. 23: 3932-3944.
- [100] Patten, H., DeLong, M. and Merrill, A Jr. 2002. Benzo(a)pyrene activates extracellular signal-related and p38 mitogen-activated protein kinases in HT29 colon adenocarcinoma cells: involvement in NAD(P)H:quinone reductase activity and cell proliferation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 183: 160-167.
- [101] Tannheimer, S., Ethier, S., Caldwell, K. and Burchiel, S. 1998. Benzo[a]pyrene- and TCDD-induced alterations in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line. *Carcinogenesis*. 19: 1291-1297.
- [102] Van Agen, B., Maas, L., Zwingmann, I., Van Schooten, F. and Kleinjans J. 1997. B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 30: 287-292.
- [103] Tan, Z., Chang, X., Puga, A. and Xia, Y. 2002. Activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochemical Pharmacology*. 64: 771-780.
- [104] Tan, Z., Huang, M., Puga, A. and Xia, Y. 2004. A critical role for MAP kinases in the control of Ah receptor complex activity. *Toxicological Science*. 82: 80-87.
- [105] Ding, J., Ning, B., Gong, W., Wen, W., Wu, K., Liang, J., He, G., Huang, S., Sun, W., Han, T., Huang, L., Cao, G., Wu, M., Xie, W and Wang, H. 2009. Cyclin D1 Induction by Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide via the phosphatidylinositol 3-inase/Akt/MAPK- and p70s6k-dependent pathway promotes cell transformation and tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 284: 33311-33319.
- [106] Occhi, G., Barollo, S., Regazzo, D., Bertazza, L., Galuppini, F., Guzzardo, V., Jaffrain-Rea, M., Vianello, F., Ciato, D., Ceccato, F., Watutantrige-Fernando S., Bisognin, A., Bortoluzzi, S., Pennelli, G., Boscaro, M., Scaroni, C. and Mian, C. 2015. A constitutive active

MAPK/ERK pathway due to BRAFV600E positively regulates AHR pathway in PTC. *Oncotarget*. 6: 32104-32114.

[107] Christmann, M., Boisseau, C., Kitzinger, R., Berac, C., Allmann, S., Sommer, T., Aasland, D., Kaina, B. and Tomicic, M. 2016. Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Research*. 44: 10727-10743.

[108] Park, S., Mazina, O., Kitagawa, A., Wong, P. and Matsumura, F. 2004. TCDD causes suppression of growth and differentiation of MCF10A, human mammary epithelial cells by interfering with their insulin receptor signaling through c-Src kinase and ERK activation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 18: 322-331.

[109] Nebert, D., Dalton, T., Okey, A. and González, F. 2004. Role of Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 23847–23850.

[110] Frauenstein, K., Tigges, J., Soshilov, A., Kado, S., Raab, N., Fritsche, E., Haendeler, J., Denison, M., Vogel, C. and Haarmann-Stemann, T. 2015. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the widely used Src family kinase inhibitor 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2). *Archives of Toxicology*. 89: 1329-1336.

[111] Courcot, E., Leclerc, J., Lafitte, J., Mensier, E., Jaillard, S., Gosset, P., Shiralì, P., Pottier, N., Broly, F. and Lo-Guidice, J. 2012. Xenobiotic metabolism and disposition in human lung cell models: comparison with in vivo expression profiles. *Drug Metabolism and Disposition*. 40: 1953-1965.

[112] Kim, J., Sherman, M., Curriero, F., Guengerich, F., Strickland, P. and Sutter, T. 2004. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 199: 210-219.

[113] Andrieux, L., Langoue, S., Fautrel, A., Ezan, F., Krauser, J., Savouret, J., Guengerich, F., Baffet, G. and Guillouzo, A. 2004. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Molecular Pharmacology*. 65: 934-943.

[114] Pontillo, C., García, M., Peña, D., Cocca, C., Chiappini, F., Alvarez, L., Kleiman de Pisarev, D. and Randi, A. 2011. Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Toxicological Science*. 120: 284-296.

115 Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G. and Rahmani, R. 2000. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology*. 153: 73-82

[116] Minsavage, G., Vorobjikina, D., and Gasiewicz, T. 2003. Mutational analysis of the mouse aryl hydrocarbon receptor tyrosine residues necessary for recognition of dioxin response elements. *Arch. Biochem. Biophys.* 412: 95–105.

[117] Ogiso, H., Kagi, N., Matsumoto, E., Nishimoto, M., Arai, R., Shirouzu, M., Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y. and Yokoyama, S. 2004. Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry.* 43: 15510-15519.

[118] Backlund, M. and Ingelman-Sundberg, M. 2005. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell Signal.* 17: 39-48.