



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Ciencias

Efecto de la flavona sobre la actividad microsomal
hepática de CYP1A1 y 1A2 en *Rattus norvegicus*.

TESIS

Para obtener el título de Biólogo

Presenta

Jorge Iván Botello Rueda

Tutor

Dr. Rafael Camacho Carranza



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos.

A mi tutor el Dr. Rafael Camacho Carranza por su asesoramiento en este trabajo de investigación, al compartir sus consejos académicos y profesionales, su experiencia como investigador y su trato accesible y humano.

A *todos los investigadores* que apoyaron este proyecto, el Dr. Jesús Javier Espinoza Aguirre del laboratorio de Genética Molecular del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas y todo su equipo, al técnico laboratorista Sandra por la enseñanza de los procesos y métodos experimentales y por sus consejos siempre con la amabilidad y gentileza que le caracteriza, a la Dra. Tzipe Govezensky por el soporte en el análisis estadístico, a la Dra. Rebeca Santes Palacios por su excelente ayuda con los estudios de acoplamiento molecular, y especialmente al Dr. Samuel Ávila por su inigualable apoyo en la enseñanza de los procedimientos y métodos experimentales, por sus consejos prácticos y el asesoramiento cercano a lo largo de toda la investigación.

A la Unidad de Modelos Biológico y el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por sus instalaciones y el tratamiento de animales de laboratorio.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Luis Felipe Jiménez García

Secretario: Dr. Rafael Camacho Carranza

Vocal: Dra. Adriana Muñoz Hernández

Suplente 1: Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

Suplente 2: Dra. Marcela Sosa Garrocha

Dedicatoria.

Ofrezco este trabajo y esfuerzo a mi familia. A mi mamá, por apoyar mi decisión de tomar el fascinante camino de las ciencias que tanto me entusiasma y por enriquecer mi perspectiva a través de ideas y consejos más allá de la disciplina. A mi papá, que además de ser quien me introdujo en el campo de la biología, me apoyó anímicamente e intelectualmente, además de proporcionarme todas las facilidades para llevar a cabo mis metas académicas. A mi hermana Mariana y mis hermanos Adrián e Isaac, por ser un referente en el cual encontré eco de mis conocimientos y aspiraciones, cuyos contrastes promovieron el ímpetu de mejorar y crecer.

Dedicatoria especial a mi amor Yessi, quien me acompañó en el desarrollo y conclusión de este trabajo con su constante motivación y cariño, en el cual encontré fuerza e inspiración para culminar este trabajo.

Importante mención de los organismos experimentales que entregaron su vida para hacer posible el desarrollo de este trabajo de investigación.

Por último, quiero dedicar este trabajo a la Universidad, que bajo su esfera adquirí todo el conocimiento con el que forjé mi formación académica, siempre con enfoque social y un invaluable crecimiento personal a través de un entorno de experiencias de vida más allá de las aulas y del ámbito escolar.

“Si, por lo tanto, la ciencia actual apunta en su perplejidad a logros técnicos para «probar» que tratamos con un «auténtico orden» dado en la naturaleza, parece que ha caído en un círculo vicioso, que cabe formular así: los científicos formulan sus hipótesis para disponer sus experimentos y luego usan dichos experimentos para comprobar sus hipótesis; durante toda esta actividad está claro que tratan con una naturaleza hipotética.

Dicho con otras palabras, el mundo del experimento siempre parece capaz de convertirse en una realidad hecha por el hombre, y esto, que acrecienta el poder del hombre para hacer y actuar, incluso para crear un mundo, mucho más allá de lo que cualquier época anterior se atrevió a imaginar en sueños y fantasías, por desgracia hace retroceder una vez más al hombre – y ahora de manera más enérgica – a la cárcel de su propia mente, a las limitaciones de los modelos que él mismo creó.”

- Hannah Arendt, *The Human Condition*, 1958.

Índice

Lista de Figuras	1
Lista de Tablas	2
Abreviaturas y acrónimos	3
Resumen	4
I Introducción.....	5
1. Los citocromos P450	5
1. 1 Los CYP1A catalizan endobióticos y xenobióticos	6
1. 1. 1 Función de CYP1A1.....	7
1. 1. 2 Función de CYP1A2.....	7
1. 2 Vía del receptor de hidrocarburo de arilo	9
1. 3 Flavonoides	12
1. 3. 1 Las flavonas y sus propiedades bioquímicas.....	13
II Planteamiento del problema.....	14
III Hipótesis general	15
IV Objetivo general	15
V Materiales y métodos.....	15
5. 1 Modelo biológico	15
5. 2 Tratamientos.....	15
5. 3 Obtención de la fracción microsomal a partir de hígado de rata.....	17
5. 4 Cuantificación de proteínas totales de la fracción microsomal de hígado de rata ...	18
5. 5 Evaluación de la <i>O</i> -desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata.....	18
5. 6 Estudios de acoplamiento molecular (Molecular docking)	18
5. 7 Análisis estadístico	20
VI Experimento A.....	20
6. 1 Hipótesis.....	20
6. 2 Objetivos	20
6. 3 Resultados.....	20
6. 3. 1 Reacción de <i>O</i> -desalquilación de la etoxirresorufina con CYP1A1 por flavona .	21
6. 3. 2 Reacción de <i>O</i> -desalquilación de la metoxirresorufina con CYP1A2 por flavona	21

6. 4 Conclusión.....	23
VII Experimento B.....	23
7. 1 Hipótesis.....	23
7. 2 Objetivo.....	23
7. 3 Resultados.....	23
7. 3. 1 Reacción de <i>O</i> -desalquilación de la etoxirresorufina con <i>CYP1A1</i> por flavona/B[a]P.....	23
7. 3. 2 Reacción de <i>O</i> -desalquilación de la metoxirresorufina con <i>CYP1A2</i> por flavona/B[a]P.....	24
7. 4 Conclusión.....	26
VIII Experimento C.....	26
8. 1 Hipótesis.....	26
8. 2 Objetivo.....	26
8. 3 Resultados.....	26
8. 3. 1 Estudios de acoplamiento molecular.....	26
IX Discusión.....	29
X Conclusiones.....	34
XI Perspectivas.....	34
XII Referencias.....	35
XIII Anexos.....	42
A-I Estudios de acoplamiento molecular.....	42
A-II Datos estadísticos.....	43
A-III Secuencia de aminoácidos para las isoformas de <i>CYP1A</i>	44
A-IV Resultados del docking molecular.....	44

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo de la reacción general mediada por los citocromos P450 (CYP).

Figura 2. Descripción gráfica de la nomenclatura para los CYP.

Figura 3. Diagrama de la biotransformación de benzo[a]pireno.

Figura 4. Diagrama de la vía del AHR.

Figura 5. Esquema de ligandos clásicos y no clásicos de AHR.

Figura 6. Estructura fundamental de la flavona con los nombres de los anillos y la posición de sus carbonos.

Figura 7. Esquema representativo de las flavonas más abundantes en las plantas.

Figura 8. Esquema que describe los diferentes tratamientos aplicados.

Figura 9. Efecto del tratamiento con flavona en la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina por CYP1A1 y el efecto del tratamiento con flavona en la *O*-desalquilación de la metoxirresorufina por CYP1A2.

Figura 10. Efecto del tratamiento con flavona en la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina por CYP1A1 y el efecto del tratamiento con flavona en la *O*-desalquilación de la metoxirresorufina por CYP1A2.

Figura 11. Acoplamiento entre CYP1A1 de rata con flavona.

Figura 12. Acoplamiento entre CYP1A2 rata con flavona.

Figura 13. Acoplamiento entre AHR de rata con flavona.

Figura A1. Acoplamiento entre CYP1A1 humano con flavona.

Figura A2. Acoplamiento entre CYP1A2 humano con flavona.

Figura A3. Acoplamiento entre AHR de humano con flavona.

Lista de Tablas

Tabla 1. Funciones de las isoformas de CYP1A.

Tabla 2. Esquema de administración de tratamientos.

Tabla 3. Esquema de las simulaciones experimentales efectuadas para el acoplamiento molecular.

Tabla 4. Porcentaje de similitud de aminoácidos entre las proteínas evaluadas, obtenidas con BLAST.

Tabla A1. Procedimiento para realizar una prueba de acoplamiento molecular.

Tabla A2. Datos obtenidos de actividad específica de CYP1A1 (pmol/mg proteína * min).

Tabla A3. Datos obtenidos de actividad específica de CYP1A2 (pmol/mg proteína * min).

Tabla A4. Secuencia de aminoácidos para las isoformas de CYP1A

Abreviaturas y acrónimos

AHR	Receptor de hidrocarburos de arilo
ARNT	Receptor nuclear del AHR
B[a]P	Benzo[a]pireno
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
BPDE	Benzo[a]pireno diolepóxido
CPR	Citocromo P450 reductasa
CYP	Citocromos P450
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EROD	Reacción de O-desalquilación de la etoxirresorufina
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IH	Interacciones hidrofóbicas
MROD	Reacción de la O-desalquilación de la metoxirresorufina
NADH	Nicotinamida dinucleótido
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
XAP2	Proteína 2 asociada a proteína X
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos

Resumen

Los flavonoides son la subclase más amplia de polifenoles con cerca de 9 000 moléculas presentes en la mayoría de los grupos vegetales. Dentro de este grupo se encuentran las flavonas, que son los flavonoides menos complejos. Debido a su amplia presencia las ingerimos constantemente en nuestra alimentación a través de frutas y vegetales. Los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de monooxigenasas hemotioladas presentes en la mayoría de los organismos, que biotransforman una amplia variedad de endobióticos y xenobióticos; la subfamilia CYP1A incluye dos genes para las isoformas CYP1A1 y CYP1A2 que biotransforman principalmente xenobióticos con estructuras anilladas, estructuras heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos en fármacos, contaminantes ambientales y metabolitos secundarios de origen vegetal. Asimismo, están implicados en procesos de activación de procarcinógenos que podrían tener efectos genotóxicos. En varios modelos se ha reportado que las flavonas como apigenina, chrysin, diosmetina, galangina y quercitina presentan diversas propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticarcinogénicas a causa de sus efectos sobre la inducción de la expresión de CYP1A1 y CYP1A2 y al mismo tiempo, su inhibición en la actividad enzimática. En este trabajo se evaluaron los efectos de la flavona (2-fenil-1,4-benzopirona) que carece de grupos sustituyentes, sobre la actividad de CYP1A1 y CYP1A2 *in vivo* en microsomas hepáticos en modelo de *Rattus norvegicus* y se proponen las posibles interacciones *in silico* entre la flavona y sus sustratos en CYP1A y el receptor de hidrocarburos de arilo a través de estudios de acoplamiento molecular.

I Introducción

1. Los citocromos P450

Los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia de monooxigenasas hemotioladas, conformadas por un grupo hemo y átomos de azufre, con los que biotransforman una amplia variedad de moléculas endógenas (endobióticos), tales como esteroides, ciertas vitaminas, ácidos biliares, ácidos grasos, prostaglandinas y retinoides. Asimismo, moléculas exógenas (xenobióticos) como fármacos, contaminantes ambientales y metabolitos de origen vegetal ⁽¹⁻³⁾.

La reacción catalizada por los CYP consiste en la transferencia de un átomo de oxígeno al sustrato, a partir de oxígeno diatómico (O_2), lo que incrementa su solubilidad facilitando su biotransformación y su excreción a través de la orina o bilis ^(1, 2).

La energía indispensable para el rompimiento de enlace entre oxígenos se obtiene de la transferencia de dos electrones procedentes de NADH asistido por NADH-citocromo P450 reductasa (Figura 1).

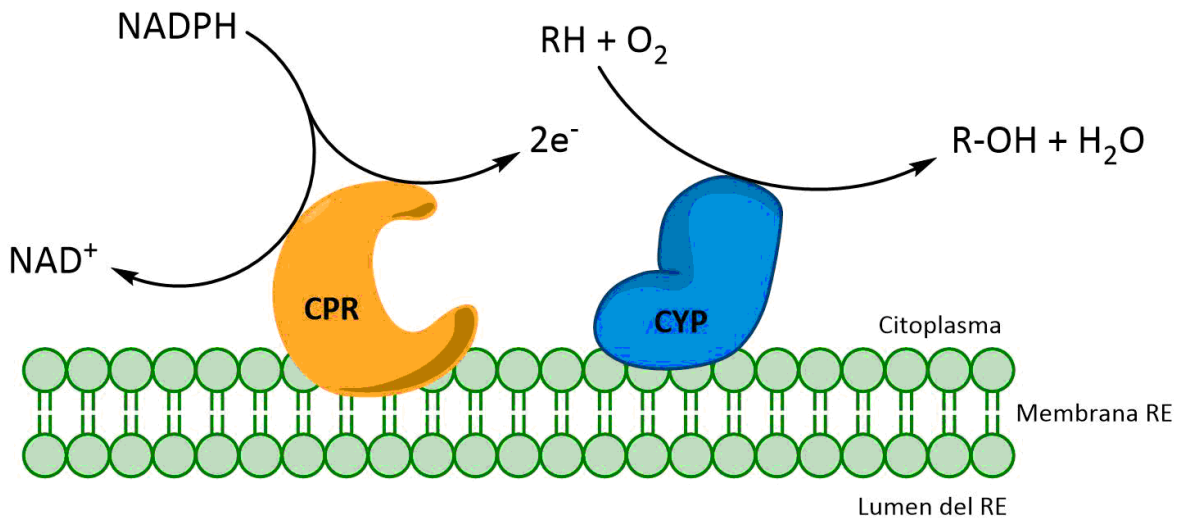


Figura 1. Esquema representativo de la reacción general mediada por los citocromos P450 (CYP). La inserción de un átomo de oxígeno al sustrato (RH) requiere un par de electrones provenientes del NADPH. La obtención de los electrones es mediada por la NADH-citocromo reductasa (CPR) ^(2, 5).

La superfamilia de CYP se compone de múltiples proteínas que contienen entre 400-500 residuos de aminoácidos. Están presentes en la mayoría de los organismos, con excepción de ciertos grupos bacterianos como *Enterobacter spp*, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (2, 5-7). En mamíferos, los CYP se localizan prácticamente en todo el organismo (10), principalmente en los órganos implicados en la biotransformación tales como hígado, intestino y pulmón, donde se encuentran como proteínas transmembranales del retículo endoplasmático liso y en la mitocondria (8, 10).

En humanos están identificados 57 CYP, los cuales están organizados en dos grupos: El primero se conforma por 35 isoformas involucradas en la biotransformación de xenobióticos; y en el segundo se agrupan 22 enzimas encargadas de la biotransformación de endobióticos (1, 7). La nomenclatura de esta superfamilia se forma con el prefijo CYP seguido de un número que representa a una familia cuando hay una similitud >40% en su secuencia de aminoácidos, seguido de una letra, que agrupa a las isoformas con 55% de similitud en su secuencia y, por último, un número que representa un gen individual (Figura 2) (9).

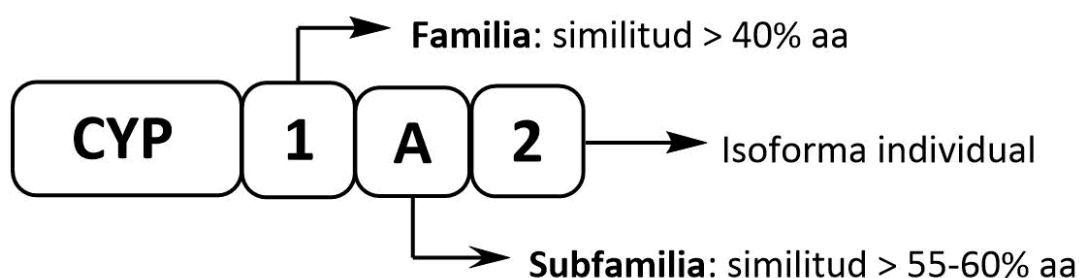


Figura 2. Descripción gráfica de la nomenclatura para los CYP. Se utiliza el prefijo CYP seguido de un número arábigo que representa a una misma familia con una similitud del 40% en su secuencia de aminoácidos, seguido de una letra del alfabeto latino que agrupa a las isoformas con 55% de similitud en su secuencia de aminoácidos, por último, un número arábigo que representa a la isoforma individual (9).

1. 1 Los CYP1A catalizan endobióticos y xenobióticos

La subfamilia CYP1A incluye dos genes: *CYP1A1* y *CYP1A2*, ambas isoformas se localizan en el cromosoma 15 q24.1 de humano y en 8 q24 de rata, cuyas regiones de DNA tienen una

similitud del 70% entre ambas especies. Este porcentaje de similitud está altamente conservada entre especies de mamíferos, lo que permite que estas isoformas sean capaces de biotransformar tanto endobióticos como xenobióticos con estructuras anilladas ^(8, 11).

1. 1. 1 Función de CYP1A1

La función de la isoforma CYP1A1 es muy variada ya que depende del endobiótico que tome como sustrato, a partir del cual darán como resultado diversos productos. En el caso de las hormonas sexuales, sintetiza progesterona, degrada testosterona y estradiol; en el de otras hormonas, degrada melatonina; y en el de vitaminas, produce retinol, entre otros. Por otra parte, participa en la biotransformación de xenobióticos ⁽⁸⁾, entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), las aminas heterocíclicas y los bifenilos policlorados, los cuales están considerados como procarcinógenos, ya que su bioactivación se asocia a procesos carcinogénicos ^(7,9,11,12); así como alrededor del 2% del total de fármacos. El CYP1A1 se localiza principalmente en pulmón, intestino, placenta, leucocitos e hígado ^(1, 8). A nivel de mRNA, se ha reportado en páncreas, timo, próstata, intestino delgado, útero y glándulas mamarias ⁽⁸⁾.

1. 1. 2 Función de CYP1A2

Las principales funciones y sustratos endobióticos de CYP1A2 comprenden moléculas que tienen estructuras heterocíclicas, como las de las hormonas sexuales, donde degrada estradiol, sintetiza estriol y pregnenolona; otras hormonas donde degrada melatonina; en ácidos grasos donde biotransforma ácido linoleico, sintetiza ácido fosfatídico; y vitaminas donde sintetiza retinoides ^(8, 9, 11). Por otra parte, biotransforman xenobióticos como la cafeína, algunos productos industriales como las aminas aromáticas, productos de la combustión como las arilaminas heterocíclicas presentes en la comida sobrecosida y cerca del 7% de los fármacos como el acetaminofén ^(9, 13). La presencia de CYP1A2 se reporta en prácticamente todo el organismo, pero se expresa fuertemente en hígado, con reportes de expresión de mRNA en otros órganos como en colon ⁽⁸⁾.

Tabla 1. Funciones de las isoformas de CYP1A.			
Isoforma	Función	Sustrato	Referencia
CYP1A1	Hidroxilación y oxidación	Compuestos aromáticos, hidrocarburos aromáticos	(Lu <i>et al.</i> , 2019)
	Hidroxilación	Progesterona, pregnenolona y estradiol	(Niwa <i>et al.</i> , 1998) y (Spink <i>et al.</i> , 1994)
CYP1A2	Hidroxilación y oxidación	Aminas aromáticas, compuestos heterocíclicos	(Lu <i>et al.</i> , 2019)
	Degradación	Melatonina	(Von Bahr <i>et al.</i> 2000)
		Ácido linoleico	(Moran <i>et al.</i> 2000)
		Fosfatidilcolina	(Yun <i>et al.</i> 1999)
	Hidroxilación y Oxidación	Progesterona, estradiol y testosterona	(T. Niwa <i>et al.</i> 1998) (Schwarz <i>et al.</i> 2000)

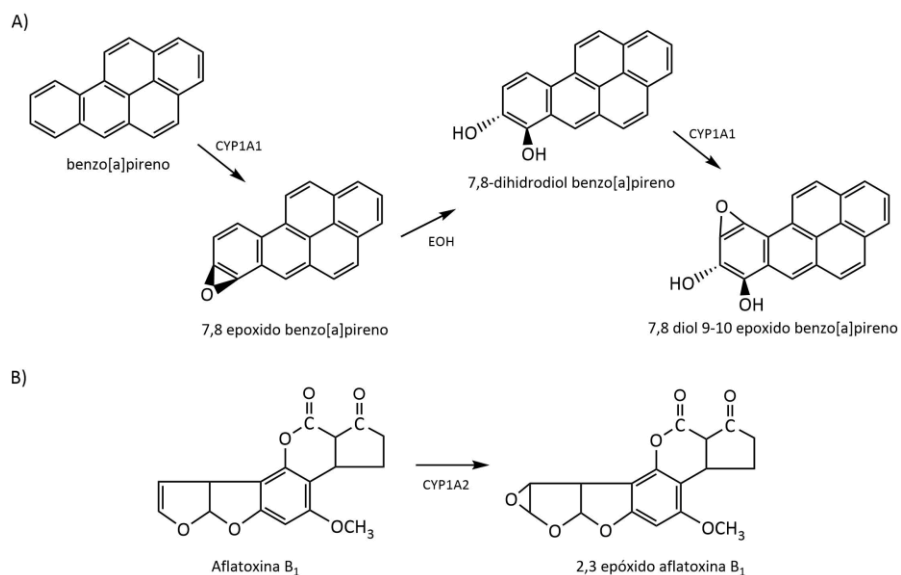


Figura 3. Diagrama de la biotransformación de benzo[a]pireno (A), que es catalizado por CYP1A1 en dos ocasiones, primero formando 7,8 epóxido B[a]P, luego es hidrolizado por EOH formando 7,8 dihidrodiol B[a]P, finalmente CYP1A1 vuelve a actuar para formar el metabolito genotóxico 7,8 diol 9-10 epóxido de benzo[a]pireno, BPDE. En B) aflatoxina B₁ es biotransformado por CYP1A2 en 2,3 epóxido aflatoxina B₁. EOH = epóxido hidrolasa.

1. 2 Vía del receptor de hidrocarburo de arilo

El receptor de hidrocarburos de arilo (AHR) es un factor de transcripción activado por ligando que regula la expresión de los *CYP1A* ^(9, 13, 14). El AHR se localiza en el citosol en su forma inactiva en complejo con la proteína de choque térmico 90 (HSP90), la co-chaperona p23 y la proteína 2 asociada al activador transcripcional X, descrito en el virus de hepatitis B (XAP2), que en conjunto le proporcionan estabilidad estructural. La activación de AHR por unión a un ligando promueve su traslocación al núcleo, donde interactúa con el translocador nuclear de AHR (ARNT) provocando la separación de HSP90, p23 y XAP2. El heterodímero AHR-ARNT reconoce los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en el DNA promoviendo la transcripción de *CYP1A1*, *CYP1A2* y *CYP1B1* (Figura 4) ^(7, 8, 10, 14, 16).

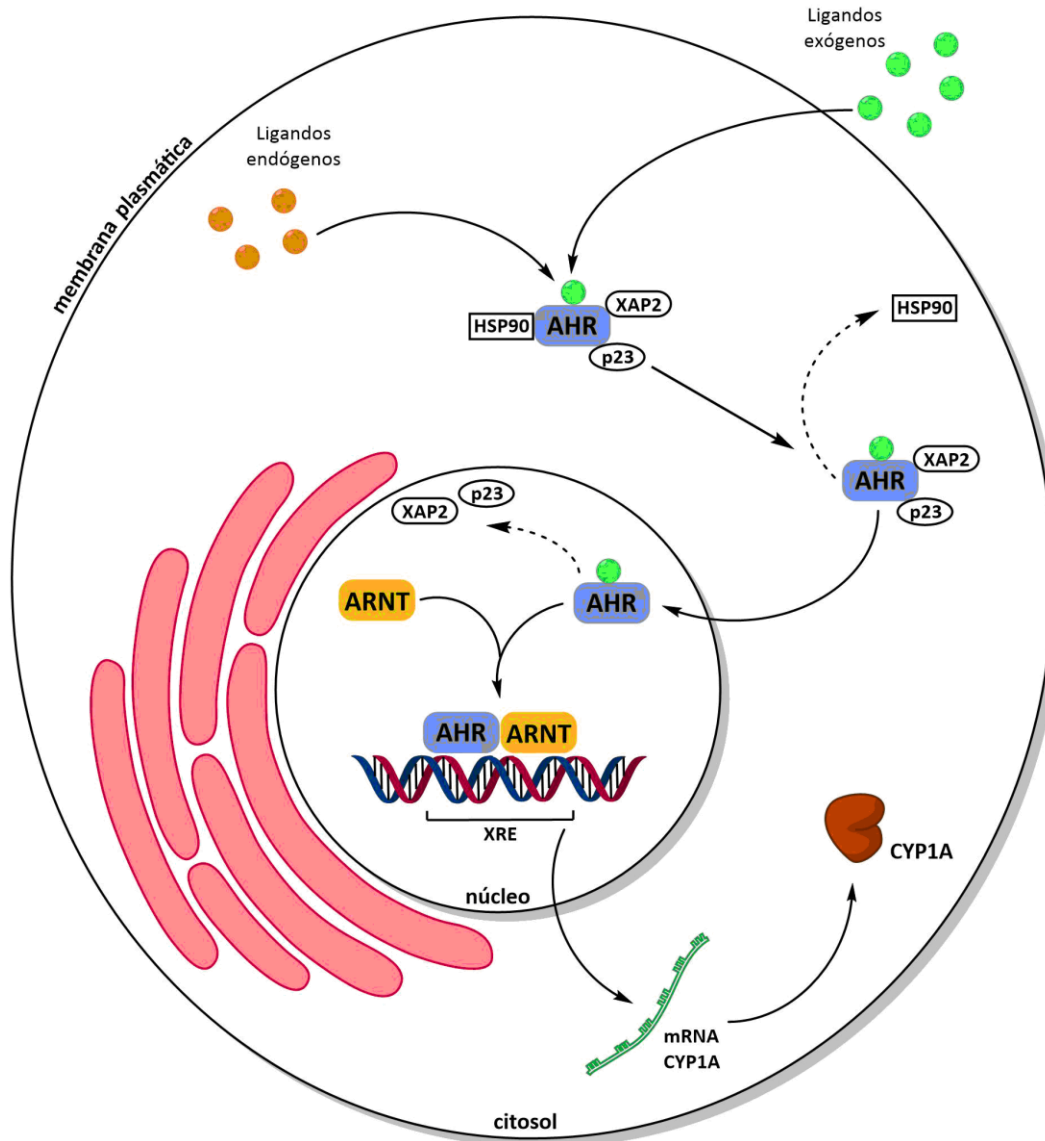


Figura 4. Diagrama de la vía del AHR. La unión de un ligando con AHR produce la formación del complejo de AHR con las chaperonas HSP90, XAP2 y p23, esto permite la traslocación al núcleo y la separación de las chaperonas, formando el heterodímero AHR-ARNT. En el núcleo, este interactúa con la región promotora XRE del DNA para inducir la expresión de genes CYP1A ⁽¹⁶⁾.

La inducción de la expresión de genes *CYP1A* por la vía de AHR se considera como un proceso adaptativo donde el organismo responde a ligandos exógenos que estimulan la síntesis de proteínas, provocando un aumento en la cantidad de la enzima en el organismo para la biotransformación del agente xenobiótico ⁽⁸⁾.

Los ligandos que activan la vía del AHR, se clasifican en dos grupos: clásicos y no clásicos. Los ligandos clásicos, llamados así por su alta afinidad de unión a AHR, comprenden componentes de contaminantes ambientales con estructuras planas como las aminas heterocíclicas, los bifenilos policlorinados, fármacos como el omeprazol ⁽⁸⁾ y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre los que destaca el benzo[a]pireno (B[a]P) por ser un potente inductor de la vía de AHR (Figura 5) ⁽¹⁷⁾. Los ligandos no clásicos son componentes naturales con menor toxicidad, pero capaces de inducir a AHR ⁽²⁷⁾. El grupo más extenso de los ligandos no clásicos es el de los flavonoides que, de acuerdo con algunos reportes, el efecto de distintas flavonas hidroxiladas como diosmetina, diosmina, quercetina, taxifolina, morina, robinetina, luteolina y apigenina, se unen al AHR e inducen la expresión de las enzimas CYP1A ^(14, 18, 19, 20). De igual forma se ha reportado que otras flavonas como galangina, miricetina ^(28, 29), crisina, apigenina ^(7, 30, 31) y luteolina ^(7, 33) inhiben la actividad catalítica de CYP1A en diferentes modelos experimentales *in silico*.

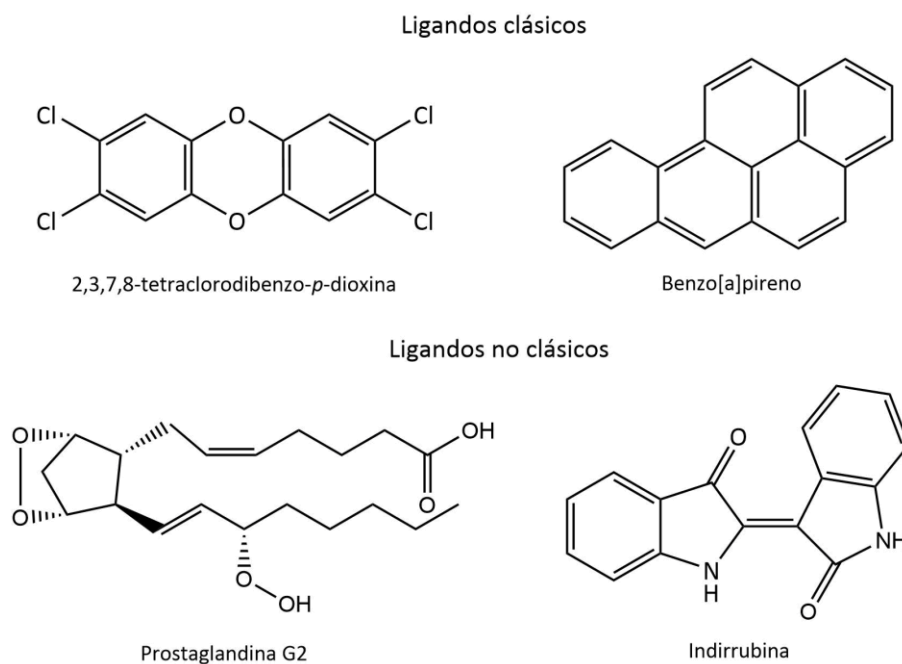


Figura 5. Esquema de ligandos clásicos y no clásicos de AHR. ⁽⁴⁵⁾ 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina o TCDD.

1.3 Flavonoides

Los flavonoides forman la clase más amplia de polifenoles con alrededor de 9 000 componentes naturales que poseen propiedades diferenciadas y están presentes en todos los órganos de las plantas ⁽²²⁻²⁴⁾. En la fisiología vegetal, los flavonoides desempeñan diversas funciones, como la de protección de rayos ultravioletas-B (UV-B), pigmentación para la atracción de polinizadores, como fitoalexinas, moléculas de señalización celular y como reguladores de auxinas ⁽²³⁾. La estructura fundamental de los flavonoides está compuesta de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos denominados A, B y C, los cuales pueden presentar varios tipos de sustituciones y diferentes niveles de oxidación, conformando varias subclases de flavonoides, (Figura 6) ⁽²²⁾. En mamíferos, una dieta con flavonoides manifiesta en el organismo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticarcinogénicas, cuyos efectos están determinados por sus características estructurales ^(14, 24, 25).

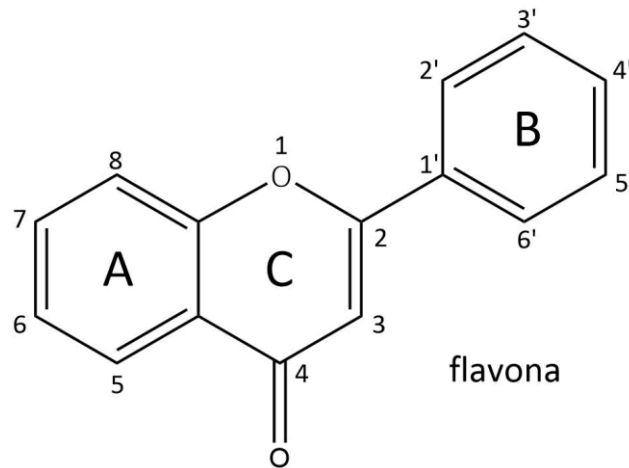


Figura 6. Estructura fundamental de la flavona con los nombres de los anillos y la posición de sus carbonos. ⁽²²⁾

Las subclases de flavonoides son flavanoles, flavanonas, flavonoles, flavonas, antocianidinas e isoflavonas. La variedad y complejidad de estructuras dentro de los flavonoides, así como sus efectos en el metabolismo, se debe principalmente al nivel y posición de grupos hidroxilo, además de su grado de metilación y glicosilación en su estructura sencilla (Figura 7) ^(14, 18, 22, 25).

1. 3. 1 Las flavonas y sus propiedades bioquímicas

La subclase de flavonas está presente en todos los grupos vegetales, con excepción de las briofitas hepáticas del género *Anthoceros* ⁽²³⁾. Las flavonas comprenden varias moléculas identificadas, como diosmetina, diosmina, quercetina, taxifolina, morina, robinetina, luteolina y apigenina ^(14, 25). Se encuentran comúnmente en vegetales y frutas de la dieta diaria como la cebolla, el perejil, la hoja de té, la naranja, el brócoli, el apio, la zanahoria, la pimienta, la manzana y la manzanilla, entre otras ⁽²²⁾.

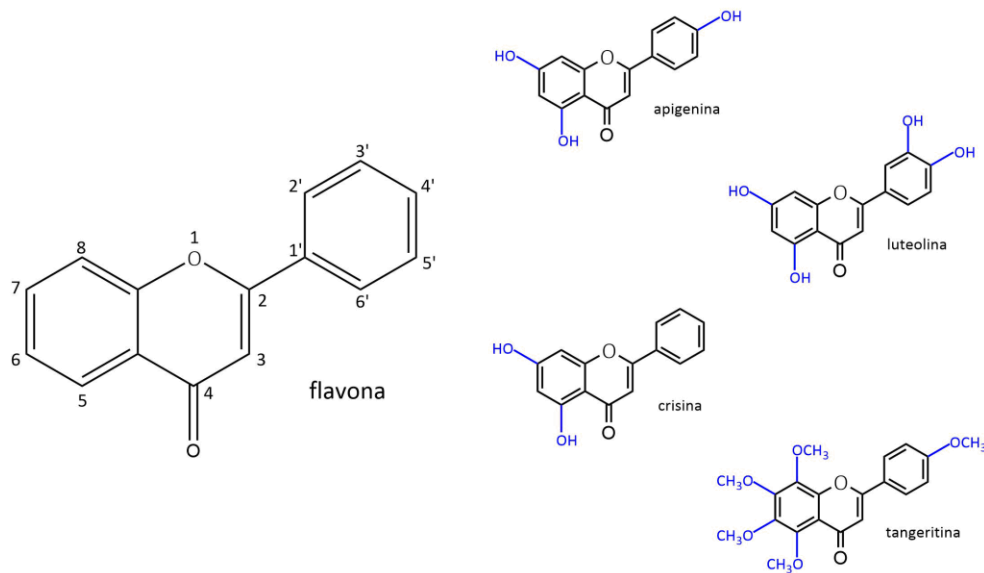


Figura 7. Esquema representativo de las flavonas más abundantes en las plantas. Se destaca en azul ejemplos de los tipos de sustitución y sus posiciones específicas en los carbonos de la estructura básica de la flavona.

Como se ha mencionado, se han reportado los efectos de distintas flavonas con diferentes niveles y tipos de sustitución, como diosmetina, diosmina, quercetina, taxifolina, morina, robinetina, luteolina y apigenina los cuales se unen al AHR induciendo la expresión de las enzimas CYP1A ^(14, 18, 19, 20). De igual forma se reporta que varias flavonas inhiben la actividad catalítica de CYP1A en diferentes modelos experimentales *in vitro* a través del ensayo de la *O*-desalquilación de la etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) ⁽³¹⁾, como la galangina, miricetina, cuyo efecto se observó en células HepG2 ^(28, 29); crisina, apigenina cuyo efecto se observó en células HepG2 y en células de hámster chino ^(7, 30, 31) y diosmetina donde se observó su efecto en células de L-MDR1 ^(30, 31)

II Planteamiento del problema

Actualmente, el estudio de diversos metabolitos vegetales y sus efectos en la biotransformación de xenobióticos son de creciente interés, debido a que nos permite explorar posibles agentes quimioprotectores y candidatos a fármacos que contrarresten la bioactivación de carcinógenos asociados a la actividad de los citocromos P450.

Los CYP1A están implicados en procesos de activación de procarcinógenos y en la eliminación de endobióticos y xenobióticos del organismo a través de biotransformación^(8, 9). Su expresión está regulada por la vía del AHR, la cual se activa por diversos ligandos^(9, 13, 14). Dentro de los ligandos naturales de AHR, el grupo más extenso es el de los flavonoides, y entre estos, las flavonas se identifican por ser los flavonoides menos complejos y por su amplia presencia en vegetales⁽²³⁾ y las ingerimos constantemente en nuestra alimentación⁽²¹⁾. Se ha reportado que múltiples flavonas entre las que se encuentran galangina, miricetina^(28, 29), crisina, apigenina^(30, 31) y luteolina^(7, 33), son capaces de activar la vía de AHR, induciendo la expresión de CYP1A^(14, 18-20), al tiempo inhiben su actividad catalítica de acuerdo con diferentes modelos experimentales^(7, 28-31, 33). Sin embargo, aún no existe suficiente evidencia de que estas propiedades se repliquen por parte de la flavona menos compleja, es decir carente de grupos sustituyentes.

Por esta razón, en este trabajo nos propusimos evaluar de forma experimental el efecto de la flavona sin sustituyentes sobre la actividad enzimática de CYP1A después de su administración en modelo experimental *in vivo* de *Rattus norvegicus*. Así también, evaluamos *in silico* a través de estudios de acoplamiento molecular, la posible interacción de la flavona con los CYP1A de rata y de la flavona con el AHR de rata. En el presente escrito, para mayor claridad, se decidió exponer cada paso experimental como un segmento o bloque de investigación, cada uno con su propia hipótesis, objetivos y resultados, partiendo desde una hipótesis general.

III Hipótesis general

- La actividad total de CYP1A hepático se inhibirá como consecuencia del tratamiento con flavona, adicionalmente se observará una atenuación de la actividad total como consecuencia del tratamiento combinado de flavona y B[a]P *in vivo*, y existirá una interacción ligando-receptor entre la flavona y las isoformas de CYP1A, así como entre la flavona y AHR *in silico*, en todos los casos usando como modelo experimental a *Rattus norvegicus*.

IV Objetivo general

- Se evaluarán los efectos de inhibición de la flavona en las isoformas de CYP1A1 y 1A2 de forma individual y en tratamiento combinado con B[a]P en modelo *in vivo* de rata, adicionalmente se propondrán las interacciones *in silico* entre la flavona con CYP1A y flavona con AHR a través de acoplamiento molecular.

V Materiales y métodos

5.1 Modelo biológico

La unidad experimental corresponde a la rata macho cepa Wistar (*Rattus norvegicus*). Se emplearon 16 ratas con un peso aproximado de 196 g provistas por la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los animales fueron colocados en 4 grupos de 4 individuos cada uno, mantenidos en jaulas de acrílico (40 x 50 x 20 cm) con acceso a agua y alimento *ad libitum* a una temperatura de 22 °C con un fotoperíodo de 12 h luz- 12 h oscuridad.

5.2 Tratamientos

Todos los grupos experimentales recibieron un esquema de administración que consistió en 4 dosis de 3 diferentes tratamientos y un control (Figura 8), suministrados en 3 días (1 dosis por 2 días y 2 dosis en el día tres), en los cuales se usó aceite de maíz como vehículo debido a su inocuidad, su facilidad de asimilación por el organismo experimental y porque

no interfiere con el efecto de los demás tratamientos ⁽⁴⁶⁾. El procedimiento se detalla a continuación.

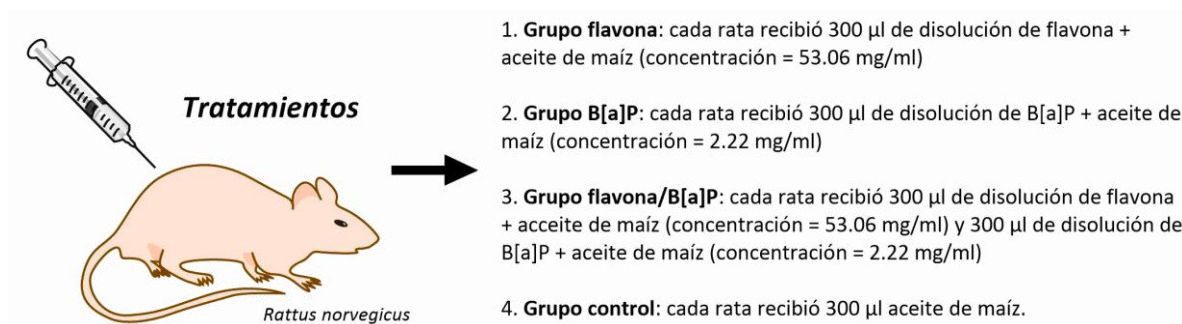


Figura 8. Esquema que describe los diferentes tratamientos aplicados. Cada grupo se conformó de 4 ratas macho con peso promedio de 196 g.

El grupo control (C) recibió 3 dosis de 300 μ l de aceite de maíz vía intraperitoneal (ip) ⁽³⁴⁾ por tres días. En el tercer día, 1 h después de la última administración, se suministró una cuarta dosis de 300 μ l de aceite de maíz.

El segundo grupo (flavona, F), recibió 3 dosis de 80 mg/kg de flavona (Sigma-Aldrich) disuelta en aceite de maíz, en un volumen final de 300 μ l, vía ip por tres días. En el tercer día, 1 h después de la última administración, se suministró una cuarta dosis de 300 μ l de aceite de maíz.

El tercer grupo (B[a]P, B) recibió 3 dosis de 300 μ l aceite de maíz vía ip por 3 días. En el tercer, día 1 h después de la última administración, se suministró una cuarta dosis de 10 mg/kg de B[a]P (Sigma-Aldrich) disuelto en aceite de maíz en un volumen final de 300 μ l.

El cuarto grupo (Flavona/B[a]P, FB) recibió 80 mg/kg de flavona disueltos en 300 μ l de aceite de maíz ip por 3 días. Posteriormente, al tercer día 1 h después de la última administración, se suministró una cuarta dosis de 10 mg/kg de B[a]P (Sigma-Aldrich) disuelto en aceite de maíz en un volumen final de 300 μ l.

En la Tabla 1 se resume el esquema de administración de tratamientos.

Tabla 2. Esquema de administración de tratamientos.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Control	□	□	□ (1 h después)	Tiempo de inducción de CYP1A	Muestreo
Flavona	○	○	○		
B[a]P	□	□	▣		
Flavona/B[a]P	○	○	▣		

□ = Aceite de maíz 300 µl
 ○ = Flavona 80 mg/kg en aceite de maíz, en volumen total de 300 µl
 ▣ = B[a]P 10 mg/kg en aceite de maíz, en volumen total de µl
M = Muestreo

Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 48 h posterior a la última administración, tiempo en donde la literatura reporta que en el ciclo biológico de expresión de CYP1A se da el punto máximo ⁽³⁴⁾, siguiendo con la reglamentación oficial de la NOM-062-ZOO-1999 y la aprobación del comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Posteriormente se extrajo el hígado y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento.

5.3 Obtención de la fracción microsomal a partir de hígado de rata

El hígado de cada rata se homogenizó en KCl 0.15 M en una proporción 3:1 peso-volumen, se centrifugó a 9 000 x g por 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante (fracción S9) ⁽³⁷⁾. Se tomaron 6 ml de cada fracción S9, se centrifugaron a 10 000 x g por 1 h a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 6 ml de un amortiguador de fosfatos con sacarosa 0.25 M pH 7.4 e inhibidores de proteasas, fosfatasas II y fosfatasas III, donde se homogenizó y se centrifugó una vez más bajo las condiciones previas. El nuevo botón se resuspendió en 2 ml de amortiguador de fosfatos 1 mM EDTA, 0.1 mM, y glicerol ultrapuro al 20% (v/v); se prepararon 20 alícuotas por muestra y se almacenaron a - 80 °C.

5. 4 Cuantificación de proteínas totales de la fracción microsomal de hígado de rata

Se cuantificaron las proteínas de la fracción microsomal conforme al ensayo original de Bradford ⁽³⁶⁾ con modificaciones para su lectura en microplaca. Se emplearon 10 µl de una dilución 1:80 de la muestra microsomal en agua, agregando 200 µl de una dilución 1:4 del reactivo de Bradford en agua, y se determinó la absorbancia a 595 nm en el lector de microplaca Synergy H4™.

5. 5 Evaluación de la *O*-desalquilación de etoxiresorufina (EROD) y metoxiresorufina (MROD) por la fracción microsomal de hígado de rata

La reacción se midió conforme al protocolo original ⁽³⁷⁾ con modificaciones para su lectura en microplaca. Se incubó a 37 °C por 3 min un volumen total de 200 µl que contenía los siguientes reactivos: 150 µl de amortiguador de Tris 50 mM con MgCl₂ 24 mM, pH 7.6, luego se agregaron 40 µg de proteína de la fracción microsomal, después se añadió 5 µl de EROD de una solución a 50 µM. Al final de la incubación, la reacción se inició con la adición de 40 µl de NADPH 5 mM. Se tomaron 20 lecturas de la fluorescencia en intervalos de 20 s en un lector de microplaca Synergy H4™ con excitación de 520 nm y una emisión de 585 nm. En el protocolo anterior se reemplazó EROD por MROD del cual se usaron 0.75 µl de una solución 500 µM.

5. 6 Estudios de acoplamiento molecular (Molecular docking)

Las estructuras químicas de flavona (ID: 10230) y α-naftoflavona, α-NF (ID: 11297) se obtuvieron de ChemSpider (Royal Society of Chemistry). El formato de ambas estructuras se modificó con PyMOL Molecular Graphics System (Shrödinger, LLC versión 2.5.4). Las estructuras tridimensionales para CYP1A1, CYP1A2 y AHR se obtuvieron de bases de datos especializadas como se muestra en el resumen de tratamientos de la Tabla 2. A cada proteína se le removieron iones, moléculas de agua cristalográficas y otros ligandos (excepto el grupo hemo) usando PyMOL 2.5.4. La incorporación de cargas atómicas, los parámetros de solvatación, así como la simulación del acoplamiento centrado en el sitio catalítico de cada proteína se realizó usando AutoDockTools 1.5.6. Los modos de unión

mejor obtenidos y las interacciones proteína-ligando fueron visualizadas una vez más con PyMOL 2.5.4. Los detalles del procedimiento se encuentran en la sección A-I de los Anexos.

Tabla 3. Esquema de las simulaciones experimentales efectuadas para el acoplamiento molecular.

	Docking	Código	Base de datos	Modelo
CYP1A humano (Control)	CYP1A1/a-NF	4I8V ¹²	Protein Data Base	Cristalografía de rayos X
	CYP1A2/a-NF	2HI4 ⁴⁴	Protein Data Base	Cristalografía de rayos X
CYP1A humano	CYP1A1/flavona	4I8V ¹²	Protein Data Base	Cristalografía de rayos X
	CYP1A2/flavona	2HI4 ⁴⁴	Protein Data Base	Cristalografía de rayos X
CYP1A rata	CYP1A1/flavona	4I8V ¹²	Protein Data Base	Por homología
	CYP1A2/flavona	2HI4 ⁴⁴	Protein Data Base	Por homología
AHR	AHR hum/flavona	A0A2R8Y7G1	UniProt	Por homología
	AHR rata/flavona	P41738	UniProt	Por homología

Para sustentar el acoplamiento molecular, se empleó un modelo por homología para CYP1A de rata y AHR de humano/rata, por lo que se obtuvo el porcentaje de similitud de aminoácidos entre las isoformas de humano y rata para las proteínas. Se compararon las respectivas secuencias de las proteínas experimentales, usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) en la plataforma de NCBI, como se resume en la Tabla 3.

Tabla 4. Porcentaje de similitud de a. a. entre las proteínas evaluadas, obtenidas con BLAST.

CYP1A1 humano/rata	78.80 %
CYP1A2 humano/rata	75.10 %
AHR humano/rata	70.92%

5. 7 Análisis estadístico

Se usó el programa especializado R Studio y GraphPad Prism 8 para el análisis estadístico y la obtención de gráficos, en la sección A-II de los Anexos se encuentran los datos obtenidos. Por cada grupo de datos, primero se evaluó la normalidad aplicando una prueba de Shapiro-Wilks con los valores obtenidos de la actividad total (CYP1A1: $W = 0.89623$, $p\text{-value} = 0.06997$; CYP1A2: $W = 0.94008$, $p\text{-value} = 0.35$). Se probó la homocedasticidad aplicando una prueba de Levene (CYP1A1: $F\text{ value} = 4.3602$, $\text{Pr}(>F) = 0.02699$; CYP1A2: $F\text{ value} = 0.906$, $\text{Pr}(>F) = 0.4669$). Posteriormente se realizaron pruebas *T student* con correcciones de Welch entre los grupos Control-Flavona y entre B[a]P-Flavona/B[a]P.

VI Experimento A

6. 1 Hipótesis

- Considerando el efecto de inhibición de los distintos tipos de flavonas sobre la actividad total de CYP1A descrito en la literatura, se espera que la aplicación de un tratamiento con la flavona sencilla también inhibirá la actividad total de CYP1A hepático en el modelo *in vivo* de *Rattus norvegicus*.

6. 2 Objetivos

- Evaluar el efecto de la flavona en la inhibición de CYP1A1 en microsomas hepáticos de rata.
- Evaluar el efecto de la flavona en la inhibición de CYP1A2 en microsomas hepáticos de rata.

6. 3 Resultados

Para investigar el efecto de la flavona sobre la actividad catalítica de CYP1A en el hígado de rata, se compararon dos tratamientos; un grupo experimental con 80 mg/kg de flavona con respecto al grupo Control.

6. 3. 1 Reacción de *O*-desalquilación de la etoxirresorufina con CYP1A1 por flavona

La actividad enzimática de CYP1A1 se analizó a través del cambio de la etoxirresorufina a resorufina (Figura 9A). En la Figura 9 se presentan los resultados de la actividad de CYP1A1. El grupo control mostró un valor basal de actividad de 10 ± 4.643396 pmol de resorufina por mg por min^{-1} para esta isoforma. El grupo de flavona (50 ± 4.643396 pmol de resorufina por mg por min^{-1}) mostró un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la tasa de formación de resorufina, de aproximadamente 4 veces, respecto al grupo control.

6. 3. 2 Reacción de *O*-desalquilación de la metoxirresorufina con CYP1A2 por flavona

La actividad enzimática de CYP1A2 se avaluó a través del cambio de la metoxiresorufina a resorufina con la reacción de la *O*-desalquilación (Figura 9C). En la Figura 9C se presentan los resultados de la actividad de CYP1A2. En el grupo control se observó un valor basal de actividad de 5 ± 1.766686 pmol de resorufina por mg por min^{-1} para esta isoforma. En el grupo flavona (9 ± 1.658164 pmol de resorufina por mg por min^{-1}) se observó cerca el doble de producción de resorufina respecto al control, siendo un incremento significativo ($p \leq 0.05$).

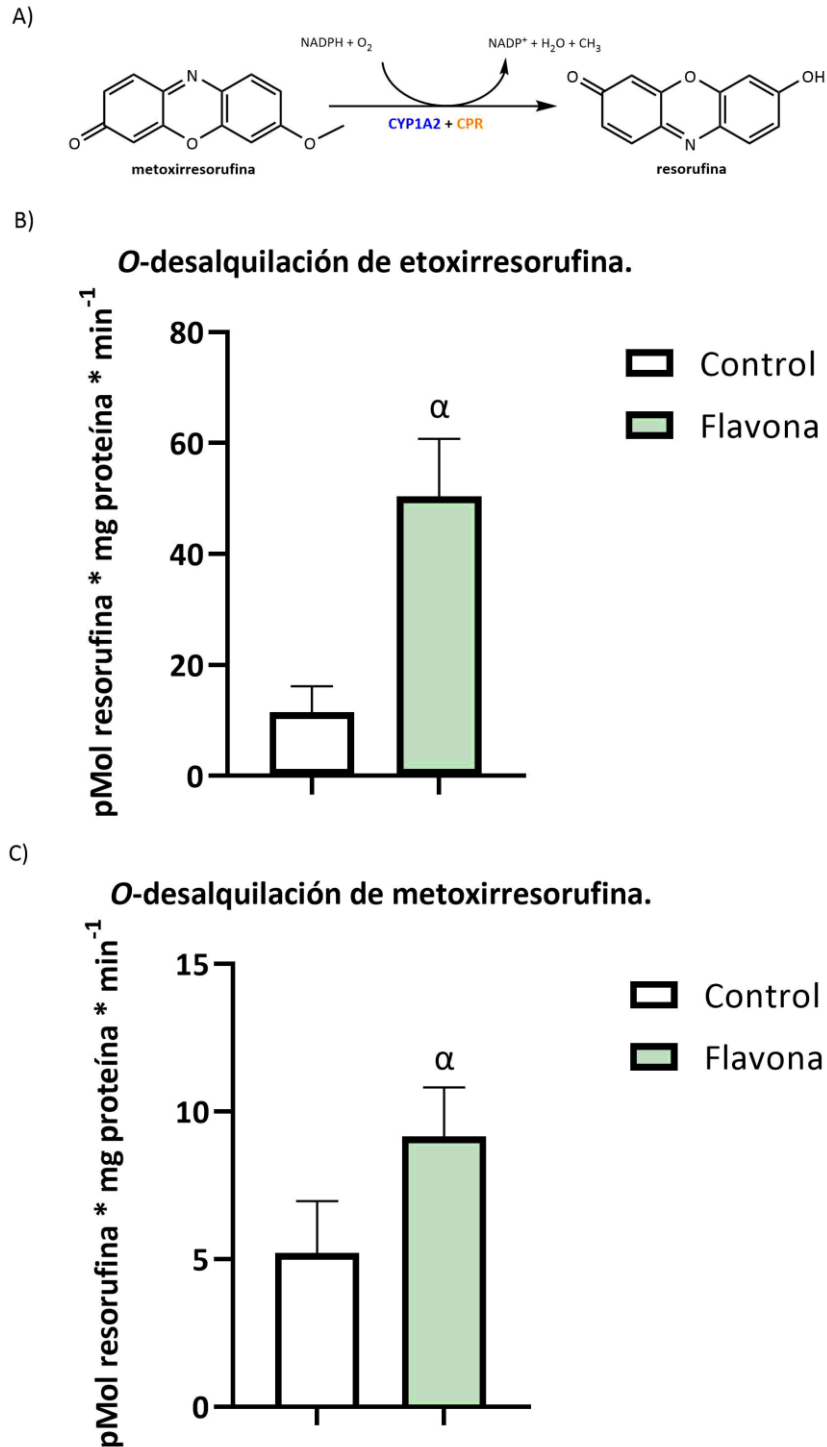


Figura 9. A) Esquema de la reacción de la *O*-desalquilación de la metoxirresorufina a resorufina por CYP1A2 en microsomas de hígado de rata. B) Efecto del tratamiento con flavona (80 mg/kg) en la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina por CYP1A1 y C) Efecto del tratamiento con flavona (80 mg/kg) en la *O*-desalquilación de la metoxirresorufina por CYP1A2. Cada barra corresponde al promedio de 3 lecturas de 4 ratas \pm E.E. α $P \leq 0.05$ respecto al control. α = diferente vs Control.

6. 4 Conclusión

- El tratamiento con flavona aumenta la actividad total de CYP1A en modelo *in vivo* en microsomas de hígado en *R. norvegicus*, probablemente al inducir la expresión de CYP1A a través de AHR.

VII Experimento B

7. 1 Hipótesis

A consecuencia de los resultados de inducción de la actividad por parte de la flavona aunado a un posible efecto antagónico entre inducción de la transcripción e inhibición de la actividad total, se espera que al aplicar un tratamiento de B[a]P como inductor, así como un tratamiento combinado de flavona con B[a]P se observará una atenuación de la inducción enfocado en la actividad total de CYP1A hepático en un modelo *in vivo* de *R. norvegicus*.

7. 2 Objetivo

- Evaluar el efecto de la flavona en combinación con el B[a]P, sobre la inducción de la actividad total de CYP1A.

7. 3 Resultados

Para investigar el efecto de inducción observado de la flavona sobre la actividad total de CYP1A en microsomas de hígado de rata, se compararon dos tratamientos. Uno de inducción, al que se le administró 10 mg/kg de B[a]P y un grupo combinado con flavona más B[a]P, lo cual nos permitió obtener más información al observar el efecto dual de la flavona, tanto como inhibidor postraduccional como inductor transcripcional de *CYP1A*. Para ello se evaluó el efecto de la flavona en conjunto con dicho inductor conocido de *CYP1A*.

7. 3. 1 Reacción de *O*-desalquilación de la etoxirresorufina con *CYP1A1* por flavona/B[a]P

La actividad enzimática de *CYP1A1* se analizó a través del cambio de la etoxirresorufina a resorufina (Figura 10B). En la Figura 10B se presentan los resultados de la actividad de

CYP1A1. En el tratamiento con B[a]P (150 pMol de resorufina por mg por min⁻¹) se observó un aumento en la resorufina de 0.3 veces más en comparación con el grupo combinado de Flavona/B[a]P (C) ($p \leq 0.05$).

7. 3. 2 Reacción de *O*-desalquilación de la metoxirresorufina con CYP1A2 por flavona/B[a]P
La actividad enzimática de CYP1A2 fue analizada a través del cambio de la metoxirresorufina a resorufina. En la Figura 10C se presentan los resultados de la actividad de CYP1A1. En la comparación entre los grupos B[a]P y el tratamiento combinado Flavona/B[a]P se observaron valores estadísticamente similares de resorufina ($p \leq 0.05$), mostrando un nivel ligeramente mayor del grupo combinado sobre el tratamiento con B[a]P.

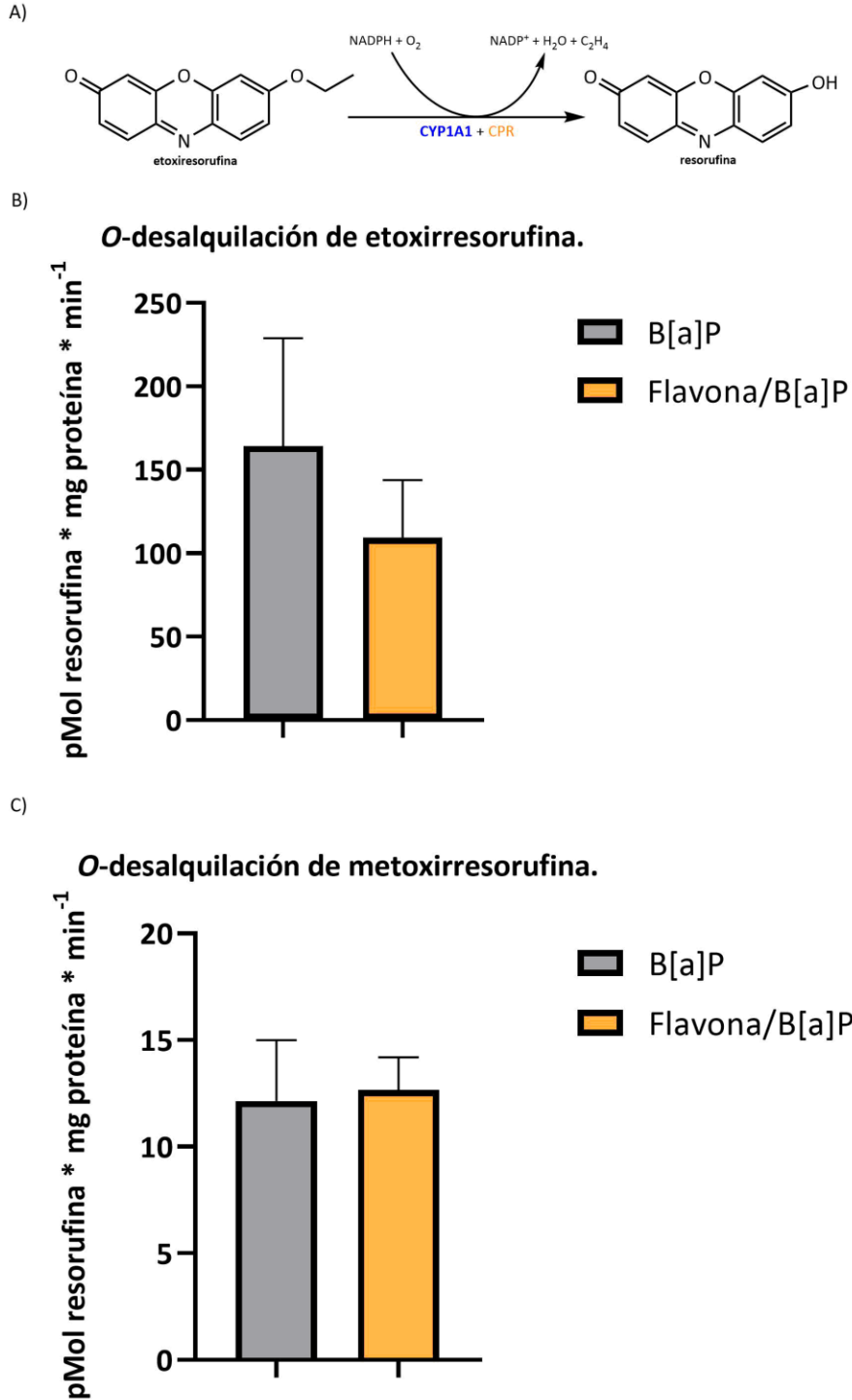


Figura 10. A) Esquema de la reacción de la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina a resorufina por CYP1A1 en microsomas de hígado de rata. El efecto de B[a]P (10 mg/kg) y la combinación de flavona/B[a]P, en B) la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina por CYP1A1; y en C) la *O*-desalquilación de la metoxirresorufina por CYP1A2. Cada barra corresponde al promedio de 3 lecturas de 4 ratas \pm E.E. $\alpha P \leq 0.05$ respecto al control. α = diferente vs Control.

7. 4 Conclusión

- El tratamiento con flavona en combinación con B[a]P atenuó la actividad total de CYP1A en el modelo *in vivo* de *R. norvegicus*.
- Se observa una tendencia de inducción de CYP1A1 de la flavona menor al de B[a]P.

VIII Experimento C

8. 1 Hipótesis

- Considerando que las flavonas sustituidas activan la expresión de CYP1A a través de AHR, asimismo que son ligandos de CYP1A, se espera que la flavona se acoplará tanto a CYP1A como a AHR en modelo *in silico* de *R. norvegicus*.

8. 2 Objetivo

- Proponer, mediante estudios de acoplamiento molecular, los modos de interacción entre:
 - ◆ La flavona y el AHR de rata.
 - ◆ La flavona y las isoformas de CYP1A de rata.

8. 3 Resultados

Se evaluaron las interacciones entre la flavona y las isoformas de CYP1A de las especies humano y rata, junto con la interacción flavona con AHR, para que, de acuerdo con los resultados obtenidos, proponer la factibilidad de dichas interacciones. Se realizaron estudios de acoplamiento molecular siguiendo varias pruebas. Primero, entre la flavona con las isoformas de CYP1A y AHR humano (Anexo III) y luego, con sus homólogos de rata. Por simplicidad, los resultados del acoplamiento se muestran con solamente los aminoácidos de interacción con el ligando (Figuras 11 a 13).

8. 3. 1 Estudios de acoplamiento molecular

En el acoplamiento entre CYP1A1 de rata con flavona se observó la unión del ligando en el sitio catalítico junto al grupo hemo (Figura 11). Esta unión se logra a través de la interacción

hidrofóbica (IH) con 5 residuos de aminoácidos (Thr-126, Phe-228, -262, -323, Ala-321), cada uno con una IH, excepto Phe262 que presenta dos. También se observó que en los residuos Phe 228 y 127 presentan apilamiento de anillos aromáticos, el primero con los anillos A y C, mientras que el segundo con el anillo B de la flavona. La estructura planar de la flavona presenta una leve rotación en su enlace C2-C1', cuya conformación presenta la estructura energética más favorable de -12.20 kcal/mol.

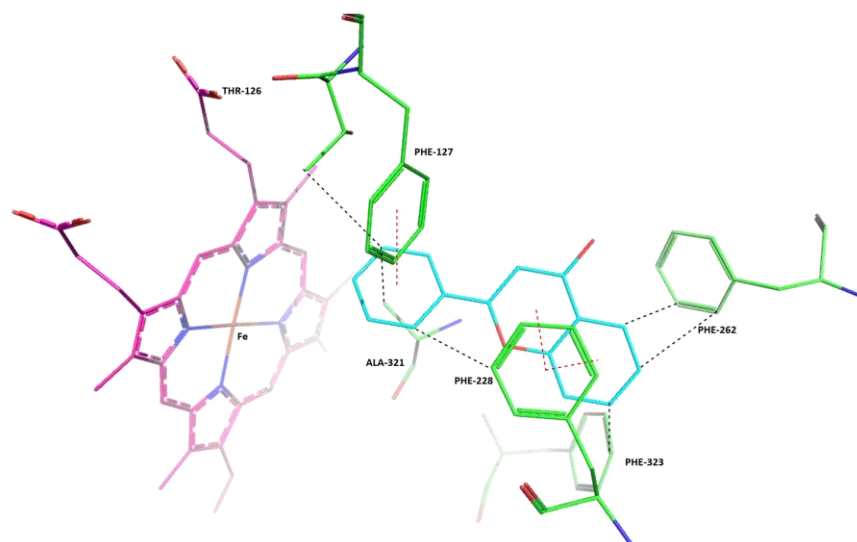


Figura 11. Acoplamiento entre CYP1A1 de rata con flavona. Rosa: grupo hemo; azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; líneas negras punteadas: interacción hidrofóbica; líneas rojas punteadas: apilamiento de anillos aromáticos.

La Figura 12 muestra los resultados del acoplamiento entre CYP1A2 de rata con flavona. Se observó la unión del ligando en el sitio catalítico junto al grupo hemo. La unión se logra a través de la IH con 8 residuos de aminoácidos (Ile-384, Thr-123, Leu-495, Phe-124, 225, 255, 259 y Ala-315), entre los que destacan Phe 255 y 259, ambos con dos IH con el anillo B de la flavona; mientras que con Phe-225 se observó una IH con el anillo C y un apilamiento de anillo aromático con el anillo B de la flavona. La estructura de la flavona conserva su forma planar, sin rotación en el enlace C2-C1', adoptando la conformación energéticamente más favorable de -12.10 kcal/mol.

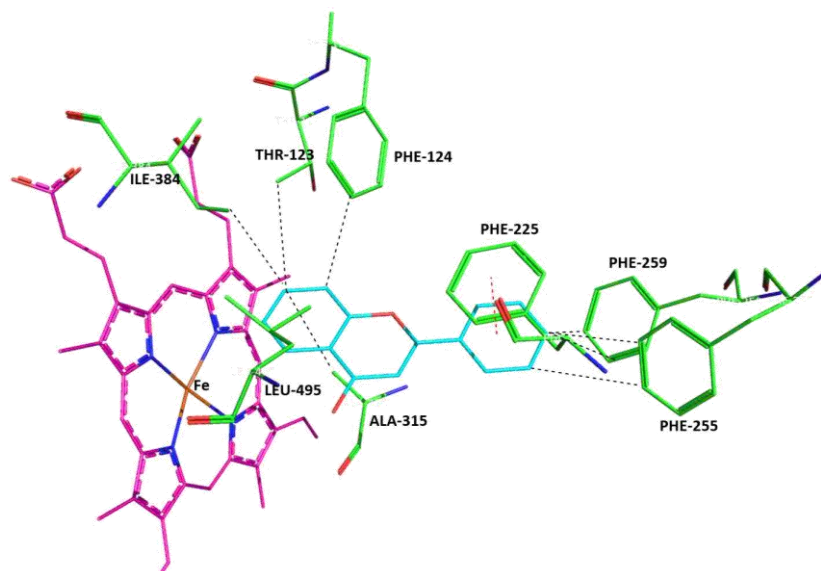


Figura 12. Acoplamiento entre CYP1A2 rata con flavona. Rosa: grupo hemo; azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; líneas negras punteadas: interacción hidrofóbica; líneas rojas punteadas: apilamiento de anillos aromáticos.

En la figura 13 se muestra el acoplamiento entre AHR de rata con flavona donde se observaron IH de 7 residuos de aminoácidos (Ile-152, Ala-78, Phe-55, 82, Tyr-75, 135, 122 y Pro-54) con la flavona cuyo enlace C2-C1' que conecta con el anillo B presenta una torsión oblicua respecto al resto de la molécula, formando una unión de -8.00 kcal/mol con AHR.

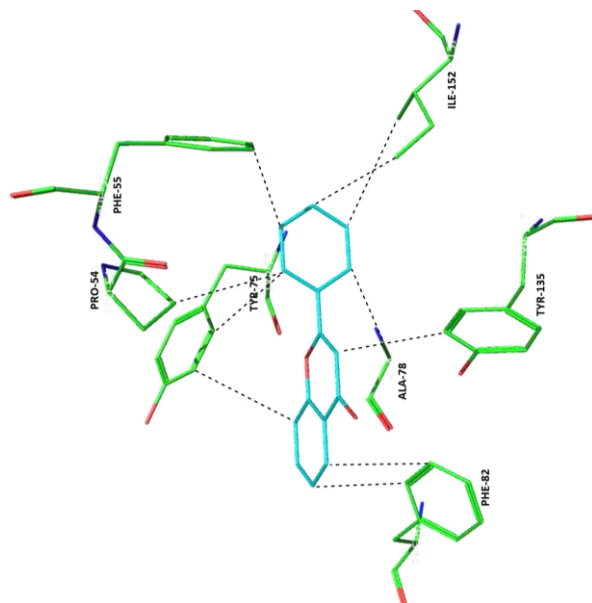


Figura 13. Acoplamiento entre AHR de rata con flavona. Azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; línea punteada: interacciones hidrofóbicas.

IX Discusión

Las flavonas son metabolitos presentes en una gran diversidad de vegetales con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticarcinogénicas (14, 22, 24, 25). Se ha reportado que poseen la capacidad de modular la biotransformación de xenobióticos (25). La familia CYP1A biotransforma este tipo de metabolitos que, por su participación en la formación de carcinógenos, así como en la inducción de resistencia a fármacos por la inactivación de agentes quimioterapéuticos es que han atraído el interés en diversos estudios (9, 13). Los sustratos de los CYP1A son ligandos del AHR que al activarse tiene efectos diversos, como la de iniciar un proceso de activación de procarcinógenos que inducen la expresión de *CYP1A* y, en consecuencia, propiciar el desarrollo de cáncer en tejidos específicos (8, 13). El B[a]P es un PAH con efectos carcinogénicos y un potente inductor transcripcional de *CYP1A*. Se forma por la combustión parcial de materia orgánica, como en alimentos cocinados en exceso y está presente en el escape de vehículos y en el humo de cigarro. En este trabajo se evaluó la inhibición de la actividad total de CYP1A1 y CYP1A2 en microsomas hepáticos de *R. norvegicus* después de un tratamiento con flavona y se comparó con B[a]P y cotratamientos de ambos. Los datos obtenidos de la reacción de *O*-desalquilación de la metoxirresorufina y la etoxirresorufina mostraron cambios notables en la actividad global de CYP1A, que coinciden con lo reportado en estudios previos.

Los grupos experimentales recibieron durante los tres días de tratamiento aceite de maíz como vehículo debido a su inocuidad, su facilidad de asimilación por el organismo experimental y porque no interfiere con el efecto de los demás tratamientos (46). En el grupo control se aplicaron únicamente dosis de aceite de maíz, obteniendo un valor basal de actividad de 10 pmol de resorufina por mg por min⁻¹ para la isoforma CYP1A1 y de 5 pmol de resorufina por mg por min⁻¹ para la isoforma CYP1A2, mostrando que ambas enzimas se expresan de forma constitutiva en condiciones fisiológicas controladas. El resultado fue diferente en el grupo tratado con flavona disuelta en aceite de maíz, donde se observó a través de la reacción de EROD y MROD, un aumento en la formación de resorufina para ambas isoformas de CYP1A. Lo anterior se puede interpretar como un incremento de

aproximadamente 5 veces en CYP1A1 y de casi el doble en CYP1A2 en comparación con el Control, posiblemente como consecuencia de un incremento en la inducción transcripcional de *CYP1A* por parte de la flavona. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la flavona sea un ligando de AHR de rata que induce la expresión de *CYP1A*, aumentando la cantidad de enzima funcional en el grupo tratado, lo que correspondería con el incremento de la resorufina a partir de la reacción de la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina o de la metoxirresorufina catalizada por CYP1A1 y CYP1A2, respectivamente. Lo anterior encuentra soporte en los resultados de acoplamiento molecular entre la flavona y el AHR de rata, donde se obtuvieron energías de afinidad de -8.00 kcal/mol que, de acuerdo con la ecuación de la energía libre de Gibbs, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ para condiciones de temperatura, presión y de sistemas biológicos constantes, donde los valores más negativos son más favorables para que ocurra la reacción. También es posible que la flavona se una a CYP1A y bloquee el sitio catalítico, inhibiendo parcialmente su función en la formación de resorufina en la *O*-desalquilación de la etoxirresorufina. Los resultados del acoplamiento muestran que la energía de afinidad entre flavona y CYP1A1 de rata fue de -12.20 kcal/mol, semejante a lo obtenido en otros estudios de acoplamiento entre flavona con CYP1A1 de humano ⁽⁴⁸⁾. Dado que esta energía de afinidad es mayor a la obtenida entre flavona y AHR, la posible inhibición de CYP1A sería más factible. Sin embargo, los resultados corresponden a un aumento de la actividad total de CYP1A, probablemente la localización diferencial de las proteínas implicadas sea un factor a favor de que estos resultados se inclinaran hacia la inducción transcripcional sobre la actividad enzimática, ya que AHR se encuentra en el citosol, mientras que los CYP1A se encuentran como proteínas transmembranales de retículo endoplasmático liso. No obstante, y en contraste con los resultados, se ha reportado que otras flavonas, como galangina, miricetina ^(28, 29) crisina, apigenina, ^(7, 30, 31) y luteolina ^(7, 33), inhiben la actividad catalítica de CYP1A en diferentes modelos experimentales *in silico*, probablemente a causa de las diferencias estructurales de grupos sustituyentes, como hidroxilación y metilación, particulares de cada tipo de flavona. Por lo tanto, contrario a lo esperado en nuestra hipótesis, en los resultados experimentales se

observó un incremento, en vez de una inhibición, de la actividad global de CYP1A en microsomas de hígado de rata después de un tratamiento con flavona.

Al observar el aumento de la actividad total de CYP1A como resultado del tratamiento con flavona, se evaluó qué tan potente sería el efecto inductor de este flavonoide al compararlo con un tratamiento con B[a]P. En el grupo tratado con una dosis única de B[a]P disuelto en aceite de maíz se observó un aumento en la formación de resorufina, catalizada por CYP1A1, que corresponde a una inducción de la actividad de aproximadamente 14 veces en comparación con la observada en el grupo Control, como era de esperarse como control positivo, así como un aumento de la resorufina de 0.6 veces, en comparación con el grupo combinado Flavona/B[a]P. Sin embargo, es posible que la inducción observada de CYP1A por B[a]P, así como el potencial inductor de B[a]P en general, se haya debido a una inducción estimulada por alguno de sus metabolitos hidroxilados como 3-hidroxi-benzo[a]pireno (3-OH-B[a]P), 7-hidroxi-benzo[a]pireno (7-OH-B[a]P), 9-hidroxi-benzo[a]pireno (9-OH-B[a]P); o metabolitos glucorinados como B[a]P 3-O-G, B[a]P 7-O-G, B[a]P 9-O-G), ya que se ha reportado que estos metabolitos formados también inducen la transcripción de *CYP1A* a través de AHR en línea celular del epitelio oral humano, probablemente causando un segundo ciclo de inducción transcripcional, semejante a un efecto de retroalimentación positiva ⁽⁵¹⁾.

Con respecto al efecto sobre CYP1A2 en la reacción de la *O*-deasquilación de la metoxirresorufina, se observó un aumento de poco más del doble en comparación con el Control, menor a lo observado con CYP1A1. Es posible fundamentar lo anterior porque CYP1A1 es la principal isoforma que biotransforma al B[a]P en sus metabolitos hidroxilados, como el *benzo[a]piyrene diol epoxide* (BPDE) ⁽⁹⁾. En su defecto, dicha variación puede ser atribuible a diferencias interindividuales en los organismos experimentales, o bien, por alteración fisiológica del organismo a causa de estrés, ya que se ha reportado que la administración intraperitoneal podría tener efectos de irritación por las inyecciones, o por

la aplicación de volúmenes de sustancia demasiado grandes, con relación con el peso individual del organismo, que suelen distender el abdomen y provocar malestar ⁽⁴⁹⁾.

En lo referente al tratamiento combinado con flavona y una dosis de B[a]P, se observó un aumento de la resorufina, catalizada por CYP1A1, que corresponde a un incremento de aproximadamente 10 veces más a lo obtenido en el Control. Sin embargo, si comparamos este aumento con lo observado en el tratamiento con flavona, así como en el tratamiento con B[a]P, se podría esperar un efecto sinérgico en el grupo combinado Flavona/B[a]P, dado que ambos sustratos indujeron la actividad de CYP1A1. Diferente a lo esperado, se observó un valor intermedio entre los niveles de resorufina formada entre los grupos de Flavona y en el grupo de B[a]P. Una vez más, esta hipótesis se sostiene si comparamos las energías de afinidad obtenidas por las pruebas de acoplamiento con AHR, donde se muestra que puede haber unión entre flavona y AHR de humano y entre flavona y AHR de rata con energías de afinidad de -8.10 y -8.00 Kcal/mol, respectivamente; y que presentarían una afinidad ligeramente menor a la obtenida en el acoplamiento entre B[a]P y AHR de -8.60 kcal/mol, lo que sugiere que en efecto la flavona se une a AHR y que posiblemente exista inhibición competitiva con B[a]P por el receptor. Conociendo que el B[a]P induce la expresión del mRNA de *CYP1A* al activar la vía de AHR ^(7, 9, 14, 16), en este mismo sentido, existen reportes de otras flavonas, como apigenina, baicalenina, chrysin, diosmetina, daidzeina, galangina, genisteína y quercitina, que incrementan la transcripción de *CYP1A* a través de la activación de AHR ⁽³¹⁾. Aunado a lo anterior, y en conjunto con los resultados de actividad que se reportan, se señala la posibilidad de que la flavona menos compleja, sin grupos sustituyentes, se acople al AHR e induzca la vía de expresión del mRNA de *CYP1A* y, en consecuencia, aumente la cantidad de enzima en microsomas de hígado de rata, e inclusive podría fomentar la biotransformación de otros xenobióticos. Dicho aumento en la concentración también podría haberse reflejado en los ensayos de EROD y MROD, ya que, al existir mayor cantidad de enzima, habría mayor cantidad de resorufina, y en consecuencia actividad total de CYP1A. Por otra parte, en lo que refiere a la unión entre flavona y CYP1A, los resultados del acoplamiento mostraron que la energía de afinidad entre flavona y

CYP1A1 de rata fue de -12.20 kcal/mol, que en comparación con la energía de -15.7 kcal/mol entre B[a]P y CYP1A1 de rata, señalando que este efecto interesante puede atribuirse a una inhibición competitiva entre estas dos sustancias por el sitio catalítico de CYP1A1 dentro de los organismos experimentales, durante el tiempo de inducción a lo largo del día 4, que probablemente haya sucedido en favor del B[a]P debido a su mayor afinidad por la enzima.

Respecto a lo obtenido con la isoforma CYP1A2 en el grupo Flavona/B[a]P, se observó un aumento de resorufina producida por CYP1A2, que corresponde a una inducción en su actividad de casi el triple respecto al Control. No obstante, no parece observarse un efecto de inhibición competitiva de la enzima por los sustratos, como en el caso de CYP1A1; además de que el nivel de resorufina es semejante al del grupo tratado únicamente con B[a]P. Estos resultados pueden deberse a la inducción inesperadamente baja en el grupo de B[a]P en esta isoforma que, como se ha discutido, no manifestó su verdadero poder catalítico, o bien, por una inducción diferencial de la flavona para cada isoforma. Esto último es probable si tomamos en cuenta que se ha reportado que existen *clusters* de CYP: CPR en una proporción 20:1 en microsomas de hígado de rata ⁽⁵²⁾, lo que sugiere la existencia de una dinámica de reacciones limitadas en función de la presencia o ausencia de CPR disponibles. Aunado a lo anterior, es posible la presencia de diferentes isoformas en estos *clusters*, que varían en cantidad dependiendo del tejido u organismo, como es el caso del CYP1A2, que solo se encuentra mayormente en tejido hepático ⁽⁸⁾, lo que podría ser la causa de los niveles diferenciados de resorufina en los grupos experimentales. Adicionalmente, existe la posibilidad de que la activación de AHR por flavona induzca vías de señalización alternas como la actividad de miembros de NF-κB, receptores de estrógeno, funciones de respuesta inmune, células troncales, cáncer, entre otros ⁽³⁹⁾. Así como procesos celulares como migración y diferenciación ^(47, 48, 50).

X Conclusiones

- El tratamiento con flavona provocó un incremento en la actividad total de CYP1A en el modelo *in vivo* en microsomas de hígado en *R. norvegicus*, lo cual posiblemente se debe a la inducción de la expresión de *CYP1A* a través de AHR.
- El tratamiento con flavona provocó una disminución en la actividad total de CYP1A cuando se administró en combinación con B[a]P en el modelo *in vivo* de *R. norvegicus*.
- Se observa una tendencia de inducción de CYP1A1 de la flavona menor al de B[a]P.
- A partir de los estudios de acoplamiento molecular, se propone que la flavona es un ligando de las enzimas CYP1A de *R. norvegicus*.
- A partir de los estudios de acoplamiento molecular, se propone que la flavona es ligando del AHR de *R. norvegicus* e induce la transcripción de *CYP1A*.

XI Perspectivas

- Evaluar la toxicidad de la flavona con diversas concentraciones en modelo de *R. norvegicus*.
- Evaluar la cantidad de mRNA de CYP1A después de la administración de flavona en *R. norvegicus*.
- Evaluar los efectos de la flavona en la actividad catalítica de CYP1B1 de *R. norvegicus*.
- Evaluar el efecto de la flavona en la actividad y la toxicidad en otros tejidos relacionado con la biotransformación de xenobióticos, como pulmón e intestino.
- Evaluar los efectos de la flavona en procesos celulares de diferenciación celular al activar al AHR en modelo *in vivo*.

XII Referencias

- 1.- Li, Y., Meng, Q., Yang, M., Liu, D., Hou, X., Tang, L., Wang, X., Lyu, Y., Chen, X., Liu, K., Yu, A. M., Zuo, Z., & Bi, H. (2019). Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 9(6), 1113–1144. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.10.001>.
- 2.- Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current drug targets*, 19(1), 38–54. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170125144557>
- 3.- Liu, X., Zhu, X., Wang, H., Liu, T., Cheng, J., & Jiang, H. (2020). Discovery and modification of cytochrome P450 for plant natural products biosynthesis. *Synthetic and systems biotechnology*, 5(3), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.06.008>
4. Goodsell D. S. (2001). The molecular perspective: cytochrome P450. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 19(3), 263–264. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-3-263>
5. Li, Z., Jiang, Y., Guengerich, F. P., Ma, L., Li, S., & Zhang, W. (2020). Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *The Journal of biological chemistry*, 295(3), 833–849. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.008758>.
- 6.- Fujii-Kuriyama, Y., & Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.162>
- 7.- Santes-Palacios, R., Ornelas-Ayala, D., Cabañas, N., Marroquín-Pérez, A., Hernández-Magaña, A., Del Rosario Olguín-Reyes, S., Camacho-Carranza, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Regulation of Human Cytochrome P4501A1 (hCYP1A1): A Plausible Target for Chemoprevention?. *BioMed research international*, 2016, 5341081. <https://doi.org/10.1155/2016/5341081>

- 8.- Nebert, D. W., Dalton, T. P., Okey, A. B., & Gonzalez, F. J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of biological chemistry*, 279(23), 23847–23850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400004200>
- 9.- Dong, J., Zhang, Q., Cui, Q., Huang, G., Pan, X., & Li, S. (2016). Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem*, 11(19), 2102–2118. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600316>
- 10.- Guengerich, F. P. (2015). Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Fourth Edition* (pp. 523–785). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12108-6_9
- 11.- Lu, J., Shang, X., Zhong, W., Xu, Y., Shi, R., & Wang, X. (2020). New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 10(1), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.11.016>
- 12.- Walsh, A. A., Szklarz, G. D., & Scott, E. E. (2013). Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism. *The Journal of biological chemistry*, 288(18), 12932–12943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452953>
- 13.- Bock K. W. (2014). Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system. *Biochemical pharmacology*, 90(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.04.009>
- 14.- Yang, T., Feng, Y. L., Chen, L., Vaziri, N. D., & Zhao, Y. Y. (2019). Dietary natural flavonoids treating cancer by targeting aryl hydrocarbon receptor. *Critical reviews in toxicology*, 49(5), 445–460. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1635987>
- 15.- Androutsopoulos, V. P., & Tsatsakis, A. M. (2014). Benzo[a]pyrene sensitizes MCF7 breast cancer cells to induction of G1 arrest by the natural flavonoid eupatorin-5-methyl ether, via activation of cell signaling proteins and CYP1-mediated metabolism. *Toxicology letters*, 230(2), 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.08.005>

- 16.- Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., & Coumoul, X. (2018). AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie open*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2018.05.001>
- 17.- Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama S, et al. β -carotene and retinol reduce benzo[a]pyrene-induced mutagenicity and oxidative stress via transcriptional modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cell line. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2018 Mar;25(7):6320-6328. DOI: 10.1007/s11356-017-0977-z. PMID: 29247416.
- 18.- Jin, U. H., Park, H., Li, X., Davidson, L. A., Allred, C., Patil, B., Jayaprakasha, G., Orr, A. A., Mao, L., Chapkin, R. S., Jayaraman, A., Tamamis, P., & Safe, S. (2018). Structure-Dependent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activities by Flavonoids. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 164(1), 205–217. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy075>
- 19.- Ciolino, H. P., Wang, T. T., & Yeh, G. C. (1998). Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer research*, 58(13), 2754–2760.
- 20.- Zhai, S., Dai, R., Friedman, F. K., & Vestal, R. E. (1998). Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 26(10), 989–992.
- 21.- Guo, Y., Sun, Q., Wu, F. G., Dai, Y., & Chen, X. (2021). Polyphenol-Containing Nanoparticles: Synthesis, Properties, and Therapeutic Delivery. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.), 33(22), e2007356. <https://doi.org/10.1002/adma.202007356>
- 22.- Guven, Hulya & Arici, Aylin & Simsek, Oguzhan. (2019). Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. 10.30621/jbachs.2019.555.
- 23.- Yonekura-Sakakibara, K., Higashi, Y., & Nakabayashi, R. (2019). The Origin and Evolution of Plant Flavonoid Metabolism. *Frontiers in plant science*, 10, 943. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00943>

- 24.- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(2), 123–152. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.758083>
- 25.- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- 26.- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- 27.- Busbee, P. B., Rouse, M., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. S. (2013). Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition reviews*, 71(6), 353–369. <https://doi.org/10.1111/nure.12024>
- 28.- Ye, M., Xu, M., Fan, S., Zhang, M., Zhou, B., Yang, S., Wei, W., Ji, C., Ji, J., & Ji, F. (2020). Protective effects of three propolis-abundant flavonoids against ethanol-induced injuries in HepG2 cells involving the inhibition of ERK1/2-AHR-CYP1A1 signaling pathways. *Journal of Functional Foods*, 73(July), 104166. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104166>
- 29.- Jee, S. C., Kim, M., Kim, K. S., Kim, H. S., & Sung, J. S. (2020). Protective effects of myricetin on benzo[a]pyrene-induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and BPDE-DNA adduct. *Antioxidants*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antiox9050446>
- 30.- Lautraite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O., & Chipman, J. K. (2002). Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*, 17(1), 45–53. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.1.45>
- 31.- Bajraktari, G., & Weiss, J. (2020). The aglycone diosmetin has the higher perpetrator drug-drug interaction potential compared to the parent flavone diosmin. *Journal of Functional Foods*, 67, 103842.
- 32.- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y.H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 1197 - 1238.

- 33.- López-Lázaro M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(1), 31–59. <https://doi.org/10.2174/138955709787001712>
- 34.- Ávila-Rosales, O. S., Díaz-Muñoz, M., Camacho-Carranza, R., Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., García-Rebollar, J. O., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2021). Daytime Restricted Feeding Modifies the Temporal Expression of *CYP1A1* and Attenuated Damage Induced by Benzo[a]pyrene in Rat Liver When Administered before *CYP1A1* Acrophase. *Toxics*, 9(6), 130. <https://doi.org/10.3390/toxics9060130>
- 35.- 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, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- 36.- Burke, M. D., & Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2(6), 583–588.
- 37.- Wilms, L. C., Hollman, P. C., Boots, A. W., & Kleinjans, J. C. (2005). Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutation research*, 582(1-2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.01.006>
- 38.- Lautraite, S., Musonda, A. C., Doehmer, J., Edwards, G. O., & Chipman, J. K. (2002). Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing *CYP1A2* and *CYP1A1*. *Mutagenesis*, 17(1), 45–53. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.1.45>
- 39.- Jee, S. C., Kim, M., Kim, K. S., Kim, H. S., & Sung, J. S. (2020). Protective Effects of Myricetin on Benzo[a]pyrene-Induced 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and BPDE-DNA Adduct. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(5), 446. <https://doi.org/10.3390/antiox9050446>

- 40.- Guyot, E., Chevallier, A., Barouki, R., & Coumoul, X. (2013). The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug discovery today*, 18(9-10), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.11.014>
- 41.- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- 42.- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- 43.- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic acids research*, 49(W1), W530–W534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.
- 44.- Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., & Johnson, E.F. (2007). Adaptations for the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exhibited by the Structure of Human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14348 - 14355.
- 45.- Nukaya, M., & Bradfield, C. A. (2009). Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochemical pharmacology*, 77(4), 654–659. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.026>.
- 46.- Dupont, J., White, P. J., Carpenter, M. P., Schaefer, E. J., Meydani, S. N., Elson, C. E., Woods, M., & Gorbach, S. L. (1990). Food uses and health effects of corn oil. *Journal of the American College of Nutrition*, 9(5), 438–470. <https://doi.org/10.1080/07315724.1990.10720403>.
- 47.- Tomkiewicz C, Herry L, Bui LC, Métayer C, Bourdeloux M, Barouki R, Coumoul X. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. (2013) *Oncogene*. Apr;32(14) 1811-1820. doi:10.1038/onc.2012.197. PMID: 22665056.

- 48.- Santes-Palacios, R., Marroquín-Pérez, A. L., Hernández-Ojeda, S. L., Camacho-Carranza, R., Govezensky, T., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2020). Human CYP1A1 inhibition by flavonoids. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 62, 104681. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104681>.
- 49.- Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C., & European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of applied toxicology : JAT*, 21(1), 15–23. <https://doi.org/10.1002/jat.727>.
- 50.- Gagliani, N., Amezcua Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limón, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., ... Flavell, R. A. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 523(7559), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature14452>.
- 51.- Almahmeed, T., Boyle, J. O., Cohen, E. G., Carew, J. F., Du, B., Altorki, N. K., Kopelovich, L., Fang, J. L., Lazarus, P., Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A. J. (2004). Benzo[a]pyrene phenols are more potent inducers of CYP1A1, CYP1B1 and COX-2 than benzo[a]pyrene glucuronides in cell lines derived from the human aerodigestive tract. *Carcinogenesis*, 25(5), 793–799. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh078>.
- 52.- Peterson, J. A., Ebel, R. E., O'Keeffe, D. H., Matsubara, T., & Estabrook, R. W. (1976). Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. A model for NADPH-cytochrome P-450 reductase:cytochrome P-450 interaction. *The Journal of biological chemistry*, 251(13), 4010–4016.

XIII Anexos

A-I Estudios de acoplamiento molecular.

Programas utilizados para realizar el acoplamiento molecular.

1) PyMOL: Permite visualizar las estructuras tridimensionales de las macromoléculas.

- Descargar en <https://pymol.org/2/>
- Tramitar licencia de uso educativo en <https://pymol.org/edu/?q=educational/>

2) Vina de AutoDock Tools 1.5.6.

- Descargar en <https://vina.scripps.edu/downloads/>

Tabla A1. Procedimiento para realizar una prueba de acoplamiento molecular.	
Paso 1. Obtención de la estructura tridimensional de las proteínas de interés.	Paso 2. Obtención de la estructura tridimensional de los ligandos (compuestos a evaluar).
-Ingresar al Protein Data Bank (PDB) en https://www.rcsb.org/ -Realizar la búsqueda de la proteína de interés. -Dar click en el número de identificación de la proteína. -Click en Download files -> guardar como PDB Format.	-Ingresar a ChemSpider en: http://www.chemspider.com/ -Realizar la búsqueda de los compuestos de interés. -Click en el número de identificación del compuesto. -Click en ícono para guardar la estructura como formato (.mol)
Paso 3. Convertir archivos de mol a mol2 para ligandos.	Paso 4. Generar archivos pdbqt para ligandos.
-Abrir el programa PyMOL. -Skip activation -File -> Open -> Escoger archivo mol -File -> Export molecule -> Save -Nombrar con formato (.mol2) -Guardar en <i>carpeta de estructuras</i> .	-Abrir AutoDock Tools. -Ligand -> Input -> Open -> Selec archivo mol2 -Ligand -> Torsion tree -> Detect root -Ligand -> Output -> Save as PDBQT Guardar en formato (.pdbqt) en <i>carpeta de estructuras</i> .
Paso 5. Modificar pdb.	Paso 6. Generar archivos pdbqt para proteínas.
-Abrir PyMOL. -Skip activation -File -> Open -> Escoger archivo pdb -Display -> Secuence -Seleccionar con el cursor 00000, ligandos NO HEM, otras cadenas. -Click derecho -> Remove -File -> Export molecule -> Save -Nombrar con formato (.pdb) -Guardar en <i>carpeta de estructuras</i> .	-Abrir AutoDock tools. -Grid -> Macromolecule -> Open -> Selec pdb de proteína -Guardar con formato (.pdbqt) en <i>carpeta de estructuras</i> . -Grid -> Grid box -Anotar valores de x center, y center, z center Cerrar
Paso 7. Docking.	Paso 8. Inspeccionar en PyMOL los modos de unión.
-Abrir símbolo del sistema -Ubicarse en la carpeta de estructuras.	-File -> Open -> Seleccionar <i>ligand_out.pdbqt</i> -File -> Open -> Seleccionar archivo pdb de la proteína

<p>-Usar los comandos: <code>.\vina.exe --center_x -19.52 --center_y 24.003 --center_z 13.086 --size_x 44 --size_y 44 --size_z 44 --ligand Dcatequina.pdbqt --receptor CYP3A4.pdbqt</code></p> <p>-Anotar en excel los valores de afinidad para los 3 primeros modos de unión.</p> <p>-El programa generará un archivo <i>ligand_out.pdbqt</i> en la <i>carpeta de estructuras</i>.</p>	<p>-Con las flechas del teclado observar los modos de unión.</p>
<p>Paso 9. Análisis de resultados en AutoDock tolos.</p>	<p>Paso 10. Análisis de resultados en AutoDock tools y Maestro.</p>
<p>-Abrir AutoDock Tools.</p> <p>-Analyze -> Docking -> Open AutoDock vina result -> Seleccionar <i>ligand_out.pdbqt</i></p> <p>-Load models as a single molecule with multiple conformations -> OK</p> <p>-Analyze -> Macromolecule -> Open -> Seleccionar <i>receptor.pdbqt</i></p> <p>-Seleccionar R y quitar L</p> <p>-Analyze -> Dockings -> Show Interactions</p> <p>-Marcar puentes de hidrógeno</p> <p>-Anotar aminoácidos de interacción.</p>	<p>-Abrir Maestro</p> <p>-File -> Import structures -> Seleccionar archivo pdb de Autodock tools -> Import -> Ok</p> <p>-Edit -> 2D Sketcher</p> <p>-Añadir enlaces con la opción Draw -> Update entry File -> Import Structures -> Seleccionar archivo pdb de la proteína -> Import -> Ok</p> <p>-Posicionarse en el círculo azul del Entry List, junto al nombre de la proteína -> click derecho -> Fix in Workspace -> Dar click en el círculo del Entry List, -Seleccionar Ligand Interaction</p> <p>-Se abre 2D Workspace Ligand Interaction Diagram</p> <p>-Verificar que la estructura del ligando sea correcta</p> <p>-File, Save screenshot.</p>

A-II Datos estadísticos.

Tabla A2. Datos obtenidos de actividad específica de CYP1A1 (pmol/mg proteína * min). *			
Control	Flavona	B[a]P	Flavona-B[a]P
12.3577 ± 0.216	43.0450 ± 3.330	69.7234 ± 4.348	91.8861 ± 5.628
17.2076 ± 1.171	49.8433 ± 1.619	214.1458 ± 1.675	153.7365 ± 8.739
10.5792 ± 0.986	65.2434 ± 2.790	191.7269 ± 4.509	73.5860 ± 7.044
5.9749 ± 0.409	43.3475 ± 1.558	181.8710 ± 10.371	117.5180 ± 4.598

Tabla A3. Datos obtenidos de actividad específica de CYP1A2 (pmol/mg proteína * min). *			
Control	Flavona	B[a]P	Flavona-B[a]P
6.0968 ± 0.624	10.0354 ± 0.462	7.8867 ± 0.745	12.7645 ± 0.917
7.2450 ± 0.287	8.5024 ± 0.463	13.8315 ± 1.178	12.2302 ± 0.774
3.9462 ± 0.435	10.9253 ± 0.564	13.0441 ± 2.593	10.9722 ± 0.719
3.5251 ± 0.490	7.1767 ± 0.505	13.7904 ± 1.181	14.6529 ± 0.368

*Cada valor corresponde al promedio de 3 lecturas de 4 ratas \pm E.E. α P \leq 0.05 respecto al control.

A-III Secuencia de aminoácidos para las isoformas de CYP1A

Tabla A4. Secuencia de aminoácidos para las isoformas de CYP1A
CYP1A1 humano
MLFPI SMSATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGWP LIGHMLTLGKNPHLALS RMSQQYGDV LQIRIGSTPVVVL SGLD TIRQALVRQGD DFKGRPDLYTFTLISNGQSMSFSPD SGPVWAARRRLAQNGLKSF S IASDPASSTSCYLEEHVSKEAEVL ISTLQELMAGPGHFN PYRYVVSV TNVICAICFGRRYDHNHQLLSLVN LNNNFGEVVGSGNPADFIPI LRYPNPSLNAFKDLNEKFYSFMQKMKVKEHYKT FEKGHIRDITDSLIEHCQEKQLDENANVQLSDEKI INIVLDLFGAGFDTVTTAISWSLMYLV MNPRVQRKIQEELDTVIGRSRRPRLSDRSHLPYMEAFI LETFRHSSFPFTIPHSTTRDTS LKGFYIPKGRCVFVNQWQINHDQKLWVNPSEFLPERFLT PDGAIDKVLSEKVIIFGMGKRKCIGETIARWEVFLFLAILLQ RVEFSVPLGVKVDMTPIYGLTMKHACCEHFQMQLR S
CYP1A1 rata
MPSVYGFPAFTSATELLAVTTFC LGFWVVRVTRTWVPKGLKSP PGWGLPFIGHVLT LGKNPHLSLTKLSQQYGDV LQIRIGSTPVVVL SGLNTIKQALVKQGD DFKGRPDLYSFTLIANGQSMTFNPDSGPLWAARRRLAQNALKSFSIASDPTLASSCYLEEHVSKEAEYLI SKFQKLM AEVGHFDPFKYLVVSVANVICAICFGRRYDHDDQELLSIVNLSNEFGEV TSGYPADFIPI LRYPNPSLDAFKDLNKKFY SFMKKL I KEHYRTFEKGHIRDITDSLIEHCQDRRLDENANVQLSDDKVIITIVFDLFGAGFDTITTAISWSLMYLV TNPRIQRKIQEE LDTVIGRDRQPRLSDRPQLPYLEAFI LETFRHSSFPFTIPHSTIRDTSLNGFYIPKGHCVFVNQWQVNH DQELWGDPNEFRPERFLTSSGTLDKHLSEKVIIFGLGKRKCIGETIGRLEVFLFLAILLQ QMEFNVSPGEKVDMTPAYGLTLKHARCEHFQVQMRSSGPQHLQA
CYP1A2 humano
MALSQSVFPSATELLLASAIFCLVFWVLKGLRPRVPKGLKSPPEPWGWP LLGHVLT LGKNPHLALS RMSQRYGDV LQIRIGSTPVLVLSRLD TIRQALVRQGD DFKGRPDLYTSTLITDQSLTFSTDSGPVWAARRRLAQNALNTFSIASDPASSSSCYLEEHVSKEAKALISRLQELMAGPGHFD PYNQVVSVANVIGAMCFGQHFPESDDEMLSLVKN THEFVETASSGNPLDFFPI LRYPN PALQRKAFNQRFLWFLQKTVQEHYQDFDKNSVRDITGALFKH SKKGP RASGNLIPQEKIVNLVNDIFGAGFDTVTTAISWSLMYLVTKPEIQRKIQKELDTVIGRERRPRLSDRPQLPYLEAFI LETFRHSSFLPFTIPHSTTRD TTLNGFYIPKKCCVFVNQWQVNHDP ELWEDPSEFRPERFLTADGTAINKPLSEKMMLFGMGKRRCIGEV LAKWEIFLFLAILLQ QLEFSVPPGVKVDLTP IYGLTMKHARCEHVQARLRFSIN
CYP1A2 rata
MAFSQYISLAP ELLLATAIFCLVFWVLRGTRTQVPKGLKSP PGWGLPFIGHMLTLGKNPHLSLTKLSQQYGDV LQIRIGSTPVVVL SGLNTIKQALVKQGD DFKGRPDLYSFTLITNGKSMTFNPDSGPVWAARRRLAQDALKSFSIASDPTSVSSCYLEEHVSKEANHLISKFQKLM AEVGHFEPVNQVVESVANVIGAMCFGKNFPRKSEEMLN LVKSSKDFVENVTSGNAVDFFPVLRYLPN PALKRKFNFNDFVLF LQKTVQEHYQDFNKNSIQDITGALFKHSENYKDNGLIPQEKIVNIVNDIFGAGFETVTTAIFWSILLLVTEPKVQRKIHEELDTVIGRDRQPRLSDRPQLPYLEAFI EIYRYTSFVPFTIPHSTTRDTS LNFH I PKECCIFINQWQVNHDEKQWKDPFVFRPERFLTNDNTAIDKTLSEKVMLFGLGKRRCIGEI PAKWEVFLFLAILLHQLEFTVPPGVKVDLTPSYGLTMKPRTCEHVQAWPRFSK

A-IV Resultados del docking molecular.

La Figura 1 muestra los resultados del docking entre CYP1A1 humano con flavona. Se observa al ligando en el sitio catalítico junto al grupo hemo. La unión es posible debido a

las interacciones hidrofóbicas (IH) representadas por líneas punteadas negras con 4 residuos de aminoácidos (Ile-286, Ala-317, Phe-224 y 258). Además de dos apilamientos de anillos aromáticos, (líneas punteadas rojas), entre los anillos C y B de la flavona con Phe-224 y Phe-123, respectivamente. También se observa que la conformación energética más favorable para la flavona, -12.20 kcal/mol, incluye la rotación del enlace C2-C1' que conecta el anillo B, el cual se observa oblicuo respecto al resto de la estructura planar.

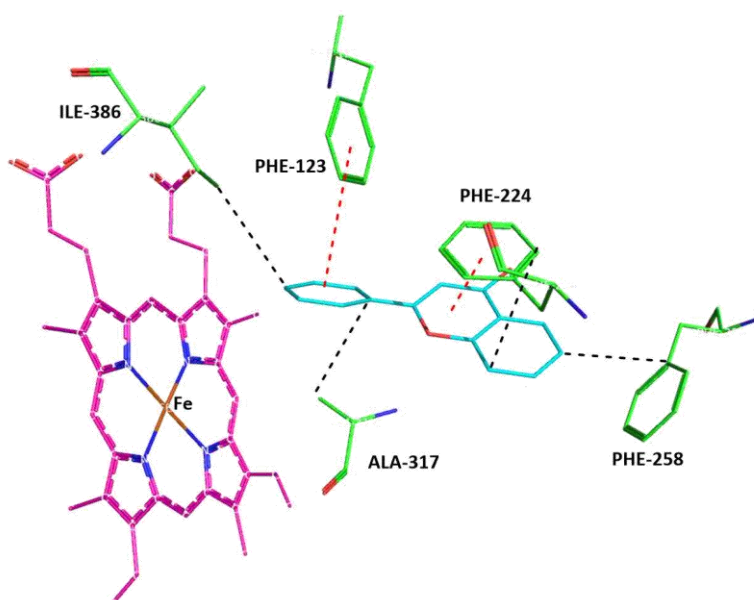


Figura A1. Docking CYP1A1 humano con flavona. Rosa: grupo hemo; azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; líneas negras punteadas: interacción hidrofóbica; líneas rojas punteadas: apilamiento de anillos aromáticos.

La Figura 2 muestra los resultados del docking entre CYP1A2 humano con flavona. Se observan interacciones hidrofóbicas con 8 aminoácidos (Thr-124, 321, Phe-125, 226, Ala-317, Leu-382, 497 y Ile-386), y un enlace de hidrógeno con Asp-320 (línea azul gruesa). La estructura de la flavona presenta su estructura planar sin rotación en el enlace C2-C1', adoptando la conformación energética más favorable de -11.90 kcal/mol.

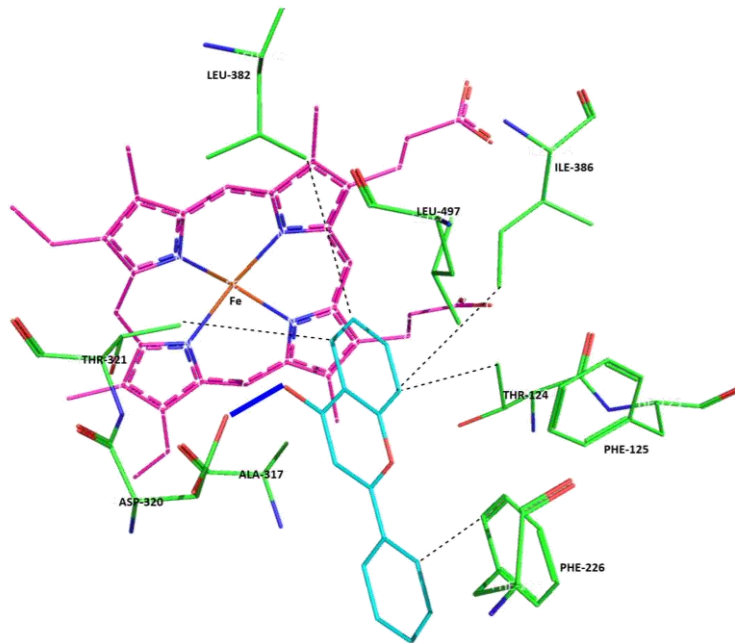


Figura A2. Acoplamiento entre CYP1A2 humano con flavona. Rosa: grupo hemo; azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; líneas negras punteadas: interacción hidrofóbica; líneas rojas punteadas: apilamiento de anillos aromáticos.

La Figura 3 muestra los resultados del docking entre AHR humano con flavona. Se observan interacciones hidrofóbicas de 6 residuos de aminoácidos (Ile-139, Phe-41, 68, Tyr-61, 122 y Pro-40) con la flavona cuyo enlace C2-C1' que conecta con el anillo B presenta una torsión de $\sim 45^\circ$ casi perpendicular respecto al resto de la molécula formando una unión de -8.10 kcal/mol con AHR.

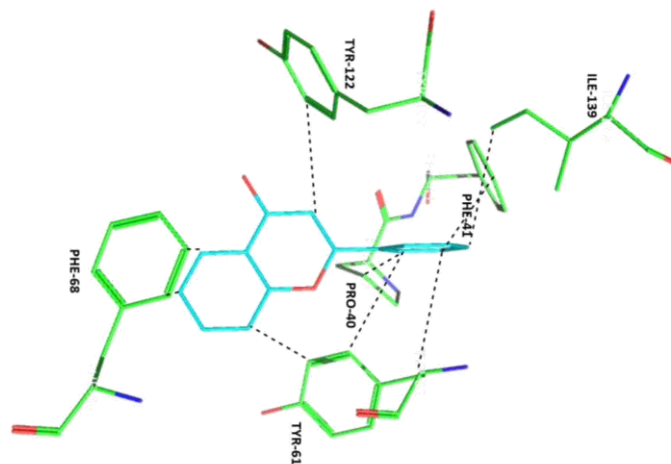


Figura A3. Acoplamiento entre AHR de humano con flavona. Azul cian: flavona; verde: aminoácidos de interacción; línea punteada: interacciones hidrofóbicas.