



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTOS EPIGENÉTICOS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE LOS CYP1A

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAÚL EDUARDO GARIBAY MALDONADO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALETA VELASCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX. NOVIEMBRE, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTOS EPIGENÉTICOS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN
DE LOS CYP1A

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RAÚL EDUARDO GARIBAY MALDONADO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. FABIÁN JESÚS ARECHAVALETA VELASCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. NOVIEMBRE, 2018



OFICIO CPCB/1063/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de septiembre del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GARIBAY MALDONADO RAÚL EDUARDO** con número de cuenta **307002286** con la tesis titulada "**Efectos epigenéticos en la regulación de la expresión de los CYP1A**", realizada bajo la dirección del **DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**:

- Presidente: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
Vocal: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES
Secretario: DR. ALFONSO LEÓN DEL RÍO
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de noviembre del 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas.
- Apoyo financiero: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado en el programa de apoyo de becarios (CVU 774535), Dr. Rafael Camacho Carranza y Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre.
- Tutores: Dr. Rafael Camacho Carranza (Principal), Dr. Alfonso León del Río, Dr. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- Apoyo en la proporción de clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio: Dr. Alfonso Dueñas González.
- Apoyo en la administración de animales: Luis Serrano García y Jorge Omar García Rebollar.
- Apoyo en el cuidado y manejo de animales: Cynthia María Navarro Mabarak y Érika Elizabeth Miguel Cruz.
- Apoyo en la enseñanza de las técnicas: Cynthia María Navarro Mabarak, Sandra Luz Hernández Ojeda, Rebeca Santes Palacios.
- Apoyo en la eutanasia de los animales: Cynthia María Navarro Mabarak, Sandra Luz Hernández Ojeda, Rebeca Santes Palacios, Mónica María Loaiza Zuluaga, Laurel Hernández Gutiérrez, Ana Lilia Marroquín Pérez y Cristina Jiménez López.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	4
AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.....	5
GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS	8
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Metilación de DNA.	13
Metilación de mantenimiento.	15
Metilación <i>de novo</i>	15
Desmetilación de DNA.	16
Acetilación de histonas.	17
HATs	19
Citocromos P450.	20
Subfamilia CYP1A.	21
Inducción de CYP1A por la vía AHR-ARNT.....	24
Organización genética de CYP1A.....	27
Regulación de <i>CYP1A1</i>	28
Regulación de <i>CYP1A2</i>	30
La subfamilia CYP1A durante la gestación.	31
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos particulares	33
JUSTIFICACIÓN	33
ANTECEDENTES.	34
METODOLOGÍA.....	37
Tratamiento de ratas.....	37
Actividad enzimática (Obtención de microsomas).....	40
Actividad enzimática (Ensayos de Actividad enzimática de CYP1A1 y CYP1A2).	40
Actividad enzimática (Análisis de datos).....	41
RT-qPCR (Extracción de RNA).....	41
RT-qPCR (Medición de Integridad y Cuantificación de RNA total).....	42
RT-qPCR (Transcripción inversa).	42
RT-qPCR (Preparación de la curva para qPCR Múltiplex y evaluación de los niveles de mRNA de <i>CYP1A1</i> y <i>CYP1A2</i> en las muestras problema).	42

RT-qPCR (Análisis de resultados).....	43
Western blot (SDS-PAGE).....	43
Western blot (Electrotransferencia).....	44
Western blot (Inmunodetección y Revelación con Luminiscencia).....	44
Western blot (Análisis densitométrico).....	45
Análisis estadístico.....	45
RESULTADOS	46
Ensayos de actividad enzimática.....	46
qPCR.....	47
Western Blot.....	49
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES	56
LITERATURA CITADA.....	57
ANEXO	63

GLOSARIO DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

5caC: 5-carboxilcitosina

5caU: 5-carboxiluracilo

5fC: 5-formilcitosina

5fU: 5-formiluracilo

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

ACN: Acetaminofenilo

AID: Citidina desaminasa inducida por activación

AHR: Receptor de hidrocarburos de arilos

AhrRE: Elementos de respuesta a AHR, también llamados XRE

APOBEC: Enzima editora del mRNA de la apolipoproteína B similar al polipéptido catalítico

ARNT: Translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilos

AzaC: 5-Azacidina

BER: Sistema de reparación de escisión de bases

bHLH: Hélice-bucle-hélice básico

B-Naf: β -Naftoflavona

BTE: Elemento de transcripción basal

BTEB: Proteína de unión al elemento de transcripción basal

CBP: Proteína de unión a CREB

CYP1A1: Gen *CYP1A1*

CYP1A1: Proteína CYP1A1

CYP1A2: Gen *CYP1A2*

CYP1A2: Proteína CYP1A2

CYP450: Citocromos P450

DNMT1: DNA metiltransferasa 1

DNMT3a: DNA metiltransferasa 3a

DNMT3b: DNA metiltransferasa 3b

DNMT3L: Proteína tipo DNA metiltransferasa 3

DRE: Elementos de respuesta a dioxina, también llamados XRE

DTT: Ditioneitol

FAD: Flavina adenina dinucleótido

FICZ: 6-formilindolo [3,2b] carbazol

FMN: Flavina mononucleótido

GAPDH: Gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HAT: Histona acetiltransferasa

HDAC: Histona desacetilasa

Hidra: Hidralazina hidrocloreto

HNF1 α : Factor nuclear de hepatocito 1 α

HNF4: Factor nuclear de hepatocito 4 α

hsCYP1A1: Gen *CYP1A1* de *Homo sapiens*

hsCYP1A1: Proteína CYP1A1 de *Homo sapiens*

hsCYP1A2: Gen *CYP1A2* de *Homo sapiens*

hsCYP1A2: Proteína de CYP1A2 de *Homo sapiens*

hsCYP450: Citocromos P450 de *Homo sapiens*

Hsp90: Chaperona de choque térmico de 90 kDa

HTF: Fragmentos pequeños de HpaII

KCl: Cloruro de potasio

KO: «Knock Out»

MBD4: Dominio 4 de unión a metilo

MDP: Metileno dioxifenil

MeCP2: Proteína 2 de unión a metilo

NES: Señal de exportación nuclear

NLS: Señal de localización nuclear

NPC: Complejo del poro nuclear

NRE: Elemento de regulación negativa

PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PAS: Per-ARNT-Sim

PBO: Butóxido de piperonilo

PCAF: Factor asociado a p300/CBP

PCNA: Antígeno nuclear de células proliferativas

rnCYP1A1: Gen *CYP1A1* de *Rattus norvegicus*

rnCYP1A1: Proteína CYP1A1 de *Rattus norvegicus*

rnCY1A2: Gen *CYP1A2* de *Rattus norvegicus*

rnCYP1A2: Proteína CYP1A2 de *Rattus norvegicus*

SAM: S-adenosil-L-metionina

Sp1: Factor de transcripción, proteína 1 de especificidad

SRA: Dominio asociado a RING y SET

SRC-1: Coactivador 2 del receptor de esteroides

TAE: Amortiguador Tris-Acetato-EDTA

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

TDG: Timina DNA glucosilasa

TET: Enzimas dioxigenasas de translocación diez-once

tPA: Forbol 12-O-tetradecanotato 13-acetato

UHRF1: Homeodominio de planta tipo ubiquitina y dominio dedo RING1

Val: Valproato de magnesio

XAP2: Proteína X del virus de hepatitis B, también conocida como AID o ARA9

XRE: Elementos de respuesta a xenobióticos

RESUMEN

CYP1A1 y CYP1A2 son enzimas del metabolismo de fase I, encargadas de la desintoxicación de compuestos exógenos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas, entre otros. Además, son importantes para el metabolismo de fármacos. CYP1A1 se expresa principalmente en tejidos extrahepáticos, en cuanto a hígado, su expresión es muy baja. En cambio, CYP1A2 es altamente expresada en hígado, mientras que en otros órganos su expresión es mínima o nula. La expresión de estas enzimas cambia a lo largo de la vida, por ello, la eficiencia de los tratamientos también depende del nivel de expresión de estas enzimas. Es importante conocer sus mecanismos de regulación para ofrecer tratamientos adecuados para el paciente. La metilación de DNA y la acetilación de histonas han mostrado ser relevantes en la regulación de *CYP1A1* y *CYP1A2*. Sin embargo, no se ha reportado cómo estos procesos epigenéticos regulan a estas enzimas en diferentes periodos de edad. La metilación de DNA ha mostrado ser un proceso dinámico con el cual se puede determinar la edad de un tejido. Con esta premisa, pensamos que la metilación de DNA y la acetilación de las histonas tienen un papel en la regulación genética de *CYP1A1* y *CYP1A2*, el cual cambia de acuerdo con la edad del individuo. Para ello, hemos evaluado el nivel de mRNA, proteína y actividad enzimática correspondiente de *CYP1A1* y *CYP1A2*, en hígado de ratas destetadas de 4 semanas (1 mes) y ratas adultas de 7 meses (30 semanas), sometidas a cuatro tratamientos distintos: el primer grupo es un control, el segundo tratado con β -Naftoflavona (inductor de CYP1A), el tercero tratado con clorhidrato de hidralazina (inhibidor de la DNMT1, conduciendo a una desmetilación pasiva del DNA) y valproato de magnesio (inhibidor de la desacetilación de las histonas H3 y H4), y el cuarto tratado con β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio. Hemos encontrado que la metilación de DNA y la acetilación de histonas no parecen tener un papel en la regulación de *CYP1A2* en hígado de ratas de 4 semanas, sin embargo, en ratas de 7 meses, hay una respuesta que apunta a que estos mecanismos epigenéticos son importantes en la regulación de este gen en esta edad. En cuanto a *CYP1A1*, no hemos obtenido evidencia que indique que la metilación de DNA y la acetilación de histonas son relevantes en su regulación transcripcional. Por ello, podemos concluir que la regulación de estos *CYP1A2* cambia a lo largo de la vida del individuo y en adulto podría involucrar la metilación de DNA y/o el grado de acetilación de histonas.

ABSTRACT

CYP1A1 and CYP1A2 are enzymes of phase I metabolism, responsible for the detoxification of exogenous compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines, among others. In addition, they are important for drug metabolism. CYP1A1 is expressed mainly in extrahepatic tissues, but in the liver, its expression is very low. In contrast, CYP1A2 is highly expressed in the liver, while in other organs has minimal or null expression. The expression of these enzymes changes throughout life; therefore, the efficiency of the treatments also depends on the expression level of these enzymes. It is important to know their regulatory mechanisms to offer adequate treatments for the patient. DNA methylation and histone acetylation have shown to be relevant in the regulation of *CYP1A1* and *CYP1A2*. Nonetheless, it has not been reported how these epigenetic processes regulate these enzymes in different age periods. DNA methylation has proven to be a dynamic process which allows determining the age of a tissue. With this premise, we could think that DNA methylation and histone acetylation have a role in the genetic regulation of *CYP1A1* and *CYP1A2*, which changes according to organism age. To this end, we have evaluated *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNA level, protein level and the corresponding enzymatic activity in the liver of 4 weeks old rats (1 month) and 7 months old rats (30 weeks), subjected to four different treatments: The first group has been a control, the second one was treated with β -Naphthoflavone (CYP1A subfamily inducer), the third group was treated with hydralazine hydrochloride (DNMT1 inhibitor, which leads to a passive DNA demethylation) and magnesium valproate (H3 and H4 deacetylation inhibitor), and the fourth group was treated with β -Naphthoflavone, hydralazine hydrochloride and magnesium valproate. We have found that DNA methylation and histone acetylation do not seem to play a role in the regulation of *CYP1A2* in the liver of 4 weeks old rats, however, in 7 months old rats, there is a response that suggests that these epigenetic mechanisms are important in the regulation of this gene at this age. Regarding *CYP1A1*, we have not obtained evidence indicating that DNA methylation and histone acetylation are relevant in its transcriptional regulation. Therefore, we can conclude that the *CYP1A2* regulation changes throughout the life of the rat, and, in adult, DNA methylation and/or histone acetylation could be involved.

INTRODUCCIÓN

En eucariontes, el DNA se encuentra compacto dentro del núcleo, a esta forma se le conoce como cromatina. Esta estructura se compone de DNA empaquetado mediante proteínas básicas llamadas histonas, las cuales forman un octámero llamado nucleosoma (Inche and La Thangue 2006, Kornberg 1974). La cromatina es dinámica, aunque se especulaba que su única función era la compactación, ahora se sabe que permite la regulación de diferentes procesos como la recombinación, la reparación de DNA, la replicación, la formación del cinetocoro y el centrómero, y la transcripción (Li, Carey and Workman 2007). La cromatina se puede encontrar en dos estados: eucromatina y heterocromatina. Eucromatina se refiere a la cromatina transcripcionalmente activa y heterocromatina implica represión genética (Allis and Jenuwein 2016). La heterocromatina se subdivide en heterocromatina constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva es aquella que permanece condensada en interfase, es DNA satélite, esencial para funciones estructurales y que corresponde a regiones centroméricas y teloméricas, la cantidad de genes en estas regiones es muy escasa y los niveles de transcripción son igualmente mínimos. La otra forma es Heterocromatina facultativa, que tiene una conformación compacta, pero tiene la capacidad de adoptar una transcripcionalmente activa bajo ciertas circunstancias: por ciertas fases del desarrollo o del ciclo celular, cambios espaciales de la localización nuclear (del centro a la periferia o viceversa), e impronta (Trojer and Reinberg 2007) de la cual uno de los resultados es la inactivación de unos de los cromosomas X en hembras (Peters et al. 2002, Haaf and Schmid 2000). La compactación de la cromatina y el posicionamiento de los nucleosomas repercuten en la expresión genética; sin embargo, esto se debe a múltiples mecanismos, como la metilación de DNA y la acetilación de histonas (Razin 1998), mecanismos que se describen a continuación.

Metilación de DNA.

Una de las modificaciones covalentes que puede sufrir el DNA es la metilación, la cual es fundamental para el desarrollo, la impronta genómica, represión genética de elementos transposones y la inactivación del cromosoma X (Jin, Li and Robertson 2011). En células de mamíferos, la metilación de DNA ocurre principalmente en la posición 5' del anillo de citosina (5mC), alterando la apariencia del surco mayor del DNA (Jin et al. 2011, Jones and Takai 2001). Se lleva a cabo por enzimas llamadas DNA metiltransferasas (DNMTs), usando como donante del grupo metilo a la S-adenosil-L-metionina (SAM). Esta modificación ocurre en el dinucleótido CpG principalmente, aunque durante el desarrollo es común la metilación de citosinas en sitios no-CpGs, en ovocitos y en neuronas maduras, aunque se desconoce su función (Jin et al. 2011, Wu and Zhang 2014). Existen aproximadamente 3×10^7 sitios CpGs en el genoma humano (Edwards et al. 2017) y aproximadamente el 70-80% se encuentran metilados, consistiendo las

citocinas metiladas (5mC) el 1% del total de las bases del DNA (Bird 1999, Bird 2002). Hay grupos de sitios CpGs que suelen asociarse principalmente a promotores y los primeros exones de genes, y en menor medida a regiones cercanas al extremo final 3' del gen (Un ejemplo es el gen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); estos sitios se denominan islas CpGs (Bird 1986, Jones and Takai 2001). Una isla CpGs se define como una secuencia cercana al extremo 5' del gen, con una longitud de 500 a 2000 pares de bases, que es rica en contenido GC (mayor al 50%, específicamente 67%, mientras que el resto del genoma posee 41% de contenido GC) (Antequera 2003), cuyos dinucleótidos CpGs no se encuentran metilados (Varriale and Bernardi 2010) y que posee un radio de CpGs observados/CpGs esperados con un valor de 0,6 (Takai and Jones 2002). Son regiones donde la frecuencia de los sitios CpGs es diez veces mayor que el promedio del genoma (Antequera 2003). Las islas CpGs fueron identificadas como secuencias con múltiples sitios de corte para la enzima de restricción HpaII (Cross and Bird 1995), la cual tiene como blanco la secuencia palindrómica 5'C[^]CGG3' (Mann and Smith 1977), por lo que fueron llamadas Islas de fragmentos pequeños de HpaII (HTF) (Cross and Bird 1995). La enzima HpaII es incapaz de realizar el corte si la citosina central se encuentra metilada (Hammons et al. 2001). En el genoma humano se estiman 45 000 islas CpGs y el 60% de los promotores están asociados a estas islas, de los cuales, todos los promotores de los genes constitutivos están vinculados a islas CpGs, además de algunos genes tejido-específico y genes involucrados en el desarrollo (Antequera 2003, Deaton and Bird 2011). Cabe destacar que las islas CpGs poseen características de cromatina transcripcionalmente activa, como hiperacetilación de las histonas H3 y H4, y una separación mayor entre nucleosomas, debida a una deficiencia de la histona H1 (Antequera 2003).

La metilación de DNA permite la represión de elementos transposones, se involucra en la inactivación del cromosoma X en hembras y permite la expresión alelo-específica en la impronta genética (Ooi and Bestor 2008). Se ha observado que la metilación adyacente al sitio de inicio de la transcripción bloquea la iniciación; sin embargo, cuando la metilación se encuentra en el cuerpo del gen, incluso estimula la elongación de la transcripción. La metilación de DNA también interviene en el empalme de exones (Jones 2012). Se ha observado que la metilación de DNA regula la actividad de secuencias reguladoras, como potenciadores o aislantes. También se observa que la metilación de islas CpGs ocurre sólo en genes donde se busca una represión a largo plazo, como ocurre en genes que se expresan exclusivamente en células germinales y su expresión en células somáticas sería aberrante, por ejemplo, los genes localizados en el cromosoma X inactivado. Aún no está claro si la metilación de DNA en sitios de inicio de la transcripción carentes de islas CpGs permite reprimir la transcripción, aunque se aprecia que la metilación en estos sitios es más dinámica y parece depender del tejido (Jones 2012). La

metilación de DNA prevé la transcripción de DNA parásito (ya que sus promotores mimetizan una isla CpG, atrayendo factores de transcripción), manteniendo la estabilidad genómica. Otra forma de mantener la estabilidad es impedir la recombinación de secuencias repetitivas (Antequera 2003). El dominio CXXC reconoce sitios CpGs no metilados, y este dominio se encuentra en la proteína FBXL10, la cual es antagonista de la metilación de DNA, llevada a cabo por complejos represores Polycomb, y permite que las islas CpGs se encuentren desmetiladas (Edwards et al. 2017).

Metilación de mantenimiento.

Los patrones de metilación se transmiten mitóticamente (Ooi and Bestor 2008), y a este tipo de metilación se le conoce como metilación de mantenimiento. Esta reacción es llevada a cabo por la DNA Metiltransferasa 1 (DNMT1), que depende del homeodominio de planta tipo ubiquitina y del dominio dedo RING 1 (UHRF1), los cuales se unen a sitios CpGs hemimetilados (Jeltsch 2006, Wu and Zhang 2014). También depende de PCNA (Antígeno nuclear de células proliferativas), el cual es el factor de procesividad de la DNA polimerasa δ , gracias a que la DNMT1 posee un dominio de unión a esta proteína en su extremo N terminal, lo cual indica que la metilación de mantenimiento ocurre en la horquilla de replicación (Iida et al. 2002). Este mecanismo depende de una reproducción semiconservativa de los patrones de metilación de las secuencias parentales a las secuencias nacientes (Bird 2002). La DNMT1 de humano posee aproximadamente 1.616 residuos de aminoácidos; su región amino tiene funciones reguladoras, mientras que los últimos 500 residuos en el carboxilo terminal representan la parte catalítica (Pradhan et al. 2008). La DNMT1 tiene preferencia por sustratos hemimetilados flanqueados por secuencias CCGG (Jeltsch 2006) y también posee un dominio de unión a sitios CpGs no metilados CXXC, además de que interactúa con la proteína multidomínios UHRF1, la cual contiene un dominio SRA (Dominio asociado a RING y SET) que le permite unirse a sitios CpGs hemimetilados (Pradhan et al. 2008, Edwards et al. 2017, Avvakumov et al. 2008). La metilación de mantenimiento ha mostrado una fidelidad muy variable: mientras que secuencias de genes importados tienen una fidelidad alta, en otras secuencias es menos eficiente, incluso en poblaciones de células clónicas donde la tasa de cambio puede ser del 4-5% de los sitios CpGs por generación celular (Edwards et al. 2017, Bird 2002, Bird 1986). Existe evidencia que asegura que la metilación de DNA no interviene en el silenciamiento de promotores activos, sino que refuerza el estado de silenciamiento, siendo un mecanismo de silenciamiento secundario (Bird 2002).

Metilación *de novo*.

Además de la metilación de mantenimiento, existe la metilación de DNA *de novo*, la cual es independiente de la replicación. Un ejemplo de este mecanismo ocurre durante la impronta

genómica, donde ciertos loci sufren metilación de DNA que dependen del origen parental, por lo que la expresión de estos genes improntados es monoalélica (Chedin, Lieber and Hsieh 2002). La actividad de la metilación *de novo* es en su mayoría detectada durante el desarrollo embrionario temprano (Okano et al. 1999). La familia DNMT3 incluye tres miembros: las DNA metiltransferasas *de novo* DNMT3a y DNMT3b, y la DNMT3L. La DNMT3L carece de actividad de DNA metiltransferasa, pero es esencial como factor regulador en células germinales (proespermatozoos y ovocitos en crecimiento, los únicos tipos celulares donde se expresa) (Edwards et al. 2017, Jia et al. 2007). Tanto la DNMT3a como la DNMT3b tienen un dominio de unión a DNA de 50 residuos de aminoácidos, que al dimerizar duplica su tamaño. La metilación *de novo* parece depender de un tetrámero conformado por dos moléculas de DNMT3A2 y dos de DNMT3L, el cual se une al nucleosoma para efectuar la metilación en zonas transcripcionalmente inactivas en genes improntados de células germinales de mamíferos (Jia et al. 2007). También se ha observado *in vitro* que la DNMT1 es capaz de metilar DNA *de novo*, sin embargo, *in vivo* no ha demostrado la misma capacidad (Bird 1999). Se ha mostrado que las secuencias repetidas pueden atraer la metilación *de novo* (Edwards et al. 2017).

Desmetilación de DNA.

La desmetilación del DNA es un fenómeno que se presenta en el desarrollo de células germinales primordiales (durante la migración, con una nueva onda de metilación de estas células después de la migración) y en la preimplantación de los embriones (en la fase de blastocisto) (Edwards et al. 2017, Wu and Zhang 2014). La desmetilación del DNA puede ocurrir debido a diferentes causas, ya sea de forma activa (es decir, debido a reacciones enzimáticas e independiente de la replicación) o pasiva (que es dependiente de la fase de síntesis de DNA). La desmetilación activa puede deberse a mecanismos dependientes o independientes de oxidación, los cuales son muy diversos (Wu and Zhang 2014). Primero se describen a grandes rasgos los mecanismos de desmetilación activa dependientes de oxidación.

Se piensa que la desmetilación activa del DNA se inicia por las mismas DNA metiltransferasas DNMT3a y DNMT3b, ya que, según reportes, median la desaminación oxidativa de la citosina en el carbono 4, en ausencia del cofactor SAM y en condiciones oxidantes. Cuando una citosina se encuentra metilada, la desaminación oxidativa da como resultado una timina, que al estar emparejada con una guanina produce un desajuste de timina-guanina, el cual puede atraer enzimas Timina DNA glucosilasas y el dominio 4 de unión a metilo (MBD4), los cuales remueven la timina. El sitio abásico es reconocido por el sistema de reparación de escisión de bases (BER), que sustituye la timina por una citosina. La 5mC también puede sufrir una transaminación mediada por enzimas de la familia AID (Citidina desaminasa inducida por activación)/APOBEC, formando una timina. La desmetilación activa también puede llevarse a cabo mediante enzimas

dioxigenasas de translocación diez-once (TET), las cuales convierten la 5mC en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), después la 5hmC en 5-carboxilcitosina (5caC), y finalmente la Timina DNA glucosilasa (TDG) hace una escisión tanto de la 5-formilcitosina (5fC) como de la 5caC, dejando un sitio abásico el cual es restaurado por la maquinaria BER (Conticello 2008, Jones 2012, Ooi and Bestor 2008, Trerotola et al. 2015, Wu and Zhang 2014). Tras la transaminación, es posible que la timina sea convertida en 5-formiluracilo (5fU), mediante una timina hidroxilasa, posteriormente a 5-carboxiluracilo (5caU) tras tres oxidaciones sucesivas llevadas a cabo por la misma enzima, y finalmente el 5caU sufre una descarboxilación efectuada por la isoorotato descarboxilasa formando un uracilo (Wu and Zhang 2014).

Entre los mecanismos de desmetilación activa independientes de oxidación está la remoción de la 5mC de forma directa, que puede ser mediante el mecanismo de escisión de nucleótidos (NER), el cual repara lesiones de DNA de varios nucleótidos (24-32), pudiendo sustituir una 5mC por una citosina. Alternativamente, las DNA glucosilasas (como MBD4), pueden escindir la 5mC, aunque su actividad es menor en comparación con la escisión de timinas y uracilo, cuya transaminación puede ocurrir mediante la actividad de enzimas de la familia AID/APOBEC (Wu and Zhang 2014).

Las islas CpGs y los promotores de genes activos permanecen desmetilados puesto que el blanco de la metilación es el nucleosoma, los cuales no se encuentran en estos sitios. Además, los nucleosomas adyacentes al sitio de inicio de la transcripción poseen marcas de histonas antagonistas de la metilación (H3K4me3 y la variante H2A.Z), lo cual permite reclutar a enzimas TET, las cuales pueden ejecutar la desmetilación activa del DNA (Jones 2012).

Acetilación de histonas.

Los nucleosomas son la unidad fundamental de la cromatina. Estos se componen de un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Un tetrámero de las histonas H3-H4 y dos veces el dímero H2A-H2B), siendo dos moléculas de cada histona en el complejo. Hay 146 pares de bases de DNA enredadas en cada nucleosoma y las histonas son globulares en su mayoría; sin embargo, su cola N-terminal carece de estructura (Kouzarides 2007, Turner 2000). La histona H1 se encuentra en el DNA espaciador. Es una marca dinámica y su presencia se asocia a represión transcripcional, siendo relevante para la estabilización de la fibra de 30 nm, también llamada solenoide, la cual consta de seis nucleosomas unidos estrechamente en forma de barril (Misteli et al. 2000). Por ello, la histona H1 es fundamental en la formación de la heterocromatina constitutiva, mientras que la fibra de 11 nm está desprovista de H1 (Trojer and Reinberg 2007). Las histonas están sujetas a modificaciones postranscripcionales, lo cual cambia sus propiedades (Misteli et al. 2000). Se han descrito 60 residuos en las colas de las histonas que están sujetos a modificaciones postranscripcionales y actualmente se han registrado ocho tipos de

modificaciones (Acetilación de lisinas, metilación de lisinas y argininas, fosforilación de serinas y treoninas, ubiquitinación y sumoilación en lisinas, ADP ribosilación en glutamato, desiminación de argininas a citrullinas e isomerización de prolinas de cis a trans) (Kouzarides 2007). La acetilación de las histonas es la más frecuente, la cual es una marca reversible asociada a una cromatina transcripcionalmente activa. La eucromatina se encuentra hiperacetilada y la heterocromatina se halla hipoacetilada (Grunstein 1997, Turner 2000). Esta marca se coloca por una Histona acetil transferasa (HAT), la cual, usando Acetil-coenzima A como cofactor, añade un grupo acetilo en el grupo amino ϵ de los residuos de lisina, el cual es un aminoácido con carga positiva. Como consecuencia de la acetilación, se neutraliza la carga neta de las lisinas, lo que conlleva a una disminución de la afinidad de las colas de las histonas por el DNA, el cual posee carga negativa gracias a los grupos fosfatos. La disminución de la afinidad entre el DNA y los nucleosomas da como resultado una cromatina accesible para la maquinaria encargada de la transcripción (Rice and Allis 2001). Aunque también se ha manifestado que aún más importante que la neutralización de la carga, los patrones de acetilación de los residuos de lisina en las colas de las histonas permiten reclutar a complejos remodeladores dependientes de ATP, que remueven los nucleosomas, permitiendo así, una mayor accesibilidad de la maquinaria transcripcional al promotor y facilitando la elongación de la transcripción (Eberharter and Becker 2002). Esta idea está reforzada con el hecho de que se ha reportado que algunas HATs tienen especificidad por acetilar ciertos residuos de lisina (Sternier and Berger 2000). Se ha observado que la acetilación de ciertas histonas, especialmente de las histonas H2A y H2B, desestabiliza la interacción DNA-nucleosoma (Inche and La Thangue 2006). En células diferenciadas, la mayoría de la cromatina se encuentra compactada, inactiva transcripcionalmente y caracterizada por hipoacetilación de histonas, mientras que genes constitutivos y tejido-específico, los cuales son transcripcionalmente activos, presentan acetilación de histonas (Eberharter and Becker 2002). Los genes constitutivos están agrupados en regiones que se replican de manera temprana durante la fase S del ciclo celular, los genes tejido-específico se replican temprano en las estirpes celulares que los expresan y regiones carentes de genes replican tardíamente. Las regiones que replican tempranamente se empaquetan con histonas acetiladas, mientras que las que replican tardíamente se empaquetan con histonas desacetiladas (Lande-Diner et al. 2007). No únicamente los nucleosomas cercanos al promotor se encuentran hiperacetilados, también en el cuerpo del gen, lo que evita que la RNA polimerasa II sufra una pausa (Nakatani 2001). Todas las histonas son dianas de la acetilación, incluyendo a la H1 (Izzo and Schneider 2016). La histona H3 se acetila en los residuos 9, 14, 18 y 23 de lisina del extremo amino terminal (Strahl and Allis 2000), y la histona H4 en los residuos 5, 8, 12 y 16 del mismo extremo (Grunstein 1997).

HATs

Se han descubierto muchas HATs, las cuales se han clasificado de acuerdo con su localización celular (nucleares o citoplasmáticas) y a su nivel de homología. Las nucleares se encargan de mediar la transcripción, mientras que las citoplasmáticas parecen acetilar histonas recientemente sintetizadas que se transportan al núcleo y ahí se desacetilan. Las HATs pueden asociarse a dominios de transactivación, que pueden requerir a una proteína adaptadora, como TRRAP y E2F en humanos (Eberharther and Becker 2002). La mayoría de los coactivadores asociados a HATs contienen bromodominios, los cuales son motivos de unión a lisinas acetiladas, con una longitud de aproximadamente 110 aminoácidos (Dhalluin et al. 1999, Zeng et al. 2008). Todos los bromodominios tienen una estructura levógira, cuatro hélices alfa y dos bucles entre las hélices que forman el motivo hidrofóbico para la unión a la lisina acetilada (Zeng et al. 2008). Se han descubierto varias familias de HATs: la superfamilia GNAT (conformada por Gcn5, PCAF, Hat1, Elp3), la familia MYST (en la cual se encuentran Tip60, MOZ, MORF y HB01), p300/CBP, coactivadores de receptores nucleares (SRC-1, ACTR y TIF2), el factor TAF_{II}250 asociado a TBP y TFIIC (Sterner and Berger 2000).

Tabla 1. Las HATs tienen sitios de acetilación definidos. En la tabla se muestran algunas enzimas y sus blancos.

HAT	Blanco
GNC5/PCAF	H3 (K9, K14, K18) H4 (K8)
HAT1	H2A (K5) H4 (K5, K12)
CBP/P300	H2A (K5) H2B (K5, K12, K15, K20) H3 (K14, K18) H4 (K5, K8)
TIP60	H2A (K5) H3 (K14) H4 (K5, K8, K12, K16)
HB01/TFIIC	H4 (K5, K8, K12)
ScSAS2	H3 (K14, K23)
ScSAS2	H4 (K16)
ScRTT109	H3 (K56)
Referencias: (Kouzarides 2007, Sterner and Berger 2000, Nakatani 2001, Beedanagari et al. 2010).	

La acetilación es una modificación reversible y es llevada a cabo por enzimas Histonas desacetilasas (HDACs) (Sterner and Berger 2000). Se han reportado dos familias de HDACs: La clase 1 (conformada por HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8), la clase 2 (conformada por HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9a, HDAC9b, HDAC10 y HDRP/HDAC9c) y HDAC11. Estas enzimas se encargan de remover un grupo acetilo de las histonas, que conduce a una reducción en el espacio entre nucleosomas y por lo tanto a una reducción de la accesibilidad para los factores

de transcripción. En general, todas las HDACs son sensibles por igual a los inhibidores, sin embargo, HDAC6 y HDAC9 son una excepción debido a que poseen mayor número de dominios catalíticos (de Ruijter et al. 2003). Se ha observado que en microarreglos de DNA de células inmortalizadas sometidas a un tratamiento con inhibidores de HDACs muestran que sólo un porcentaje pequeño de genes sufren una alteración en su expresión (de Ruijter et al. 2003).

Existen proteínas capaces de reclutar HDACs, como por ejemplo el heterodímero Mad-Max o heterodímeros de receptores hormonales, los cuales se unen a la caja E (E-Box) en el DNA, y reclutan al correpresor mSin3, que a su vez, recluta a las HDAC1 y HDAC2, ocurriendo una represión transitoria (Razin 1998).

La activación y la represión transcripcional se han descrito como efectos sinérgicos de varios mecanismos epigenéticos interactuando entre sí. Por ejemplo, la metilación de DNA se reconoce por la proteína 2 de unión a metilo (MeCP2), que posee un dominio de unión a metilo y otro de represión transcripcional. Este último permite interactuar con el correpresor mSin3A, que como ya se ha mencionado, recluta HDAC1 y HDAC2, y se manifiesta una represión estable (Razin 1998).

Citocromos P450.

Los citocromos P450 (CYP450) es una superfamilia compuesta por un grupo de enzimas del metabolismo de fase I, importantes en la desintoxicación de xenobióticos y metabolismo de fármacos, además de la producción de colesterol, esteroides, prostaciclina y tromboxano A₂ (Lynch and Price 2007, Czekaj et al 2006). El nombre fue acuñado debido a que estas enzimas se encuentran unidas a membranas en la célula y contienen un grupo hemo que permite absorber luz, con un pico de absorción máxima a una longitud de onda de 450 nm, cuando estas se exponen, se reducen y se unen con monóxido de carbono (Lynch and Price 2007, Nebert and Russell 2002). Los CYP450 se encuentran en *Eukarya*, *Archaea* y *Bacteria* (Lamb et al. 2009). Gracias a análisis de comparación de secuencias, se deduce que la superfamilia de citocromos se originó de un ancestro común hace tres billones de años (Nebert and Russell 2002). Los CYP450 se clasifican en familias y subfamilias, de acuerdo con el porcentaje de identidad en las secuencias de aminoácidos. Cuando dichas secuencias comparten un porcentaje igual o mayor al 40%, se agrupan en la misma familia (asignada con un número), mientras que aquellas secuencias que poseen una identidad igual o mayor al 55% conforman una subfamilia (asignada con una letra). Actualmente se han registrado 270 familias, con 18 en mamíferos (Nebert and Russell 2002). En el genoma humano se han identificado 57 genes y 58 pseudogenes (McGraw and Waller 2012, Polimanti et al. 2012). Los CYP450 de *Homo sapiens* (*hsCYP450*) se clasifican en 18 familias con 44 subfamilias (McGraw and Waller 2012). Los genes de las familias 1-3 codifican para 22 isoformas, involucradas en el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos,

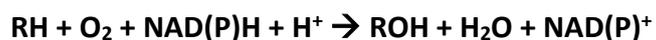
mientras que las familias 4-51 se involucran en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos (Polimanti et al. 2012). Los CYP450 se expresan principalmente en hígado, aunque también se encuentran en tejidos extrahepáticos como intestino delgado, cerebro, pulmones, placenta y riñones (Lynch and Price 2007).

Estas enzimas contienen un grupo prostético constituido de una protoporfirina de hierro (III) covalentemente unido a la proteína por el átomo de azufre de un ligando de cisteína próximo (Meunier, de Visser and Shaik 2004)). Las reacciones catalizadas por los CYP450 generalmente involucran hidroxilaciones de sustratos, sin embargo, se llaman monooxigenaciones externas puesto que catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno de O₂ en el sustrato, consistiendo en un corte heterocíclico de un dioxígeno, que culmina en la C-, S- u O-hidroxilación del sustrato, mientras que el segundo átomo del O₂ se reduce en agua. Esta reacción requiere a un donante de electrones externo (NADPH o NADH), a diferencia de las monooxigenaciones internas, donde la enzima extrae dos equivalentes reductores del sustrato para reducir un átomo de dioxígeno formando agua (Fig. 1)(Bernhardt 2006, Jensen and Møller 2010, Hanukoglu 1996). Los electrones del donante son transportados a través de la enzima CYP450 oxidoreductasa, usando como cofactores a la flavina adenina dinucleótido (FAD) y a la flavina mononucleótido (FMN), hacia el hierro del grupo hemo del CYP450 (Jensen and Møller 2010).

Subfamilia CYP1A.

La familia CYP1 se compone de dos subfamilias: CYP1A y CYP1B. La subfamilia CYP1A cuenta con dos miembros (CYP1A1 y CYP1A2). Esta familia metaboliza xenobióticos, ácido araquidónico y eicosanoides. Los CYP450 se localizan predominantemente en el retículo endoplasmático liso de las células de varios tejidos (Ogu and Maxa 2000, Omiecinski, Rimmel and Hosagrahara 1999), sin embargo, algunas isoformas como CYP1A1, 2B1 y 2E1 también se localizan en el compartimento de la membrana interna de la mitocondria, expuestas en su mayoría a la matriz mitocondrial (Avadhani et al. 2011). La expresión de los miembros de la familia CYP1 se induce por el receptor de hidrocarburos de arilos (AHR), el cual es un factor de transcripción que se activa por la unión de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Las isoformas CYP1A1 y CYP1B1 son más eficientes en el metabolismo de PAHs, mientras que CYP1A2 metaboliza preferentemente arilaminas y N-heterocíclicas (Nebert and Russell 2002).

Los CYP450 catalizan la siguiente reacción, según Bernhardt (2006):



(a) Hidroxilación de hidrocarburos



(b) Alqueno epoxidación/Alquino oxigenación



(c) Areno epoxidación, Hidroxilación aromática



(d) N-Desalquilación



(e) S-Desalquilación



(f) O-Desalquilación



(g) N-Hidroxilación



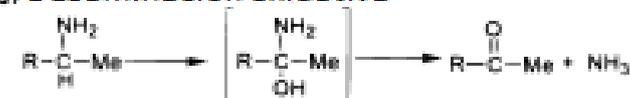
(h) N-Oxidación



(i) S-Oxidación



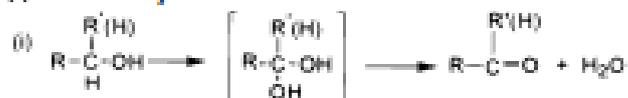
(j) Desaminación oxidativa



(k) Deshalogenación oxidativa



(l) Alcohol y aldehído oxidaciones



(m) Deshidrogenación



(n) Deshidratación



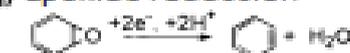
(o) Deshalogenación reductiva



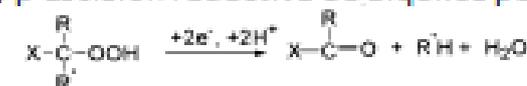
(p) N-óxido reducción



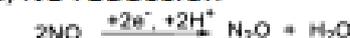
(q) Epóxido reducción



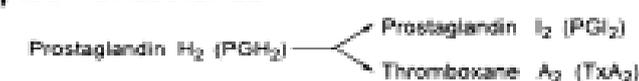
(r) β-Escisión reductiva de alquilo peróxidos



(s) NO reducción



(t) Isomerizaciones



(u) División oxidativa del enlace C-C

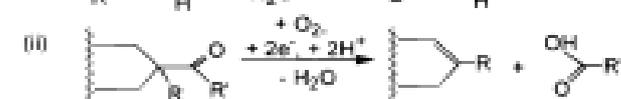
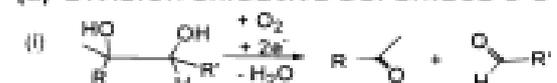


Fig. 1. Se muestran las reacciones catalizadas por CYP450, incluyendo a CYP1A1 y CYP1A2. (Sono et al. 1996).

Las isoformas CYP1A1 y CYP1A2 catalizan la oxigenación de PAHs (Fig. 2), aminas aromáticas y aminas policíclicas; la desmetilación de colorantes aminoazo; la desalquilación de fenacetina y cafeína y otros agentes terapéuticos (Tabla 2). La monooxigenación catalizada por los CYP1A permite convertir a los sustratos en metabolitos más polares, con la finalidad de facilitar su excreción (Ma and Lu 2007).

Tabla 2. Sustratos, inductores e inhibidores de los miembros de la subfamilia CYP1A. El símbolo * indica que el sustrato es endógeno.

Isoforma	Sustratos	Inductores	Inhibidores
CYP1A1	7-Etoxicoumarina; 7-Etoxiirresorufina; 17 β -Estradiol*; Benzo[a]pireno; Prostaglandinas*; R-Warfarina; Tacrina; Testosterona*;	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD); 3-Metilcolantreno; 5,6-Benzoflavona (β -Naftoflavona); Omeprazol.	7,8-Benzoflavona (α -Naftoflavona); 9-OH-Elipticina; Apigenina;
+CYP1A2	2-Acetilamino fluoreno; 2-Amino-3,4-dimetilimidazol[4,5-f]quinoleína; 2-Amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]pirimidina; 4-aminobifenil; 7-Etoxiirresorufina; 7-Metoxiirresorufina; 17 β -Estradiol*; Acetaminofen; Acetanilida; Aflatoxina B1; Cafeína; Clorpromazina; Clozapina; Ciclobenzaprina, Fenacetina; Fluoroquinolona; Flutamida; Fluvoxamina, Genisteína; Guanabenz; Imipramina, Lidocaína; Melatonina*, Mexiletina, Mianserina; Nabumetona; Naproxeno; Olanzapina, Perfenazina; Pimozida, Propafenona; Propranolol, Prostaglandinas*; R-Warfarina; Riluzol; Ropinirol; Tacrina; Teofilina; Testosterona*; Verapmil.	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD); 3-Metilcolantreno; 5,6-Benzoflavona (β -Naftoflavona); Aminoglutetimida; Antipirina; Cafeína; Carbamazepina; Fenitoína; Fenobarbital; Nelfinavir; Omeprazol; Primaquina; Rifampicina; Ritonavir; Sulfinpirazona; Tabaco.	α -Naftoflavona; Ácido Tolfenámico; Amiodarona; Apigenina; Cimetidina; Ciprofloxacina, Disulfiram; Ditiagem, Enoxacina; Eritromicina; Furafilina; Fluvoxamina; Isosafol; Mexiletina; Moricizina; Ofloxacina; Tacrina; Ticlopidina

(Ghotbi et al. 2009, Lynch and Price 2007, Ogu and Maxa 2000, Omiecinski et al. 1999, Zanger and Schwab 2013, Ikeya et al. 1989).

Los PAHs son una familia de compuestos orgánicos lipofílicos no polares, que comprenden de moléculas que poseen al menos dos anillos de benceno. Se forman principalmente por procesos pirolíticos, en particular la combustión incompleta de materiales orgánicos (Boffetta, Jourenkova and Gustavsson 1997). Los PAHs se pueden encontrar en hollín, alquitrán, comida cocinada, humo de cigarrillo, fundiciones de hierro y acero, en la producción de coque y aluminio, combustión de madera y combustibles fósiles, entre otros (Boström et al. 2002, Mastrangelo, Fadda and Marzia 1996). Existe evidencia epidemiológica que vincula la exposición a PAHs con incidencia de cáncer, siendo el pulmón el principal órgano diana de riesgo, seguido de la piel y la vejiga (Boffetta et al. 1997).

La isoforma CYP1A1 se expresa en bajas proporciones en hígados humanos, de ratón y rata; sin embargo, se puede encontrar en órganos extrahepáticos como intestino delgado, pulmón, placenta y riñón, además de células de sangre periférica (Guengerich, 2005). CYP1A1 se expresa predominantemente en intestino delgado de rata, mientras que en ratón se detecta débilmente.

Los niveles altos de CYP1A1 se asocian con tabaquismo, ejercicio físico y la ingestión de carnes a la parrilla (Martignoni *et al.*, 2006). La reacción clásica de CYP1A1 es la Benzo[a]pireno 3-hidroxilación (Guengerich, 2005).

CYP1A2 se expresa principalmente en hígados de humano, rata y ratón, mientras que en otros tejidos la expresión es débil o no hay ninguna (Martignoni, Groothuis and de Kanter 2006). La reacción clásica de CYP1A2 es la Cafeína N3-desmetilación (Guengerich, 2005).

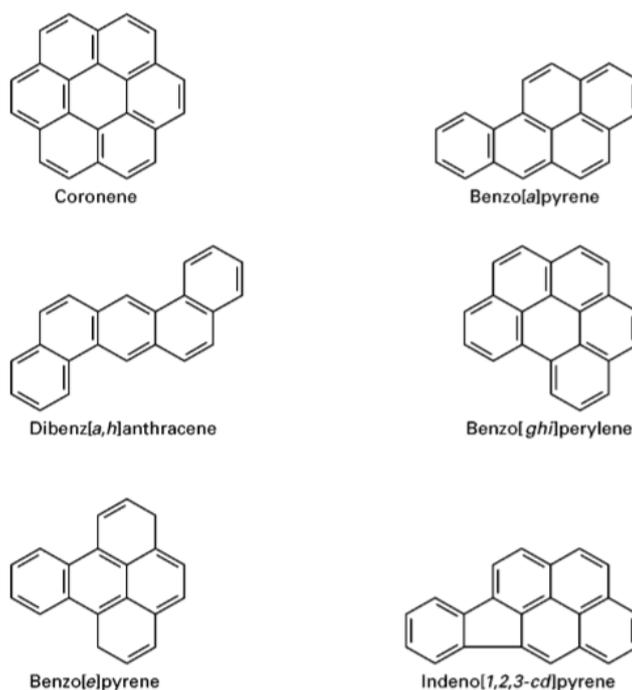


Fig. 2. Ejemplos de PAHs. Imagen tomada de Lee (2000).

Inducción de CYP1A por la vía AHR-ARNT.

La regulación de CYP1A está mediada por la vía AHR (Fig. 3), en la cual un inductor o ligando lipofílico atraviesa la membrana plasmática y se une a AHR, un receptor citosólico. AHR es un miembro de la familia de factores de transcripción Hélice-bucle-hélice básicos (bHLH)-Per-ARNT-Sim (PAS), que posee una señal de dimerización y un dominio de unión a DNA bHLH localizado en el extremo amino de un dominio PAS (Delescluse et al. 2000, Roberts and Whitelaw 1999, Zhou et al. 1997). El acrónimo PAS indica tres péptidos donde se ha observado ese motivo, entre ellos, el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilos (ARNT). El dominio PAS consiste de 260 aminoácidos aproximadamente y contiene dos repeticiones directas de 60 aminoácidos (Delescluse et al. 2000). La familia de factores de transcripción bHLH-PAS se involucra en distintas vías, en las que se incluyen la hipoxia, ritmos circadianos, desarrollo de glándulas salivales, neurogénesis y metabolismo químico (Roberts and Whitelaw 1999). AHR forma un complejo 9S con dos proteínas chaperonas de choque térmico de 90 kDa (Hsp90) (Delescluse et al. 2000), la cochaperona p23 y la proteína 2 asociada a la proteína X del virus de

hepatitis B (XAP2), conformando un complejo multimérico de aproximadamente 300 kDa (Gradin et al. 1996). La asociación con Hsp90 le permite a AHR asumir la conformación necesaria para la unión con el ligando (Kekatpure, Dannenberg and Subbaramaiah 2009), ocultar el dominio de unión a DNA de AHR (Shetty, Bhagwat and Chan 2003), además que se piensa que el complejo Hsp90, junto con XAP2 (también conocida como AIP o ARA9), permite retener a AHR en el citoplasma y le protege ante la degradación proteosómica. Se piensa que la proteína p23 permite estabilizar el complejo Hsp90 (Cox and Miller 2004, Petrulis et al. 2003) y tiene un papel en la importación hacia el núcleo, además de que participa en la heterodimerización de AHR y ARNT, aunque no interactúa con ellos directamente, sino mediante Hsp90 (Shetty et al. 2003). Una vez que el ligando se une a AHR, este último sufre un cambio conformacional que aumenta su afinidad por el DNA y reduce mucho su tasa de la disociación del ligando (Delescluse et al. 2000), posteriormente, el complejo AHR-Hsp90-p23-XAP2 se trasloca hacia el núcleo y AHR se disocia del complejo, lo que permite que se asocie a la proteína nuclear ARNT, otra proteína miembro de la familia de factores de transcripción bHLH-PAS (Gradin et al. 1996, Mimura and Fujii-Kuriyama 2003, Zhou et al. 1997). El dominio PAS de AHR lleva a cabo tres funciones importantes: en el estado latente confiere la unión con Hsp90; se une al ligando cuando ocurre la activación; y permite la dimerización con ARNT, uniéndose al dominio PAS del mismo (Zhou et al. 1997). La proteína AHR tiene una señal de localización nuclear rica en arginina (NLS) y una señal de exportación nuclear rica en leucina (NES) (Petrulis et al. 2003, Zhou et al. 1997, Zhou et al. 2010). Después de la unión de ligando, AHR sufre cambios conformacionales que exponen la NLS mediante alteraciones de la unión de XAP2. La proteína importina α reconoce la NLS, uniéndose a AHR. Posteriormente la importina β también se une al complejo AHR-importina α , mientras que la importina β también interactúa con el complejo del poro nuclear (NPC). La traslocación requiere de la unión de otras proteínas (Ran GDP y p10). Ran es una proteína importante en la translocación nuclear de muchas vías, que interactúa con una proteína GTPasa y una proteína de unión a Ran que potencia la actividad de GTPasa. La proteína p10/NTF2 es esencial para la importación nuclear en células permeabilizadas. AHR se acumula rápidamente en el núcleo y forma un heterodímero con ARNT (Zhou et al. 2010). AHR y ARNT se encuentran ampliamente y coordinadamente expresados en muchas estirpes celulares y órganos, tanto durante el desarrollo embrionario como en adultos (Sahlberg et al. 2002). El heterodímero AHR-ARNT es capaz de regular la transcripción de varios genes, entre ellos CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, NADPH quinona oxidoreductasa y Glutatión S-transferasa, mediante la unión con secuencias llamadas Elementos de respuesta a xenobióticos (XRE), Elementos de respuesta a AHR (AhrRE) o también conocidos como Elementos de respuesta a Dioxina (DRE); ubicadas en las regiones potenciadoras (Petrulis et al. 2003, Schnekenburger, Peng and Puga 2007, Ghafarian-bahraman

et al 2017). Estos elementos poseen una secuencia consenso 5'-TNGCGTG-3', y se localizan río arriba de los genes dianas (Delescluse et al. 2000, Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007, Sahlberg et al. 2002). AHR ocupa el sitio 5'-TNGC, mientras que ARNT ocupa el sitio GTG-3'; aunque se sugiere que los nucleótidos flanqueantes de este elemento, regulan la afinidad de unión al DNA y la función del potenciador (Sun et al. 2004). Esta unión produce cambios en la estructura de la cromatina, permitiendo la transcripción de varios genes, incluyendo a *CYP1A1* y *CYP1A2* (Delescluse et al. 2000). Un componente del complejo remodelador de la cromatina dependiente de ATP, SWI/SNF, llamado BRG1, se involucra en el remodelamiento dependiente de AHR, para *CYP1A1*, mediante la movilización de los nucleosomas (Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007, Wilson and Roberts 2011), dejando expuesta la secuencia TATA y permitiendo que el complejo de preiniciación tenga acceso al promotor y ocurra la estabilización de la RNA polimerasa II (Taylor et al. 2009). El heterodímero AHR-ARNT transactiva, junto con los factores de transcripción basales mediante interacciones con proteínas coactivadoras como la proteína de unión a CREB (CBP)/ y la histona acetiltransferasa p300, SRC-1 (coactivador 2 del receptor de esteroides, que es una histona acetiltransferasa), NCoA-2, p/CIP y RIP140 (proteína coactivadora y correpresora), BRCA1, BRG1 y ERAP140 (Schnekenburger et al. 2007). El complejo Mediador-TRAP-DRIP-ARC se recluta para activar la transcripción del gen *CYP1A1*. En el caso de *CYP1A2*, aunque el complejo AHR-ARNT también está involucrado en su activación, no se conoce mucho de su inducción (Beedanagari et al. 2010, Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007). El complejo CBP/p300 está compuesto de más de 2.400 residuos y tiene un peso de 300 kDa. Su región central tiene un motivo bromodominio (Sternier and Berger 2000). El factor remodelador de nucleosomas dependiente de ATP Brahma/switch 2 se recluta para permitir la transcripción del gen (Beedanagari et al. 2010) Después de la activación transcripcional, el AHR regresa al citoplasma gracias a la proteína CRM-1, y una vez fuera del núcleo, se degrada vía proteosoma. En ausencia de los XRE, el promotor carece de activación, siendo requerida la unión del complejo AHR-ARNT para que se efectúe el cambio en la conformación de la cromatina que es necesario para la activación transcripcional; por ello, sin un inductor no se lleva a cabo la transcripción del gen (Schnekenburger et al. 2007). En ratones «Knock out» (KO) de AHR, ni *CYP1A1* ni *CYP1A2* se inducen mediante la exposición con TCDD y la expresión constitutiva de *CYP1A2* en hígado, se reduce un 90%. La exposición a compuestos como el metileno dioxifenil (MDP) inducen la transcripción y la traducción de *CYP1A2*, pero no de *CYP1A1*, lo cual sugiere mecanismos alternos a AHR (Ryu et al. 1996).

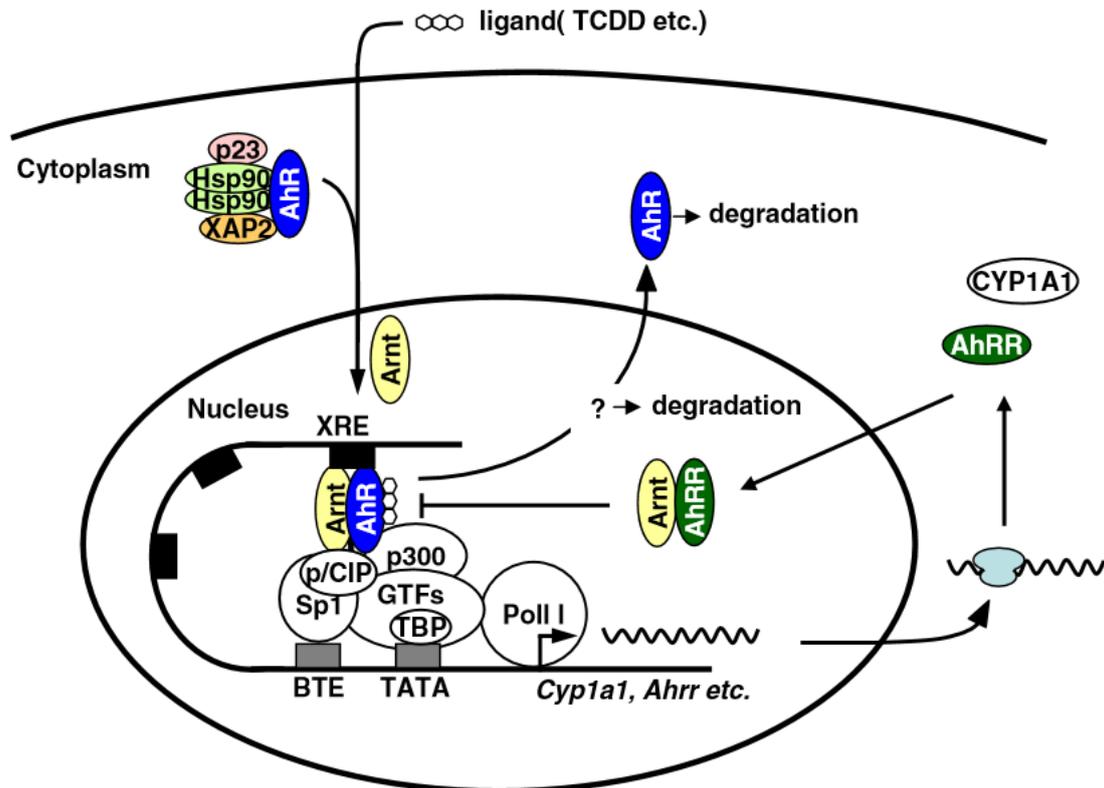


Fig. 3. Mecanismo de activación y traslocación nuclear de AHR. Después de la unión al ligando, el complejo AHR-Hsp90(X2)-p23-XAP2 ingresa en el núcleo y se disocia, permitiendo que AHR forme un heterodímero con ARNT e interactúen con los XRE de regiones potenciadoras. (Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007).

Organización genética de CYP1A.

En cuanto a la organización genética, el loci de los genes humanos *CYP1A1* y *CYP1A2* se localiza en el cromosoma 15q22-qter, y entre los genes hay una separación de 23 kb. Los promotores de los genes se orientan en direcciones opuestas, por lo que comparten una región 5'. La organización de estos dos genes soporta la idea de que hubo un evento de duplicación de un gen ancestral, con una estimación de 300-350 M.A., además de que al comparar la estructura entre *CYP1A1* y *CYP1A2*, los exones 2, 3, 6 y especialmente el 5 se encuentran altamente conservados (Corchero et al. 2001). Ambos genes poseen siete exones, tanto en humanos como en ratas (Ikeya et al. 1989). Los estudios realizados en ratones que carecen del gen *AHR*, desvelan que este es indispensable para la expresión por inducción de *CYP1A1* y *CYP1A2*, y parece que estabiliza el mRNA de éstos (Sogawa et al. 2004).

En cuanto a rata, *CYP1A1* y *CYP1A2* se localizan en cromosoma 8 en el brazo largo y en la región 24 (8q24), sus coordenadas dentro del cromosoma son: 62472087-62478122 y 62451360-62458244 (cadena complementaria), respectivamente y tienen promotores divergentes, con una separación de 13,8 Kb (Fig. 4) (NCBI, 2017).

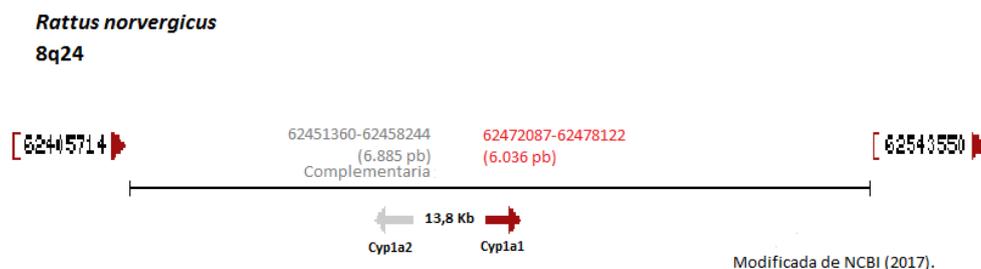


Fig. 4. Esquema de la organización genética de CYP1A en el cromosoma 8 de rata (Imagen tomada y modificada de NCBI, 2017).

Tabla 3. Longitudes del gen, mRNA y proteína de CYP1A. Información obtenida del sitio NCBI (2017).

	rnCYP1A1	rnCYP1A2
Tamaño del gen	6.036 pb (ID gen: 24296)	6.885 pb (ID gen: 24297)
Número de exones	7	7
Tamaño del mRNA	2.615 pb (NM_012540)	1.882 pb (NM_012541)
Tamaño de la proteína	524 aa (NM_036672)	513 aa (NM_036673)

Regulación de *CYP1A1*.

El gen *hsCYP1A1* posee al menos 5 XRE dentro de las primeras 1.300 pb de la región 5' (Hirota et al. 2008, Corchero et al. 2001) y una secuencia caja GC, que es un elemento de transcripción basal proximal al promotor (Kawajiri and Fujii-Kuriyama 2007). El gen *CYP1A1* de *Rattus norvegicus* (*rnCYP1A1*) presenta cinco XRE en las posiciones -537, -1.010, -1.089, -1.233 y -3.586 pares de bases, río arriba. También se encuentra el elemento de transcripción basal (BTE), localizado en la posición -43, río arriba del elemento TATA (Fig. 5), en la cual se une la proteína de unión a BTE (BTEB), aunque también se une Sp1 (presente también en humano). Estas proteínas poseen tres veces repetido un dominio dedo de cinc (Fujii-Kuriyama et al. 1992). Según Ikeya (1989), también existe un sitio de unión para el factor regulador de la transcripción Sp1 río arriba del sitio de inicio de la transcripción en la posición -943 en humanos y -975 en ratas. El *rnCYP1A1* posee un elemento de regulación negativa (NRE) que contiene motivos de AP-1 y Oct-1 en los sitios -808 a -788 (Sterling and Bresnick 1996), también hay un NRE en las -843 y -746 pb, existiendo dos subregiones conservadas (-833 a -814 y entre -778 a -760), entre rata, ratón y humano (Sterling et al. 1993). En el promotor de *CYP1A1* hay una HDAC1 constitutivamente unida, la cual se desacopla debido a la inducción. En células de hepatoma de ratón Hepa-1c1c7, al tratarse con Benzo(α)pireno, se inducen las marcas H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac, H4K16ac y fosforilación de H3S10 (Schnekenburger et al. 2007). En las líneas celulares HepG2 y MCF-7, las modificaciones H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac y H4ac, que se asocian con actividad transcripcional, se presentan cuando se trata las células con 100 mM de dioxina, siendo mayor el nivel de estas marcas en la línea HepG2 que en MCF-7. Además de que se recluta a la histona acetiltransferasa p300 y al factor asociado a p300/CBP (PCAF)(Beedanagari et al. 2010).

el omeprazol y el quetoconazol potencian la actividad enzimática de CYP1A1, cuando se administran junto con FICZ, más que por separado, pudiendo deberse a que evitan la degradación de FICZ (Ghafarian-bahraman et al 2017).

Regulación de *CYP1A2*.

El gen humano *CYP1A2* (*hsCYP1A2*) se localiza en el cromosoma 15 y se encuentra opuestamente orientado frente a la región 5' del gen *CYP1A1*, separándose por 23 kpb (Miyajima, Furihata and Chiba 2009). Como ya se ha mencionado, el gen *CYP1A2* posee siete exones en todos los genes de mamíferos que se han caracterizado. Los exones 2-6 de *CYP1A2* se han conservado en cuanto a similitud entre nucleótidos y número de nucleótidos, al compararlo con *CYP1A1* y entre los genes humanos, ratón, conejo y rata (Ikeya et al. 1989). En adulto, *hsCYP1A2* se expresa constitutivamente en el hígado y se somete a inducción debido a la exposición a ciertos xenobióticos o procesos patológicos. Se ha reportado que *CYP1A2* de hígado se expresa principalmente en hepatocitos perivenosos, tanto en humano como en rata (Elbarbry, McNamara and Alcorn 2007). En la región 5' del gen *CYP1A2* se han identificado distintos elementos de regulación, tales como secuencias de elementos de respuesta a xenobióticos; potenciales sitios para la unión de factores de transcripción (que incluyen a NF-1/CCAAT, SP-1, HNF-1 y AP-1); elementos de respuesta a interleucina 6 y elementos de respuesta a antioxidantes (Hammons et al. 2001). Según Corchero (2001), se ha identificado sólo un XRE en la posición -2903 del 5' de *hsCYP1A2*. Además, se han reportado sitios de unión para Sp1 en la posición -907 en la cadena negativa y -32 en la cadena positiva del *hsCYP1A2*, sin embargo, no se han encontrado sitios de unión en *CYP1A2* de *Rattus norvegicus* (*rnCYP1A2*) (Ikeya et al. 1989). La metilación del sitio CCGG en la posición -2759, es capaz de regular la unión de AP-1 en el promotor de *hsCYP1A2*, de acuerdo al grado de hipermetilación (Hammons et al. 2001). Quattrochi et al. (1998) han reportado la presencia de dos elementos homólogos a los elementos de respuesta a forbol 12-O-tetradecanoato 13-acetato (tPA) en la región potenciadora de *hsCYP1A2*, llamados 5'AP1 y 3'AP1, donde se unen los factores de transcripción, AP-1, c-Jun, JunD y c-Fos (Quattrochi, Shih and Pickwell 1998). Las variaciones interindividuales en la expresión de *hsCYP1A2* se pueden deber a la metilación en el promotor, del sitio CCGG (-2759) adyacente al sitio AP-1 (Hirota et al. 2008, Ghotbi et al. 2009). Por otro lado, hay una caja GC (5'-GGGCGG-3'), localizada en el sitio -37/-32 del promotor de *hsCYP1A2*, cuya presencia intacta (es decir, libre de mutaciones) es indispensable para una correcta actividad del promotor (Miyajima et al. 2009). Se sugiere que el estado de metilación del sitio CpG de dicha caja está asociado a la actividad transcripcional del gen *hsCYP1A2*, ya que en el trabajo de Miyajima et al. (2009) se evaluó su estado de metilación en líneas celulares y distintos tejidos, y han encontrado que la frecuencia del porcentaje de metilación del sitio en la línea de hepatocarcinoma HepG2

fue de 0%, en hígado humano fue de 20%, mientras que en la línea de carcinoma colorrectal Caco-2, la línea de riñón embrionaria HEK293 y en la línea de adenocarcinoma cervical HeLa, la frecuencia de metilación es mayor al 80%, al igual que en pulmón, intestino delgado y riñón humano. Es probable que la caja GC, la caja E (E-box) y el elemento tipo NF-1, actúen sinérgicamente para llevar a cabo la actividad del promotor de *hsCYP1A2*. Se especula que, debido a la proximidad de la caja GC y la caja TATA en el promotor de *hsCYP1A2*, la caja GC otorgue flexibilidad para alinear el factor USF-1 con el factor NF-1 con el complejo de preiniciación (Miyajima et al. 2009).

El mRNA de *CYP1A2* se expresa constitutivamente en ratones AHR KO, aunque en menor medida en comparación con un control; pero mediante el tratamiento con fenobarbital, acetaminofenilo (ACN) y butóxido de piperonilo (PBO) se potencia esa inducción, siendo evidencia de mecanismos de inducción alternativos a AHR (Ryu et al. 1996). El sitio de unión al factor nuclear hepático 1 le da especificidad a *CYP1A2* para expresarse en hígado de ratón (Ryu et al. 1996). Además, el factor nuclear 1 α de hepatocito (HNF1 α) y el factor nuclear 4 α de hepatocito (HNF4) también tienen un papel en la expresión constitutiva de *CYP1A2* en hígado de humano, estos se unen río arriba de la región potenciadora del gen (Miyajima et al. 2009).

La subfamilia CYP1A durante la gestación.

En la placenta de rata, *rnCYP1A1* se ha detectado entre los días 19 y 21 de preñez. En la placenta humana se ha detectado mRNA de *hsCYP1A1*, la proteína correspondiente y su actividad enzimática. La expresión de CYP450 en los órganos maternos durante el embarazo es un factor de riesgo para los fetos. La expresión de *CYP1A1* y *CYP1A2*, y su participación en el metabolismo de xenobióticos, disminuye en el hígado de ratas preñadas y mujeres embarazadas. En ese momento, la progesterona y sus metabolitos, así como el óxido de nitrógeno pueden tener efectos inhibidores en la expresión de estos genes. El receptor AHR es funcional en la embriogénesis temprana (Czekaj et al 2006). En el día 7^o después de la concepción, no es posible inducir a *CYP1A1* en endo- y ectodermo, en ratón. Conforme avanza el desarrollo, la expresión constitutiva de *CYP1A1* aumenta, al igual que su inducción en ratón (Campbell et al. 2005). Según Hsueh (1991), *CYP1A1* no se expresa en el cono extraplacentario, el embrión, ni en el saco vitelino de rata, en el día 12^o de la gestación. Sin embargo, es posible inducir su transcripción, usando 3-metilcolantreno, donde el saco vitelino tiene mayor inducción y el embrión tiene menor respuesta (Yang, Zelus and Juchau 1991). En el trabajo de Czekaj et al. (2006) se observa que en fetos de ratas de 18-20 días, hay una expresión constitutiva de *rnCYP1A1*, la cual fue muy baja en hígado, sin embargo, aumenta 5,5 veces en recién nacidos. Los mecanismos de inducción de *rnCYP1A1* son eficientes un día antes del nacimiento (Czekaj et al 2006). En cuanto a *rnCYP1A2*, en fetos de ratas (18-20 días de preñez) y en recién nacidos hay una expresión a nivel

de mRNA en hígado. No se ha detectado la proteína de rnCYP1A1 ni rnCYP1A2 en fetos de 21 días de preñez, pero sí en recién nacidos. Al igual que ocurre con rnCYP1A1, la expresión de la proteína rnCYP1A2 se activa un día antes del nacimiento (Czekaj et al 2006). La expresión de CYP1A1 en fetos de 18-20 días fue susceptible a β -Naftoflavona, en el estudio de Czekaj et al. (2006), tanto a nivel de mRNA y proteína.

CYP1A2 puede ser importante en el desarrollo embrionario, para la iniciación del metabolismo embrionario, pero también para la morfogénesis y el control del ciclo celular (Czekaj et al 2006). Los ratones con un KO de *CYP1A1*, se desarrollan normalmente, por lo que parece que dicho gen no tiene un papel importante durante el desarrollo (Campbell et al. 2005).

HIPÓTESIS

La metilación de DNA y la acetilación de histonas son mecanismos epigenéticos que regulan expresión de CYP1A y cambian a lo largo de la vida.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar si la metilación de DNA y la acetilación de histonas en los promotores de CYP1A afectan la expresión de éstos, en hígado de rata, en distintas edades.

Objetivos particulares

Comparar los niveles de mRNA, proteína y actividad enzimática de los CYP1A de hígado de ratas en distintas edades.

Comparar los niveles de actividad enzimática, mRNA y proteína de los CYP1A tratados con un inductor de CYP1A (β -Naftoflavona), un agente inhibidor de la DNMT1 (Clorhidrato de hidralazina) con un agente inhibidor de Desacetilasas de histonas (Valproato de magnesio) y un control sin tratamientos, entre ratas destetadas y ratas adultas.

JUSTIFICACIÓN

La proteína hsCYP1A2 representa el 13% del contenido total de CYP450 en el hígado y se involucra en el metabolismo del 4% de los fármacos disponibles en el mercado (Martignoni et al. 2006). Las diferencias en el nivel de expresión del mRNA y el nivel de proteína de CYP1A2 tiene repercusiones en la eficacia de fármacos y la susceptibilidad de los metabolitos carcinogénicos (Hammons et al. 2001). Está claro que la expresión de estas enzimas cambia a lo largo de la vida del individuo (Yun et al. 2010), por lo que los tratamientos empleados en adultos no tendrán el mismo efecto en niños ni ancianos, cuando se emplea un fármaco que sea blanco de los CYP1A. Es indispensable conocer a fondo los mecanismos de regulación de estas enzimas para ofrecer un tratamiento adecuado para el paciente. Debido a la cercanía entre los genes, se evalúan *CYP1A1* y *CYP1A2*, por cuanto es factible que se compartan ciertos fenómenos de regulación transcripcional. Se estudian la metilación de DNA y la acetilación de histonas por ser los mecanismos, generalmente, más relevantes epigenéticamente, y en un tratamiento conjuntamente puesto que la metilación de DNA es una señal que permite el reclutamiento de HDACs mediante proteínas que contienen un dominio de unión a DNA metilado (de Ruijter et al. 2003), siendo factible un efecto sinérgico entre ambas marcas para la regulación genética.

ANTECEDENTES.

En pulmón, la expresión de *CYP1A1*, inducida por Hidrocarburos aromáticos policíclicos se asocia a un riesgo del desarrollo de cáncer en dicho órgano. Al analizar el promotor de *CYP1A1* se ha encontrado que el 10-20% de los sitios CpGs se metilan en pulmón humano entre los nucleótidos -1.400 y -1.000, y el único XRE que se somete a metilación se encuentra entre -1.385 y -1.381. Además, se observa que entre los nucleótidos -1.400 y -1.295 hay una metilación completa en el 94% de personas no fumadoras, y en sólo el 46% de los fumadores (Anttila et al. 2003).

También se ha observado una correlación inversa entre la metilación del potenciador de *CYP1A1* y los niveles de mRNA *in vivo*, y una hipermetilación del potenciador se correlaciona con bajos niveles de mRNA en tejido cancerígeno de pulmón (Tekpli et al. 2012). En la línea celular de hepatoma HepG2 y de cáncer de mama, al evaluar el nivel de expresión de *CYP1A1* y *CYP1B1*, usando un inductor (Dioxina) y un inhibidor de la DNMT1 (5'-Azadesoxicitidina), se observa que en la línea HepG2 hay un aumento significativo en la expresión de *CYP1B1* en comparación con los controles (Control vehículo, control dioxina y control 5'-Azadesoxicitidina), mientras que en MCF-7 para *CYP1B1* y en ambas líneas para *CYP1A1*, no hay cambios significativos, lo cual indica que la regulación epigenética de estos citocromos es distinta en los tejidos.

En el caso de *hsCYP1A2*, al tratar células de hepatoma con el agente hipometilante AzaC (5-Azaciditidina), se observa que la expresión del gen se induce a medida que se incrementa la concentración de AzaC, lo que indica que la metilación de DNA regula negativamente a *CYP1A2* (Ghotbi et al. 2009). Se han documentado más de 16 variantes polimórficas de *hsCYP1A2*, sin embargo, las variantes que otorgan una funcionalidad distinta están en baja frecuencia, por lo tanto, no explican la variación en la expresión ni la actividad de *CYP1A2*. Es probable que la expresión genética esté controlada por factores como componentes transcripcionales que actúan en cis o trans, empalme de exones alternativo, RNAs reguladores, estabilidad del mRNA mensajero y/o elementos epigenéticos. En hígados humanos, se ha observado que la metilación de 17 sitios CpGs en la isla CpG ubicada en el exón 2 explica la variación individual en el nivel de mRNA. La metilación de DNA puede bloquear la unión de factores de transcripción, como SP1, SPI1, GATA-2, GATA-3, TFAP2A, BRAC1, etc (Ghotbi et al. 2009).

Se ha demostrado que ocurre una hipometilación relacionada con la edad en animales como ratas, ratones y salmón. En humanos, se han caracterizado regiones genómicas que, al hiper o hipometilarse, dan un indicio de la edad. La hipermetilación de islas CpGs en genes relacionados con el desarrollo (con dominios de cromatina divalente) y blancos de los complejos Polycomb es un claro ejemplo de este fenómeno. En el trabajo de Horvath (2013) se efectuó una búsqueda de sitios CpGs que sirven como un marcador universal, que evidencian la edad de la mayoría de los tejidos (Horvath 2013).

En el trabajo de Yun *et al.* (2010) se miden los niveles de las isoformas CYP450 en hígados de ratas de 3, 12 (3 meses), 26 (5,9 meses) y 104 (26 meses) semanas de edad; donde se observa que CYP1A1 sólo se detecta en ratas destetadas de 3 semanas, CYP1A2 presenta una expresión máxima en ratas de 3 semanas y disminuye con la edad (Fig. 6).

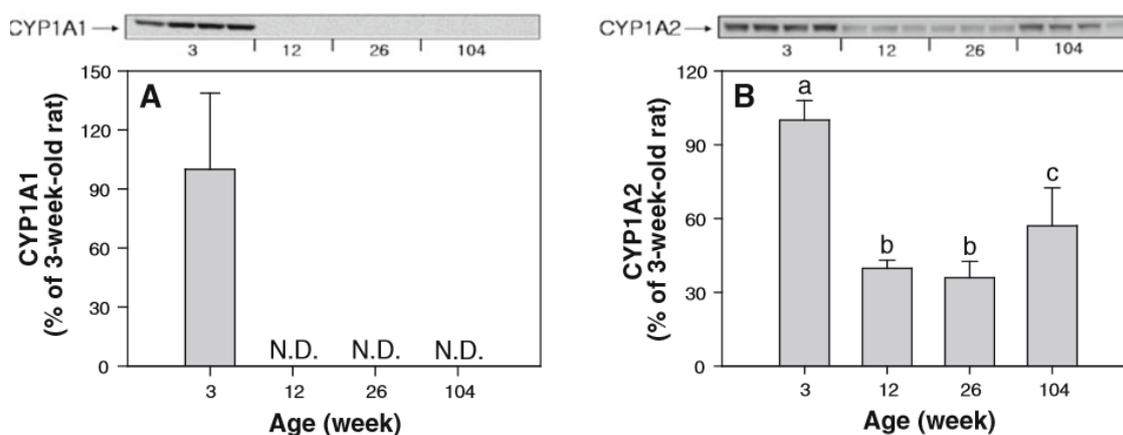


Fig. 6. Comparación de niveles de CYP1A1 y CYP1A2 de microsomas de hígado de rata macho, en distintas edades: 3, 12, 26 y 104 semanas. Se observa una disminución en la expresión de ambas isoformas conforme ocurre el envejecimiento (Yun *et al.* 2010).

El clorhidrato de hidralazina es un vasodilatador arterial usado para tratar la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva, la preclamsia y el infarto en el miocardio; que reduce la resistencia periférica, mediante el relajamiento de las células del músculo liso de los vasos arteriales (Arce *et al.* 2006, Knowles *et al.* 2004). La interacción entre los átomos de nitrógeno de la hidralazina con los residuos Lys162 y Arg240 del sitio activo de la DNMT1 conducen a la inhibición de esta enzima, y por lo tanto a una desmetilación pasiva de DNA (Chavez-Blanco *et al.* 2006). El tratamiento con clorhidrato de hidralazina permite revertir la resistencia a fármacos usados en las quimioterapias, como la gemcitabina y la doxorubicina, debido a la hipermetilación que ocurre en células cancerosas (Dueñas-Gonzalez *et al.* 2014). La hidralazina está sujeta a biotransformación principalmente por la N-acetiltransferasa, que puede acetilarla (Lemke and McQueen 1995).

El ácido valproico es un ácido graso ramificado de 8 carbonos (Chavez-Blanco *et al.* 2006), que ha sido usado para el tratamiento de la epilepsia, el desorden bipolar y se ha descubierto que inhibe a las HDACs, como la tricostatina A y el *n*-butirato, promoviendo un incremento en la expresión de genes, a una concentración de 0,4-0,5 mM (Dueñas-Gonzalez *et al.* 2014). También se ha reportado que estimula la desmetilación activa en células postmitóticas, siendo independiente de la replicación, sin embargo, dependiendo de la acetilación de histonas (Detich, Bovenzi and Szyf 2003). El mecanismo de inhibición de las HDACs es la unión al centro catalítico,

impidiendo la unión del sustrato, ocasionando la inhibición de la desacetilación de las H3 y H4 (Chavez-Blanco et al. 2006). La inhibición del valproato de magnesio es cinco veces menos efectiva a HDACs de clase 2 (de Ruijter et al. 2003) y parece no tener efecto en la HDAC6 y HDAC10 (Dueñas-Gonzalez et al. 2014).

Al aplicarse conjuntamente un inhibidor de la DNMT1 y de HDACs hay una reactivación de genes supresores de tumores inactivados en cáncer, dando lugar a efectos antitumorales (De la Cruz-Hernández et al. 2011). En el trabajo de De la Cruz (2011), se ha evaluado el transcriptoma de biopsias de tumores cervicales, después de ocho días de tratamiento con clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio conjuntamente; observándose sobreexpresión de 964 genes mediante un microarreglo, donde destacan 38 genes de proteínas de ribosomas (entre ellos *RPL7A*, *RPL35A*, *RPL41*), 34 genes de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa (por ejemplo, el gen de la Citocromo C oxidasa 72A) y 20 genes de proteínas de la vía de las MAPK.

METODOLOGÍA

Tratamiento de ratas.

Cuatro grupos conformados por 6 ratas machos Wistar, con una edad de 4 semanas (peso promedio de 100 g), y cuatro grupos conformados por 6 ratas machos Wistar, con una edad de siete meses (peso promedio de 628,375 g) se han sometido a cuatro distintos tratamientos:

Primer tratamiento: Se trató del grupo control, al cual se le han administrado los vehículos de las soluciones en las que se diluyen los compuestos de interés, es decir, agua y aceite, durante siete días.

Segundo tratamiento: El grupo control de inducción ha recibido el tratamiento con el inductor de CYP1A, β -Naftoflavona (80 mg/Kg), una sola dosis, dos días antes del término del tratamiento, es decir, el sexto día, además del vehículo agua.

Tercer tratamiento: El grupo control de inhibición ha recibido el tratamiento con Clorhidrato de hidralazina (5 mg/Kg) (inhibidor de la DNMT1), Valproato de magnesio (164 mg/Kg) (inhibidor de las HDACs), y aceite, durante siete días.

Cuarto tratamiento: A este grupo se le administró el tratamiento de inducción con β -Naftoflavona (80 mg/kg) y el tratamiento de inhibición con Clorhidrato de hidralazina (5 mg/Kg) y Valproato de magnesio (164 mg/Kg), tal como el segundo y el tercer tratamiento.

Los tratamientos han sido administrados vía intraperitoneal. Estos tratamientos se han aplicado durante siete días, como se muestra en los siguientes esquemas, considerando que el tiempo de replicación celular es de aproximadamente 21,5 horas en el hígado de rata (Post, Huang and Hoffman 1963). El tratamiento con el inhibidor de la DNMT1 debe durar entre 2-4 días al menos, para permitir que se dé el nuevo patrón de metilación de DNA y el tratamiento con el inhibidor de las HDACs debe durar al menos 24 horas (Karpf 2007). Las dosis de los tratamientos se basaron en los trabajos de Escobar-Garcia et al. (2001) para el tratamiento con β -Naftoflavona y de Chavez-Blanco et al. (2006) para el tratamiento con Clorhidrato de hidralazina y Valproato de magnesio. El octavo día se llevó a cabo la eutanasia, siendo decapitación por guillotina, siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente se ha realizado la extracción de los hígados, los cuales se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Tabla 4. Esquema de tratamiento usado para ratas de 4 semanas.

	1º día Vie-21-oct-16	2º día Sáb-22-oct-16	3º día Dom-23-oct-16	4º día Lun-24-oct-16	5º día Mar-25-oct-16	6º día Mié-26-oct-16	7º día Jue-27-oct-16	8º día Vie-28-oct-16
<i>Grupo 1</i>	Agua inyectable (200 µL)	Agua inyectable (200 µL)	Agua inyectable (200 µL)	Agua inyectable (200 µL) <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	Agua inyectable (200 µL) <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	Agua inyectable (200 µL) <i>Aceite de maíz (200 µL)</i>	Agua inyectable (200 µL) <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	Eutanasia
<i>Grupo 2</i>	Agua inyectable (200 µL)	Agua inyectable (200 µL)	Agua inyectable (200 µL) β-Naftoflavona (8 mg) 100 µL	Agua inyectable (200 µL)				
<i>Grupo 3</i>	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL				
	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL <i>Aceite de maíz (200 µL)</i>	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL <i>Aceite de maíz (100 µL)</i>	
<i>Grupo 4</i>	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL	Valproato de magnesio (16,4 mg) 100 µL				
	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL β-Naftoflavona (8 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (0,5 mg) 100 µL				

Tabla 5. Esquema de tratamiento usado para ratas de 7 meses.

	1º día Viernes 10- Febrero-17	2º día Sábado 11- Febrero -17	3º día Domingo 12- Febrero -17	4º día Lunes 13- Febrero -17	5º día Martes 14- Febrero -17	6º día Miércoles 15- Febrero -17	7º día Jueves 16- Febrero -17	8º día Viernes 17- Febrero- 17
Grupo 1	Agua inyectable (700 µL)	Agua inyectable (700 µL)	Agua inyectable (700 µL)	Agua inyectable (700 µL) Aceite de maíz (500 µL)	Agua inyectable (700 µL) Aceite de maíz (500 µL)	Agua inyectable (700 µL) *Aceite de maíz (1.000 µL)	Agua inyectable (700 µL) Aceite de maíz (500 µL)	Eutanasia
Grupo 2	Agua inyectable (700 µL)	Agua inyectable (700 µL)	Agua inyectable (700 µL) β-Naftoflavona (50,24 mg) 500 µL	Agua inyectable (700 µL)				
Grupo 3	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL				
	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL Aceite de maíz (500 µL)	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL Aceite de maíz (500 µL)	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL *Aceite de maíz (1.000 µL)	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL Aceite de maíz (500 µL)	
Grupo 4	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL	Valproato de Magnesio (103 mg) 600 µL				
	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL β-Naftoflavona (50,24 mg) 500 µL	Clorhidrato de hidralazina (3,14 mg) 100 µL				

Actividad enzimática (Obtención de microsomas).

El primer paso implicó realizar la obtención de la fracción S9 de hígado. Para ello se descongelaron los hígados en hielo. Después se ha obtenido el peso de cada uno (el peso promedio fue de 5,147 g en el caso de ratas de 4 semanas, y 16,86 g en ratas de 7 meses) y se le añadió tres veces un volumen (en mililitros) de Cloruro de potasio (KCl) 0,15 M, según el peso. Se han homogeneizado los hígados usando un Homogeneizador de tejidos. Se centrifugó a 9.000 g (10.000 rpm), durante 15 minutos a 4°C. Se ha recuperado el sobrenadante y se congelaron en hielo seco. Las muestras de S9 de hígado se han almacenado a -80°C.

Después se obtuvo la fracción microsómica, para ello se descongelaron las muestras de S9 en frío y se sometieron a una centrifugación a 100.000 g (32.500 rpm) durante 1 hora a 4°C. Se ha recuperado el pellet y se resuspendieron en un amortiguador de fosfatos (100 mM, con sacarosa 0,25 M, pH=7.4) en un volumen igual al inicial. Se han homogeneizado las muestras y se han centrifugado a 100.000 g (32.500 rpm) durante 1 hora a 4°C. Se ha recuperado el pellet y se ha resuspendido en un tercio del volumen inicial en amortiguador de fosfatos (100 mM, con EDTA 1 mM, DTT 0,1 mM y glicerol 20%). Las fracciones microsómicas obtenidas se almacenaron a -80°C. Nota: Todo el procedimiento se ha llevado a cabo manteniendo las soluciones y el material a 4°C. La metodología de obtención de S9 y fracción microsómica se ha basado en el trabajo de Escobar-Garcia et al. (2001).

Actividad enzimática (Ensayos de Actividad enzimática de CYP1A1 y CYP1A2).

Se ha evaluado el nivel de actividad enzimática de CYP1A1 con el sustrato 7-Etoxirresorufina y de CYP1A2 con el sustrato 7-Metoxirresorufina. En una placa se ha añadido en cada pocillo 0,25 µm de 7-Etoxirresorufina para CYP1A1 o 2,5 µm de 7-Metoxirresorufina para CYP1A2; 80 µg de la fracción microsómica para CYP1A1 o 160 µg para CYP1A2; y se ha ajustado a un volumen final de 160 µL con amortiguador Tris-base 50 mM MgCl₂ 25 mM pH=7,6. Cada muestra de fracción microsómica se añadió en 4 pocillos distintos. Se ha incubado a 37°C durante 3 minutos y se ha añadido NADPH 0,1 mM sólo en tres de los cuatro pocillos de la muestra, para que uno funcione a modo de blanco de reacción y el resto de los pocillos constituyeron un triplicado. Se ha medido la fluorescencia a una longitud de onda de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, en intervalos de 20 segundos (realizándose 45 lecturas por pocillo), durante 15 minutos a 37°C.

Se elaboró una curva de resorufina para poder conocer la concentración del sustrato producido. Añadiéndose, por triplicado: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmol de resorufina y amortiguador Tris-base 50 mM MgCl₂ 25 mM (pH=7,6), con un volumen final de 200 µL por pocillo. Se ha incubado a 37°C durante 3 minutos en un espectrómetro y se ha realizado una lectura de

absorbancia a una longitud de onda de 530 nm, con una longitud de onda de emisión de 590 nm.

Actividad enzimática (Análisis de datos).

Para determinar la actividad específica de cada una de las muestras, los datos de absorbancia se han analizado como se menciona a continuación:

1. Se obtuvo la fórmula de la curva de resorufina, y se despejó X .

$$X=(Y+b)/m$$

Donde X es la cantidad de resorufina (pmol), Y es el valor de absorbancia de las lecturas, b es la ordenada y m es la pendiente.

2. En cada uno de los pocillos, del ensayo de actividad enzimática, se obtuvieron 45 valores de absorbancia, y el siguiente paso fue restar las lecturas de los controles sin NADPH a cada uno de los triplicados. Después se determina la cantidad de producto (pmol), mediante la fórmula de la curva de resorufina, considerando que Y es el valor de absorbancia de las 45 lecturas.

3. Al observar las curvas de actividad enzimática, se consideraron los datos que forman la fase lineal y se calculó la pendiente (que representó la cantidad de producto generado -pmol- por segundo) y el coeficiente de correlación de las 45 lecturas de cada pocillo. Para poder determinar la actividad total (pmol/min), se multiplicó el valor de la pendiente por 60.

4. Finalmente, se calculó la actividad específica (pmol/(mg prot*min), dividiendo entre el valor de la concentración de proteína añadida en la reacción (para CYP1A1 son 0,08 mg y para CYP1A2 son 0,16 mg).

RT-qPCR (Extracción de RNA).

Como la finalidad ha sido conocer el nivel de mRNA de *CYP1A1* y *CYP1A2*, primero se ha obtenido RNA total usando TRIzol, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadió un 1 mL de TRIzol en un tubo que contenía un pedazo de hígado. Se homogeneizó perfectamente y se incubó durante 5 minutos, para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó durante 3 minutos. Se realizó una centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Al terminar la centrifugación, se ha transferido la fase acuosa a un tubo nuevo y se han agregado 500 μ L de Alcohol isopropílico. Se han incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y se han centrifugado las muestras a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C. Al concluir, se eliminó el sobrenadante, conservando el botón, se añadió 1 mL de etanol al 75%, y se agitó vigorosamente. Las muestras se centrifugaron a 7.500 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el botón, evitando que se secase por completo. Se ha disuelto el RNA en agua libre de DNasas y RNasas.

RT-qPCR (Medición de Integridad y Cuantificación de RNA total).

Para conocer la integridad del RNA, las muestras se han corrido en un gel de agarosa al 1% (con amortiguador Tris 40 mM, ácido acético 20mM y EDTA 1 mM (TAE)), a 100 voltios, durante 27 minutos.

La medición de la concentración y pureza del RNA se realizó usando el equipo Nanodrop.

RT-qPCR (Transcripción inversa).

Primero se ha realizado una transcripción inversa, para obtener cDNA de las muestras, del siguiente modo:

1. Se añadieron los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas estéril, por muestra:
 - a) 1 μ L de cebador oligo d(T)₁₂₋₁₈ (500 μ g/mL).
 - b) 1 μ g de RNA total.
 - c) 1 μ L de cóctel de dNTPs (10 mM) (10 mM de cada uno: dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
 - d) Agua libre de nucleasas, a un volumen final de reacción de 12 μ L.
2. Se calentó la mezcla a 65°C, durante 5 minutos en un termociclador y se enfrió rápidamente en hielo.
3. Después se ha colectado con centrifugación.
4. Se añadieron los siguientes componentes a cada uno de los tubos:
 - a) 4 μ L de amortiguador «First strand 5X».
 - b) 2 μ L de DTT 0,1 M.
 - c) 1 μ L de Inhibidor de ribonucleasa recombinante RNaseOUT (40 unidades/ μ L).
5. Se ha mezclado el contenido y se incubó a 37°C durante 2 minutos en un termociclador.
6. Posteriormente, se añadió 1 μ L (200 unidades) de la enzima RT M-MLV. Se ha incubado, en un termociclador, a 37°C durante 50 minutos.
7. Finalmente se inactivó la reacción calentando los tubos a 70°C durante 15 minutos.

RT-qPCR (Preparación de la curva para qPCR Múltiplex y evaluación de los niveles de mRNA de CYP1A1 y CYP1A2 en las muestras problema).

Antes de evaluar el nivel de expresión de las muestras, se realizó una curva para definir la concentración de cDNA que se usará en la reacción. Se ha añadido 1 μ L de cDNA total de todas las muestras en un tubo, para usarlo en la curva. Se manejaron 8 puntos de la curva (1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 y 0 ng de RNA). Cada punto se realizó por triplicado. Se ha usado como control endógeno el nivel de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). En cada reacción se añadieron los siguientes componentes:

Posteriormente se añadió 1 μL de RNA o agua en la reacción. Las reacciones se corrieron con el siguiente protocolo:

- 55°C durante 2 minutos.
- 95°C durante 10 minutos.
- 45 ciclos: 95°C durante 15 segundos; 60°C durante 60 segundos.

La concentración óptima ha sido 250 ng/ μL , con ella se procedió a evaluar la concentración relativa con respecto a un gen endógeno. Posteriormente, se realizó la dilución de todas las muestras. Se preparó el mix para todas las muestras, con los siguientes componentes para cada tubo:

- a) 0,4 μL de sonda Taqman para *CYP1A1* o *CYP1A2*.
- b) 0,4 μL de sonda Taqman para *GAPDH*.
- c) 4 μL de «Master Mix Múltiplex».
- d) 2,2 μL de Agua libre de DNasas y RNasas.

Se añadió 7 μL del mix y 1 μL de la dilución de la muestra. Se corrieron las reacciones con el siguiente protocolo.

- 55°C durante 2 minutos.
- 95°C durante 10 minutos.
- 45 ciclos: 95°C durante 15 segundos; 60°C durante 60 segundos.

RT-qPCR (Análisis de resultados).

Los resultados de las curvas fueron analizados mediante el cálculo del ΔC_T , ya que este método permite comparar la expresión entre el gen control *GAPDH* y el gen problema (*CYP1A1* y *CYP1A2*). Para ello, se restó el valor del C_T del gen endógeno al valor del C_T del gen de interés y se realizó una normalización de los datos, tomando en cuenta una de las muestras como referencia cuyo valor fue igual a 1, el cual fue elegido de acuerdo con la homogeneidad en los triplicados, además de que formaba parte de las muestras de los grupos 1 (es decir, que se trataron sólo con los vehículos).

Western blot (SDS-PAGE).

El nivel de las proteínas *CYP1A1* y *CYP1A2* se evaluó mediante inmunodetección. Se prepararon geles con las muestras de los cuatro tratamientos, para cada una de las proteínas que se pretendían identificar, además de que cada gel se realizó por duplicado, con la meta de teñir uno de ellos con el colorante Azul de Coomassie. Se prepararon geles de poliacrilamida del siguiente modo:

Gel separador (10%)	Gel concentrador
---------------------	------------------

H ₂ O	H ₂ O
Acrilamida-bisacrilamida 30%	Acrilamida-bisacrilamida 30%
Tris 1M (pH 8,8)	Tris 1M (pH 6,8)
SDS 10%	SDS 10%
Persulfato de amonio 10%	Persulfato de amonio 10%
TEMED (2 µL/5 mL)	TEMED (1 µL/mL)

Primero se añadió el gel separador (aproximadamente 5 mL por gel) y 500 µL de isopropanol. Una vez que polimerizó perfectamente, se removió el isopropanol y se vertió la mezcla del gel concentrador. Finalmente, se colocó en un tanque de electroforesis vertical con amortiguador de corrida. Las muestras (microsomos) se diluyeron 1:5 y se les añadió amortiguador de carga. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargan 20 µg de proteínas totales. Las muestras se corrieron a 60 voltios durante 90 minutos y después otros 40 minutos a 100 voltios.

Al terminar la electroforesis, los geles que se desearon teñir, para comprobar la homogeneidad de las muestras, se han colocado en bandejas con la solución de tinción de Coomassie (Azul de Coomassie 0,1%; metanol 5 % y ácido acético 75%) durante 10 minutos, en agitación. Posteriormente se ha retirado la solución de tinción y se añadió solución desteñidora (Ácido acético 10% y metanol 40%), realizando varios lavados, en agitación, hasta que el gel quedó lo más desteñido posible (Ver anexo).

Western blot (Electrotransferencia).

Se ha realizado una electrotransferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm). Se ha ensamblado un cassette que contiene al gel y la membrana, además de papel filtro y esponjas. La transferencia se ha realizado en un tanque, usando amortiguador de transferencia, a 250 mA, 4°C, durante 65 minutos.

Western blot (Inmunodetección y Revelación con Luminiscencia).

Al terminar la electrotransferencia, las membranas se han teñido con el colorante rojo de Ponceau, para observar la calidad de la transferencia y la homogeneidad de las muestras (Ver anexo). Las membranas se han recortado justo debajo de la cuarta banda del marcador. Se ha realizado el bloqueo de la membrana (T-TBS BSA 5%), en agitación constante, durante 2 horas. Al terminar el bloqueo, se ha incubado con el anticuerpo primario contra las proteínas de interés (CYP1A1 1:1000, CYP1A2 1:1000) y contra la proteína del control (GAPDH 1:1000) durante 16 horas, a 4°C, en agitación constante. Al terminar, se han realizado tres lavados con T-TBS, durante 10 minutos cada uno. Después se incubó con el anticuerpo secundario, que contiene a la peroxidasa de rábano (para CYP1A1 y CYP1A2 anticonejo 1:5000 y para GAPDH antirrátón 1:5000), durante una hora, a 4°C, en agitación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados con T-TBS, durante 10 minutos cada lavado.

La revelación se ha realizado usando el kit «Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent» de la marca GE Healthcare Life Sciences. Dicho kit contiene una solución de luminol e hidróxido de sodio y otra de ferricianuro potásico y peróxido de hidrógeno. El luminol y el peróxido de hidrógeno reaccionan y liberan energía fotónica emitiendo quimioluminiscencia con un color azul brillante, mientras que el ferricianuro potásico y el hidróxido de sodio funciona a modo de catalizadores. Las membranas con las proteínas se bañaron con la mezcla de estas soluciones. Se ha realizado una exposición de luminiscencia en el equipo fotoanalizador Gel Logic 1500, Imaging system.

Western blot (Análisis densitométrico).

Para conocer el nivel de expresión de proteínas, las imágenes de las bandas de proteínas se analizaron con el programa ImageJ, con la finalidad de obtener un valor densitométrico, dado por una curva de intensidad. Se han corregido los datos, para que el programa solamente considerara el área bajo la curva que corresponde a la banda de interés.

Análisis estadístico.

Después se ha procedido averiguar si hay diferencias significativas entre tratamientos, y por lo tanto que hay un efecto en la metilación de DNA y desacetilación de histonas en la regulación (directa o indirecta) de CYP1A, en los tres niveles (actividad de la enzima, nivel de mRNA y nivel de proteína). Se realizaron pruebas ANOVA para realizar múltiples comparaciones de las medias de cada grupo entre sí, usando el programa GraphPad Prism 6. La prueba usada para comparar las medias fue la prueba de múltiples comparaciones de Tukey.

Nota: Como ya se ha demostrado que la β -Naftoflavona es un potente inductor de *CYP1A1* y *CYP1A2* (Ueda et al. 2006), es obvio que los grupos con dicha inducción mostraron diferencias significativas (en las pruebas ANOVA), con aquellos grupos que no fueron tratados con la misma. Para fines prácticos, se omitieron y sólo se discutieron las comparaciones entre el grupo control y el grupo Hidralacina/Valproato, además entre el grupo β -Naftoflavona y el grupo β -Naftoflavona/Hidralacina/Valproato, ya que las diferencias entre estos indican que podría haber una regulación epigenética operando en la transcripción de *CYP1A1* y *CYP1A2*.

RESULTADOS

Ensayos de actividad enzimática.

Para conocer el nivel de actividad de las enzimas CYP1A1 y CYP1A2, y, por lo tanto, la respuesta biológica ante el tratamiento, se midieron mediante ensayos con 7-etoxirresorufina, para CYP1A1, y 7-metoxirresorufina, para CYP1A2. La actividad de ambas enzimas fue mayor en ratas de 4 semanas, por lo que disminuyó con la edad, sin embargo, la inducción con β -Naftoflavona fue mucho mayor en ratas de 7 meses (Gráfico 1). En los ensayos de actividad de CYP1A1, tanto con ratas de 4 semanas como ratas de 7 meses de edad, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio; ni entre el grupo tratado con el inductor β -Naftoflavona y el grupo tratado con β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio (Gráfico 1). Por otro lado, estas diferencias no se han observado en la actividad de CYP1A2 en ratas de 4 semanas, pero sí en ratas de 7 meses, entre el grupo inducido con β -Naftoflavona y el grupo con β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio (Gráfico 2). Con la finalidad de conocer el comportamiento de los datos, se han graficado todos los individuos (Gráficos 1 y 2).

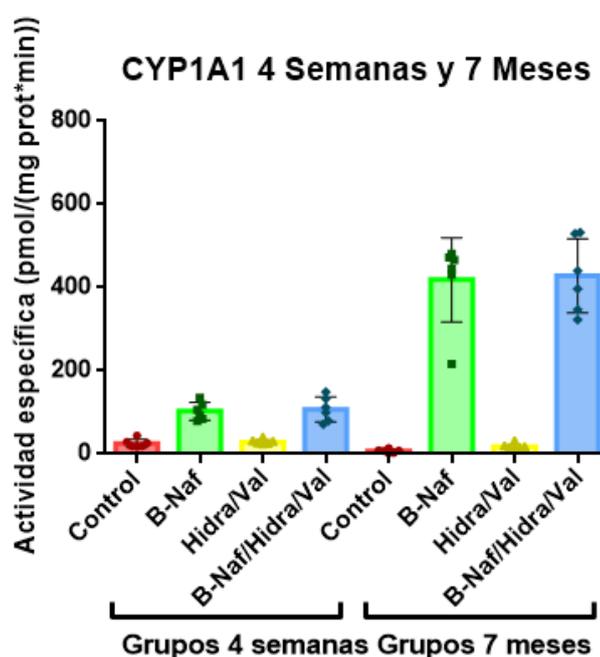


Gráfico 1. Promedio de la actividad específica de CYP1A1, de los cuatro grupos, medida con 7-etoxirresorufina en ratas de 4 semanas y 7 meses. Tanto para los grupos de ratas de 4 semanas como de 7 meses, no hubo diferencias significativas con ANOVA de una vía. También se muestra el comportamiento de los individuos denotados como puntos.

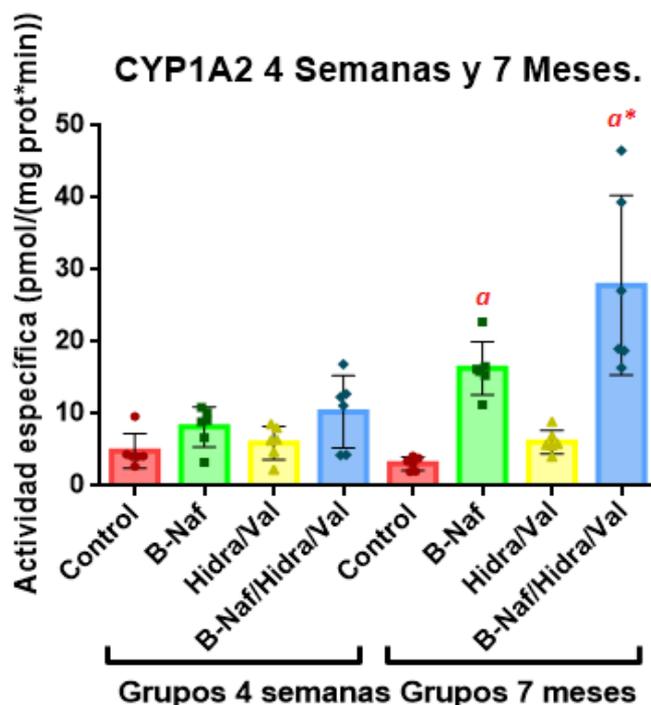


Gráfico 2. Promedio de la actividad específica de CYP1A2, de los cuatro grupos, medida con 7-Metoxirresorufina en ratas de 4 semanas y 7 meses. Para los grupos de ratas de 4 semanas, no hubo diferencias significativas entre grupos; sin embargo, para los grupos de ratas de 7 meses, hubo diferencias significativas entre el grupo β -Naftoflavona y el grupo β -Naftoflavona/Hidralazina/Valproato de Magnesio con ANOVA ($P < 0,05$), marcados con el símbolo α . Se utilizó la prueba de Tukey para confirmar las diferencias entre lotes. Igualmente se ubicaron los individuos dentro del gráfico para apreciar el comportamiento de estos.

qPCR.

Se ha evaluado la expresión relativa del mRNA de *CYP1A1* (Gráfico 3) y *CYP1A2* (Gráfico 4) en ratas de 4 semanas y 7 meses. Se ha usado a *GAPDH* como control endógeno para normalizar. Según los resultados de la prueba ANOVA, no hubo diferencias significativas entre los grupos con β -Naftoflavona y β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio en los niveles de mRNA de *CYP1A1* en ratas de 4 semanas y ratas de 7 meses, ni en los niveles de mRNA de *CYP1A2* en ratas de 4 semanas, sin embargo, entre el grupo 2 (β -Naftoflavona) y el grupo 4 (β -Naftoflavona/Clorhidrato de hidralazina/Valproato de magnesio) hubo diferencias significativas ($P < 0,05$), en la transcripción de *CYP1A2*, en ratas de 7 meses (Gráfico 4). Al igual que ha ocurrido con los resultados de actividad enzimática, la fuerza de inducción con β -Naftoflavona ha sido mucho mayor en ratas de 7 meses. Igualmente, se han graficado los individuos para que sea posible observar la variación entre grupos (Gráficos 3 y 4).

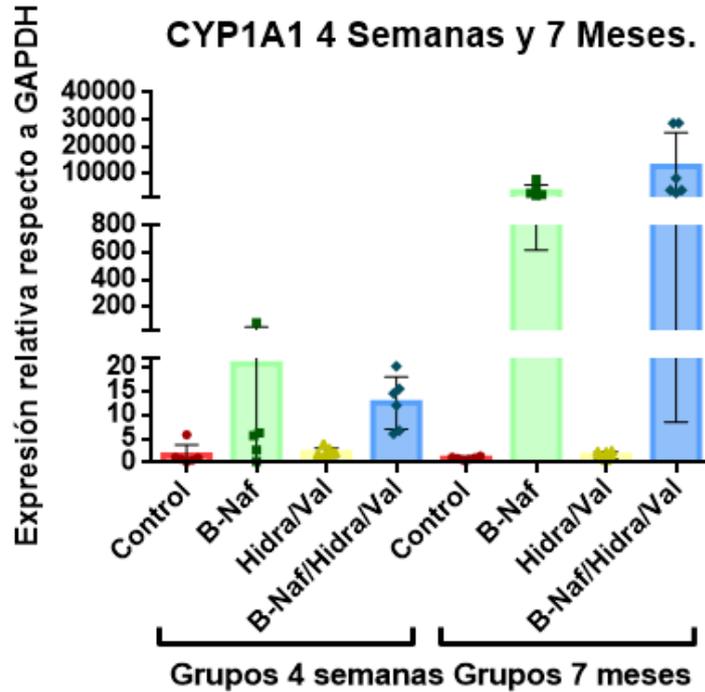


Gráfico 3. Expresión relativa de mRNA de *CYP1A1* con respecto a *GAPDH*, en los grupos de ratas de 4 semanas y grupos de 7 meses. Los símbolos representan a cada uno de los individuos.

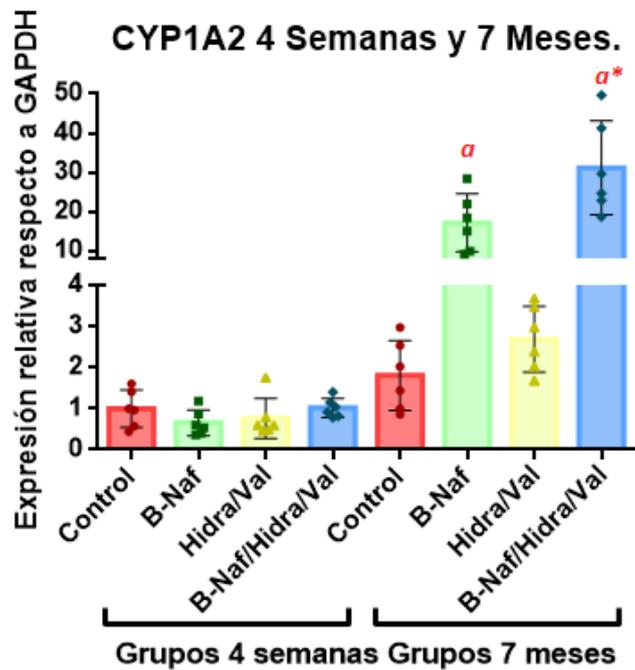


Gráfico 4. Expresión relativa de mRNA de *CYP1A2* con respecto al gen endógeno *GAPDH*, en grupos de ratas de 4 semanas y ratas de 7 meses. Se observaron diferencias significativas entre los grupos marcados con *a* (β -Naftoflavona y β -Naftoflavona/Clorhidrato de hidralazina/Valproato de magnesio) usando la prueba ANOVA de una vía y posteriormente la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Como en los gráficos anteriores, se marca el comportamiento de los individuos mediante símbolos dentro del gráfico.

Western Blot.

Finalmente, se ha evaluado el nivel de proteína de CYP1A1 y CYP1A2, en ratas de 4 semanas y 7 meses, sometidas al tratamiento inductor, al tratamiento inhibitor y a ambos tratamientos juntos, además del control sin tratamiento. Después de la electroforesis, los geles de tñeron con el colorante Azul de Coomassie y las membranas, después de la electrotransferencia, con rojo de Ponceau, con la finalidad de observar homogeneidad en la carga de las muestras (Ver anexo: Figs. I, II, III y IV).

En las imágenes de las de proteínas de CYP1A1 en ratas de 4 semanas y en ratas de 7 meses (Fig. 7) se observó una total ausencia de bandas en los grupos 1 y 3, mientras que para los grupos 2 y 4 se observaron bandas de distintas intensidades. Las bandas de GAPDH se usaron a modo de control endógeno. La inducción de CYP1A1 fue mayor en ratas de 7 semanas (Gráfico 5). Se observó una diferencia de intensidades entre el grupo tratado con β -Naftoflavona y el grupo de β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio en ratas de 7 meses. Según la prueba ANOVA, hubo diferencias significativas entre el grupo 2 tratado con β -Naftoflavona y el grupo 4 tratado con β -Naftoflavona/Clorhidrato de hidralazina/Valproato de magnesio (Gráfico 5) ($P < 0,05$).

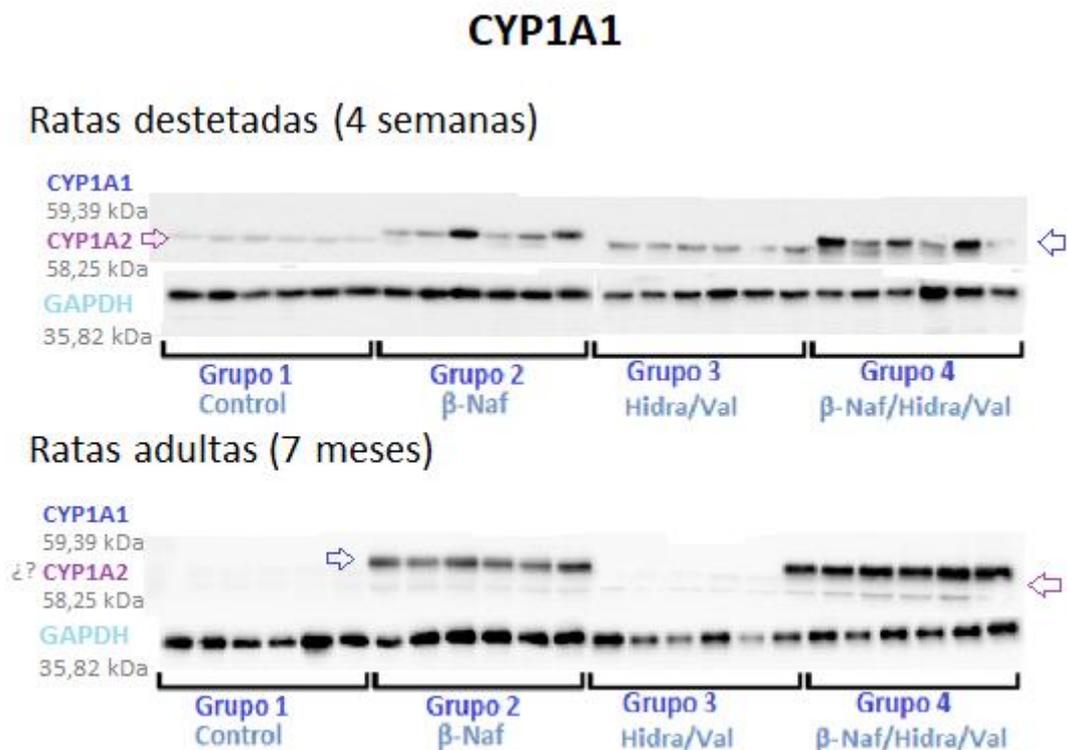


Fig. 7. Expresión a nivel de proteína de CYP1A1 en ratas de 4 semanas (Superior) y ratas de 7 meses (Inferior). Tanto para ratas de 4 semanas como de 7 meses, en el grupo control y el en grupo tratado con hidralazina y valproato no se detectó la presencia de CYP1A1, mientras que en el grupo de β -Naftoflavona

y el grupo tratado con β -Naftoflavona, hidralazina y valproato se pudo apreciar la proteína. En ambos casos las bandas del grupo 4 fueron generalmente más intensas que las del grupo 2. Así mismo, las bandas de ratas de 7 meses han sido más intensas que las bandas de ratas de 4 semanas.

Nivel de proteína de CYP1A1 en ratas de 4 semanas y 7 meses

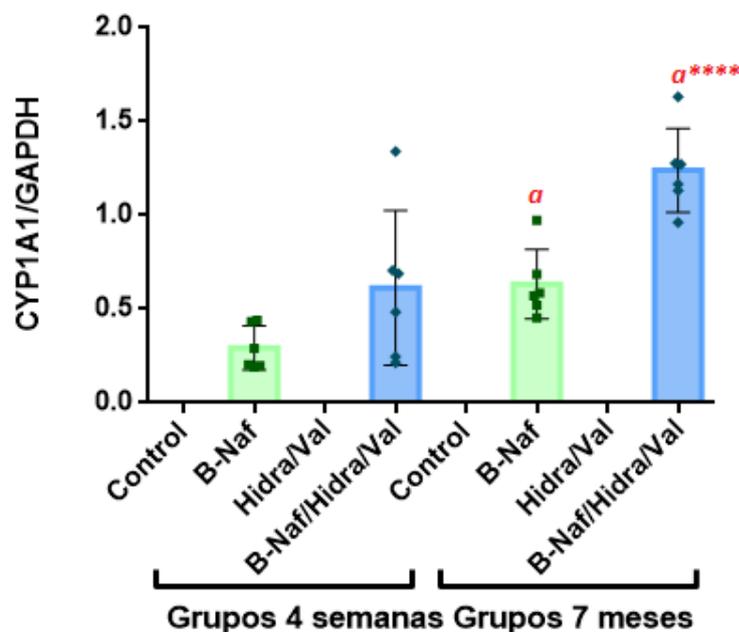
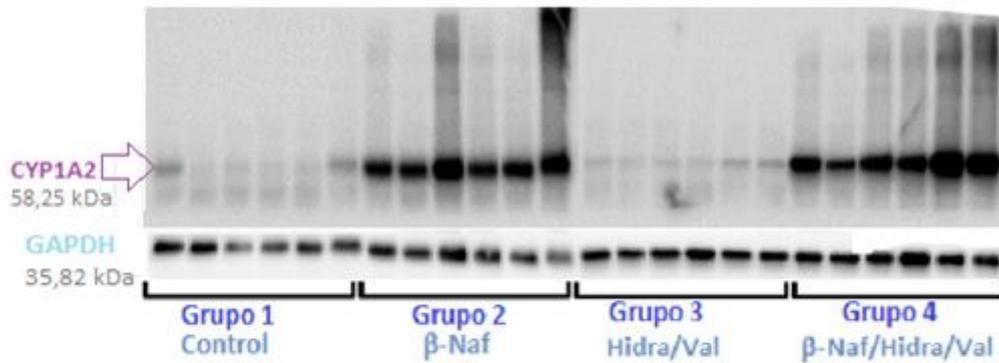


Gráfico 5. Análisis densitométrico de la expresión de CYP1A1 en ratas de 4 semanas y en ratas de 7 meses. En estas últimas se observaron diferencias significativas entre el grupo 2 (β -Naftoflavona) y el grupo 4 (β -Naftoflavona/Clorhidrato de hidralazina/Valproato de magnesio), que poseen el símbolo α ($P < 0,05$) bajo la prueba ANOVA. La prueba usada para comparar las medias fue la prueba de Tukey. El comportamiento de los individuos se ha representado por símbolos en el grupo correspondiente.

En el caso de CYP1A2, se han detectado bandas en el grupo control de ratas de 4 semanas, mientras que estas no se han podido observar en muestras de ratas de 7 meses (Fig. 8). En el caso de las ratas de 4 semanas, la inducción fue mayor que en ratas de 7 meses (Gráfico 6). Usando la prueba ANOVA, hubo diferencias significativas entre el grupo de inducción con β -Naftoflavona y el grupo 4 de β -Naftoflavona/Clorhidrato de hidralazina/Valproato de magnesio ($P < 0,05$) (Gráfico 6).

CYP1A2

Ratas destetadas (4 semanas)



Ratas adultas (7 meses)

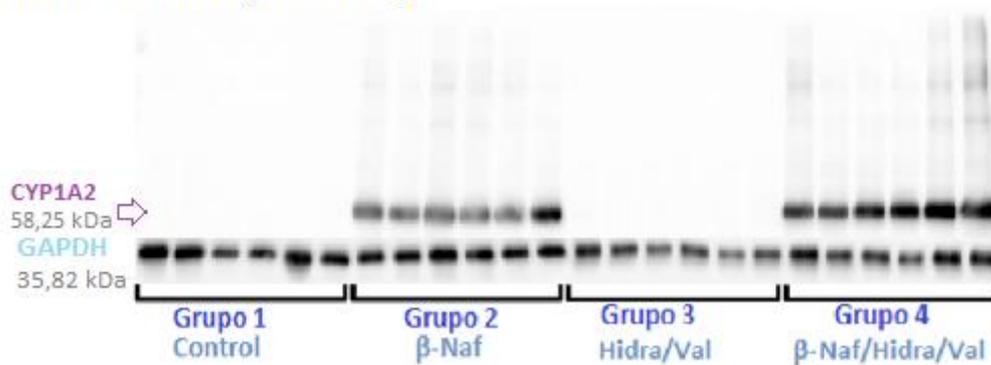


Fig. 8. Inmunodetección de CYP1A2 en muestras de ratas de 4 semanas (Superior) y ratas de 7 meses (Inferior). En el caso de las ratas de 4 semanas, las bandas de los grupos 1 (control) y 3 (hidralazina y valproato) son más tenues que las de los grupos 2 (grupo β -Naftoflavona) y 4 (grupo β -Naftoflavona, hidralacina y valproato). Mientras tanto, en ratas de 7 meses no se han detectado bandas en los grupos 1 y 3.

Nivel de proteína de CYP1A2 en ratas de 4 semanas y 7 meses

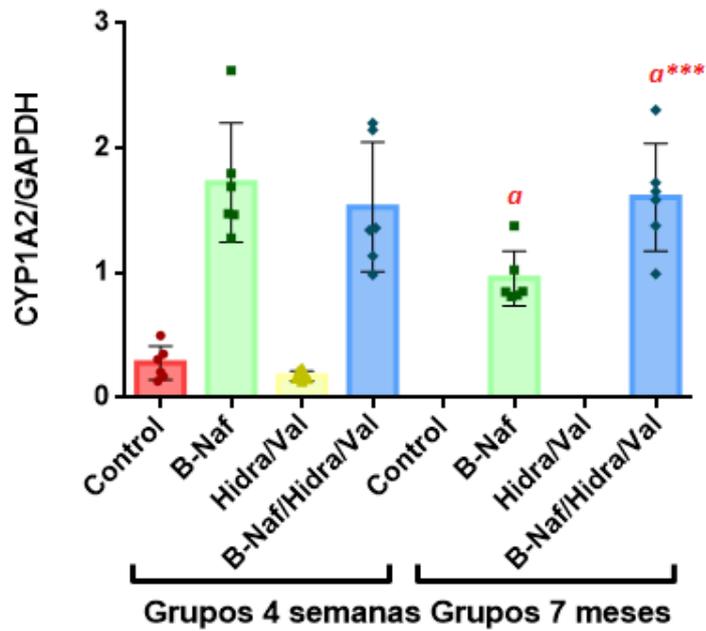


Gráfico 6. Análisis densitométrico de la proteína CYP1A2 en ratas de 4 semanas y 7 meses. La prueba paramétrica ANOVA señala que entre el grupo 2 (β -Naftoflavona) y el grupo 4 (β -Naftoflavona, Hidralazina y Valproato) hubo diferencias significativas, que se muestran con el símbolo α ($P < 0,05$). La prueba usada para comparar las medias fue la prueba de Tukey. Se aprecia el comportamiento de los datos mediante símbolos.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de conocer si la metilación de DNA y la acetilación de histonas son mecanismos que regulan la expresión de *CYP1A1* y *CYP1A2* de acuerdo con la edad del individuo, se ha evaluado el nivel de mRNA de estos genes en hígado de ratas destetadas (4 semanas de edad) y ratas adultas (7 meses/30 semanas), en cuatro grupos: un control, un grupo de inducción mediante la vía AHR (β -Naftoflavona), un grupo de relajación de la cromatina (Clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio) y un grupo tratado con el inductor y con los agentes de descompactación (β -Naftoflavona, clorhidrato de hidralazina y valproato de magnesio). Sólo se ha observado una diferencia interesante en ratas de 7 meses, entre los grupos de *CYP1A2*: β -Naftoflavona contra β -Naftoflavona/Hidralazina/Valproato (Gráfico 4). Para conocer el efecto biológico en el tratamiento, se ha evaluado la actividad enzimática, y nuevamente, en ratas de 7 meses se observa un efecto en la actividad de *CYP1A2* (Gráfico 2). Para correlacionar el nivel de transcripción y actividad enzimática, se ha medido el nivel de proteína, nuevamente hay una diferencia entre los grupos β -Naftoflavona y β -Naftoflavona/Hidralazina/Valproato, de *CYP1A2* en ratas de 7 meses (Gráfico 6). Estos resultados sugieren que la metilación del promotor o de potenciadores y la acetilación de los nucleosomas podrían tener un papel modulador directo de *CYP1A2* en las ratas adultas. Otros estudios han realizado experimentos muy similares al realizado en este trabajo: Al tratar células RK13 de riñón de conejo con el inductor 3-metilclorantreno, se da la inducción del gen *CYP1A1*, mientras que en células R9ab de pulmón de conejo, la inducción falla; mientras que el uso del inhibidor de la DNMT1, 5-aza-2'-desoxicitidina, promovió la transcripción génica (Hirota et al. 2008). Otro caso similar ocurre en la línea de hepatoma HepG2, donde al tratar las células con dioxina, la inducción de *CYP1B1* y la inducción de marcas de histonas de cromatina activa, fallaron, por otro lado, el uso de 5-aza-2'-desoxicitidina permitió la transcripción del gen y se especula que es debido a que la metilación parcial de las XRE2 y XRE3, ubicadas en la región potenciadora, regula la unión de AHR-ARNT, mientras que la metilación completa en el promotor impide la unión de los factores de transcripción necesarios (Beedanagari et al. 2010). En nuestro caso, el ligado de AHR, β -Naftoflavona, promueve la inducción adecuadamente de *CYP1A1* y *CYP1A2*, a diferencia de la dioxina, que falla en inducir *CYP1B1*, y sólo ocurre la transcripción tratándose juntamente con 5-aza-2'-desoxicitidina. Esta diferencia se puede deber a que el grado de metilación es distinto en ambos casos. La metilación total puede impedir completamente su transcripción, como es el caso de *CYP1B1* en células HepG2, mientras que la metilación parcial permite la transcripción dependiente de ligando (Beedanagari et al. 2010), la cual se potencia cuando se bloquea el mantenimiento de la metilación, pudiendo ser el caso de *CYP1A2* en hígado. A diferencia de *CYP1A2* en ratas de 7 meses, *CYP1A2* en ratas de 4 semanas tiene un nivel de mRNA y actividad

enzimática muy similar en los cuatro grupos (Gráfico 4), no siendo el caso del nivel de proteína (Gráfico 6). Pues ni la inducción con β -Naftoflavona ni el tratamiento con hidralazina/valproato, ni el tratamiento conjunto tienen una diferencia con respecto al control, pero en el nivel de proteína, los grupos tratados con el inductor β -Naftoflavona sí que tienen un efecto. Esta disparidad podría explicarse con mecanismos de regulación post-transcripcional, como intervención de la traducción mediante RNAs interferentes, circularización del mRNA o la pérdida gradual de la cola poliA que conlleva a la degradación del mRNA (Filipowicz, Bhattacharyya and Sonenberg 2008), que no afectan el nivel global de CYP1A2 activa enzimáticamente, que puede deberse a modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, la fosforilación y la glucosilación que se ha observado que regulan a CYP1A2 de rata (Aguiar, Masse and Gibbs 2005). En cuanto a CYP1A1, no se observó ningún efecto relevante con el tratamiento de hidralazina/valproato en ratas de 4 semanas ni de 7 meses, a excepción del nivel de proteína de CYP1A1 en ratas de 7 meses (Gráfico 5). En estos casos, puede que actúe un mecanismo de represión distinto.

CYP1A1 se expresa en hígado de rata en el feto a los 18 días de gestación, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Czekaj et al 2006). Su expresión continúa a nivel de mRNA en ratas de 4 semanas y 7 meses (Gráfico 3), pero no se detecta proteína (Gráfico 5). En el caso de *CYP1A2*, durante la gestación, se detecta la presencia de mRNA en feto de hígado de rata, pero no se percibe la proteína correspondiente, sin embargo, la expresión de la proteína se activa un día antes del nacimiento, pero no está completamente desarrollado (Czekaj et al 2006). En nuestro estudio hemos observado que a las 4 semanas de edad se detecta mRNA y proteína de CYP1A2 (Gráficos 4 y 6), pero no es posible inducir la expresión de ambos citocromos, usando un ligando de AHR (Gráficos 3 y 4). Posteriormente, a los 7 meses, continúa detectándose mRNA de *CYP1A2*, pero no proteína, y la inducción con β -Naftoflavona potencia su expresión en ambos niveles de expresión (Gráficos 4 y 6). En el estudio de Yun et al. (2010) se ha detectado proteína de CYP1A1 en ratas de 3 semanas (Yun et al. 2010), mientras que en nuestro estudio sólo se detecta mRNA, pero no la proteína. En el mismo estudio no se detecta proteína de CYP1A1 a las 26 semanas (5,9 meses) (Yun et al. 2010), siendo congruente con lo encontrado en nuestro estudio a los 7 meses (30 semanas). Por otro lado, en el mismo estudio se observa que a las tres semanas de edad, las ratas presentan expresión de la enzima CYP1A2, y en el nuestro observamos proteína a las cuatro semanas de edad. Sin embargo, a las 26 semanas (5,9 meses), en el trabajo de Yun et al. (2010), se sigue presentando expresión a nivel de proteína, mientras que en el presente trabajo no se ha detectado proteína. Estas discrepancias pueden explicarse por la sensibilidad de los anticuerpos empleados para la inmunodetección y también porque las cepas de ratas

fueron distintas (En el estudio de Yun et al. (2010) usan ratas Sprague-Dawley, mientras que en nuestro estudio hemos usado ratas Wistar).

Mediante inyección intraperitoneal de β -Naftoflavona a ratas hembras preñadas, se ha visto que se induce la proteína CYP1A1, pero no CYP1A2, en los hígados de los embriones (Czekaj et al 2006). La inducción en ratas recién nacidas es consistente con lo observado en nuestros resultados (Gráfico 6).

Controversialmente, el tratamiento de inhibidores de HDACs con agonistas de AHR pueden no siempre permitir la activación transcripcional. Por ejemplo, en el trabajo de Jin y Ryu (2004) se ha estudiado la regulación de la acetilación de histonas del gen *CYP1A2* en hepatocitos de ratón y han encontrado que al tratar las células con TCDD, hay una inducción que disminuye, pero no desaparece, a las 192 horas después del tratamiento, y al usar inhibidores de HDACs (Butirato de sodio y tricostatina A), estos promueven la transcripción del gen una vez que han transcurrido 144 horas con Tricostatina A y 192 horas con Butirato de sodio, mientras que el co-tratamiento con el inductor TCDD y los inhibidores de HDACs inhiben la transcripción del gen (Jin et al. 2004). Este resultado se le atribuye a interacciones entre los compuestos que impiden que actúen promoviendo la transcripción eficazmente.

Los resultados de este estudio soportan la idea de regulación epigenética en *CYP1A2* en hígado de ratas de 7 meses, para descartar efectos epistáticos, el siguiente paso es estudiar a nivel molecular las diferencias en el estado de metilación y la acetilación de histonas en hígado de ratas de 4 semanas y 7 semanas, utilizando secuenciación con bisulfito de sodio y ChIPs, correspondientemente. También sería conveniente llevar este mismo estudio a otros órganos relevantes para el metabolismo de xenobióticos, como pulmón e intestino.

CONCLUSIONES

La metilación de DNA y la acetilación de histonas parecen no ser relevantes en la regulación transcripcional de *CYP1A2* en hígado de ratas de 4 semanas, pero sí que lo parece en ratas de 7 meses, corroborándose que hay un cambio en la regulación de este gen de acuerdo con la edad del individuo. Interesantemente, *CYP1A1* y *CYP1A2* no responden significativamente a la inducción con β -Naftoflavona en hígado de ratas de 4 semanas, pero se consigue la inducción en ratas de 7 meses. Por otro lado, estos mecanismos epigenéticos no parecen afectar la transcripción de *CYP1A1* en hígado de rata, en las edades estudiadas. Al parecer, los mecanismos de regulación de *CYP1A1* y *CYP1A2* son distintos, a pesar de la proximidad de los promotores.

LITERATURA CITADA.

- Aguiar, M., R. Masse & B. F. Gibbs (2005) Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metab Rev*, 37, 379-404.
- Allis, C. D. & T. Jenuwein (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 17, 487-500.
- Antequera, F. (2003) Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1647-58.
- Anttila, S., J. Hakkola, P. Tuominen, E. Elovaara, K. Husgafvel-Pursiainen, A. Karjalainen, A. Hirvonen & T. Nurminen (2003) Methylation of cytochrome P4501A1 promoter in the lung is associated with tobacco smoking. *Cancer Res*, 63, 8623-8.
- Arce, C., B. Segura-Pacheco, E. Perez-Cardenas, L. Taja-Chayeb, M. Candelaria & A. Dueñas-Gonzalez (2006) Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome. *J Transl Med*, 4, 10.
- Avadhani, N. G., M. C. Sangar, S. Bansal & P. Bajpai (2011) Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J*, 278, 4218-29.
- Avvakumov, G. V., J. R. Walker, S. Xue, Y. Li, S. Duan, C. Bronner, C. H. Arrowsmith & S. Dhe-Paganon (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature*, 455, 822-5.
- Beedanagari, S. R., R. T. Taylor, P. Bui, F. Wang, D. W. Nickerson & O. Hankinson (2010) Role of epigenetic mechanisms in differential regulation of the dioxin-inducible human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Mol Pharmacol*, 78, 608-16.
- Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol*, 124, 128-45.
- Bird, A. (1999) DNA methylation de novo. *Science*, 286, 2287-8.
- (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21.
- Bird, A. P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209-13.
- Boffetta, P., N. Jourenkova & P. Gustavsson (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 8, 444-72.
- Boström, C. E., P. Gerde, A. Hanberg, B. Jernström, C. Johansson, T. Kyrklund, A. Rannug, M. Törnqvist, K. Victorin & R. Westerholm (2002) Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 3, 451-88.
- Campbell, S. J., C. J. Henderson, D. C. Anthony, D. Davidson, A. J. Clark & C. R. Wolf (2005) The murine Cyp1a1 gene is expressed in a restricted spatial and temporal pattern during embryonic development. *J Biol Chem*, 280, 5828-35.
- Chavez-Blanco, A., C. Perez-Plasencia, E. Perez-Cardenas, C. Carrasco-Legleu, E. Rangel-Lopez, B. Segura-Pacheco, L. Taja-Chayeb, C. Trejo-Becerril, A. Gonzalez-Fierro, M. Candelaria, G. Cabrera & A. Duenas-Gonzalez (2006) Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int*, 6, 2.
- Chedin, F., M. R. Lieber & C. L. Hsieh (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16916-21.
- Coticello, S. G. (2008) The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol*, 9, 229.
- Corchero, J., S. Pimprale, S. Kimura & F. J. Gonzalez (2001) Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*, 11, 1-6.
- Cox, M. B. & C. A. Miller (2004) Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Cell Stress Chaperones*, 9, 4-20.
- Cross, S. H. & A. P. Bird (1995) CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*, 5, 309-14.

- Czekaj, P., A. Wiaderkiewicz, R. Wiaderkiewicz & A. Palasz (2006) Expression of constitutive and inducible cytochromes P450 in fetal and newborn rat liver. *Polish J of Environ Stud*, 15, 5, 699-708.
- De la Cruz-Hernández, E., C. Perez-Plasencia, E. Pérez-Cardenas, A. Gonzalez-Fierro, C. Trejo-Becerril, A. Chávez-Blanco, L. Taja-Chayeb, S. Vidal, O. Gutiérrez, G. I. Dominguez, J. E. Trujillo & A. Duenas-González (2011) Transcriptional changes induced by epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate in cervical carcinoma. *Oncol Rep*, 25, 399-407.
- de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp & A. B. van Kuilenburg (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370, 737-49.
- Deaton, A. M. & A. Bird (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25, 1010-22.
- Delescluse, C., G. Lemaire, G. de Sousa & R. Rahmani (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology*, 153, 73-82.
- Detich, N., V. Bovenzi & M. Szyf (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem*, 278, 27586-92.
- Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal & M. M. Zhou (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399, 491-6.
- Dueñas-Gonzalez, A., J. Coronel, L. Cetina, A. González-Fierro, A. Chavez-Blanco & L. Taja-Chayeb (2014) Hydralazine-valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 10, 1433-44.
- Eberharter, A. & P. B. Becker (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, 3, 224-9.
- Edwards, J. R., O. Yarychkivska, M. Boulard & T. H. Bestor (2017) DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin*, 10, 23.
- Elbarbry, F. A., P. J. McNamara & J. Alcorn (2007) Ontogeny of hepatic CYP1A2 and CYP2E1 expression in rat. *J Biochem Mol Toxicol*, 21, 41-50.
- Escobar-Garcia, D., R. Camacho-Carranza, I. Pérez, V. Dorado, M. Arriaga-Alba & J. J. Espinosa-Aguirre (2001) S9 induction by the combined treatment with cyclohexanol and albendazole. *Mutagenesis*, 16, 523-8.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya & N. Sonenberg (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-14.
- Fujii-Kuriyama, Y., H. Imataka, K. Sogawa, K. Yasumoto & Y. Kikuchi (1992) Regulation of CYP1A1 expression. *FASEB J*, 6, 706-10.
- Ghafarian-bahraman, A., N. Sadeghimanesh, M. Mirzaei, A. Akbarizadeh, M. Omid, H. Mohammadi, M. Arabnezhad, K. Mobini & A. Mohammadi-Bardbori (2017) Effects of omeprazol and ketoconazole on aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3, 1, 13-18.
- Ghotbi, R., A. Gomez, L. Milani, G. Tybring, A. C. Syvänen, L. Bertilsson, M. Ingelman-Sundberg & E. Aklillu (2009) Allele-specific expression and gene methylation in the control of CYP1A2 mRNA level in human livers. *Pharmacogenomics J*, 9, 208-17.
- Gradin, K., J. McGuire, R. H. Wenger, I. Kvietikova, M. L. fhitelaw, R. Toftgård, L. Tora, M. Gassmann & L. Poellinger (1996) Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, 16, 5221-31.
- Guengerich P. Human cytochrome P450 enzymes. Capítulo 10. Ortiz P. 2005. Cytochrome P450: Structure, mechanism, and Biochemistry. 3ª Edición. Kluwer Academics/Plenum Publishers. USA. Pp: 377-530.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-52.

- Haaf, T. & M. Schmid (2000) Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 91, 113-23.
- Hammons, G. J., Y. Yan-Sanders, B. Jin, E. Blann, F. F. Kadlubar & B. D. Lyn-Cook (2001) Specific site methylation in the 5'-flanking region of CYP1A2 interindividual differences in human livers. *Life Sci*, 69, 839-45.
- Hanukoglu I. 1996. Electron transfer proteins of cytochrome P450 systems. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 14: 29-56
- Hirota, T., H. Takane, S. Higuchi & I. Ieiri (2008) Epigenetic regulation of genes encoding drug-metabolizing enzymes and transporters; DNA methylation and other mechanisms. *Curr Drug Metab*, 9, 34-8.
- Horvath, S. (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14, R115.
- Iida, T., I. Suetake, S. Tajima, H. Morioka, S. Ohta, C. Obuse & T. Tsurimoto (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells*, 7, 997-1007.
- Ikeya, K., A. K. Jaiswal, R. A. Owens, J. E. Jones, D. W. Nebert & S. Kimura (1989) Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol Endocrinol*, 3, 1399-408.
- Inche, A. G. & N. B. La Thangue (2006) Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise. *Drug Discov Today*, 11, 97-109.
- Izzo, A. & R. Schneider (2016) The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1859, 486-95.
- Jeltsch, A. (2006) On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics*, 1, 63-6.
- Jensen, K. & B. L. Møller (2010) Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry*, 71, 132-41.
- Jia, D., R. Z. Jurkowska, X. Zhang, A. Jeltsch & X. Cheng (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, 449, 248-51.
- Jin, B., Y. Li & K. D. Robertson (2011) DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*, 2, 607-17.
- Jin, B., D. W. Park, K. W. Nam, G. T. Oh, Y. S. Lee & D. Y. Ryu (2004) CpG methylation of the mouse CYP1A2 promoter. *Toxicol Lett*, 152, 11-8.
- Jones, P. A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484-92.
- Jones, P. A. & D. Takai (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293, 1068-70.
- Karpf, A. R. (2007) Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Curr Opin Mol Ther*, 9, 231-41.
- Kawajiri, K. & Y. Fujii-Kuriyama (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*, 464, 207-12.
- Kekatpure, V. D., A. J. Dannenberg & K. Subbaramaiah (2009) HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *J Biol Chem*, 284, 7436-45.
- Knowles, H. J., Y. M. Tian, D. R. Mole & A. L. Harris (2004) Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res*, 95, 162-9.
- Kornberg, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868-71.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705.
- Lamb, D. C., L. Lei, A. G. Warrillow, G. I. Lepesheva, J. G. Mullins, M. R. Waterman & S. L. Kelly (2009) The first virally encoded cytochrome p450. *J Virol*, 83, 8266-9.

- Lande-Diner, L., J. Zhang, I. Ben-Porath, N. Amariglio, I. Keshet, M. Hecht, V. Azuara, A. G. Fisher, G. Rechavi & H. Cedar (2007) Role of DNA methylation in stable gene repression. *J Biol Chem*, 282, 12194-200.
- Lee H. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons, Gas chromatography. Academic press. 3860-3866.
- Lemke, L. E. & C. A. McQueen (1995) Acetylation and its role in the mutagenicity of the antihypertensive agent hydralazine. *Drug Metab Dispos*, 23, 559-65.
- Li, B., M. Carey & J. L. Workman (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128, 707-19.
- Lynch, T. & A. Price (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician*, 76, 391-6.
- Ma, Q. & A. Y. Lu (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*, 35, 1009-16.
- Mann, M. B. & H. O. Smith (1977) Specificity of Hpa II and Hae III DNA methylases. *Nucleic Acids Res*, 4, 4211-21.
- Martignoni, M., G. M. Groothuis & R. de Kanter (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2, 875-94.
- Mastrangelo, G., E. Fadda & V. Marzia (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect*, 104, 1166-70.
- McGraw, J. & D. Waller (2012) Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 8, 371-82.
- Meunier, B., S. P. de Visser & S. Shaik (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev*, 104, 3947-80.
- Mimura, J. & Y. Fujii-Kuriyama (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*, 1619, 263-8.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin & D. T. Brown (2000) Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 408, 877-81.
- Miyajima, A., T. Furihata & K. Chiba (2009) Functional analysis of GC Box and its CpG methylation in the regulation of CYP1A2 gene expression. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24, 269-76.
- Nakatani, Y. (2001) Histone acetylases--versatile players. *Genes Cells*, 6, 79-86.
- National Centre for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nebert, D. W. & D. W. Russell (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360, 1155-62.
- Ogu, C. C. & J. L. Maxa (2000) Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 13, 421-3.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber & E. Li (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99, 247-57.
- Omicinski, C. J., R. P. Remmel & V. P. Hosagrahara (1999) Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci*, 48, 151-6.
- Ooi, S. K. & T. H. Bestor (2008) The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 133, 1145-8.
- Peters, A. H., J. E. Mermoud, D. O'Carroll, M. Pagani, D. Schweizer, N. Brockdorff & T. Jenuwein (2002) Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, 30, 77-80.
- Petrulis, J. R., A. Kusnadi, P. Ramadoss, B. Hollingshead & G. H. Perdew (2003) The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem*, 278, 2677-85.

- Polimanti, R., S. Piacentini, D. Manfellotto & M. Fuciarelli (2012) Human genetic variation of CYP450 superfamily: analysis of functional diversity in worldwide populations. *Pharmacogenomics*, 13, 1951-60.
- Post, J., C. Y. Huang & J. Hoffman (1963) The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. *J Cell Biol*, 18, 1-12.
- Pradhan, M., P. O. Estève, H. G. Chin, M. Samaranayake, G. D. Kim & S. Pradhan (2008) CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry*, 47, 10000-9.
- Quattrochi, L. C., H. Shih & G. V. Pickwell (1998) Induction of the human CYP1A2 enhancer by phorbol ester. *Arch Biochem Biophys*, 350, 41-8.
- Razin, A. (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J*, 17, 4905-8.
- Rice, J. C. & C. D. Allis (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 263-73.
- Roberts, B. J. & M. L. Whitelaw (1999) Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, 274, 36351-6.
- Ryu, D. Y., P. E. Levi, P. Fernandez-Salguero, F. J. Gonzalez & E. Hodgson (1996) Piperonyl butoxide and acenaphthylene induce cytochrome P450 1A2 and 1B1 mRNA in aromatic hydrocarbon-responsive receptor knock-out mouse liver. *Mol Pharmacol*, 50, 443-6.
- Sahlberg, C., R. Pohjanvirta, Y. Gao, S. Alaluusua, J. Tuomisto & P. L. Lukinmaa (2002) Expression of the mediators of dioxin toxicity, aryl hydrocarbon receptor (AHR) and the AHR nuclear translocator (ARNT), is developmentally regulated in mouse teeth. *Int J Dev Biol*, 46, 295-300.
- Schnekenburger, M., L. Peng & A. Puga (2007) HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation. *Biochim Biophys Acta*, 1769, 569-78.
- Shetty, P. V., B. Y. Bhagwat & W. K. Chan (2003) P23 enhances the formation of the aryl hydrocarbon receptor-DNA complex. *Biochem Pharmacol*, 65, 941-8.
- Sogawa, K., K. Numayama-Tsuruta, T. Takahashi, N. Matsushita, C. Miura, J. Nikawa, O. Gotoh, Y. Kikuchi & Y. Fujii-Kuriyama (2004) A novel induction mechanism of the rat CYP1A2 gene mediated by Ah receptor-Arnt heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 746-55.
- Sono, M., M. P. Roach, E. D. Coulter & J. H. Dawson (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev*, 96, 2841-2888.
- Sterling, K. & E. Bresnick (1996) Oct-1 transcription factor is a negative regulator of rat CYP1A1 expression via an octamer sequence in its negative regulatory element. *Mol Pharmacol*, 49, 329-37.
- Sterling, K., J. Weaver, K. L. Ho, L. C. Xu & E. Bresnick (1993) Rat CYP1A1 negative regulatory element: biological activity and interaction with a protein from liver and hepatoma cells. *Mol Pharmacol*, 44, 560-8.
- Sterner, D. E. & S. L. Berger (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 435-59.
- Strahl, B. D. & C. D. Allis (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41-5.
- Sun, Y. V., D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, M. R. Fielden & T. R. Zacharewski (2004) Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res*, 32, 4512-23.
- Takai, D. & P. A. Jones (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3740-5.
- Taylor, R. T., F. Wang, E. L. Hsu & O. Hankinson (2009) Roles of coactivator proteins in dioxin induction of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast cancer cells. *Toxicol Sci*, 107, 1-8.

- Tekpli, X., S. Zienolddiny, V. Skaug, L. Stangeland, A. Haugen & S. Mollerup (2012) DNA methylation of the CYP1A1 enhancer is associated with smoking-induced genetic alterations in human lung. *Int J Cancer*, 131, 1509-16.
- Trerotola, M., V. Relli, P. Simeone & S. Alberti (2015) Epigenetic inheritance and the missing heritability. *Hum Genomics*, 9, 17.
- Trojer, P. & D. Reinberg (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, 28, 1-13.
- Turner, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22, 836-45.
- Ueda, R., H. Iketaki, K. Nagata, S. Kimura, F. González, K. Kusano, T. Yoshimura & Y. Yamazoe (2006) A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human CYP1A1 and CYP1A2 genes. *Mol Pharmacol*, 69, 1924-30.
- Varriale,, A. & G. Bernardi (2010) Distribution of DNA methylation, CpGs, and CpG islands in human isochores. *Genomics*, 95, 25-8.
- Walsh, A. A., K. Tullis, R. H. Rice & M. S. Denison (1996) Identification of a novel cis-acting negative regulatory element affecting expression of the CYP1A1 gene in rat epidermal cells. *J Biol Chem*, 271, 22746-53.
- Wilson, B. G. & C. W. Roberts (2011) SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11, 481-92.
- Wu, H. & Y. Zhang (2014) Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 156, 45-68.
- Yang, H. Y., B. D. Zelus & M. R. Juchau (1991) Organogenesis-stage cytochrome P450 isoforms: utilization of PCR for detection of CYP1A1 mRNA in rat conceptal tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 178, 236-41.
- Yun, K. U., S. J. Oh, J. M. Oh, K. W. Kang, C. S. Myung, G. Y. Song, B. H. Kim & S. K. Kim (2010) Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch Toxicol*, 84, 939-46.
- Zanger, U. M. & M. Schwab (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 138, 103-41.
- Zeng, L., Q. Zhang, G. Gerona-Navarro, N. Moshkina & M. M. Zhou (2008) Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure*, 16, 643-52.
- Zhou, H., H. Wu, C. Liao, X. Diao, J. Zhen, L. Chen & Q. Xue (2010) Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway. *Toxicol Mech Methods*, 20, 279-86.
- Zhou, Y. D., M. Barnard, H. Tian, X. Li, H. Z. Ring, U. Francke, J. Shelton, J. Richardson, D. W. Russell & S. L. McKnight (1997) Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 713-8.

ANEXO

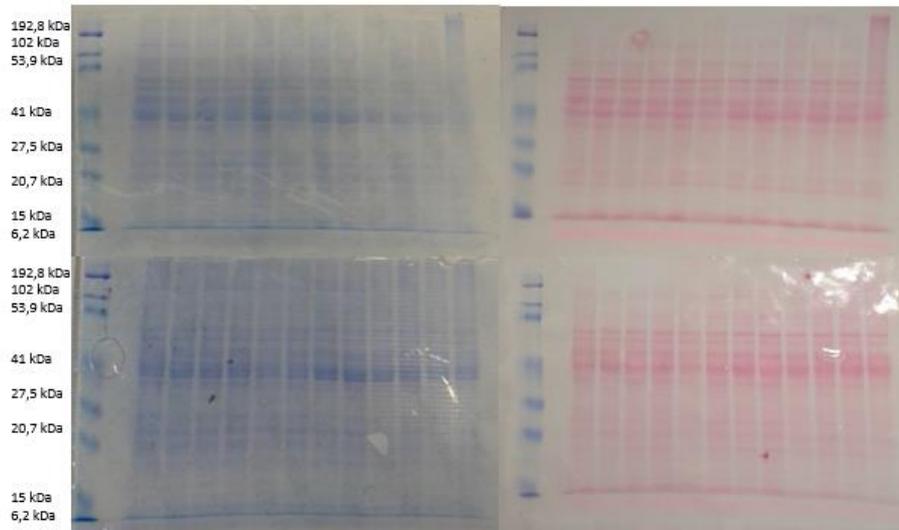


Fig. I. Cada una de las muestras de microsomas de ratas de 4 semanas se cargó en dos geles distintos, después de la electroforesis, uno de ellos se tiñó con el colorante azul de Coomassie (izquierda), mientras que el otro se sometió a electrotransferencia. Posteriormente, la membrana se tiñó con el colorante rojo de Ponceau (derecha). Se ha adicionado marcador molecular y en la imagen se muestran los pesos moleculares correspondientes de las bandas del marcador. Posteriormente este gel se sometió a la inmunodetección de CYP1A1

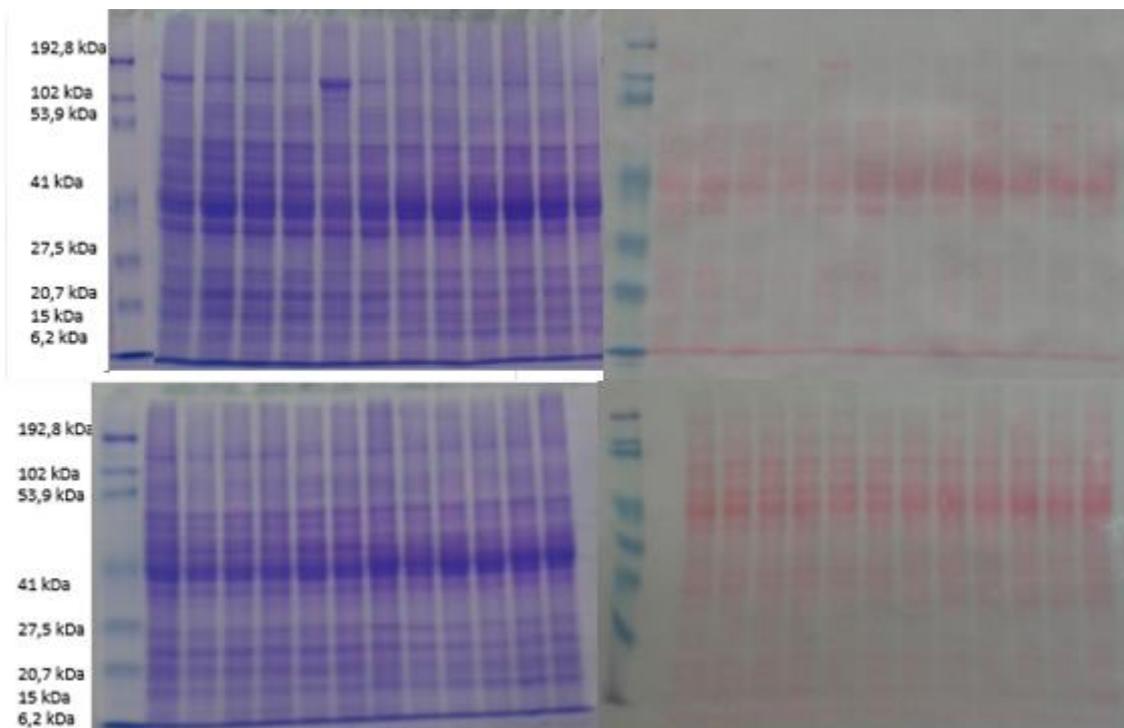


Fig. II. En la izquierda se presentan las 24 muestras de ratas de 7 meses después de la electroforesis, cuyos geles fueron teñidos con azul de Coomassie. En la derecha se muestran las membranas después de la transferencia de las muestras de ratas de siete meses teñidas con el colorante rojo de Ponceau. Posteriormente este gel se sometió a la inmunodetección de CYP1A1.

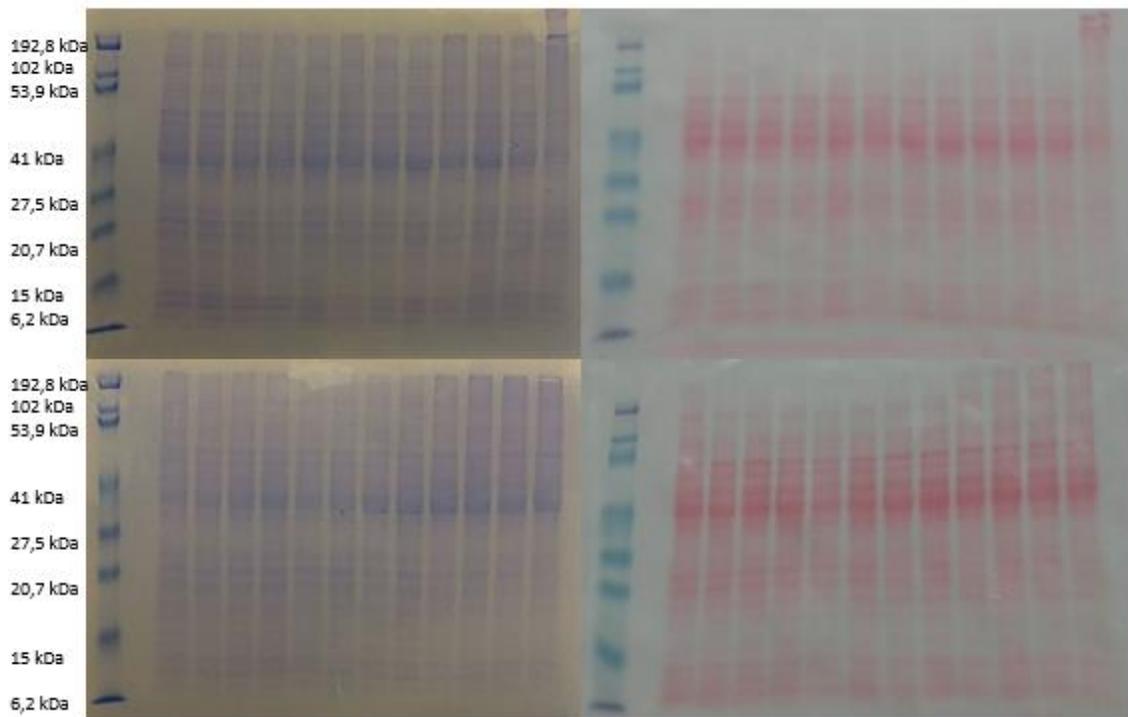


Fig. III. En el lado izquierdo se muestran los gels donde se corrieron en una electroforesis las muestras de ratas de 4 semanas, los cuales se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie. En el lado derecho se muestran las membranas teñidas con Rojo de Ponceau. Posteriormente este gel se sometió a la inmunodetección de CYP1A2.

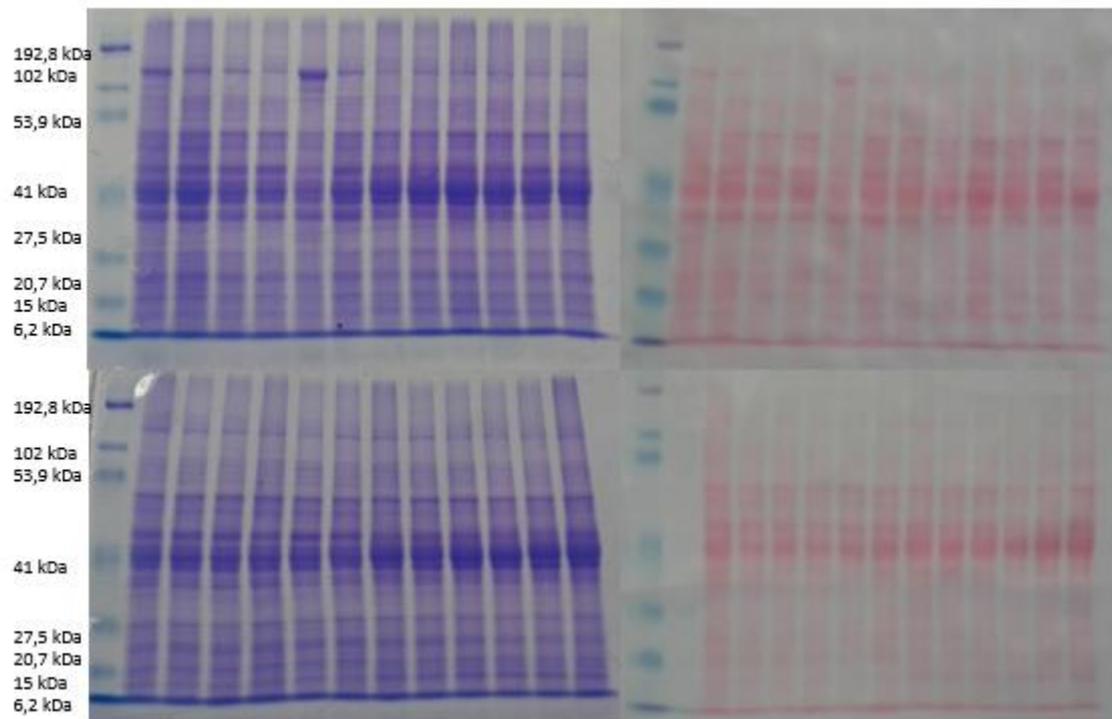


Fig. IV. En el lado izquierdo se cargaron las muestras de microsomas de ratas de 7 meses, se sometieron a una electroforesis y se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie. En el lado derecho se realizó el mismo procedimiento (a excepción de la tinción de los gels) y se llevó a cabo una electrotransferencia, que fue seguida de la tinción de las membranas con Rojo de Ponceau. Posteriormente este gel se sometió a la inmunodetección de CYP1A2.