



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOMEDICINA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CITOCROMO P450

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LAUREL HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)

COMITÉ TUTOR: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)
DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

CD. MX. SEPTIEMBRE, 2020



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
BIOMEDICINA

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CITOCROMO P450

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LAUREL HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)

COMITÉ TUTOR: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (UNAM)
DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA (UNAM)

MÉXICO, CD. MX. SEPTIEMBRE, 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/510/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de marzo de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **HERNÁNDEZ GUTIÉRREZ LAUREL** con número de cuenta **410001532** con la tesis titulada **"Efecto de la concentración de oxígeno sobre la actividad de citocromo P450"**, realizada bajo la dirección del **DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
Vocal: DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
Secretario: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
Suplente: DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de agosto de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM). Por darme las herramientas para formarme como maestra en Ciencias Biológicas, mediante clases, conferencias y congresos nacionales e internacionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría No. de CVU 776085. También por la beca otorgada posteriormente como ayudante de investigador.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por la beca otorgada para asistir al Congreso Internacional 20 th International Conference on Cytochrome P450; Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, en Düsseldorf, Alemania

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, mi tutor principal. Por aceptarme en su grupo de investigación, guiarme durante la realización de este proyecto y comprometerse en mi formación profesional, brindándome tiempo, consejos, observaciones y pláticas para mi crecimiento profesional. Así como la asesoría para la asistencia a congresos nacionales e internacionales. Gracias por las comidas del laboratorio y festejos compartidos.

A los miembros de mi Comité Tutor por su valiosa asesoría y por guiarme durante el período de realización de la maestría.

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Agradecimientos a título personal

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre en el laboratorio C-206 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Es mi alma mater, me ha brindado la oportunidad de estudiar la Licenciatura y la maestría, en ella me he formado de forma integral.

A los miembros de mi jurado para mi examen de grado por sus acertadas observaciones durante la revisión de mi tesis y el tiempo dedicado a estas.

Dra. Aliesha Araceli González Arenas

Dr. Enrique García Hernández

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Dra. Ana María Salazar Martínez

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda, por el apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto de investigación. Gracias Sandy por formar parte de mi familia académica, por el tiempo compartido, por tú gran calidad humana, las risas, pláticas y festejos.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por su asesoría para la realización de este trabajo y actividades académicas, así como permitirme trabajar con su equipo de laboratorio para la realización de ensayos en condiciones de hipoxia. Por las pláticas, comidas y festejos de laboratorio compartidos.

A la Dra. Tzipe Silvia Govezensky Zack por el apoyo estadístico que me brindó durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmen Martha Elinos Báez, por el apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Rebeca Santes Palacios por su disposición para asesorarme en todas las dudas que tuve durante la realización de este trabajo, de forma amable y paciente.

Agradecimientos a título personal

A mi mamá por ser mi pilar, consejera y una mujer con un gran corazón, a mi papá por su cariño, consejos y apoyo. A mi tía América por brindarme su cariño, sabiduría y apoyo.

A mi querida abuelita Efi y mi prima Andrea que siempre ha tenido un gran impulso por vivir y me contagia con su entusiasmo.

A mi familia, mis tíos y mis primos, que me han apoyado y me han dado ánimos durante este tiempo.

A mis amigas desde la Universidad: Rebeca, Miriam, Sanch y Mary que han estado conmigo en las buenas y en las malas, en su compañía física o a la distancia me hacen sentir mejor y ver la vida con mayor alegría.

A los chicos del Lab, que han compartido conmigo momentos de alegrías, risas escandalosas, viajes, comidas en Coyoacán, salidas al cine, festejos de Navidad con vino caliente, amigos secretos de San Valentín y los disfraces de Halloween, los seminarios con pastel y que decir del chicharrón con papás de Cyn, los “hot dogs colombianos” y los tamales. También pesares con los experimentos y personales, nos hemos acompañado en las tristezas y en los logros. Rebe, Anita, Cyn, Moni, Cris, Clau, Dafne, Raúl y Sandy que siempre estuvo con nosotras dándonos consejos. Gracias por su apoyo durante este tiempo dentro y fuera del laboratorio.

A las integrantes del taller “Pilar Sen Torrijos” por brindarme su apoyo moral, fraternidad y sabiduría durante estos años.

Gracias a todos, son parte importante de mi vida y formación profesional. ¡Los quiero!



Dedico especialmente este trabajo:

a mis papás Mara y Gabriel

y

a mi tía América

por creer siempre en mí.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Citocromos P450.....	3
Ciclo catalítico	5
Ensayo de mutagenicidad con la bacteria Salmonella Typhimurium (Prueba de Ames).....	7
Planteamiento del problema.....	9
Hipótesis.....	9
Objetivo	9
Objetivos particulares.....	10
Antecedentes.....	10
Concentración de oxígeno ambiental y su efecto sobre los CYP in vivo.....	10
Estrategia experimental	11
Sustancias Químicas.....	11
Obtención de la fracción microsomal	11
Desplazamiento de oxígeno	11
Determinación de la actividad enzimática	12
Ensayo de cinética enzimática CYP1A1 y CYP2B2	12
Ensayo de mutagenicidad	13
Verificación de marcadores genéticos y determinación de la frecuencia de reversión espontánea	13
Ensayo de Ames.....	14
Ensayo de determinación de CYP totales	14
Western Blot.....	15
Análisis estadístico.....	15
Resultados.....	16
Determinación de las concentraciones de O.D.	16
Actividad enzimática.....	17
Determinación de la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B en condiciones de hipoxia .	18

Efecto de la disminución de O.D. sobre la actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2B2	19
Evaluación de mutagenicidad de 2-AA y ciclofosfamida a diferentes concentraciones de O.D.....	22
Discusión	25
Conclusión	26
Perspectivas	27
Literatura Citada	28

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de CYP humanos basada es sus sustratos principales. Tomada de (Guengerich, 2014).....	5
Tabla 2. Parámetros cinéticos enzimáticos (Km, Vmax) de actividad etoxirresorufina O-desetilasa CYP1A1 y benciloxirresorufina O-desalquilasa CYP2B2 a diferentes concentraciones de O.D.	21
Tabla 3. Cuantificación de CYP totales	24

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo catalítico del Citocromo P450. Tomada de (Pearl <i>et al.</i> 2016).....	7
Figura 2. Tiempo en el que la concentración de O.D. 50% desplazado por vacío se iguala a la concentración de O.D. ambiental n=1	17
Figura 3. Actividad enzimática de CYP1A1 a diferentes concentraciones de proteína total hepática microsomal (50, 100, 200, 300 y 400 µg) a la concentración de sustrato etoxirresorufina (EROD) 0.25mM. Se emplearon microsomas hepáticos de ratas tratadas con FB y β-NF , fármacos que inducen la expresión de CYP (Chen <i>et al.</i> , 2010; Lněničková <i>et al.</i> , 2018).	18
Figura 4. Efecto de la concentración de oxígeno en el medio de 40% (3.3 ppm) sobre la actividad enzimática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 respecto a la concentración ambiental 79% (6.5 ppm). Cada barra representa la media ± D.E. obtenida de dos experimentos independientes.	19
Figura 5. Efecto de la concentración de O. D. (79%, 60% y 40 %) sobre la actividad enzimática de CYP1A1 en microsomas de hígados de rata inducidos con FB y β-NF, a las concentraciones de sustrato etoxirresorufina (EROD) 20, 40, 60, 70, 140, y 280 nM.....	20
Figura 6. Efecto de la concentración de O. D., 50% (4.1 ppm), 60% (4.92 ppm) y ambiental 79% (6.47 ppm), sobre la actividad enzimática en microsomas de hígado de rata. Gráfico muestra velocidad (V) contra concentración de sustrato. Cada punto representa la media ± D.E. obtenida de tres experimentos independientes. Las líneas continuas representan las curvas ajustadas A) CYP1A1, sustrato EROD (1-22 nM), B) CYP2B2, sustrato BROD (1-17 nM).....	21
Figura 7. Efecto de la disminución de oxígeno sobre la actividad mutagénica de 2-AA, probado a condiciones ambientales (79% O.D.) y condiciones de hipoxia (50% O.D.). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (marcadores) junto con las líneas de regresión obtenidas (líneas continuas). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes, pero las intersecciones fueron significativamente diferentes (P <0.0001). R= 0.915	22
Figura 8. Efecto de la disminución de oxígeno sobre la actividad mutagénica de ciclofosfamida, probado a condiciones ambientales (79% O.D.) y condiciones de hipoxia (50% O.D.). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (marcadores) junto con las líneas de regresión obtenidas (líneas continuas). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes, pero las intersecciones fueron significativamente diferentes (P <0.0001). R= 0.942	23
Figura 9.A) Determinación de niveles de proteína para CYP1A1 y CYP2B2 en microsomas de hígado de rata mediante Western Blot. N=Normoxia (79% O.D.), H= Hipoxia (50% O.D.) MPB= Marcador de peso de proteína biotinilada (Biotinylated protein Ladder, Cell Signaling). B) Cuantificación relativa de los niveles de proteína de CYP1A1. Se muestra el resultado de un experimento. Los niveles de proteína de CYP1A1 fueron normalizados respecto a los niveles de proteína de GAPDH.	24

ABREVIATURAS

2-AA: 2-aminoantraceno

BROD: benciloxirresorufina O-desalquilasa

CPR: Citocromo P450 reductasa

CYP: Citocromo P450

DE: Desviación estándar

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: etilendiamino tetra acético

EROD: etoxirresorufina O-desetilasa

FAD: Flavín adenín dinucleótido

FB: fenobarbital

FMN: flavín monocucleótido

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HS: alto espín (high spin)

LS: bajo espín (low spin)

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NAT: N-acetiltransferasas

O.D.: oxígeno disuelto

O₂: oxígeno molecular

PHAs: hidrocarburos poliaromáticos

TBS: solución salina amortiguada con Tris (Tris.buffered-saline)

β-NF: β-naftoflavona

Resumen

Las hemoproteínas conocidas como Citocromo P450 (CYP) constituyen la familia más grande de enzimas capaces de catalizar la biotransformación oxidativa de aproximadamente el 80% de los fármacos conocidos, así como de numerosas moléculas endobióticas y xenobióticas. Estas enzimas llevan a cabo la monooxigenación a partir de oxígeno molecular y NADPH para introducir un átomo de oxígeno a las moléculas de sustrato mediante un ciclo catalítico de reacciones de óxido-reducción. En el sitio activo de los CYP hay un centro de hierro hexacoordinado a cuatro anillos de protoporfirina, un grupo tiol de la cisteína y agua. Posteriormente el oxígeno molecular se asocia con el hierro para convertirse en un complejo de dioxígeno más el sustrato. Para llevar a cabo el metabolismo oxidativo de sus sustratos necesita un socio redox llamado citocromo P450 reductasa. En esta reacción de oxidación, la insuficiencia de moléculas de oxígeno podría afectar la eficiencia del ciclo catalítico ya que es dependiente, datos previamente reportados respaldan esta suposición. No existe información bioquímica reportada acerca de la cinética de CYP a bajas concentraciones de oxígeno. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2B2 a diferentes concentraciones de oxígeno en un modelo *in vitro*. Se presentan los resultados obtenidos de forma *in vitro* del comportamiento de la cinética enzimática bajo condiciones normales e hipóxicas. Utilizando moléculas de alcoxiresorufina como sustrato, la V_{max} estimada para la producción de resorufina disminuyó de 1695.3 a 990.4 para CYP1A1 y de 1702.5 a 845.6 para CYP2B2 a baja concentración de oxígeno (4.1 ppm) comparado con la concentración normal de oxígeno a temperatura ambiente (6.5 ppm). Bajo las condiciones experimentales de hipoxia, las concentraciones de proteína de CYP permanecieron sin cambios, así como el contenido total de CYP en microsomas de hígado de ratas tratadas con fenobarbital y β -naftoflavona. Además, el potencial mutagénico de 2-aminoantraceno y ciclofosfamida probado con el ensayo de Ames disminuyó a baja concentración de oxígeno 32% y 42% respectivamente. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la baja disponibilidad de oxígeno se traduce en una baja eficiencia de oxidación de los sustratos de CYP.

Abstract

Hemoproteins known as Cytochrome P450 (CYP) constitute the largest family of enzymes capable of catalyzing the oxidative biotransformation of approximately 80% known drugs as well as numerous endobiotic and xenobiotic molecules. These enzymes carry out the monooxygenation from a molecular oxygen and NADPH to introduce an oxygen atom to the substrate molecules by means of a catalytic oxide- reduction cycle. At the active site of the CYP enzymes there is an iron protoporphyrin center coordinated with cysteine thiolate and water, then molecular oxygen is associated with the iron to be converted into dioxygen complex plus substrate. To carry out the oxidative metabolism of its substrates needs a redox partner called cytochrome P450 reductase. In this oxidation reaction, insufficient oxygen molecules would affect enzyme catalysis and data from literature support this assumption. Nevertheless, biochemical data about CYP kinetics at low oxygen concentration is not available. For this reason, the aim of this work was to evaluate the enzymatic activity of CYP1A1 and CYP2B2 at different oxygen concentrations in an *in vitro* model. In this work, we present results obtained *in vitro* on the variation of enzyme kinetics data under normal and hypoxic conditions. Using alkoxyresorufin molecules as substrates, the V_{max} for resorufin production diminished from 1695.3 to 990.4 for CYP1A1 and from 1702.5 to 845.6 for CYP2B2 at low oxygen concentration (4.1 ppm) compared to normal oxygen at room temperature (6.5 ppm). At hypoxic experimental conditions, the concentration of CYP proteins remained unchanged as well as total CYP content in microsomes of rats treated with phenobarbital and β -naphthoflavone. Additionally, the mutagenic potency of 2-aminoanthracene and cyclophosphamide in the Ames test diminished at low oxygen concentration by 32% and 42% respectively. These results support the hypothesis that low oxygen availability is traduced in a low efficiency of CYP to oxidized substrates.

Introducción

De manera cotidiana los seres humanos nos encontramos expuestos a un gran número de sustancias, ya sea de origen artificial (contaminantes, aditivos alimentarios, fármacos, compuestos químicos etc.) o natural (metabolitos de plantas u otros organismos) que son ajenas al cuerpo humano denominadas xenobióticos (Schook y Laskin, 1994), que al acumularse en el organismo pueden generar efectos adversos. Existen mecanismos adaptativos que permiten detectar estos agentes extraños y realizar su metabolismo y depuración (Ortiz de Montellano, 2005).

Los xenobióticos de carácter lipofílico que ingresan al cuerpo humano, son biotransformados por enzimas de fase I y II a compuestos con características hidrosolubles para facilitar su eliminación (Brunton, Chabner and Knollman, 2011).

En las reacciones de fase I, las enzimas realizan la oxidación, reducción o reacciones hidrolíticas y posteriormente las de fase II forman un conjugado del producto de la fase I, a través de UDP- glucuronosiltransferasas (UGT), sulfotransferasas (SULT) o glutatión S-transferasas (GST). La principal función de las enzimas de fase I es introducir grupos funcionales polares (-OH, -SH, -NH₂ o -COOH) en moléculas apolares. Las enzimas de fase II de conjugación catalizan la adición de más grupos funcionales polares al xenobiótico, entre ellos glucuronato, sulfato, glutatión o aminoácidos, para volverlo más hidrosoluble y con mayor peso molecular (Iyanagi, 2007).

Citocromos P450

Dentro de las enzimas de fase I se encuentran las hemoproteínas llamadas citocromos P450 (CYP), que son una super familia de proteínas altamente conservadas evolutivamente. Se encuentran en todos los reinos de la vida, las cuales constituyen la familia más grande de enzimas capaces de catalizar la biotransformación oxidante de aproximadamente el 80% de los fármacos conocidos así como de numerosos xenobióticos y la biosíntesis de hormonas esteroideas (Sirim *et al.* 2010; Ulrich M. Zanger y Schwab 2013).

Los CYP se consideran los biocatalizadores más versátiles en la naturaleza por su capacidad para realizar reacciones de oxidación altamente regio- y estereo-selectivas en un gran número de moléculas complejas. Su amplia distribución, así como la gran cantidad de reacciones y

sustratos que poseen demuestran su plasticidad. Estos citocromos se han detectado en todas las membranas subcelulares de organismos eucariotas, siendo la mitocondria, y el retículo endoplásmico las fuentes más importantes (Gallego Fernández *et al.*, 2011; Mak and Denisov, 2018; Li *et al.*, 2020)

Los CYP se encuentran anclados a la membrana del retículo endoplásmico a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal (Donato, 2000), al igual que su socio redox la proteína donadora de electrones citocromo P450 reductasa (CPR), equipada con dos flavinas; Flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavín monocucleótido (FMN) (Miyamoto *et al.*, 2015).

Los CYP se agrupan en familias con base en la similitud de secuencias de aminoácidos, los miembros de una misma familia poseen una identidad de secuencia de aminoácidos mayor a 40%, mientras que los miembros de la misma subfamilia poseen una homología mayor a 55 % (Nelson *et al.*, 1993). En el humano se encuentran 57 tipos de enzimas de CYP, sin embargo, sólo las enzimas pertenecientes a las familias CYP 1, 2 y 3 son las principales responsables del metabolismo de xenobióticos (Purnapatre *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2002; Zanger y Schwab 2013).(Tabla 1)

La familia CYP1 contiene tres isoformas diferentes, CYP1A1, 1A2 y 1B1 las cuales comparten 70% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Participan en el metabolismo de sustratos endógenos y exógenos como fármacos, productos dietéticos y juegan un papel importante en el metabolismo y activación de procarcinógenos como hidrocarburos poliaromáticos (PAH). CYP1A2 contribuye al metabolismo de la cafeína, teofilina, tacrina, tizanidina (Lang, Radtke and Bairlein, 2019; Wu *et al.*, 2019).

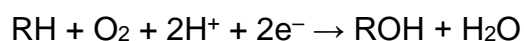
De la familia CYP2, las enzimas CYP2A6, B6, C8, C9, C19, D6, E1 y J2 son relevantes en el metabolismo de fármacos (Zanger *et al.* 2014). CYP2B6 tiene una amplia especificidad de sustrato y es importante en el metabolismo de muchos fármacos, toxinas ambientales y compuestos endógenos (Li, Zhang and Ding, 2018).

Esteroles	Xenobióticos	Ácidos grasos	Eicosanoides	Vitaminas	Desconocido
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	251
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

Tabla 1. Clasificación de CYP humanos basada es sus sustratos principales. Tomada de (Guengerich, 2014).

Ciclo catalítico

La reacción de oxidación más común de los CYP es la monooxigenación que se lleva a cabo a partir de una molécula de oxígeno y NADPH para introducir un átomo de oxígeno a las moléculas de sustrato mediante un ciclo catalítico de óxido-reducción (Perzanowski, 1999; Cook *et al.*, 2016). La reacción monooxigenasa puede representarse de la siguiente forma:



Donde “R” representa el sustrato y ROH es el producto de la reacción oxidado (Copeland, 2000).

El ciclo catalítico de CYP comprende varios pasos para llevar a cabo el metabolismo oxidante de sus sustratos. El centro catalítico de los CYP es un átomo de hierro hexacoordinado (6c) con cuatro anillos de protoporfirina IX, un grupo tiol de la cisteína de la cadena polipeptídica y agua. El ciclo inicia cuando el sustrato se une a la enzima férrica en estado de reposo, de bajo espín (LS), y desplaza la molécula de agua coordinada en el sexto ligando que se encuentra cubriendo

el sitio activo, generando un grupo hemo en estado funcional con alto espín (HS) pentacoordinado (5c). Con el cambio a 5cHS se presenta un potencial de reducción más positivo aumentando en 80-130 mV, favoreciendo la donación de un primer electrón a través de su socio redox citocromo P450 reductasa (CPR) que transfiere los electrones donados por NADPH (Cook *et al.*, 2016; Mak and Denisov, 2018; Li *et al.*, 2020).

La donación del primer electrón permite que el hierro del grupo hemo pase del estado férrico Fe^{3+} al estado ferroso Fe^{2+} . Posteriormente el oxígeno molecular se puede unir covalentemente al hierro para formar un complejo intermedio superóxido férrico. Un segundo electrón es transferido formando una especie transitoria de peróxido férrico dianiónico $(\text{Fe}^{+3} \text{OO})^{2-}$ el cual es rápidamente protonado formando hidroperóxido $(\text{Fe}^{3+}\text{OOH})^-$, una especie muy inestable.

El intermediario hidroperóxido recibe un segundo protón en el átomo de oxígeno distal, de la red de suministro del sitio activo y experimenta una ruptura heterolítica del enlace de oxígeno (O-O) formando agua y un oxiferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) llamado compuesto I. Es un complejo altamente reactivo, la especie oxidante activa que transfiere al sustrato su átomo de oxígeno a través de un mecanismo de “extracción de hidrógeno/ recuperación de oxígeno” creando el producto hidroxilado, que es liberado.

Finalmente el agua se une al sitio activo, devolviendo la enzima a su estado inicial de reposo (Cook *et al.*, 2016; Pearl *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020) (Fig. 1).

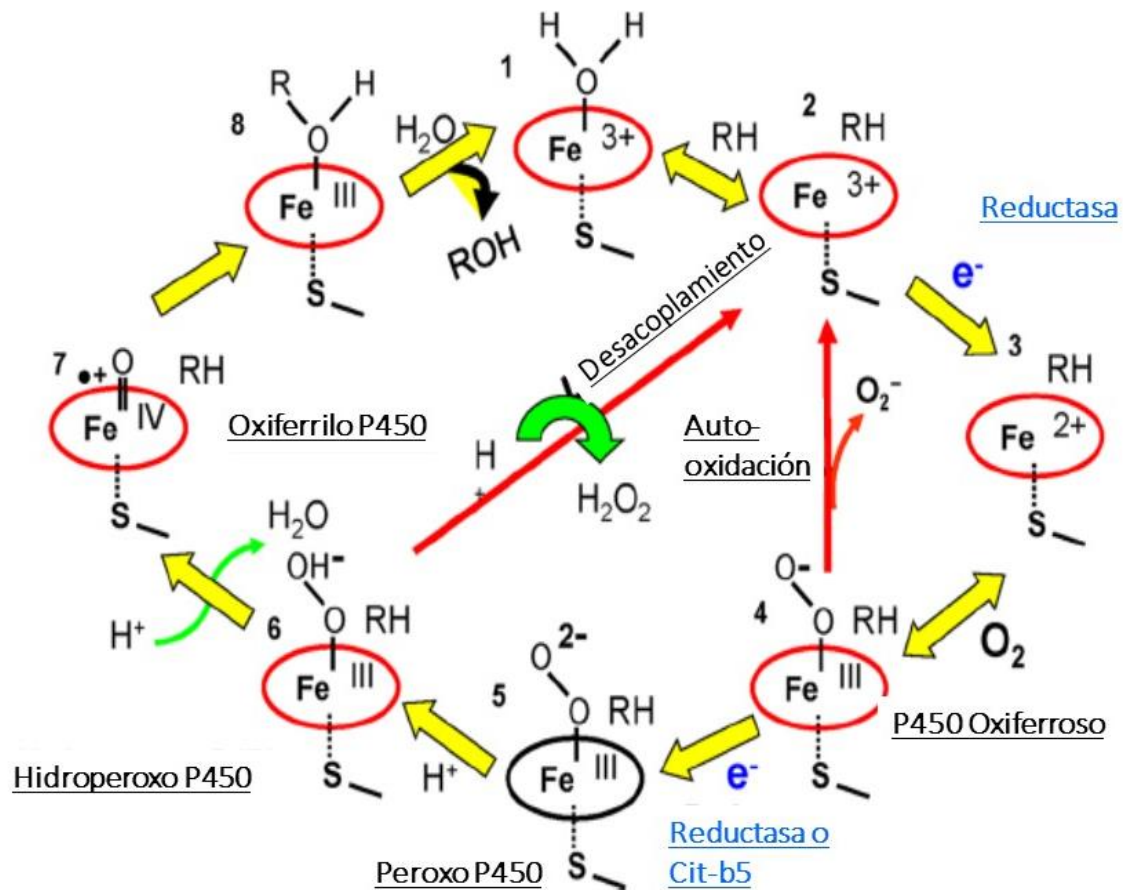


Figura 1. Ciclo catalítico del Citocromo P450. Tomada de (Pearl *et al.* 2016)

Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella Typhimurium* (Prueba de Ames)

El ensayo de Ames es un procedimiento de detección rápida para determinar la presencia de productos químicos puros, mezclas ambientales complejas y productos comerciales que tengan efecto mutagénico y carcinogénico. Para realizar el ensayo se utilizan cinco cepas estándar de *Salmonella typhimurium* mutantes que requieren de histidina, las cuales revierten la mutación después de interactuar con mutágenos convirtiéndose en independientes de histidina (his +) (Williams and Preston, 1983).

Las mutaciones en las cepas estándar de *Salmonella typhimurium* se originaron, a través de sustituciones de bases o por desfaseamiento de la secuencia nucleotídica (frameshift).

Las cepas tienen otras mutaciones diferentes a la de histidina que incrementan su capacidad para detectar mutágenos. Las cepas TA98 y TA1535 tienen la mutación (*rfa*) que tiene como consecuencia una pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que recubre la superficie de las bacterias y aumenta la permeabilidad a moléculas de elevado peso. Otra mutación (*uvrB*), es una delección de un gen que codifica el sistema de reparación por escisión de DNA, que las hace más sensibles en la detección de mutágenos. Como consecuencia de la eliminación del gen *uvrB* que se extiende a través del gen *bio*, también requieren biotina. La cepa TA98 contiene un plásmido o factor R, que le permite ser revertida por mutágenos que se detectan débilmente sin el factor (Maron and Ames, 1983).

Algunos mutágenos son directamente activos en el sistema mientras que otros requieren de activación mediante enzimas de mamíferos añadidas al sistema de prueba. Los CYP son utilizados como sistema enzimático de activación metabólica, realizan el metabolismo de fármacos inactivos que son metabolizados hasta activarse, denominados profármacos (Goodman *et al.*, 2019). El fármaco antitumoral ciclofosfamida es bioactivado por CYP2B y CYP2C19 para formar 4-hidroxi-ciclofosfamida, que está en equilibrio con su tautómero aldofosfamida, esta es oxidada por la aldehído deshidrogenasa a la forma inactiva carboxiciclofosfamida, pero cierta cantidad se escinde a dos metabolitos tóxicos: mostaza fosforamida, una sustancia alquilante citotóxica, utilizada de forma terapéutica y la acroleína (Audemard-Verger *et al.*, 2016).

La técnica de Ames permite observar el funcionamiento del sistema enzimático de activación metabólica (CYP) en *Salmonella thyphimurium*, bajo diferentes concentraciones de oxígeno, ya que el cambio en la producción de metabolitos mutagénicos se ve reflejado en el número de colonias mutantes que resulten.

Entre los hidrocarburos poliaromáticos (PHAs) se encuentra el 2-aminoantraceno (2-AA) que es un hidrocarburo aromático policíclico sustituido con nitrógeno. Se forma a través de procesos naturales y artificiales. Se libera como vapor durante la producción de plásticos, tintes, drogas, caucho, tintas, productos químicos agrícolas y combustibles sintéticos. Es un carcinógeno de acción indirecta y provoca mutación en células eucariotas y procariotas.

El 2-AA es transformado por CYP y N-acetiltransferasas (NAT) en el hígado. Es primero oxidado por los CYP generando un derivado N-hidroxilamina que es más reactivo. Posteriormente es metabolizado por NAT para generar productos intermedios altamente reactivos de N-

hidroxilamina O-sustituidos. Estos productos reactivos electrófilos tóxicos generan aductos covalentes con el DNA y lesiones oxidantes (Subastri *et al.*, 2017).

Planteamiento del problema

La hipoxia es un estado que tiene un gran impacto fisiológico. Los ajustes circulatorios a la hipoxia incluyen la dilatación de los vasos coronarios y cerebrales y la vasoconstricción en el músculo esquelético, que inducen la redistribución del flujo sanguíneo a los sistemas metabólicamente más activos. Sin embargo, estos ajustes no evitan la disminución del oxígeno arterial (O_2) y, por lo tanto, la difusión de O_2 desde la sangre hacia los tejidos se reduce (Li *et al.*, 2014). Estos cambios podrían afectar muchos aspectos de la farmacocinética en los seres humanos. En estudios realizados *in vivo* en ratas y conejos en condiciones de hipoxia, se han encontrado cambios significativos en la actividad enzimática de CYP, así como la expresión de proteína y RNAm. Estos cambios se han atribuido a la inflamación generada durante la hipoxia. Sin embargo, dada la importancia del O_2 en la catálisis de los CYP, su concentración podría estar relacionada en la regulación de su actividad.

El metabolismo de xenobióticos realizado por los CYP es dependiente de oxígeno molecular (O_2), entre otros intermediarios (Fig. 1) (Cook *et al.*, 2016). Al igual que otras enzimas que cumplen con una función vital crítica, los cambios en su ciclo catalítico y por lo tanto en el producto resultante, podrían desencadenar patologías (Nebert *et al.*, 2013).

El efecto que se observe en los CYP en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno *in vitro* puede servir para futuros estudios que ayuden a esclarecer cómo puede afectar el metabolismo de fármacos en personas con hipoxia ocasionada por enfermedad o porque se encuentren viviendo a gran altitud (Li *et al.*, 2015).

Hipótesis

Los parámetros cinéticos enzimáticos de los CYP implicados en el metabolismo de xenobióticos serán diferentes en condiciones hipóxicas en comparación con condiciones normóxicas.

Objetivo

- Evaluar la actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2B2 a diferentes concentraciones de oxígeno en un modelo *in vitro*.

Objetivos particulares

- Determinar cuantitativamente las distintas concentraciones de oxígeno disuelto (O.D.) en el medio de reacción.
- Estandarizar las soluciones con distintas concentraciones de O.D.
- Estandarizar la técnica para la determinación de producción de resorufinas por CYP1A1 y CYP2B2 a diferentes concentraciones de O.D.
- Determinación de K_m y V_{max} de CYP1A1 y CYP2B2 en distintas concentraciones de O.D.
- Evaluar la mutagenicidad de 2-aminoantraceno y ciclofosfamida en presencia de concentraciones diferentes de oxígeno mediante la prueba de Ames.

Antecedentes

Concentración de oxígeno ambiental y su efecto sobre los CYP *in vivo*

En estudios realizados *in vivo*, se ha encontrado que la altitud puede jugar un papel importante en el metabolismo de diferentes fármacos.

Se observó disminución en la expresión de CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5 y 2C16 e incremento de CYP3A6, en un estudio realizado en conejos colocados dentro de una cámara de Plexiglás con 8 % de fracción inspirada de oxígeno, durante 48 horas (Fradette *et al.*, 2007).

En un estudio realizado con ratas Sprague Dawley situadas a diferentes altitudes 400 m (Altitud baja), 2800 m (Altitud media) y 4300 m (Altitud máxima) en condiciones de hipoxia, y observaron cambios significativos en la actividad enzimática, expresión protéica y de mRNA de CYP1A2, CYP2D6 y NAT2 (Li *et al.*, 2014).

En otro estudio realizado *in vivo* con ratas Sprague Dawley situadas en diferentes altitudes 400m (Altitud baja), 2,800 m (Altitud media) y 4,300 m (Altitud máxima), durante 30 días previos a la administración de clorhidrato de lidocaína, se encontró disminución de la actividad enzimática, expresión de proteína y de RNAm de CYP3A4 en ambos grupos (Altitud baja y Altitud media) respecto al control (Zhang *et al.*, 2016).

Adicionalmente, en un estudio realizado para conocer los efectos interactivos de la hipoxia y la exposición a xenobióticos en peces *Micropogonias undulatus* que permanecieron bajo

condiciones de hipoxia (1.7 mg de oxígeno disuelto por litro) en tanques de 2025 litros. Se observó que la expresión y actividad de CYP1A en los peces se regulan a la alza por la exposición a bifenilos policlorados (PCB) con dosis de 2 y 8 mg/g de peso corporal, mientras que la exposición a hipoxia tuvo como efecto disminución de la expresión de RNAm, proteína y actividad enzimática de CYP1A1 (Rahman and Thomas, 2018).

Estrategia experimental

Sustancias Químicas

La β -naftoflavona (β -NF) (# cat. N3633), la etoxirresorufina (# cat. E3763), la benciloxirresorufina (# cat. B1532), 2-AA (# cat. A1381) y ciclofosfamida (# cat. C0768) fueron adquiridos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis MO, USA)

Obtención de la fracción microsomal

A partir de la fracción post- mitocondrial S9 proveniente del homogenizado de hígados de ratas macho Wistar tratadas con fenobarbital (FB) y β - naftoflavona (β -NF) para inducir la producción de CYP, se centrifugó a 10, 000 g durante 60 minutos a 4 °C. El botón resultante se homogenizó con solución de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y sacarosa 0.25 M, y se centrifugó a 100 000 g por 60 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el botón resultante se resuspendió en una solución de fosfatos (0.1 M pH 7.4, ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) 1 mM, ditiotreitól 0.1 mM y glicerol 20% v/v). Finalmente la fracción microsomal obtenida se homogenizó y se almacenó en alícuotas (Burke *et al.*, 1994). Se determinó la proteína total mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Desplazamiento de oxígeno

Se midió el oxígeno disuelto en el medio de reacción (amortiguador) en condiciones ambientales mediante un oxímetro (Hanna Instruments, HI 9143, España), posteriormente se colocó el amortiguador en tubos de vacío (Bellco Glass, Inc., #2048-11800A) y se desplazó el oxígeno mediante vacío para obtener una concentración de O.D. de 50% (4.10 ppm) o 60% (4.92 ppm). Se introdujeron los tubos en una cámara de anaerobiosis (Plas-Labs, Inc., #855-ACB, Lansing, M.I. USA) y nuevamente se llevó a cabo la medición de O.D. en el amortiguador mediante un oxímetro (Hanna Instruments, HI 9143, España).

Determinación de la actividad enzimática

Se llevó a cabo mediante la desalquilación oxidante, capacidad O-desalquilasa que poseen los CYP. Se utilizaron los sustratos: etoxirresorufina (etoxirresorufina O-desetilasa, ensayo de actividad EROD) para CYP1A1 y benciloxirresorufina (benciloxirresorufina O-desalquilasa, ensayo de actividad BROD) para CYP2B2, que son metabolizados por las enzimas CYP dando como producto común la resorufina que es cuantificada mediante fluorescencia.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo a las concentraciones: ambiental promedio 79% (6.47 ppm), 60% (4.92 ppm) y 50% (4.10 ppm) de oxígeno, utilizando una mezcla de 5% de CO₂, 10% de hidrógeno y 85% de nitrógeno, dentro de una cámara de anaerobiosis (Plas-Labs, Inc., #855-ACB, Lansing, M.I. USA). La concentración de oxígeno dentro de la cámara de anaerobiosis fue medida mediante un oxímetro (Hanna Instruments, HI 9143, España).

Ensayo de cinética enzimática CYP1A1 y CYP2B2

Previo a medir la actividad enzimática se realizó una curva patrón de resorufina a concentraciones 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmol disuelta en amortiguador Tris-Base 50 mM y MgCl₂ 25 mM pH 7.6 en un volumen final de 1mL.

Para la mezcla de reacción se utilizó 20 µL de sustrato EROD (1, 2, 4, 6.5, 10, 20 y 22 nM disuelto en DMSO) para CYP1A1 y 20 µL de sustrato BROD (1, 2, 6.5, 10, 15 y 17 nM disuelto en DMSO), se usó la fracción microsomal hepática a 50 µg de proteína por mL. El amortiguador con el que se ajustó la reacción (Tris-Base 50 mM y MgCl₂ 25 mM pH 7.6) a un volumen final de 1mL previamente se sometió a vacío para desplazar el oxígeno a 60% (4.92 ppm) y 50% (4.10 ppm) de O.D, la concentración de O.D. fue medida mediante un oxímetro (HI 9143, Hanna Instruments). Finalmente se activó la reacción con 10 µL de NADPH a una concentración final 0.5 mM (disuelto en amortiguador Tris-Base 50 mM y MgCl₂ 25 mM pH 7.6).

Las muestras y blancos se analizaron mediante un fluorómetro. Se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, en intervalos de 15 s, durante 7.5 min.

Para la determinación de actividad enzimática, cada punto de concentración de sustrato se realizó por triplicado, promediando el resultado de tres experimentos independientes para cada concentración de oxígeno. Y los resultados se expresan en pmol de resorufina formada por minuto por miligramo de proteína (pmol resorufina /min*mg proteína).

Se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m .

Ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Donde V es la velocidad inicial de la reacción y $[S]$ es la concentración del sustrato

Ensayo de mutagenicidad

Se utilizaron las cepas TA98 y TA1535 de *Salmonella typhimurium* para el ensayo de Ames, las cuales fueron donadas por el Dr. Bruce Ames de la Universidad de California, Berkeley, California, USA.

Verificación de marcadores genéticos y determinación de la frecuencia de reversión espontánea

A partir de cultivos de reserva congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se sembraron las cepas de prueba TA98 y TA1535, en medio Nutrient Broth No. 2 (OXOID, # cat. 66067, Hampshire, England) para la cepa TA98 además se usaron $25\text{ }\mu\text{l}$ (10 mg/ml) de ampicilina, posteriormente se incubaron 16 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación de 150 rpm.

- a) Requerimiento de histidina. Se sembró por medio de estrías el cultivo de 16 horas sobre cajas de Petri que contenían medio mínimo de Vogel Bonner. Lo mismo sobre cajas con medio mínimo complementado con histidina- biotina
- b) Sensibilidad al Cristal Violeta. Para verificar el marcador “rfa” (modificación de la pared celular), se determinó la sensibilidad de las cepas al cristal violeta. Se dividió una caja de Petri con una línea de cristal violeta (1 mg/ml), se sembraron transversalmente 5 colonias seleccionadas, se incubaron 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una zona clara de inhibición de crecimiento alrededor de la línea de cristal violeta indica la presencia de la mutación.
- c) Presencia del plásmido. Se verificó comprobando la resistencia de las cepas a la ampicilina. Se sembraron 5 colonias seleccionadas por medio de estrías en dos cajas Petri con medio NB, una de ellas suplementada con ampicilina ($25\text{ }\mu\text{g/mL}$).

Las cepas que contienen el plásmido no deben mostrar inhibición del crecimiento.

- d) Sensibilidad a la Luz U. V. En una caja de Petri con medio mínimo e histidina, se sembraron las 5 cepas seleccionadas por medio de estrías. Se tapo la mitad de la caja con papel aluminio y posteriormente se irradio con una lámpara germicida de luz U.V. de 15 W a una distancia de 33-35 cm por 6 segundos para las cepas que no contienen plásmido y 8 segundos para la que sí lo tienen. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Ensayo de Ames

Se realizó el cultivo de las cepas TA1535 o TA98 en 10 mL de medio Nutrient Broth No. 2 (OXOID, # cat. 66067, Hampshire, England) líquido y para TA98 se añadió ampicilina (25 µg/mL), se dejó en agitación durante 16 horas, a 37 °C y 150 rpm.

En tubos de 2 mL se realizó la mezcla de reacción colocando por triplicado todos los tratamientos.

Primero se colocó la reversión espontánea, que llevó 100 µL de cultivo y 900 µL de amortiguador Tris base – MgCl₂. Posteriormente se colocaron dos mezclas como control sin mutágeno; se añadieron 100 µL de cultivo, se usó 20 µL de fracción microsomal 0.4 mg como sistema de activación metabólica, 780 µL de amortiguador Tris base – MgCl₂, NADPH a una concentración final de 0.5 mM y sólo una mezcla llevó DMSO. Como control con mutágeno se colocaron 100 µL de cultivo, 2AA (1000 ng) 10 µL y 890 µL de amortiguador Tris base – MgCl₂. La curva probada de 2AA fue de 125, 250, 500, 750 y 1000 ng y para Ciclofosfamida la curva usada fue 100, 250, 500, 750 y 1000 µg, 100 µL de cultivo, 20 µL de fracción microsomal 0.4 mg, 770 µL de amortiguador Tris base – MgCl₂ y NADPH a una concentración final 0.5 mM llevando la mezcla a 1 mL. Como control, se colocó nuevamente la reversión espontánea al finalizar.

El ensayo de mutagenicidad se realizó dentro de una cámara de anaerobiosis (Plas-Labs, Inc., #855-ACB, Lansing, M.I. USA) a una concentración de 50% (4.10 ppm) de O.D. en el amortiguador Tris base (50 mM) – MgCl₂ (25 mM) y fuera de la cámara a concentración ambiente de O.D. en el amortiguador Tris base (50 mM) – MgCl₂ (25 mM).

Ensayo de determinación de CYP totales

Se utilizó el método espectrofotométrico de Omura y Sato., 1964 con modificaciones. Se diluyeron microsomas de hígado de rata en amortiguador de fosfato pH 7.4 (fosfato de potasio 0.1 M; EDTA 1mM; 20% v/v de glicerol; 0.4% v/v de tritón x-100) a una concentración final de 1

mg/ml en un volumen total de 2 ml. Se redujo la solución con ditionita de sodio y se burbujeó con monóxido de carbono durante 30 segundos. Se midió la solución a una longitud de onda de 400 a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU730, se usó como blanco la solución sin burbujear monóxido de carbono. Los CYP totales se midieron en diluciones de microsomas hepáticos en condiciones normales de O.D. en el laboratorio y expuestos 1 hora a 50% (4.10 ppm) de O.D.

Western Blot

Se utilizó el método de Bradford para calcular la cantidad de proteína total en las muestras de microsomas hepáticos (Bradford, 1976).

Se usaron 10 µg de proteína total, en condiciones normales de laboratorio (6.47 ppm O₂) en nuestro laboratorio localizado en la Ciudad de México, a una altitud de 2200 m sobre el nivel del mar. Después de una hora de exposición a 50% (4.10 ppm) de O.D., se separaron mediante SDS-PAGE (11%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.45 mm. Se bloquearon las membranas durante 2 horas con albúmina al 5% en TBS-Tween 0.3% a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las membranas con su anticuerpo primario anti-rata (anti-CYP1A1 1:1000; anti-CYP2B2 1:1000; anti-GAPDH 1:1000) durante una noche a 4 °C en agitación y después se enjuagaron tres veces con TBS-Tween 0.3%. El anticuerpo secundario correspondiente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (1:5000). Las membranas fueron lavadas dos veces con TBS-Tween 0.3% y una vez con TBS 1X. La reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo con el reactivo ECL y se obtuvieron las imágenes mediante un fotodocumentador Kodak GEL Logic 1500. La cuantificación relativa de proteína se realizó mediante la determinación de la intensidad de las bandas detectadas mediante el software Image J.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de proteína para CYP1A1 se compararon usando one-way ANOVA. La prueba de Tukey se usó para comparaciones múltiples, mediante GraphPad Prism versión 5.01 para Windows GraphPad Software, San Diego California USA.

Se realizó una regresión no lineal ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten para estimar los parámetros cinéticos; se evaluaron de forma individual tres experimentos independientes para cada concentración de oxígeno. Los parámetros estimados para diferentes concentraciones de oxígeno se compararon usando ANOVA; mediante la prueba de Levene se verificó la homogeneidad de la varianza. La prueba de Tukey se usó para comparaciones múltiples; $p < 0.1$ se considera estadísticamente significativo. Se obtuvieron los resultados promedio y los intervalos de confianza analizando los tres experimentos, para cada concentración de oxígeno, agrupados.

Los datos obtenidos mediante Ames se analizaron utilizando modelos de regresión lineal con variables cualitativas (usando variables indicadoras) y después probando porciones del modelo para verificar si las pendientes y/o las intersecciones son diferentes. Los cálculos se realizaron utilizando el resultado de dos experimentos independientes.

El contenido total de CYP en microsomas de hígado de rata en condiciones ambientales e hipóxicas de tres experimentos independientes se comparó mediante la prueba de t; la homogeneidad de la varianza se probó utilizando la prueba F. Para los análisis estadísticos de Cinética, Ames y cuantificación de contenido total de CYP se utilizó el Sistema SAS para Windows 9.0.

Resultados

Determinación de las concentraciones de O.D.

Con el fin de trabajar con disminución de O.D. en las pruebas realizadas, se estandarizaron diferentes concentraciones de O.D. en amortiguador Tris base – $MgCl_2$ desplazado por vacío; 40% (3.3 ppm), 50% (4.10 ppm) y 60% (4.92 ppm), medido en nuestro laboratorio localizado en la Ciudad de México a una altitud de 2200 m.s.n.m.

A una concentración inicial de 50% de O.D. se midió el tiempo de recuperación de O.D. hasta alcanzar la concentración ambiental de 70%, el cual fue de 90 minutos (Fig. 2).

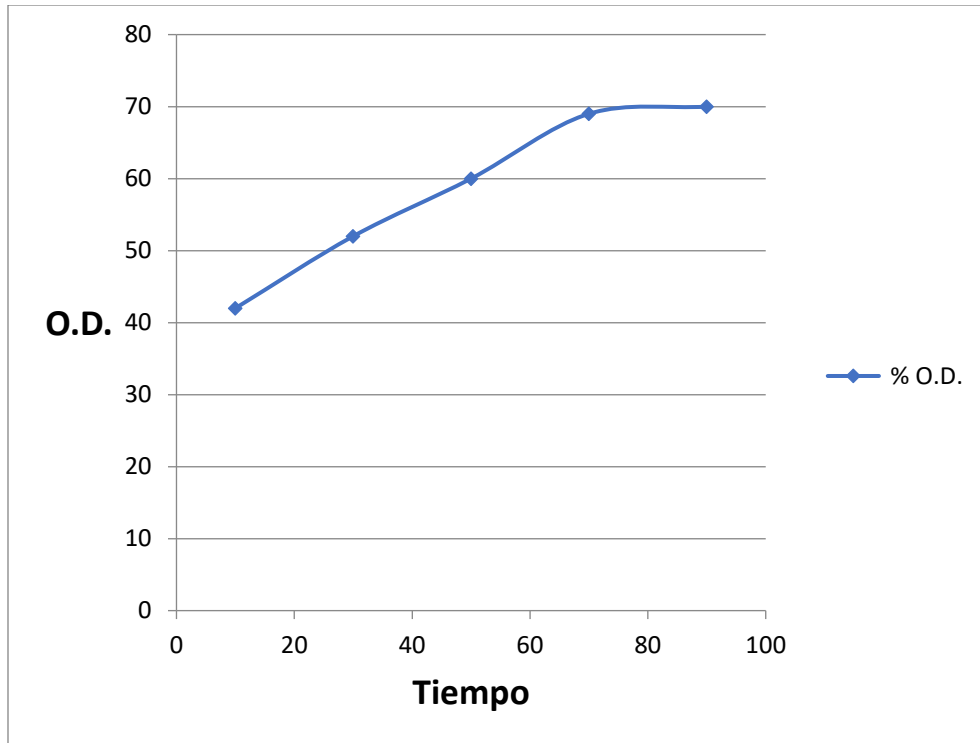


Figura 2. Tiempo en el que la concentración de O.D. 50% desplazado por vacío se iguala a la concentración de O.D. ambiental n=1

Actividad enzimática

Se cuantificó la actividad enzimática de CYP1A1 a concentraciones crecientes (50, 100, 200, 300 y 400 μg) de proteína hepática microsomal, a una concentración de sustrato etoxirresorufina 0.25mM. En la cual se observa que la actividad óptima se encuentra entre 50 y 200 μg . Se utilizó la concentración de 50 μg para trabajar (Fig. 3).

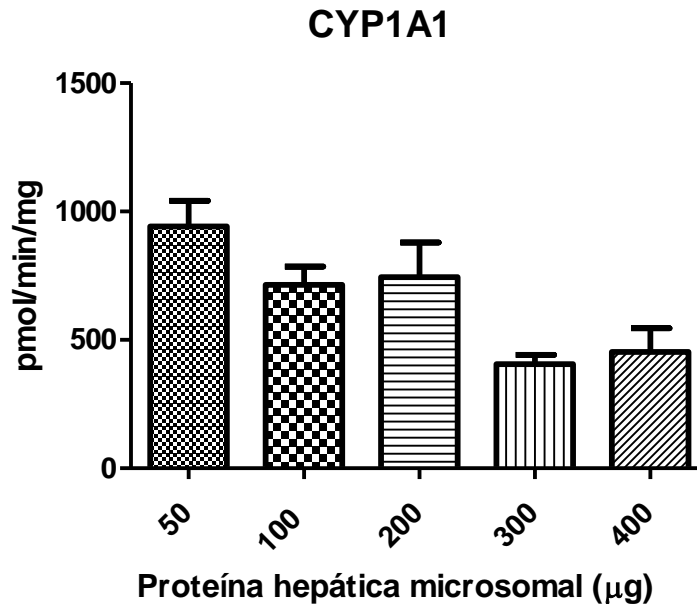


Figura 3. Actividad enzimática de CYP1A1 a diferentes concentraciones de proteína total hepática microsomal (50, 100, 200, 300 y 400 µg) a la concentración de sustrato etoxirresorufina (EROD) 0.25mM. Se emplearon microsomas hepáticos de ratas tratadas con FB y β-NF , fármacos que inducen la expresión de CYP (Chen *et al.*, 2010; Lněničková *et al.*, 2018).

Determinación de la actividad enzimática de CYP1A y CYP2B en condiciones de hipoxia

En un experimento preliminar realizado con 40% (3.3 ppm) O.D. en el medio de reacción, se observó disminución de la actividad enzimática de CYP1A1 (92.3 %), CYP1A2 (100%), CYP2B1 (99.1%), y CYP2B2 (100%) con respecto a la concentración ambiental (79%) (Fig. 4).

Se observó una respuesta diferencial en la actividad enzimática de las subfamilias de CYP1A1 y CYP2B en condiciones de hipoxia. Considerando los resultados anteriores se seleccionaron las isoformas CYP1A1 y CYP2B2 para trabajar con diferentes concentraciones de O.D. 79% (6.47 ppm) 60% (4.92 ppm) y 50% (4.10 ppm).

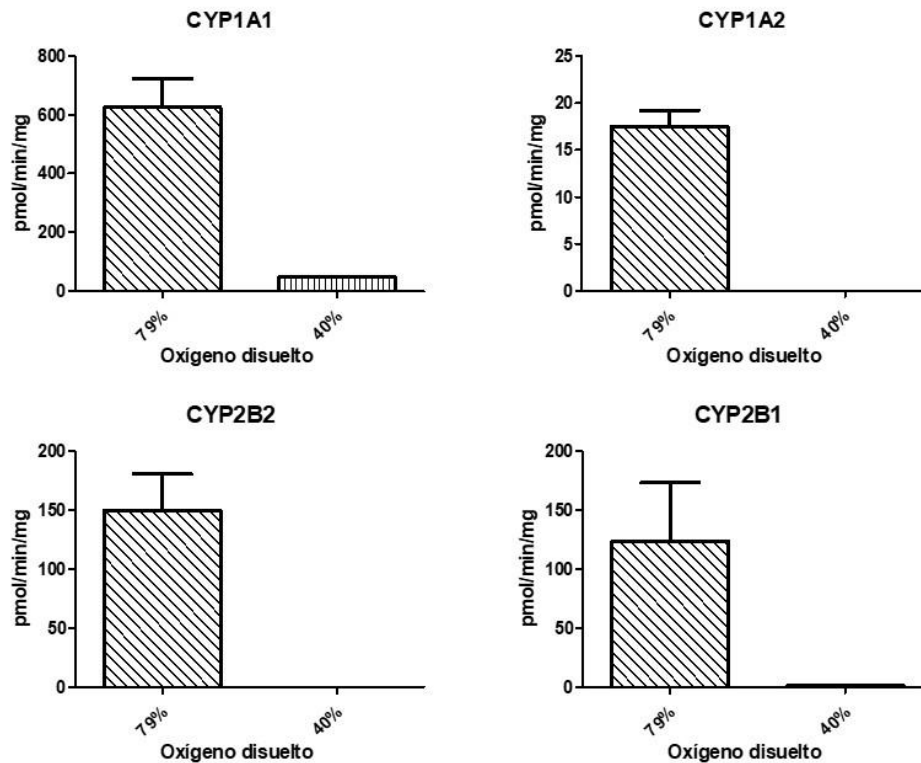


Figura 4. Efecto de la concentración de oxígeno en el medio de 40% (3.3 ppm) sobre la actividad enzimática de CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1 y CYP2B2 respecto a la concentración ambiental 79% (6.5 ppm). Cada barra representa la media \pm D.E. obtenida de dos experimentos independientes.

Efecto de la disminución de O.D. sobre la actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2B2

Se observan las curvas cinéticas de CYP1A1 (Fig. 5) obtenidas por ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal en un experimento preliminar. La tendencia observada es disminución de la actividad enzimática a las concentraciones 60% (4.92 ppm) y 40% (3.27 ppm) de O.D respecto de la concentración ambiental 79% (6.47 ppm) O.D.

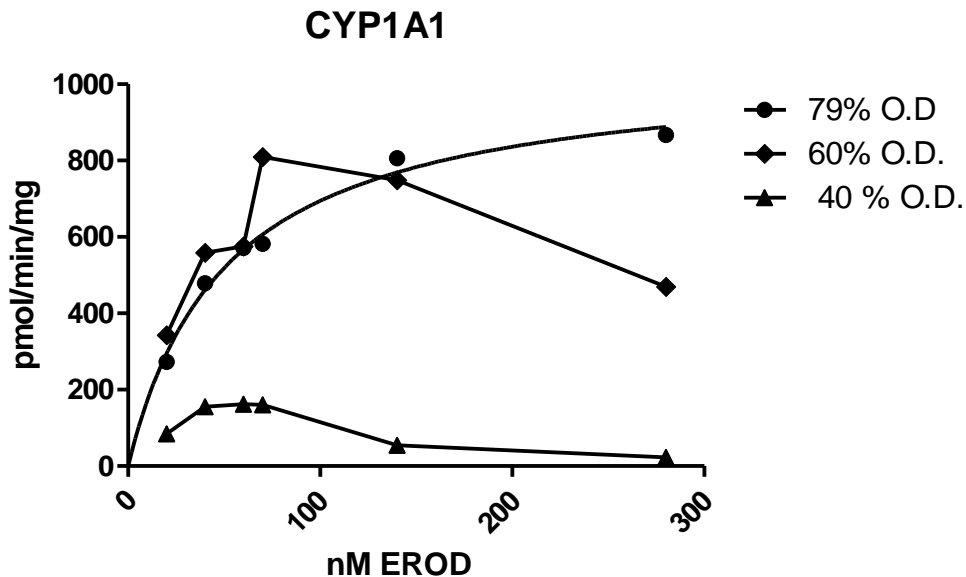


Figura 5. Efecto de la concentración de O. D. (79%, 60% y 40 %) sobre la actividad enzimática de CYP1A1 en microsomas de hígados de rata inducidos con FB y β -NF, a las concentraciones de sustrato etoxirresorufina (EROD) 20, 40, 60, 70, 140, y 280 nM.

Se observa el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal, de la velocidad inicial de CYP1A1 a diferentes concentraciones de etoxirresorufina (1, 2, 4, 6.5, 10 y 22 nM) y CYP2B2 a diferentes concentraciones de benciloxirresorufina (1, 2, 6.5, 10, 15 y 17 nM) con diferentes concentraciones de O.D. 79% (6.47 ppm), 60% (4.92 ppm) y 50% (4.1 ppm) (Fig. 6). Se obtuvieron los parámetros de cinética enzimática, la constante de Michaelis-Menten (K_m) y Velocidad máxima de la reacción (V_{max}) (Tabla 2). No se encontraron diferencias significativas en la K_m de CYP1A1 y CYP2B2 a 60% (4.92 ppm) y 50% (4.1 ppm) O.D. Por otra parte, la V_{max} disminuyó de manera significativa en CYP1A1 y CYP2B2 de 1695.3 (79% O.D.) a 990 (50% O.D.) y de 1702.5 (79% O.D.) a 845.6 (50% O.D.) respectivamente.

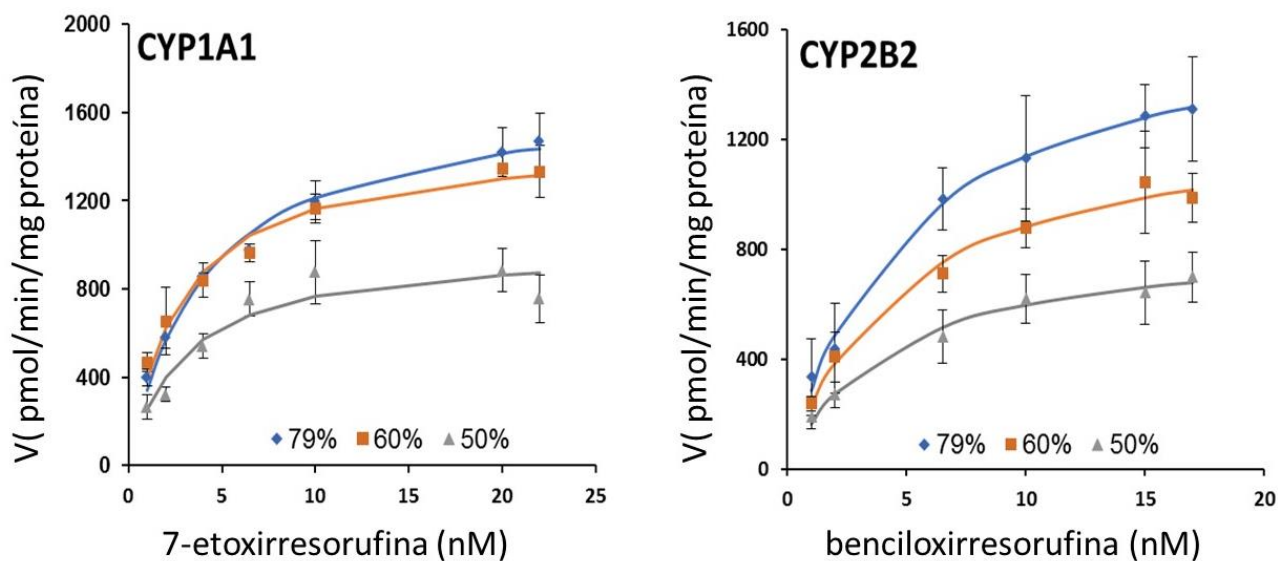


Figura 6. Efecto de la concentración de O. D., 50% (4.1 ppm), 60% (4.92 ppm) y ambiental 79% (6.47 ppm), sobre la actividad enzimática en microsomas de hígado de rata. Gráfico muestra velocidad (V) contra concentración de sustrato. Cada punto representa la media \pm D.E. obtenida de tres experimentos independientes. Las líneas continuas representan las curvas ajustadas A) CYP1A1, sustrato EROD (1-22 nM), B) CYP2B2, sustrato BROD (1-17 nM).

Tabla 2. Parámetros cinéticos enzimáticos (K_m , V_{max}) de actividad etoxiresorufina O-desetilasa CYP1A1 y benciloxiresorufina O-desalquilasa CYP2B2 a diferentes concentraciones de O.D.

	Oxígeno	V_{max}^1	K_m^2
CYP1A1	6.50 ppm (79%)	1695.3 (1579.0, 1811.7) ^a	3.98 (3.11, 4.84) ^a
	4.92 ppm (60%)	1479.7 (1371.1, 1588.3) ^a	2.73 (1.99, 3.45) ^a
	4.10 ppm (50%)	990.4 (850.5, 1130.3) ^b	2.93 (1.47, 4.40) ^a
CYP2B2	6.50 ppm (79%)	1702.5 (1378.0, 2027.1) ^a	4.97 (2.19, 7.76) ^a
	4.92 ppm (60%)	1299.1 (1100.8, 1497.3) ^{ab}	4.74 (2.57, 6.91) ^a
	4.10 ppm (50%)	845.6 (691.3, 999.8) ^b	4.18 (1.77, 6.60) ^a

Valores promedio para los parámetros cinéticos enzimáticos, en paréntesis se reporta en intervalos de confianza del 95%. Los valores promedio marcados con letras diferentes, son significativamente diferentes ($P < 0.1$).

¹ pmol resorufina/ minuto/ mg proteína

² nM

Evaluación de mutagenicidad de 2-AA y ciclofosfamida a diferentes concentraciones de O.D.

El hidrocarburo aromático policíclico 2-AA así como el fármaco ciclofosfamida son bioactivados por CYP1A y CYP2B respectivamente. La técnica de Ames permite observar el funcionamiento del sistema enzimático de activación metabólica (CYP) en *Salmonella thyphimurium* bajo diferentes concentraciones de oxígeno, ya que el cambio en la producción de metabolitos mutagénicos se ve reflejado en el número de colonias.

Se probó la mutagenicidad de 2-AA y ciclofosfamida mediante la prueba de Ames en condiciones normales (79% O.D.) e hipóxicas (50% O.D.) ver (Fig. 7 y 8). Las diferencias significativas en las intersecciones ($P < 0.0001$) para ambos CYP indican disminución de la potencia mutagénica en condiciones de hipoxia, la disminución fue de 32% para 2-AA y de 42% para la ciclofosfamida respecto a las condiciones normales de laboratorio.

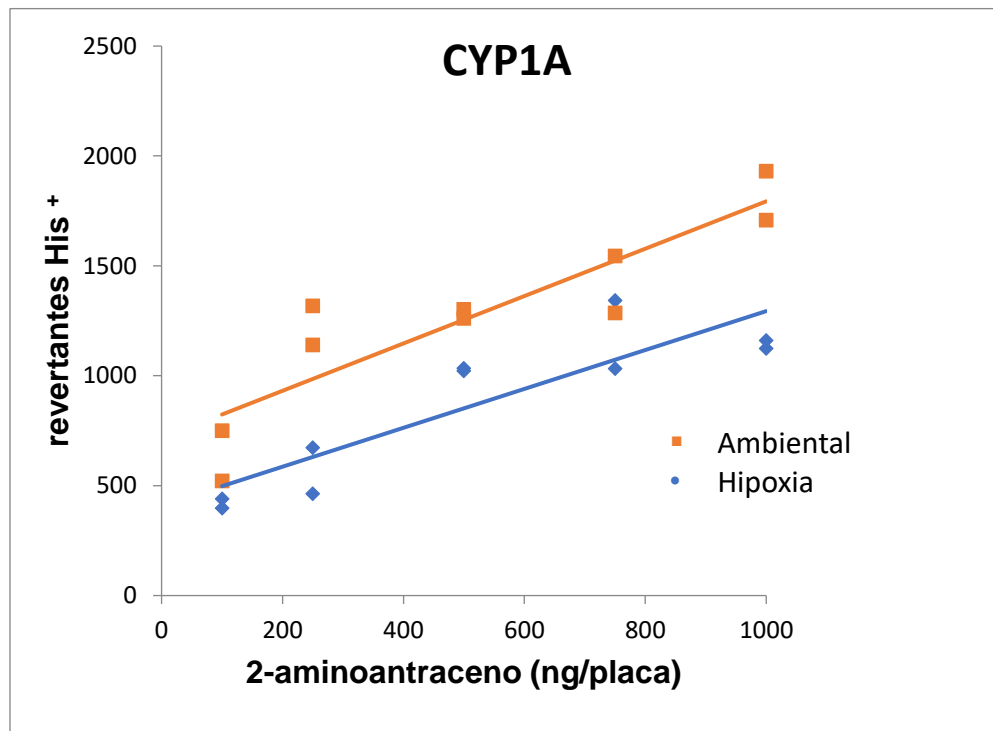


Figura 7. Efecto de la disminución de oxígeno sobre la actividad mutagénica de 2-AA, probado a condiciones ambientales (79% O.D.) y condiciones de hipoxia (50% O.D.). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (marcadores) junto con las líneas de regresión obtenidas (líneas continuas). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes, pero las intersecciones fueron significativamente diferentes ($P < 0.0001$). $R = 0.915$

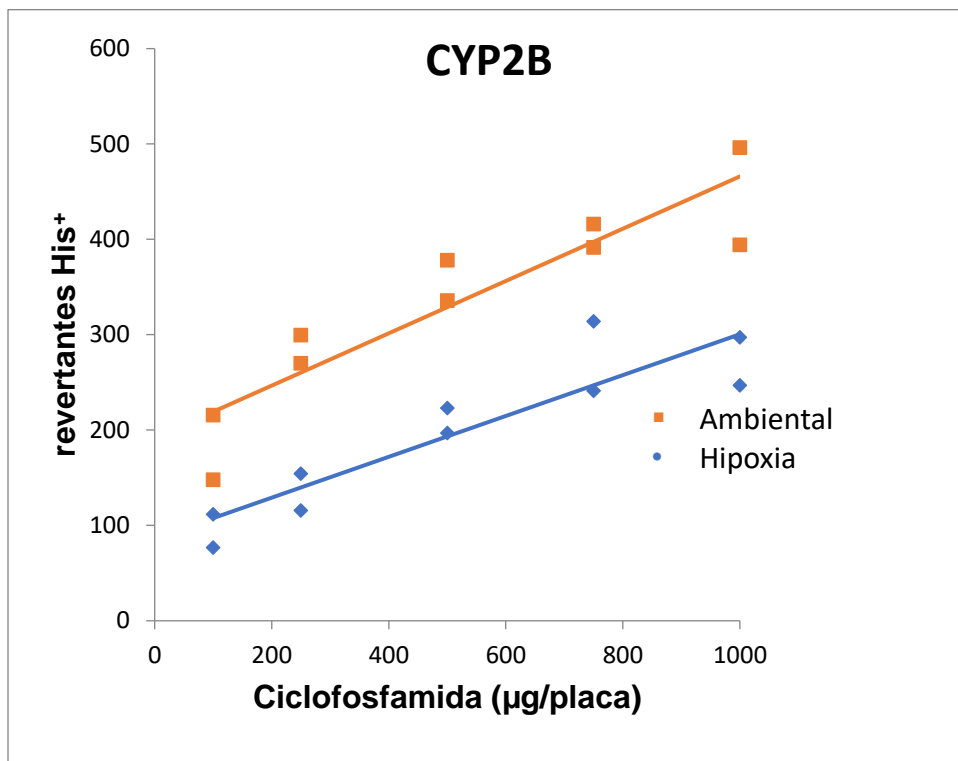


Figura 8. Efecto de la disminución de oxígeno sobre la actividad mutagénica de ciclofosfamida, probado a condiciones ambientales (79% O.D.) y condiciones de hipoxia (50% O.D.). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (marcadores) junto con las líneas de regresión obtenidas (líneas continuas). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes, pero las intersecciones fueron significativamente diferentes ($P < 0.0001$). $R = 0.942$

Para descartar la degradación de los CYP bajo condiciones de hipoxia, se llevó a cabo la determinación del contenido total de CYP por el método de Omura y Sato (1964) Tabla 3. Los niveles de proteína de CYP1A1 y CYP2B2 fueron determinados mediante Western Blot en microsomas de hígado después de una hora de exposición a condiciones de hipoxia. La cuantificación relativa de los niveles de proteína de CYP1A1 fue llevada a cabo mediante la determinación de la intensidad de las bandas utilizando el software Image J (Fig. 9 A y B).

Tabla 3. Cuantificación de CYP totales

Oxígeno	Contenido total CYP (M)
6.50 ppm (79%)	1.02 (0.90, 1.13) ^a
4.10 ppm (50%)	0.98 (0.95, 1.02) ^a

Valores promedio del contenido de CYP mediante el método de Omura y Sato (1969). En paréntesis, se reportan intervalos de confianza del 95%. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes. Los valores promedio marcados con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.1$).

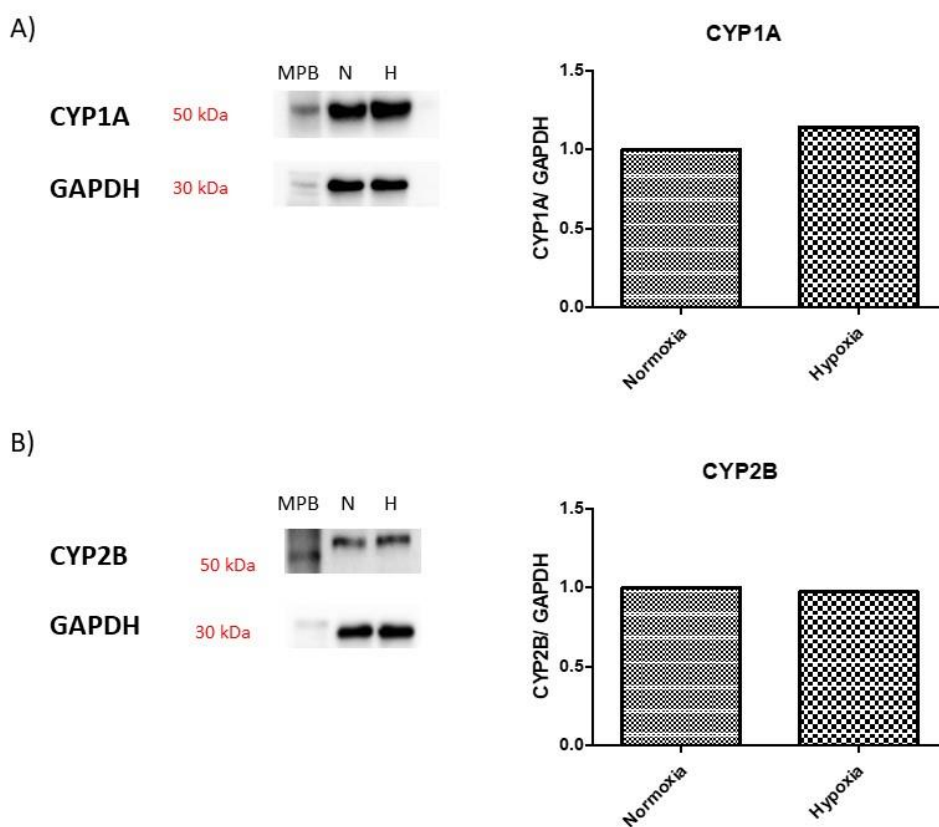


Figura 9.A) Determinación de niveles de proteína para CYP1A1 y CYP2B2 en microsomas de hígado de rata mediante Western Blot. N=Normoxia (79% O.D.), H= Hipoxia (50% O.D.) MPB= Marcador de peso de proteína biotinilada (Biotinylated protein Ladder, Cell Signaling). B) Cuantificación relativa de los niveles de proteína de CYP1A1. Se muestra el resultado de un experimento. Los niveles de proteína de CYP1A1 fueron normalizados respecto a los niveles de proteína de GAPDH.

Discusión

Los CYP tienen un ciclo catalítico complejo compuesto por diferentes pasos secuenciados que involucran la participación de intermediarios entre los cuales se encuentra el oxígeno molecular (O_2), que es un componente esencial para llevar a cabo la reacción monooxigenasa (Fig. 1) (Dubey *et al.*, 2019; Cook *et al.* 2016). En este trabajo se plantea la hipótesis de que la concentración de oxígeno molecular puede influir en la actividad catalítica de los CYP. Existen trabajos previos reportados que respaldan esta suposición.

Li *et al.*, 2014, reportó disminución de la actividad enzimática, expresión de proteína y RNAm de CYP1A2 hepático en ratas bajo condiciones limitantes de oxígeno durante 24 horas y 31 días. En otro estudio se encontró disminución de la actividad enzimática y expresión de RNAm de CYP1A1 en microsomas de hígado de peces *micropogonias undulatus* expuestos a hipoxia (1.7 mg O.D./ Litro) durante 4 semanas (Rahman and Thomas, 2018).

En un estudio realizado en un grupo de voluntarios chinos Han y tibetanos viviendo a 2200 o a 4500 msnm, se encontraron cambios en los parámetros farmacocinéticos de clorhidrato de lidocaína (tiempo de vida media plasmática, aclaramiento y volumen de distribución). También encontraron disminución en la actividad enzimática, expresión de proteína y RNAm de CYP3A1 en ratas Sprague-dawley expuestas a distintas altitudes (400, 2800 y 4300 msnm) (Zhang *et al.*, 2016).

Las diferencias que hay en la expresión de los CYP en condiciones de hipoxia han sido atribuidas al proceso inflamatorio que se genera. Sin embargo, la concentración de oxígeno también puede estar relacionada con la regulación de la actividad de los CYP. Los estudios realizados *in vivo* muestran que el oxígeno juega un papel importante en el metabolismo de los fármacos, al regular a nivel transcripcional y posiblemente a nivel post transcripcional.

En el ensayo preliminar realizado a 40% de O.D. se observó que la actividad enzimática de las familias CYP1A y CYP2B disminuyó de 90-100% (Fig. 4), parece ser una concentración limitante para la actividad enzimática; con base en estos resultados se decidió medir los parámetros de cinética enzimática (K_m y V_{max}) a 50% y 60% de O.D., ya que podrían estar regulados por la concentración de oxígeno. Se seleccionaron dos de las isoformas más afectadas para trabajar CYP1A1 y CYP2B2, estas isoformas tienen un papel importante en el metabolismo de xenobióticos y participan en el metabolismo de fármacos. La V_{max} disminuyó

de manera significativa a la concentración de 50% (4.10 ppm), sin embargo, la Km no mostró diferencias significativas lo cual implica que no hay cambios en la afinidad enzima-sustrato, pero si hay disminución de la producción de metabolitos (Fig. 6) (Tabla 2).

Aunque hay poca evidencia *in vitro* reportada, existe un trabajo previo en donde se muestra que la concentración de oxígeno influye en la función de los CYP. Günther *et al.*, (2006) reportaron disminución de la actividad enzimática de una manera dependiente de la concentración de oxígeno en células de adenocarcinoma de colon murino (CT26) transfectadas con un plásmido que codifica CYP2B1, incubadas con pentoxirresorufina en una cámara de anaerobiosis a diferentes concentraciones de oxígeno, desplazado mediante nitrógeno.

Una vez observado el efecto de disminución de actividad enzimática de CYP1A1 y CYP2B en condiciones de hipoxia, se decidió probar con el ensayo de Ames, para saber si este efecto de disminución podría verse reflejado también como efecto biológico en *Salmonella typhimurium*. Se utilizó 2-AA y ciclofosfamida que son metabolizados por CYP1A1 y CYP2B2 respectivamente, para observar posibles diferencias en la respuesta mutagénica en condiciones normóxicas e hipóxicas. La disminución de la mutagenicidad de 2-AA (Fig. 7) y ciclofosfamida (Fig. 8) fue de 32% y 42% respectivamente, en condiciones de hipoxia (50% O.D.) comparado con la concentración ambiental (79%). La disminución de la mutagenicidad podría estar relacionada con el efecto observado en los parámetros de actividad enzimática, la disminución de la Vmax de 42% para CYP1A1 y de 50% para CYP2B2 (Tabla 2). Se ha documentado que el potencial mutagénico obtenido mediante el ensayo de Ames en diferentes laboratorios presenta variaciones debido a diversos factores. La diferencia de concentración de oxígeno, debido a los cambios de altitud, es un factor biológico que podría influir en los resultados obtenidos.

Conclusión

La concentración de oxígeno es un factor crucial en la actividad de los CYP, se demostró que su concentración afecta el parámetro cinético Vmax. Esto puede tener implicaciones en personas que presentan hipoxia por encontrarse viviendo o expuestas a una mayor altitud o desde el punto de vista clínico en pacientes que puedan tener insuficiencia de oxígeno debido a enfermedades como obstrucción bronquial severa, edema pulmonar cardiogénico agudo, insuficiencia cardíaca congestiva entre otras (Souich *et al.*, 2011). También la hipoxia es un

factor que contribuye a la resistencia a la quimioterapia, pues afecta el metabolismo de fármacos activados por los CYP para el tratamiento de tumores sólidos (Günter et al., 2006)

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden servir como antecedente para futuros estudios que proporcionen orientación para el ajuste del uso y la dosificación de diversos fármacos en condiciones de hipoxia.

Perspectivas

Hace falta realizar más experimentos para contribuir a la comprensión del efecto de la concentración de oxígeno sobre la biotransformación de xenobióticos por medio de CYP.

In vitro

- Conocer el efecto en la actividad enzimática de otras isoformas de CYP en condiciones de hipoxia
- Realizar experimentos en cultivos celulares para estudiar el efecto de la concentración de O₂ en los CYP

In vivo

- Realizar experimentos en modelos de roedores para estudiar el efecto de la concentración de O₂ en los CYP involucrados en el metabolismo de medicamentos.

Literatura Citada

Audemard-Verger, A. *et al.* (2016) 'Glutathione S transferases polymorphisms are independent prognostic factors in lupus nephritis treated with cyclophosphamide', *PLoS ONE*, 11(3), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0151696.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brunton, L., Chabner, B. and Knollman, B. (2011) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. Available at: http://books.google.com/books?id=e_yAOpyyaowC&printsec=frontcover&dq=goodman+and+gilman+the+pharmacologic+basis+of+therapeutics&hl=&cd=2&source=gbs_api (Accessed: 19 February 2020).

Burke, M. D. *et al.* (1994) 'cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin', 48(5), pp. 923–936.

Chen, E. P. *et al.* (2010) 'A mechanism-based mathematical model of aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A induction in rats using β -naphthoflavone as a tool compound', *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), pp. 2278–2285. doi: 10.1124/dmd.110.034421.

Cook, D. J. *et al.* (2016) *Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application*. 1st edn, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.07.003.

Copeland, R. A. (2000) *Enzymes*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/0471220639.

Donato, M. T. (2000) '1. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?', *María Teresa Donato Martín*, pp. 29–62. doi: 10.1038/sj.npp.1301418.

Fradette, C. *et al.* (2007) 'Animal Models of Acute Moderate Hypoxia Are Associated with a Regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in Liver ABSTRACT', *Pharmacology*, 35(5), pp. 765–771. doi: 10.1124/dmd.106.013508.

Gallego Fernández, A. *et al.* (2011) *Aspectos fundamentales del citocromo P450*, *Fundación Tejerina*. Available at: http://instituto-roche.es/web/pdf/aspectos_fundamentales_citocromo.pdf.

Goodman, L. S. *et al.* (2019) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill. Available at: <https://www.laleo.com/goodman-gilman-las-bases-farmacologicas-de-la-terapeutica-p>

23761.html?gclid=Cj0KCQjwkoDmBRCCARIsAG3xzI-aQ2mUFYBCKw7rDFfDOdp0ft_z-SENRLjposEkhinsePQsNydYvplaApi5EALw_wcB (Accessed: 24 April 2019).

Guengerich, F. P. (2014) 'Fifty Years of Progress in Drug Metabolism and Toxicology: What Do We Still Need to Know About Cytochrome P450 Enzymes?', in *Fifty Years of Cytochrome P450 Research*. Tokyo: Springer Japan, pp. 17–41. doi: 10.1007/978-4-431-54992-5_2.

Günther, M. *et al.* (2006) 'Effects of hypoxia and limited diffusion in tumor cell microenvironment on bystander effect of P450 prodrug therapy', *Cancer Gene Therapy*, 13(8), pp. 771–779. doi: 10.1038/sj.cgt.7700955.

Iyanagi, T. (2007) 'Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification', *International Review of Cytology*, 260(06), pp. 35–112. doi: 10.1016/S0074-7696(06)60002-8.

Lang, D., Radtke, M. and Bairlein, M. (2019) 'Highly Variable Expression of CYP1A1 in Human Liver and Impact on Pharmacokinetics of Riociguat and Granisetron in Humans', *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 32(6), pp. 1115–1122. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00413.

Li, L., Zhang, Q. Y. and Ding, X. (2018) 'A CYP2B6-humanized mouse model and its potential applications', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. Elsevier Ltd, 33(1), pp. 2–8. doi: 10.1016/j.dmpk.2018.01.001.

Li, W. *et al.* (2015) 'Changes of pathological and physiological indicators affecting drug metabolism in rats after acute exposure to high altitude', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(1), pp. 98–104. doi: 10.3892/etm.2014.2049.

Li, X. *et al.* (2014) 'Effect of exposure to acute and chronic high-altitude hypoxia on the activity and expression of CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and NAT2 in rats', *Pharmacology*, 93(1–2), pp. 76–83. doi: 10.1159/000358128.

Li, Z. *et al.* (2020) 'Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications', *Journal of Biological Chemistry*, 295(3), pp. 833–849. doi: 10.1074/jbc.REV119.008758.

Lněničková, K. *et al.* (2018) 'Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels', *Acta Pharmaceutica*, 68(1), pp. 75–85. doi: 10.2478/acph-2018-0005.

Mak, P. J. and Denisov, I. G. (2018) 'Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction

mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, 1866(1), pp. 178–204. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.021.

Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) 'Revised methods for the Salmonella mutagenicity test', *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3–4), pp. 173–215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.

Miyamoto, M. *et al.* (2015) 'Membrane Anchor of Cytochrome P450 Reductase Suppresses the Uncoupling of Cytochrome P450', *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 63(4), pp. 286–294. doi: 10.1248/cpb.c15-00034.

Nebert, D. W. *et al.* (2013) 'Human cytochromes P450 in health and disease', (August 2012).

Nelson, D. R. *et al.* (1993) 'The P450 Superfamily : Update on new sequences, gene-mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature', *DNA and Cell Biology*, 12(1), pp. 1–51. doi: 10.1089/dna.1993.12.1.

Ortiz de Montellano, P. R. (2005) *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Pearl, N. M. *et al.* (2016) 'Protonation of the Hydroperoxo Intermediate of Cytochrome P450 2B4 Is Slower in the Presence of Cytochrome P450 Reductase Than in the Presence of Cytochrome b5', *Biochemistry*, 55(47), pp. 6558–6567. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00996.

Perzanowski, J. (1999) *Fifty Years of*. doi: 10.1016/S0140-6736(52)91759-5.

Purnapatre, K., Khattar, S. K. and Saini, K. S. (2008) 'Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs', *Cancer Letters*, 259(1), pp. 1–15. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.024.

Rahman, S. and Thomas, P. (2018) 'Interactive effects of hypoxia and PCB co-exposure on expression of CYP1A and its potential regulators in Atlantic croaker liver', (September 2017). doi: 10.1002/tox.22527.

Sirim, D. *et al.* (2010) 'Prediction and analysis of the modular structure of cytochrome P450 monooxygenases', *BMC Structural Biology*, 10. doi: 10.1186/1472-6807-10-34.

Subastri, A. *et al.* (2017) 'Effect of troxerutin on 2-aminoanthracene and DNA interaction and its anti-mutagenic property', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 88, pp. 325–334. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.042.

Williams, L. and Preston, J. (1983) *INTERIM PROCEDURES FOR CONDUCTING THE 'SALMONELLA'/MICROSOMAL MUTAGENICITY ASSAY (AMES TEST)*, U.S. Environmental

Protection Agency, Washington, D.C., EPA. Available at: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=NERL&dirEntryID=46176 (Accessed: 4 April 2019).

Wu, J. *et al.* (2019) 'Multiple CH/ π Interactions Maintain the Binding of Aflatoxin B₁ in the Active Cavity of Human Cytochrome P450 1A2.', *Toxins*, 11(3), p. 158. doi: 10.3390/toxins11030158.

Yuan, R. *et al.* (2002) 'Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions', *Drug Metab Dispos*, 30(12), pp. 1311–1319. doi: 10.1124/dmd.30.12.1311.

Zanger, U. M. *et al.* (2014) 'Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(3), pp. 258–261. doi: 10.1038/clpt.2013.220.

Zanger, U. M. and Schwab, M. (2013) 'Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation', *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), pp. 103–141. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

Zhang, J. *et al.* (2016) 'Pharmacokinetics of Lidocaine Hydrochloride Metabolized by CYP3A4 in Chinese Han Volunteers Living at Low Altitude and in Native Han and Tibetan Chinese Volunteers Living at High Altitude', *Pharmacology*, 97(3–4), pp. 107–113. doi: 10.1159/000443332.