



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Glutamato monosódico e hidroxibutilanisol posibles
moduladores *in vivo* de los citocromos P450 2J3 y 2C11**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A:**

DAFNE CIRCE MENDEZ MUÑOZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

*A mi abuela Delia Lucila, ternura en cada recuerdo.
A mis pilares Ángeles, Roberto y Cekouat,
firmes como cumbres,
guiándome y cuidándome en el caminar de la vida.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecerme la oportunidad de crecimiento académico y personal. Desde mi etapa en la preparatoria en el plantel 8 Miguel E. Schulz, agradezco por aceptarme y permitirme vivir experiencias fructíferas e inolvidables, por darme una buena educación.

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, mi tutor principal, por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Agradezco sinceramente por proporcionarme las herramientas esenciales para la realización de este trabajo y sobre todo, por ser no solo un guía en el proceso, sino también una fuente constante de inspiración. Su apoyo ha sido invaluable.

Agradezco profundamente a los distinguidos miembros del jurado encargados de evaluar mi tesis para la obtención del grado. La Dra. Rebeca Santes Palacios, la Dra. Margarita Jacaranda Rosendo Pineda, el Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre, el M. en C. Rafael Lugo Huitrón y la Dra. Mayra Dinorah Álvarez Santos han desempeñado un papel fundamental en este proceso. Su dedicación en la revisión de la tesis, así como sus valiosas correcciones y comentarios, han enriquecido significativamente mi trabajo. Agradezco la profundidad de su conocimiento y la generosidad de compartir sus perspectivas

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda por su invaluable apoyo técnico en la realización de este trabajo. Sandy, te agradezco de corazón por todo: el respaldo constante, los ánimos motivadores, las comidas compartidas, las conversaciones significativas y los consejos sabios. Tu presencia ha hecho una diferencia notable y estoy sinceramente agradecida.

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

Al Dr. César Espino de la Fuente Muñoz y a la Dra. Lizbeth Esmeralda García Velázquez por brindarme su valioso apoyo técnico a lo largo de la elaboración de este trabajo. Por compartir su experiencia y orientación.

A la Dra. Belém Yoval por su invaluable apoyo durante mi servicio social. Su dedicación y enseñanza de técnicas específicas han sido fundamentales para mi desarrollo profesional.

A la Dra. Cynthia María Navarro Mabarak por su guía excepcional durante la comprensión y desarrollo de este proyecto. Su capacidad para transmitir emoción y entusiasmo en la exploración de las CYP450 epoxigenasas ha sido inspiradora. Gracias por ilustrarme sobre el alcance significativo de sus metabolitos y por motivarme en cada paso, impulsándome a seguir avanzando con determinación. Su orientación ha sido clave en el éxito de este trabajo y ha dejado una huella significativa en mi desarrollo académico.

Agradecimientos a título personal

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi madre, María de los Ángeles Muñoz López, por permitirme perseguir aquello que me hace feliz. Gracias por colmar mi vida de amor, sueños y realidades disfrutables. Tu acompañamiento en cada etapa de mi vida, tu incondicional apoyo, y tu papel como compañera y amiga son lo mejor que me ha podido pasar. Aprecio tu capacidad para maravillarte con las pequeñas alegrías de la vida. Todo lo que he logrado no sería posible sin ti. Gracias mi Angelita.

A mi padre, Roberto Méndez Castillo, por sus cuidados y atenciones a lo largo de mi vida. Eres la persona que más se asemeja a mí, no solo en la apariencia, sino también en personalidad y entendimiento. Gracias por ser un pilar en mi camino.

A mi compañero de vida Cekouat León. Kou este proceso se está concluyendo gracias a ti, en verdad estoy agradecida por tu guía durante la carrera, por ser una gran fuente de inspiración. Por todo el amor que me haces sentir, por el apoyo incondicional, por hacerme ver y vivir la vida de una forma distinta, más cálida, más tranquila. Gracias por ser mi ejemplo, estoy ansiosa por ver lo lejos que llegaremos.

A mi semillero de sueños, Fer Blanco y Arely Caporal, gracias por formar mi otra gran pasión, Montañeras, gracias por alegrarse de mis triunfos y acompañarme con cariño y comprensión en mis fracasos. Conoceremos todas las montañas del mundo algún día, lo sé, con ustedes no hay nada imposible.

A mis amigas de los senderos, Ana, Noemí, Erica, Karla, gracias por ser las más incondicionales, gracias por abrazarme y alentarme siempre que lo necesito, gracias por vivir experiencias mágicas conmigo, gracias por acompañarme durante mis primeros pasos en la vida adulta, soñar en grande, ver estrellas y bailar al fuego. Su amistad ha sido un regalo invaluable en mi camino, llenando de luz y color cada sendero que recorreremos juntas.

A mi Equipo Dinamita desde primer semestre de la carrera, Mitzi y Dani, gracias por acompañarme a lo largo de toda la carrera de biología, por adoptarme esa primer semana, por las inolvidables prácticas de campo, las exposiciones y las noches de desvelos compartidas. Aprecio enormemente su constante apoyo y compañía. Ustedes han sido mi refugio, mi lugar de confort, y no puedo estar más agradecida por tenerlas como las mejores amigas que podría haber soñado.

A la Dra. Cynthia Mabarak, gracias por ser mi gurú, mi inspiración, una guía para seguir en el camino de la ciencia, gracias por transmitirme ese amor por las neurociencias. No es secreto que te he admirado siempre. Gracias por los cafés con chismecito, gracias por confiar en mí para continuar con tu proyecto.

A la Dra. Rebeca Santes, gracias por estar ahí para escucharme en los momentos de desaliento, por tus valiosos consejos y por ser mi mentora en este fascinante camino de la ciencia.

A la Dra. Belém Yoval, le quiero expresar mi profundo agradecimiento por ser una inspiración, por su paciencia constante y por compartir días y noches dedicados a la enseñanza. Su acompañamiento a lo largo de mi trayectoria en el Instituto Nacional de Cardiología ha sido inolvidable, gracias por enseñarme que una tutora y una alumna pueden ser grandes amigas.

A las chicas del laboratorio c-206, Anita, Laurel y Samaria por las pláticas, los experimentos y las comidas compartidas, por ser mis cómplices en la vida académica. A Monse, Ricardo y Aarón por la buena compañía durante los experimentos.

A Rous por brindarme la oportunidad de obtener mi primer trabajo como bióloga, por enseñarme las maravillas del campo, por hacer que no olvide la grandeza de las montañas que conforman a la Sierra de Santa Catarina.

A Liliana por ser una bióloga que inspira, caracterizada por su pasión y disciplina, cualidades que admiro profundamente. También valoro su amistad leal. A Dulce, mi gratitud por enseñarme el significado de la amistad incondicional, por estudiar conmigo, escucharme, cantarme y acompañarme en cada paso desde los 16 años.

A mis profesores; han sido mentores y guías que han marcado una diferencia significativa en mi camino. Siempre recordaré con gratitud el impacto positivo que han tenido en mi vida.



Un pequeño recuerdo de lo que fué mi experiencia en la carrera de biología.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio a cargo del Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tabla de contenido

1. Abreviaturas.....	4
2. Resumen	6
3. Abstract	7
4. Introducción	8
4.1 Citocromos P450	8
4.1.1 Descubrimiento de los CYP450	8
4.1.2 Características generales de los CYP450	9
4.1.3 Clasificación de los CYP450: Familia CYP2	10
4.1.4 Expresión de los CYP450 en el hígado	11
4.1.5 Expresión de los CYP450 en el cerebro	12
4.1.6 CYP450 con actividad epoxigenasa: Familia CYP2	13
4.1.6.1 Isoforma CYP2J3	14
4.1.6.2 Isoforma CYP2C11	14
4.1.7 Sustratos de los CYP450	15
4.1.7.1 Metabolismo de sustratos endógenos	16
4.1.7.1.1 Metabolismo del ácido araquidónico	16
4.1.7.1.1.1 Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)	18
4.1.8 Factores que modifican la expresión de los CYP450	20
4.1.8.1 Factores de transcripción	21
4.1.8.1.1 Factor de transcripción Nrf2	22
4.1.8.1.2 Factores de transcripción AP-1	24
4.1.8.2 Aditivos alimentarios	24
4.1.8.2.1 Glutamato monosódico (GMS).....	25
4.1.8.2.2 Hidroxibutilanisol (BHA).....	26
5. Antecedentes	26
6. Planteamiento del problema	28
7. Hipótesis	29
8. Objetivo general	29
9. Objetivos particulares	29
10. Estrategia experimental	30
10.1 Condiciones éticas	30
10.2 Tratamiento de los animales	30

10.3 Obtención y cuantificación de proteínas totales	31
10.3.1 Obtención de la fracción S9 de hígado y corteza cerebral	31
10.3.2 Obtención de microsomas de hígado y corteza cerebral	31
10.3.3 Cuantificación de proteínas totales: método de Bradford	32
10.4 Inmunodetección por Western Blot.....	32
10.4.1 Preparación de muestras	32
10.4.2 Preparación de geles	32
10.4.3 Electroforesis, transferencia y bloqueo	32
10.4.4 Incubación con anticuerpos	33
10.4.5 Revelado de membranas y cuantificación relativa de proteínas	34
10.5 Análisis de secuencias de promotores: <i>CYP2J3</i> y <i>CYP2C11</i>	34
10.6 Análisis estadístico	34
11. Resultados	35
11.1 Inmunodetección por Western Blot de <i>CYP2C11</i> y <i>CYP2J3</i>	35
11.1.1 Los niveles de proteína de <i>CYP2C11</i> aumentan en microsomas hepáticos por el tratamiento con BHA.....	35
11.1.2 Los niveles de proteína de <i>CYP2C11</i> aumentan en corteza cerebral por el tratamiento con BHA	36
11.1.3 Las concentraciones de proteína de <i>CYP2C11</i> en tejido hepático experimentan una reducción subsiguiente al tratamiento con GMS	37
11.1.4 Reducción en los niveles de proteína de <i>CYP2C11</i> y <i>CYP2J3</i> en la corteza cerebral posterior al tratamiento de GMS	39
11.2 Análisis de secuencias de promotores: <i>CYP2J3</i> y <i>CYP2C11</i>	40
11.2.1 Detección de sitios de unión para AP-1 en los promotores de <i>CYP2J3</i> y <i>CYP2C11</i>	40
11.2.2 Identificación de sitios de unión para c-Jun en los promotores de <i>CYP2J3</i> y <i>CYP2C11</i>	42
11.2.3 Detección de sitios de unión para c-Fos en los promotores de <i>CYP2J3</i> y <i>CYP2C11</i>	44
11.2.4 Identificación de sitio de unión para Nrf2 en el promotor de <i>CYP2C11</i>	45
12.Discusión	46
12.1 Tratamiento con BHA	46
12.2 Tratamiento con GMS	49
13. Conclusiones	51

14. Referencias bibliográficas	52
15. Anexo	63

1. Abreviaturas

AA: Ácido araquidónico

ALA: Ácido α -linolénico

AP-1: Proteína activadora 1

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

BBB: Barrera hematoencefálica

BHA: Hidroxibutilanisol

COX: Ciclooxygenasa

CYP2: Familia 2 de los citocromos P450

CYP2C11: Proteína CYP2C11

CYP2J2: Proteína CYP2J2

CYP450: Citocromo P450

DHA: Ácido docosaheptaenoico

diHET: Ácidos dihidroxieicosatrienoicos

EETs: Ácidos epoxieicosatrienoicos

EPA: Ácido eicosapentaenoico

EGFR: Receptores del factor de crecimiento epidérmico

ERK2: Proteína cinasa 2 regulada por señal extracelular

FDA: Food and Drugs Administration

GH: Hormona del crecimiento

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GMS: Glutamato monosódico

GRAS: Generally recognized as safe

HETE: ácidos hidroxieicosatetraenoicos

IKK: IκB quinasa

i.p. Administración intraperitoneal

JAK2: Janus cinasa 2

JNK1: Cinasa 1 N-terminal c-Jun

LNA: Ácido linoleico

MAPK: Cinasa activada por mitógeno

Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-related factor

PPAR-α: Receptor alfa activado por proliferador de peroxisoma

PPAR-γ : Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

PUFA: Ácido graso poliinsaturado

PXR: Receptor X de pregnano

sEH: Epóxido hidrolasa soluble

STAT5B: Transductor de señales y activador transcripcional 5B

2. Resumen

Los citocromos P450 constituyen una red fascinante de hemoproteínas esenciales, desempeñando un papel crucial en el metabolismo de diversas sustancias tanto endógenas como exógenas al organismo. Dentro de esta superfamilia, los CYP2 sobresalen como epoxigenasas, catalizando la epoxidación de sustratos específicos, con implicaciones significativas en la síntesis de sustancias endógenas como el ácido araquidónico (AA). Los metabolitos resultantes, conocidos como ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), han demostrado propiedades clínicas excepcionales, tales como capacidades antiinflamatorias, vasodilatadoras, efectos antiapoptóticos y mejoras en condiciones de fibrosis. En este estudio, se investigó el potencial modulador de dos aditivos alimentarios comunes, el hidroxibutilanisol (BHA) y el glutamato monosódico (GMS), sobre las isoformas CYP2C11 y CYP2J3, responsables de la biotransformación del AA. Tras administrar una única dosis de estos aditivos alimentarios a ratas Wistar, se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en el hígado y en la corteza cerebral. Con el tratamiento de BHA, se evidenció un aumento del 52% en los niveles de CYP2C11 en el hígado y un incremento del 38.4% en la corteza cerebral. Contrariamente, el GMS mostró una disminución del 52% en los niveles de CYP2C11 en la corteza cerebral y una reducción del 40% en los niveles de CYP2J3 en ambos tejidos. La investigación también exploró las posibles vías de modulación de *CYP2*, identificando la presencia de sitios de unión para factores de transcripción como: Nrf2, AP-1, c-Jun y c-Fos en los promotores de CYP2C11 y CYP2J3 mediante el *software* AliBaba 2.0. Dada la limitada información sobre los factores que influyen en las isoformas que biotransforman el AA en EETs, la identificación de moduladores para CYP2C11 y CYP2J3 presentes en la dieta común es de gran relevancia académica, por lo que los resultados de este trabajo no sólo proponen una vía molecular que podría influir en la expresión de las isoformas del CYP450 y los efectos del GMS y BHA en los EETs, sino que también sugiere nuevas oportunidades para utilizar estos aditivos alimentarios en modelos animales para futuras investigaciones sobre la modulación de los CYP450 2J3 y 2C11.

3. Abstract

The cytochrome P450 enzymes constitute a fascinating network of essential hemoproteins, playing a crucial role in the metabolism of various substances, both internal and external to the organism. Within this superfamily, CYP2 stands out as epoxygenases, catalyzing the epoxidation of specific substrates, with significant implications for the synthesis of endogenous substances such as arachidonic acid (AA). The resulting metabolites, known as epoxyeicosatrienoic acids (EETs), have showed exceptional clinical properties, including anti-inflammatory, vasodilatory and antiapoptotic effects, as well as improvements in fibrotic conditions. In this study, we investigated the modulatory potential of two common food additives, hydroxybutyl anisole (BHA) and monosodium glutamate (GMS), on the isoforms CYP2C11 and CYP2J3, responsible for the primary biotransformation of AA. After administering a single dose of these food additives to Wistar rats, significant changes were observed in the protein levels of CYP2C11 and CYP2J3 in the liver and cerebral cortex. With BHA treatment, there was a 52% increase in CYP2C11 levels in the liver and a 38.4% increase in the cerebral cortex. On the other hand, MSG showed a 52% decrease in CYP2C11 levels in the cerebral cortex and a 40% reduction in CYP2J3 levels in both tissues. This research also explored possible *CYP2* modulation pathways, identifying the presence of binding sites for transcription factors such as Nrf2, AP-1, c-Jun, and c-Fos in the promoters of CYP2C11 and CYP2J3 using Alibaba 2.0 software. Given the limited information on the factors influencing the isoforms that biotransform AA into EETs, the identification of modulators for CYP2C11 and CYP2J3 present in the common diet is of great academic relevance, therefore, the results of this work not only propose a molecular pathway that could influence CYP450 isoforms and the effects of GMS and BHA on EETs, but also suggest new opportunities to use these food additives in animal models for future research on CYP2J3 and CYP2C11 modulation.

4. Introducción

4.1 Citocromos P450

Los citocromos P450 (CYP450) constituyen un extenso grupo de hemoproteínas que desempeñan un papel crucial en el metabolismo de diversos xenobióticos (sustancias ajenas al organismo, como fármacos, aditivos alimentarios o contaminantes ambientales) y endobióticos (compuestos endógenos o propios del organismo, como hormonas o ácidos grasos). Estas enzimas se distinguen por la presencia de un grupo hemo y por su capacidad para catalizar la oxidación de diversos compuestos, principalmente a través de reacciones de monooxigenación, reacción en la que se introduce un átomo de oxígeno en el sustrato, modificando su estructura química (Cook *et al.*, 2016). Es importante destacar que algunas familias de CYP450 también pueden llevar a cabo reacciones de reducción, hidratación, epoxidación e incluso hidrólisis (Wojciech & Wladyslawa, 2021).

En la década de los 70, la idea de que existieran más de cinco isoformas de CYP450 generaba escepticismo en la comunidad bioquímica. No obstante, en la actualidad, se han documentado más de 21,000 secuencias de CYP450 expresadas en todos los reinos de la vida, incluyendo animales, plantas, hongos, protistas, bacterias y arqueas (Wojciech & Wladyslawa, 2021).

En el contexto humano, se han identificado 57 genes que codifican proteínas pertenecientes a la familia CYP450, siendo algunas de ellas de gran importancia médica debido a su participación en el metabolismo de sustancias exógenas a las que estamos expuestos (Pikuleva & Waterman, 2013). Además, se ha caracterizado la presencia de más de 88 genes en ratas y más de 100 en ratones (Guengerich, 2019). En los mamíferos, podemos encontrar presentes estas enzimas en la membrana de la mitocondria y en el retículo endoplásmico. Sin embargo, se reporta que son más abundantes en el retículo endoplásmico liso (Goepfert *et al.*, 1995).

4.1.1 Descubrimiento de los CYP450

La aparición de los CYP450 se remonta a 1954, cuando el científico Klingenberg, quien investigaba el metabolismo de las hormonas esteroideas en hepatocitos, identificó una proteína CYP450 (Klingenberg, 2003). Sin embargo, fue aproximadamente una década más tarde, en 1962, cuando Omura y Sato describieron su estructura y la designaron como P450. La elección de la letra "P" se relaciona con su naturaleza de pigmento, mientras que el número 450 hace referencia a la longitud de onda a la que absorbía (Omura & Sato, 1962) (Figura 1).

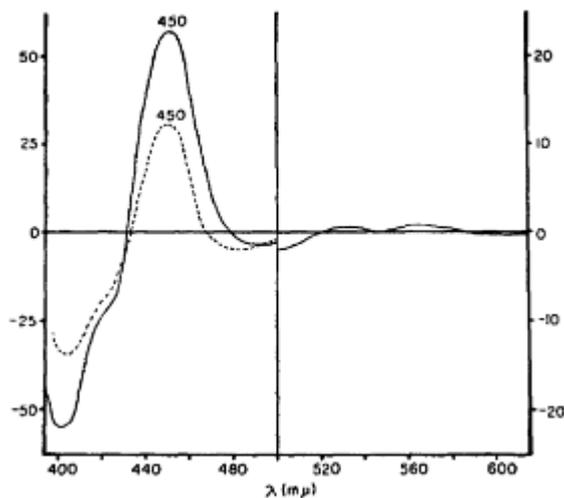


Figura 1. Pico de absorción a 450 nm. Espectro de diferencia de monóxido de carbono de microsomas de hígado de rata. Tomado de Omura, (2011).

Un año más tarde, en 1963, Estabrook, Cooper y Rosenthal llevaron a cabo la primera descripción de la función enzimática de los CYP450 al investigar la hidroxilación de la 17-hidroxiprogesterona (Cooper *et al.*, 1963; Estabrook *et al.*, 1963). En trabajos subsiguientes, este mismo grupo publicó la participación del CYP450 en la oxidación de varios fármacos, incluyendo la codeína, la monometil-4-aminopirina y la hidroxilación de acetanilida. Estas observaciones se realizaron en microsomas de hígado de rata, marcando así la primera vez que se reconoció a los CYP450 como participantes en el metabolismo de xenobióticos (Cooper *et al.*, 1965). Este descubrimiento marcó el comienzo de la investigación sobre múltiples isoformas de los CYP450 en diversas especies, cada una con afinidades distintas hacia sustratos de naturaleza química variada.

4.1.2 Características generales de los CYP450

Los CYP450 desempeñan una amplia variedad de funciones fisiológicas y se encuentran distribuidos en diversas ubicaciones celulares y en tejidos, mostrando también variabilidad en solubilidades, tipos de proteínas con las que interactúan para llevar a cabo reacciones óxido-reducción, así como en sus sustratos. A pesar de estas diferencias, comparten características estructurales y propiedades similares (Piotr & Ilia, 2018).

En un análisis de las dinámicas evolutivas de los CYP450, Parvez y colaboradores (2016) sugirieron que todas estas enzimas se originaron a partir de un ancestro común, el CYP51. Por lo tanto, presentan secuencias de aminoácidos similares y comparten el mismo grupo protésico de hierro (Fe - protoporfirina IX), con una cisteína que se une al grupo hemo.

Además, utilizan un ciclo catalítico similar que implica la utilización de una molécula de O₂, generando un sustrato oxidado y una molécula de agua (Piotr & Ilia, 2018; Navarro *et al.*, 2019). La función primordial de los CYP450 radica en la conversión de xenobióticos en moléculas más polares y, por ende, más hidrosolubles, facilitando su excreción (Donato & O'Connor, 2009).

Un sistema enzimático completamente funcional relacionado a los CYP450 consta de una isoforma de esta superfamilia así como de sus proteínas asociadas, ya sea la citocromo P450 reductasa o el citocromo b5 reductasa. La primera es una flavoproteína encargada de coordinar la transferencia de electrones desde el NADPH hacia los CYP450, y el citocromo b5 es una hemoproteína relativamente pequeña que participa en la transferencia de equivalentes reductores (Piotr & Ilia, 2018; Portal, 2013; Elahian *et al.*, 2014). Como consecuencia de estas reacciones, los CYP450 aceleran la eliminación del organismo de gran número de fármacos y compuestos tóxicos, pero también son responsables de la activación de toxinas o pre-carcinógenos. (Donato & O'Connor, 2009). Por lo que, estudiar los mecanismos que regulan a los CYP450 resulta relevante para discernir entre las vías que activan sus efectos benéficos de aquellas que activan sus efectos dañinos en los seres vivos.

4.1.3 Clasificación de los CYP450: Familia CYP2

Los CYP450 se clasifican por la similitud en las secuencias de pares de bases, se les asigna un número de familia (ej. CYP2), una letra para diferenciar las subfamilias (ej. CYP2C) y un número para establecer la isoforma (ej. CYP2C11) (McDonnell & Dang, 2013). En el ámbito humano, la familia CYP2 se caracteriza por su amplitud y diversidad, estructurándose en 20 subfamilias. Entre las isoformas destacan CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2C11 y CYP2J3, entre otras. Estas enzimas presentan diversas especificidades de sustratos, participando activamente en el metabolismo de compuestos tan variados como fármacos, toxinas y contaminantes ambientales (Chen & Wang, 2015). Los miembros de CYP2 se distribuyen en distintos tejidos del cuerpo; por ejemplo, CYP2A6 se encuentra predominantemente en el hígado, mientras que CYP2C9 está principalmente presente en el intestino, desempeñando un papel crucial en el metabolismo de diversas sustancias en estos órganos (Chen & Wang, 2015). La localización específica permite que los CYP450 de la familia CYP2 contribuyan de manera significativa al procesamiento y metabolismo de compuestos en sus respectivos tejidos (Donato & O'Connor, 2009).

4.1.4 Expresión de los CYP450 en el hígado

En las primeras descripciones de los CYP450 se pensaba que estas enzimas eran únicamente hepáticas, pero esta idea se descartó al comprobar la presencia de isoformas prácticamente en todo el cuerpo humano; incluso algunas de ellas son exclusivamente extrahepáticas (Ding & Kaminsky, 2003). Sin embargo, el hígado se ha considerado por distintos autores como el principal órgano metabolizador de xenobióticos y endobióticos, debido a que en él se presenta la mayor acumulación y variedad de CYP450. La expresión de estas enzimas está regulada por diversos factores tanto genéticos como ambientales; por ejemplo, algunas enfermedades, polimorfismos, hormonas y factores externos al cuerpo humano como la exposición a compuestos provenientes de la dieta o contaminantes ambientales (Donato & O'Connor, 2009).

En el hígado, se ejecutan procesos fundamentales para desintoxicar y facilitar la eliminación de xenobióticos, es decir, sustancias químicas externas o ajenas al organismo. Estos procesos se llevan a cabo mediante la conversión de compuestos liposolubles a compuestos hidrosolubles, empleando enzimas pertenecientes a las fases I y II del metabolismo. La fase I, incluye reacciones de oxidación, las cuales son catalizadas por una diversidad de enzimas, entre ellas, los CYP450 (Ates & Ortatli, 2021). Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la biotransformación de sustancias, preparándolas para su posterior excreción y contribuyendo así a la homeostasis del organismo. (Gibson & Skett, 2013).

En el hígado, se encuentran el 70% de las isoformas de CYP450, mismas que participan activamente en procesos fisiológicos cruciales, como el metabolismo del colesterol y diversos esteroides endógenos (Ates & Ortatli, 2021). Además, desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de la mayoría de los xenobióticos que ingresan al organismo. Las isoformas de CYP450 hepáticas, principalmente clasificadas en las familias 1, 2 y 3, incluyen al CYP3A4, que destaca por su elevada afinidad hacia sustratos y constituye la isoforma más abundante en el hígado humano. Los miembros de la familia CYP2C, que representan entre el 30% y el 20% del total de las isoformas del CYP450 en el hígado, también contribuyen significativamente a las funciones metabólicas hepáticas (Donato & O'Connor, 2009; Shimada, 1994).

Por otro lado, el hígado es susceptible a enfermedades asociadas con la inflamación, como hepatitis, cirrosis, hígado graso o incluso carcinomas hepatocelulares. Se ha observado que la

presencia de los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), producidos por ciertas isoformas de CYP450, puede contribuir a mejorar dichas condiciones inflamatorias (Qin *et al.*, 2019; Diani *et al.*, 2014). Sin embargo, es importante señalar que, en el caso de hepatocarcinomas, los EETs también han sido asociados con la conferencia de propiedades no deseadas, como el aumento de proliferación y disminución de la apoptosis (Giu *et al.*, 2020). En este contexto, resalta la relevancia de modular las isoformas de CYP450 responsables de la generación de EETs en este órgano, entre las cuales figuran enzimas clave como CYP2J3 y CYP2C11.

4.1.5 Expresión de los CYP450 en cerebro

Los CYP450 en cerebro se reportaron por primera vez en 1977 por Sasame y colaboradores, quienes documentaron que el contenido total de CYP450 en cerebro era del 3%, poco en comparación con lo encontrado en hígado. También encontraron que la actividad enzimática en el cerebro era 30 veces menor que en el hígado (Sasame *et al.* 1977). Debido a las bases anatómicas y fisiológicas que distinguen a estos dos órganos, la regulación de los CYP450 en el cerebro es distinta a la que se puede encontrar en el hígado.

El cerebro de los mamíferos está compuesto por distintas células interconectadas, como las neuronas o los astrocitos, que reciben señales de células de todo el cuerpo, estas señales activan factores de transcripción que pueden alterar la actividad enzimática, incluyendo a los CYP450. Otra diferencia que podemos encontrar entre estos dos órganos es la presencia de la barrera hematoencefálica (BBB), misma que no permite la libre entrada de sustancias encontradas fuera del sistema nervioso, excepto algunas áreas libres de BBB localizadas alrededor de los ventrículos cerebrales. Entonces, las diferencias en la señalización de neurotransmisores y la disponibilidad de sustancias endógenas y exógenas dan como consecuencia una expresión y susceptibilidad diferenciada a la regulación de CYP450 entre el cerebro y el hígado (Wojciech & Wladyslawa, 2021).

Se ha descrito en las neuronas la presencia de las isoformas CYP1A1, 2B, 2E1, 2D6 y 3A, y en las células gliales se encuentra a CYP2D6 (Dutheil *et al.* 2009; Miksys & Tyndale 2013). Recientemente, el grupo de Dutheil (2009) demostró que isoformas de la familia CYP2 se expresan en el cerebro humano, siendo CYP2J2 una de las principales isoformas, correspondiente al 20% de los CYP450 totales. En algunos estudios se ha comprobado que la presencia de enzimas como los CYP450 en el cerebro pueden regular una amplia gama de

procesos, como la neurotoxicidad y la respuesta a los medicamentos como analgésicos, antidepresivos y antipsicóticos (Toselli *et al.* 2016; McMillan & Tyndale 2018), así como el metabolismo de sustratos endógenos como los ácidos grasos, colesterol, hormonas y precursores de neurotransmisores (Navarro *et al.*, 2018).

Por otra parte, el cerebro no escapa a la presencia de enfermedades relacionadas con la inflamación, tales como la depresión, el Alzheimer, el Parkinson, entre otras. Se ha informado que la presencia de los EETs, derivados de la actividad de ciertos CYP2, puede mejorar estas condiciones inflamatorias (Peng *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021; Pallas *et al.*, 2020). En particular, se ha destacado la importancia de modular las isoformas de CYP450 responsables de la producción de EETs en este órgano, entre las cuales se incluyen enzimas como CYP2J3 y CYP2C11, ya que podría ofrecer una nueva visión para el desarrollo de estrategias terapéuticas enfocadas en regular estos procesos metabólicos específicos.

4.1.6 CYP450 con actividad epoxigenasa: Familia CYP2

Algunos miembros de la familia CYP2 actúan como epoxigenasas, es decir, catalizan la epoxidación de sustratos específicos. La epoxidación es una reacción química en la cual se forma un éster cíclico de tres miembros llamado epóxido, que tiene un oxígeno en cada uno de los carbonos del anillo (Lafargue *et al.*, 2015). Estas enzimas desempeñan un papel crucial en diversos procesos biológicos, y algunas de ellas están asociadas con el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos.

Se ha comprobado que la familia CYP2 juega un papel fundamental en la síntesis de sustancias endógenas, entre las cuales se encuentran el ácido araquidónico (AA), esteroides, vitamina D y ácido retinoico (Donato & O'Connor, 2009; Zordoky & Aboutabl, 2008). Recientemente, se identificaron dos subfamilias de CYP450 con actividad epoxigenasa, CYP2C y CYP2J, ambas reconocidas por su capacidad para catalizar la epoxidación de ácidos grasos poliinsaturados, generando metabolitos conocidos como ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs). Como se mencionó anteriormente, la generación de EETs se ha considerado como una estrategia terapéutica para abordar enfermedades vinculadas a procesos inflamatorios (Wang *et al.*, 2009).

4.1.6.1 Isoforma CYP2J3

La isoforma CYP2J3 se encuentra presente en algunos roedores, siendo inicialmente descubierta en conejos por Kikuta y colaboradores en 1991. Sin embargo, poco tiempo después, Wu y su grupo de trabajo (1996) describieron el gen ortólogo en humanos, conocido como CYP2J2. Esta enzima ha captado la atención no solo por su capacidad para metabolizar aproximadamente el 3% de los fármacos, sino también por su participación en la biotransformación de varios compuestos endógenos. En años recientes, se ha vinculado con la transformación de sustancias como el AA, el ácido α -linoleico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y la vitamina D3 (Xu *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2020). Este amplio espectro de sustratos sugiere un papel versátil y destacado de CYP2J3 en procesos biológicos y metabólicos relevantes para la salud.

Los metabolitos que se obtienen a través de esta biotransformación del AA, los ácidos EETs, son de importancia clínica. Se ha reportado que tienen propiedades como vasodilatadores (Sun *et al.*, 2011; Imig, 2018), mejoran condiciones de fibrosis (Kim *et al.*, 2021) y son potentes antiinflamatorios (Shahabi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2022). En este contexto, los compuestos que incrementan la expresión de CYP2J3 podrían representar una estrategia innovadora para aprovechar los efectos benéficos de los EETs en las células (Lee & Murray, 2010).

En las publicaciones recientes no se ha reportado que el CYP2J3 pueda modularse por algunos inductores conocidos de otros CYP450 o que esta expresión se regule por vías comunes de los CYP450 como el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), el receptor X de pregnano (PXR), ni por los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Sin embargo, se ha propuesto que CYP2J3 pueda regularse de manera indirecta por la estimulación de factores de transcripción como la proteína activadora-1 (AP-1), c-Jun, c-Fos y Nrf2 (Lee & Murray, 2010; Yuan *et al.*, 2006).

4.1.6.2 Isoforma CYP2C11

Los miembros de la subfamilia CYP2C son responsables de metabolizar el 20% de los fármacos más comunes, así como una variedad significativa de compuestos endógenos (Chen & Goldstein, 2009). La isoforma CYP2C11, presente exclusivamente en machos de ratas, exhibe una mayor abundancia en el hígado, desempeñando un papel destacado en la regulación del ciclo hormonal de la hormona del crecimiento (GH) y la testosterona (Choi &

Waxman, 2000). La expresión de CYP2C11 puede ser estimulada por estas dos hormonas, dependiendo de la frecuencia, duración y amplitud de las secreciones hormonales.

El CYP2C11 participa en la biotransformación de otros endobióticos como en la hidroxilación de esteroides endógenos, la epoxidación del AA y la hidroxilación de la vitamina D (Barbosa *et al.*, 2005; Choi & Waxman, 2000; Wei *et al.*, 2018; Wójcikowski *et al.*, 2013). Se ha informado que la regulación de CYP2C11 por la GH ocurre a través de la vía de Janus cinasa 2 (JAK2) y el transductor de señales y activador transcripcional 5B (STAT5B) (Choi & Waxman, 2000). Sin embargo, no se descarta la posible participación de otras vías reguladoras, ya que se ha observado que JAK2 puede activar otras vías, como la vía de RAS, y generar la producción de factores de transcripción como c-Jun, Nrf2 y c-Fos (Brkic *et al.*, 2021).

4.1.7 Sustratos de los CYP450

Los citocromos P450 desempeñan un papel crucial en el metabolismo de una variedad de sustratos tanto sustancias endógenas (propias del organismo) como sustancias exógenas (introducidas desde el exterior), como fármacos, toxinas, aditivos alimentarios y compuestos químicos. Dentro de los procesos del metabolismo, destaca la preeminencia del CYP3A4 como la principal isoforma, encargada de metabolizar diversos compuestos como eritromicina, claritromicina y ciclosporina, dando lugar a metabolitos inactivos (Klyushova *et al.*, 2022). Sin embargo, no se puede pasar por alto la contribución del CYP2 en estos procesos metabólicos. Por ejemplo, el CYP2D6 desempeña un papel crucial en el metabolismo de sustratos exógenos como la codeína, fluoxetina y metoprolol, generando morfina a partir de la codeína y desipramina a partir de la imipramina (Lewis *et al.*, 2004).

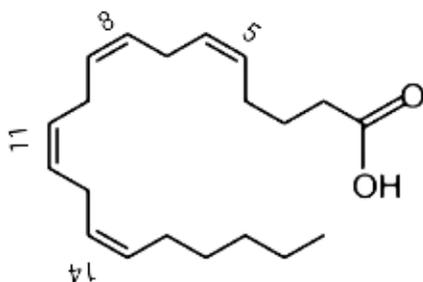
En cuanto a los sustratos endógenos, se destaca nuevamente la relevancia de la isoforma CYP3A4, que participa en el metabolismo de compuestos fundamentales como la testosterona, cortisol y progesterona. Este proceso conduce a la formación de productos de metabolismo esenciales, tales como el 6 β -hidroxicortisol y el 6 β -hidroxitestosterona (Zhou, 2008). Por otro lado, los CYP2 asumen un papel destacado en el metabolismo de sustratos endógenos cruciales, como el AA y el ALA, generando eicosanoides y epóxidos como productos (Lewis *et al.*, 2004). Esta capacidad del CYP2 para influir tanto en sustratos endógenos como exógenos resalta su papel integral dentro del metabolismo en el cuerpo.

4.1.7.1 Metabolismo de sustratos endógenos

Algunos miembros de los CYP450 principalmente los pertenecientes a la subfamilia CYP2 desempeñan un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga, contribuyendo así al control en los niveles de lípidos en el organismo. Estos ácidos grasos endógenos, como el AA y el ALA, son sometidos a reacciones de epoxidación por los CYP450, generando productos metabólicos como los eicosanoides y epóxidos que desempeñan funciones regulatorias en la respuesta inflamatoria y participan en la señalización celular (Brown & Falck, 2013).

4.1.7.1.1 Metabolismo del ácido araquidónico

El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces en las posiciones 5, 8, 11 y 14 (Figura 2). Se encuentra como parte de los fosfolípidos de las membranas y es uno de los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes en el tejido humano (Martín *et al.*, 2016)



Ácido araquidónico (AA)

Figura 2. Estructura del ácido araquidónico, fosfolípido tetrainsaturado, con dobles enlaces en las posiciones 5, 8, 11 y 14.

A mediados del siglo XX, se descubrió que este ácido graso tetrainsaturado se sintetiza a partir del ALA, que se obtiene de la dieta a través de alimentos como semillas, pescados, aceites vegetales, aves, huevos, entre otros (Bazinet & Layé, 2014). El AA ha llamado la atención debido a las vías en las que se ve involucrado, también por ser parte de los fosfolípidos membranales, teniendo un papel importante en la fluidez y estructura de la membrana celular, además por ser sustrato de algunas enzimas que forman metabolitos biológicamente activos como las prostaglandinas, los leucotrienos, EETs y algunos endocannabinoides (Martín *et al.*, 2016)

Los metabolitos del AA comúnmente se dividen en dos grupos: prostaglandinas y leucotrienos, que se asocian con las vías enzimáticas de la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) respectivamente. Sin embargo, existe una tercera vía que se ha descrito más recientemente, la vía a través de los CYP450 con actividad epoxigenasa (Colombero *et al.*, 2020) (Figura 3).

La biotransformación del AA a través de los CYP450 nos da como resultado los EETs que tienen relevancia clínica por sus propiedades antiinflamatorias, proliferativas, antiapoptóticas, disminuyen la fibrosis, entre otras. Las isoformas relacionadas con este proceso son pertenecen a las subfamilias CYP2C y CYP2J, quienes biotransforman al AA en cuatro ácidos epoxieicosatrienoicos regioisoméricos: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET y 14,15-EET (Colombero *et al.*, 2020). Los EETs son rápidamente hidrolizados por la epóxido hidrolasa soluble (sEH) formándose así los ácidos dihidroxieicosatrienoicos (diHET). El proceso de hidroxilación implica la adición de un grupo hidroxilo (-OH) a la estructura de epóxido presente en los EETs. Esta transformación bioquímica tiene varias implicaciones funcionales. Por ejemplo, los diHETs son generalmente menos activos biológicamente que los EETs, y esta conversión puede reducir la actividad antiinflamatoria de los EETs. (Colombero *et al.*, 2020).

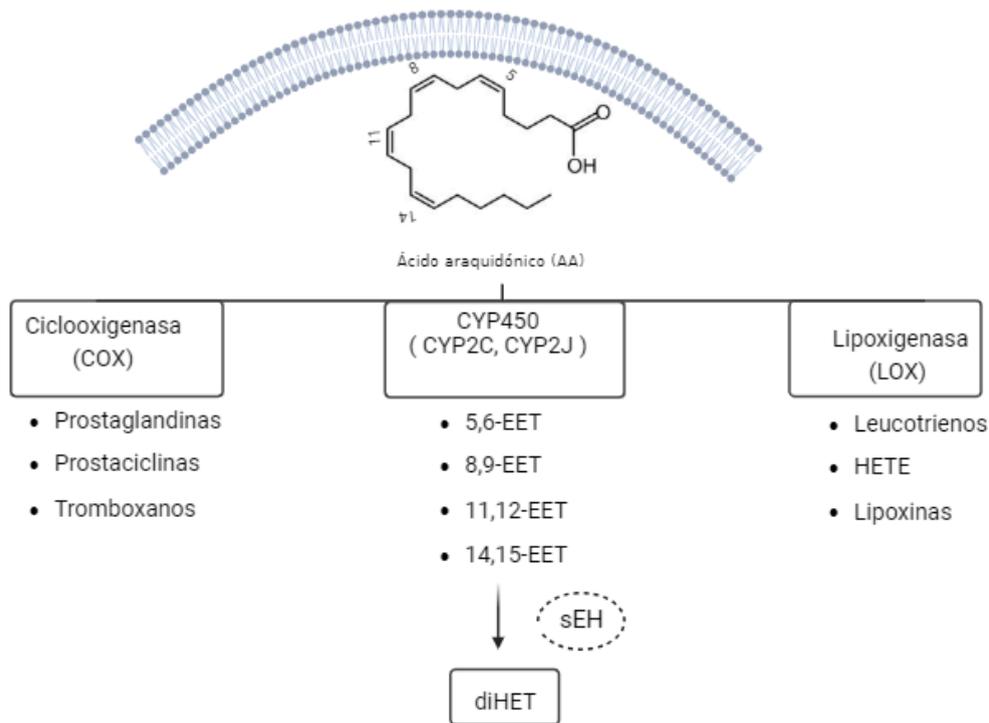


Figura 3. Vías involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico. El ácido araquidónico (AA) se metaboliza principalmente por tres vías: la ciclooxigenasa (COX) que da como resultado la producción de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos; la vía de la lipoxigenasa (LOX) por medio de la cual se obtienen leucotrienos, HETE y lipoxinas; la vía de los CYP450 epoxigenasas, relacionada con la producción de 4 ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), las isoformas participantes en este proceso se señalan entre paréntesis. La epóxido hidrolasa soluble (sEH) hidroliza a los EETs en ácidos dihidroxieicosatrienoicos (diHET).

4.1.7.1.1.1 Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

El AA sirve como sustrato para las enzimas del sistema CYP450. En esta vía metabólica, se generan dos tipos de metabolitos: los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETE), producidos por las isoformas de la familia CYP4, y los EETs, cuya obtención está a cargo de la familia CYP2 (Panigraphy *et al.*, 2011; Colombero *et al.*, 2020) (Figura 4).

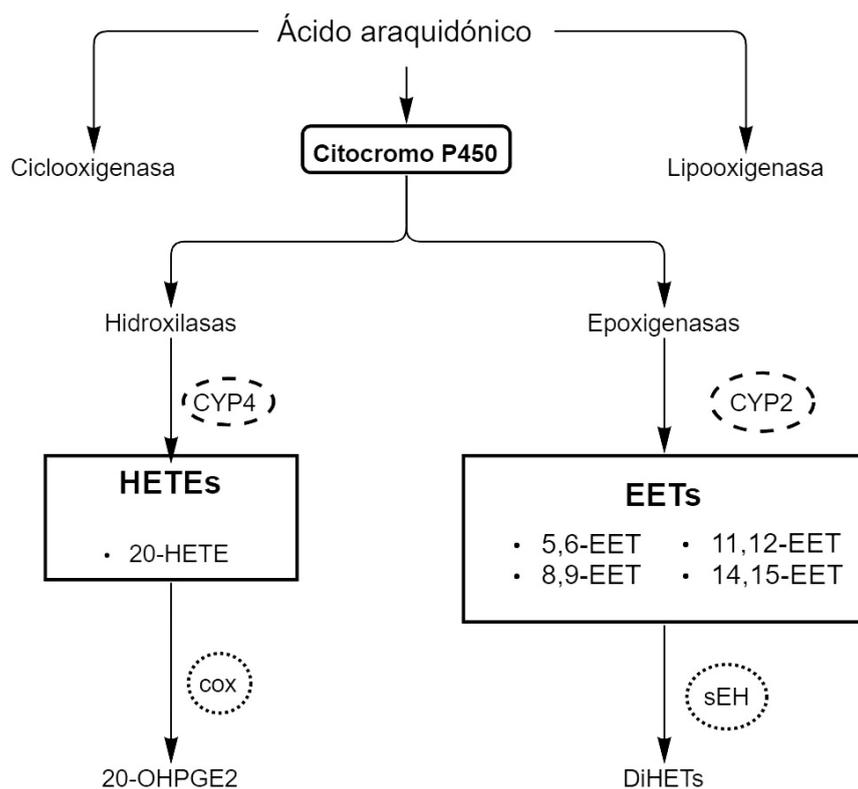


Figura 4. Esquema de la biotransformación del ácido araquidónico por la vía de los CYP450. El ácido araquidónico (AA) es metabolizado por isoformas de CYP450, dando como resultado la obtención de dos metabolitos distintos. Miembros de la subfamilia CYP4 hidroxilan al AA, a partir de esta reacción se forman los ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos HETE (20-HETE), éstos son degradados por la ciclooxigenasa (COX) a 20-hidroxi prostaglandina (20-OHPGE2). Por otro lado, isoformas de la subfamilia CYP2 con actividad epoxigenasa biotransforman al AA en ácidos epoxieicosatrienoicos EETs (5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET y 14,15-EET), estos metabolitos tienen una vida media corta debido a que son rápidamente hidroxilados por la epóxido hidrolasa (sEH) a metabolitos menos activos biológicamente los ácidos dihidroxi-eicosatrienoicos (DiHETs).

La relevancia clínica de los ácidos epoxieicosatrienoicos fue puesta en evidencia por Sun y colaboradores (2021) ya que demostraron efectos antiinflamatorios de los EETs a través de la regulación de la vía de señalización de NF- κ B. Estos mismos autores demostraron la expresión diferencial de EETs, así como de la enzima que los metaboliza, la sEH en un modelo de Alzheimer en ratones. Los EETs también han sido vinculados con la capacidad de reducir la fibrosis pulmonar, según el informe de Kim y sus colaboradores (2021). Este estudio reveló una expresión diferencial de los EETs en biopsias de pacientes con fibrosis pulmonar, destacando una mejora significativa de la enfermedad al estimular la presencia de

los EETs en un modelo animal. Esta información adquiere una relevancia en la actualidad, especialmente considerando la fibrosis que se ha identificado como una secuela resultante de la enfermedad del Covid-19 y el gran número de casos registrados en los anteriores años. Los EETs también provocan vasodilatación, lo cual está siendo objeto de estudio para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, insuficiencia cardíaca e insuficiencia cerebrovascular (Xi *et al.*, 2011). Sin embargo, se han reportado también algunos posibles efectos adversos resultantes de la presencia de estos metabolitos. Además de su capacidad para estimular la proliferación de células cancerosas, también se reportó que favorecen la migración de células de cáncer de mamá (Lu *et al.*, 2018) y la resistencia al cisplatino que es un medicamento ampliamente utilizado en las quimioterapias (Sun *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2011, Luo *et al.*, 2018).

Por la información publicada en los últimos años, se sabe que los EETs son de gran importancia para la comprensión de algunas enfermedades, así como para la mejora de otras. Hasta la fecha, existe una escasa cantidad de información disponible sobre los factores y condiciones que pueden modular la expresión de los EETs, lo que subraya la importancia crítica de comprenderlos, así como los mecanismos moleculares subyacentes. Se ha propuesto la posibilidad de modular los efectos de los EETs en tres niveles diferentes. En primer lugar, mediante la administración de EETs exógenos, se enfrenta el desafío de su rápida hidroxilación, lo que resulta en la pérdida de su actividad biológica. Una estrategia para superar esta limitación implica la inhibición selectiva de la enzima sEH, con el objetivo de prolongar la vida media de estos metabolitos. Además, una propuesta innovadora considera la posibilidad de modular los niveles de la enzima CYP450, específicamente de la familia CYP2.

4.1.8 Factores que modifican la expresión de los CYP450

La expresión de los CYP450 está sujeta a cambios que son influenciados por diversos factores, tanto endógenos como exógenos. Entre los factores identificados que pueden modificar la expresión y actividad de los CYP450 se encuentran los polimorfismos genéticos, las fluctuaciones hormonales, la presencia de enfermedades, las interacciones farmacológicas, la exposición a estímulos ambientales como el humo del tabaco y las elecciones dietéticas.

Diversos estudios han revelado que ciertos alimentos y sustancias poseen la capacidad de afectar la expresión o actividad de la enzima CYP2. Entre estos, se encuentran los vegetales

crucíferos como el brócoli, que contiene el sulforafano, un compuesto que puede modular la actividad del CYP2B6 y CYP2D6 (Vanduchova *et al.*, 2016). Asimismo, los cítricos, ricos en flavonoides, han sido asociados con la alteración de las enzimas del CYP450 (Santes *et al.*, 2020). El té verde, reconocido por sus propiedades antioxidantes, contiene catequinas que pueden influir en la expresión de algunas enzimas del CYP450, entre ellas los CYP1A2, 2C9, 2D6 y 3A4 (Sato *et al.*, 2016). La cúrcuma, con su componente activo la curcumina, también ha mostrado efectos sobre la actividad de estas enzimas (Mashayekhi *et al.*, 2021).

A nivel celular, diversos estímulos, tales como la composición de la dieta, tienen la capacidad de desencadenar intrincadas cascadas de señalización que influyen directamente en la expresión génica. Dentro de este complejo molecular, los factores de transcripción funcionan como elementos cruciales reguladores de la actividad de ciertos genes, como aquellos relacionados con la familia de enzimas CYP450. Estos factores de transcripción coordinan la transcripción génica al unirse a secuencias específicas del DNA, modulando así la síntesis de proteínas clave para el metabolismo de diversos compuestos (Manikandan & Nagini, 2018; Peter & Dubuis, 2000).

4.1.8.1 Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas capaces de alterar los niveles de expresión génica, uniéndose al DNA en una secuencia específica llamada “motivo” encontrada en el promotor del gen. Se conoce que algunos endobióticos y xenobióticos pueden estimular procesos celulares que desencadenan en la liberación de algunos factores de transcripción, mismos que al migrar al núcleo y unirse a sus motivos correspondientes, pueden promover el inicio de la transcripción de genes y así la síntesis de algunas proteínas (Lambert *et al.*, 2018).

En el contexto de las enzimas del CYP450, se han identificado factores de transcripción que juegan un papel crucial en su regulación. Estos factores de transcripción pueden inducir o inhibir la expresión de CYP450 en respuesta a estímulos específicos como compuestos químicos, fármacos, aditivos alimentarios o contaminantes ambientales. Muchos de estos factores de transcripción participan en la respuesta adaptativa del organismo a xenobióticos, siendo el factor de transcripción nuclear 2 (Nrf2) un ejemplo asociado con la respuesta antioxidante y la inducción de enzimas, incluyendo algunas isoformas de CYP450 (Luan *et al.*, 2022).

4.1.8.1.1 Factor de transcripción Nrf2

El factor 2 relacionado con el factor nuclear 2 (Nrf2) es una proteína esencial que desempeña el papel de factor de transcripción en la regulación de enzimas pertenecientes a las fases I y II del metabolismo de xenobióticos. En la fase I, las enzimas como los CYP450, catalizan reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y reacciones de epoxidación, transformando compuestos químicos en formas más solubles para su eliminación (Lu *et al.*, 2016). Mientras tanto, las enzimas de la fase II participan en la conjugación de estos metabolitos con moléculas endógenas, aumentando su hidrosolubilidad y facilitando su excreción (Lu *et al.*, 2016). Nrf2 ha demostrado ser fundamental en la inducción de diversas isoformas del sistema CYP450, facilitando estas transformaciones metabólicas a través de la interacción con la secuencia específica en el DNA denominada ARE por sus siglas en inglés *Antioxidant Response Element*, lo que subraya su relevancia en la respuesta adaptativa celular ante estímulos ambientales y químicos (Shen & Kong., 2009).

La proteína Nrf2 comprende siete dominios Neh, el primero (Neh1) se ha descrito como el más conservado en diferentes especies, lo que podría señalar su importancia en la actividad transcripcional. En Neh1 se localiza la región CNC-bZIP, la cual es necesaria para la unión al DNA, así como para la dimerización de Nrf2 con otras proteínas (Tonelli *et al.*, 2018). La activación de la transcripción de genes mediada por Nrf2 es un proceso complejo, en condiciones homeostáticas se puede encontrar a Nrf2 en el citosol unido a la proteína Keap1. Sin embargo, en condiciones de estrés, Keap1 es secuestrada y Nrf2 queda libre para translocarse al núcleo, ahí puede formar homodímeros o heterodímeros con pequeñas proteínas como c-Jun, c-Fos u otras pertenecientes a la familia bZIP. Estos complejos proteicos se unen a los promotores de genes específicos para desencadenar su transcripción (Shen & Kong., 2009) (Figura 5).

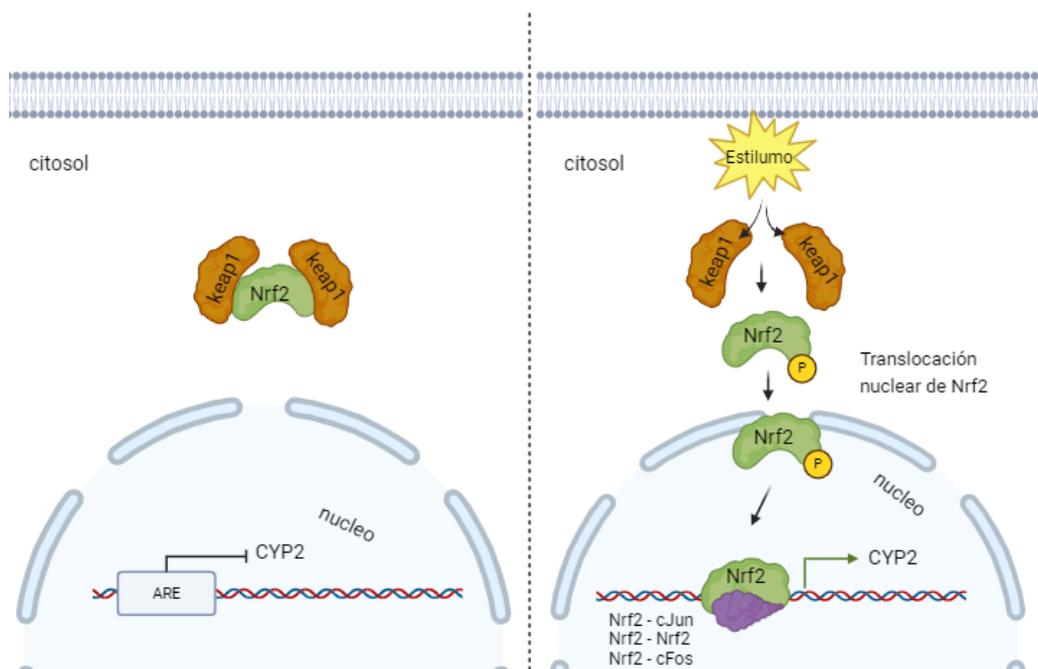


Figura 5: Esquema representativo del ciclo de Nrf2, un mecanismo crucial en la respuesta celular al estrés oxidativo. En condiciones normales (imagen de la izquierda), Nrf2 se encuentra inactivo en el citoplasma unido a la proteína Keap1. Sin embargo, cuando las células experimentan condiciones de estrés oxidativo, Keap1 libera a Nrf2, permitiendo su translocación al núcleo celular. Para entrar al núcleo Nrf2 necesita ser fosforilada, principalmente por alguna proteína de las vías de cinasas GSK-3, MAPK, PI3K y PERK. En el núcleo, Nrf2 se une al sitio ARE, activando la expresión de genes antioxidantes y detoxificadores que protegen la célula contra especies reactivas de oxígeno y otras sustancias. Después de cumplir su función, Nrf2 se desactiva y se degrada, cerrando el ciclo y manteniendo la homeostasis redox en la célula.

Es conocido que algunos xenobióticos pueden promover que Keap1 se disocie de Nrf2, así como desencadenar la activación de diferentes vías de señalización. Por ejemplo, Lee & Murray (2010) demostraron en células HepG2 que el hidroxibutilanisol (BHA) aumentaba la expresión del mRNA y los niveles de proteína de CYP2J2 acompañada de la presencia de heterodímeros conformados por Nrf2 y c-Jun (Lee & Murray, 2010). En otro estudio se demostró que un componente activo derivado de la canela, el cinamaldehído, que es utilizado como aditivo alimentario en la industria, ejerce cambios en múltiples vías de señalización incluidas PPAR, AMPK, PI3K/IRS-1, RBP4-GLUT4 y ERK/JNK/p38MAPK, TRPA1-grelina que pueden desencadenar la liberación de Nrf2, promoviendo su actividad como factor de transcripción (Zhu *et al.*, 2017). Estos estudios revelan que los aditivos alimentarios ejercen una influencia significativa en las isoformas de la familia CYP2,

participando activamente en la modulación de la biotransformación del AA. Este proceso se desencadena mediante la liberación de Nrf2, y simultáneamente, implica la activación de otras vías metabólicas.

4.1.8.1.2 Factores de transcripción AP-1

Dentro de la familia de proteínas bZIP se encuentra el complejo proteico AP-1 (proteína activadora-1) que actúa como factor de transcripción de algunos genes diana, entre los reportados hay genes de CYP450. AP-1 está conformado por homodímeros y heterodímeros de proteínas que pertenecen a Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K y Nrl) y subfamilias ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) (Shaulian & Karin., 2022). Los dímeros formados pueden regular una gran cantidad de funciones fisiológicas como la proliferación, muerte, supervivencia y diferenciación celular, esto lo hacen mediante la regulación positiva de ciertas vías de señalización. Por ejemplo, las cascadas de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), las cascadas de la cinasa 1 N-terminal c-Jun (JNK) y p38 (Shaulian & Karin., 2022).

Se ha reportado que la presencia de los miembros de AP-1 se regulan por diversos factores, tales como la presencia de citocinas, algunos factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas, estrés físico o químico dado por la presencia de xenobióticos (Shaulian & Karin., 2022). Estudios previos han relacionado a AP-1 en la regulación de CYP2J2 en células HepG2 bajo tratamiento con algunos aditivos alimentarios, como el BHA, demostrando la importancia de la proteína c-Jun principalmente (Lee & Murray, 2010). Otro estudio publicado por Makia y colaboradores (2012) demostró el aumento de los niveles de proteína y de mRNA de c-Jun y c-Fos en hígado de ratón y células Hepa1c1c7, tratadas con BHA (Makia & Karin., 2002). Estos estudios permiten pensar que es posible la modulación de genes de la familia CYP2 a través de dímeros que incluyen al factor de transcripción AP-1, induciendo la expresión de estas proteínas por medio de la exposición a aditivos alimentarios.

4.1.8.2 Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios son cualquier sustancia que se añade intencionalmente a los alimentos, productos de higiene bucal o fármacos, con el fin de proporcionarles propiedades como: reducir la oxidación y con ello la pérdida del color, ayudar a mejorar su conservación, edulcorantes, texturizantes o bien potenciadores del sabor. Es importante hacer notar que estas sustancias no añaden valor nutricional al alimento (Amchova *et al.*, 2015). La

alimentación universal se ha visto modificada a partir del siglo XX debido a la conservación y procesamiento de los alimentos. A pesar de que la industrialización de la comida ha sido conveniente para la humanidad al protegernos de algunas enfermedades infecciosas, así como lograr que los alimentos perduren en buenas condiciones por un mayor tiempo, no se han reconocido todos los efectos que algunos aditivos alimentarios puedan tener en nuestro metabolismo (Gerasimidis *et al.*, 2020).

4.1.8.2.1 Glutamato monosódico (GMS)

El glutamato monosódico (GMS) es el aditivo más utilizado en todo el mundo, se añade a los productos alimentarios para proporcionar un sabor único que se describe como “umami” en japonés, esta palabra no tiene una traducción exacta al español pero podría describirse como “sabroso” (Chakraborty, 2019). De acuerdo con el Department of Health and Human Services (DHHS, 2012) el GMS es una forma sintética de ácido glutámico, que es uno de los aminoácidos más abundantes en la naturaleza, se utiliza como aditivo alimentario (E621) en forma de proteína hidrolizada o como sal monosódica purificada.

El GMS es utilizado ampliamente en la industria alimentaria como potenciador del sabor. Entre los productos que lo pueden contener se encuentran: frituras como papas y nachos, frutos secos, sopas en polvo, sazónadores, pastillas de caldo, concentrados de carne, salsas, soja, condimentos, aceitunas, encurtidos, patés, cremas, quesos untables, pizzas, embutidos, salchichas, sushi, surimi, conservas de mar, panes tostados, arroz precocido, fideos instantáneos, también se usa en productos dietéticos con el fin de evitar el consumo añadido de sal (Ibáñez & Irigoyen., 2003). La FDA (Food and Drugs Administration) ha clasificado al GMS como seguro GRAS (Generally Recognized As Safe) y la Unión Europea como un aditivo alimentario con el código HS 29224220 y el número E621 (Walter & Lupien., 2000).

Se ha reportado que el glutamato monosódico puede alterar actividades y niveles de expresión de algunos CYP450 en hígado e intestino, tales como CYP2A5, CYP2E1, CYP3A, CYP2C y CYP2D (Tomankova *et al.*, 2015). En otro estudio publicado por Du y colaboradores (2020) se demostró en un modelo de ratones obesos inducidos con GMS el aumento significativo del mRNA de Nrf2, así como su translocación al núcleo.

4.1.8.2.2 Hidroxibutilanisol (BHA)

El hidroxibutilanisol (BHA) es un aditivo alimentario de origen sintético, es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria como antioxidante y conservador. El BHA no se degrada a altas temperaturas por lo que se aplica a productos horneados y/o fritos. Entre los alimentos que lo pueden contener se encuentran: frituras, mantecados, polvorones, bebidas lácteas, salsas, mayonesas, frutos secos, galletas, cereales y chicles, también se usa en alimento para mascotas para crear aromas artificiales y en la industria farmacéutica en multivitamínicos (Ibáñez & Irigoyen., 2003). De acuerdo con la FDA 2022, el BHA con el número E320 es seguro para agregar directamente a los alimentos de consumo humano.

Se ha descrito que el antioxidante fenólico BHA tiene importantes actividades biológicas como la modulación de la síntesis de macromoléculas y la inducción de enzimas de fase II. Un estudio realizado en células HepG2, muestra un aumento en la concentración de proteína y expresión de mRNA de CYP2J2, así como de los factores de transcripción bZIP, Nrf2 y c-Jun dependientes de la dosis del antioxidante (Lee & Murray, 2010). En otro artículo publicado por Yu & Kong (1997), se muestra que el BHA puede activar diferentes MAPK, la proteína cinasa 2 regulada por señal extracelular (ERK2) y (JNK1).

5. Antecedentes

En años recientes, las isoformas del CYP450 encargadas de metabolizar el AA han adquirido relevancia significativa debido a la generación de los EETs. Se ha atribuido a estos metabolitos la capacidad de actuar como vasodilatadores (Sun *et al.*, 2011; Imig, 2018), mejorar condiciones de fibrosis (Kim *et al.*, 2021), exhibir propiedades antiinflamatorias (Shahabi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2022), y mostrar propiedades antiapoptóticas (Chen *et al.*, 2022). La obtención de los EETs requiere la participación específica de las isoformas de la familia 2 del CYP450. Sin embargo, los EETs son metabolitos inestables, rápidamente hidroxilados sEH. Una estrategia para superar esta limitación implica la inhibición selectiva de la sEH, con el objetivo de prolongar la vida media de estos metabolitos, en este contexto, destaca un planteamiento reciente que considera la posibilidad de modular los niveles de la enzima CYP2. Esta aproximación podría abrir nuevas vías para controlar la generación de EETs y, por ende, influir en procesos fisiológicos clave. La exploración de estas estrategias no solo enriquece nuestra comprensión del metabolismo de los EETs, sino que también tiene

implicaciones significativas para el desarrollo de terapias dirigidas a mejorar diversas condiciones de salud asociadas con estos metabolitos.

Un estudio conducido por Lee & Murray (2010) reveló un incremento en la concentración de proteína y mRNA de CYP2J2, este efecto fue ocasionado por el aditivo alimentario BHA en células HepG2, una línea celular obtenida a partir del tejido hepático de un paciente con carcinoma hepatocelular (Figura 6). El BHA se encuentra presente en una amplia variedad de productos consumidos comúnmente por la población humana, incluyendo alimentos para otros mamíferos como perros y gatos. No obstante, aún no se ha demostrado sus efectos en la concentración de CYP450 epoxigenasas en un modelo *in vivo* que involucre células no cancerosas. La falta de información destaca la importancia de explorar cómo el BHA podría afectar sistemas biológicos más representativos, así como la importancia de evaluar su influencia en enzimas CYP450 epoxigenasas.

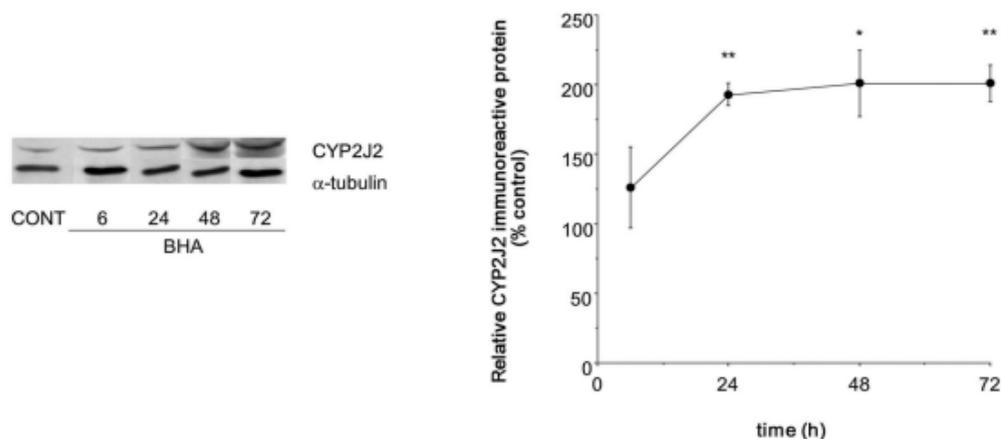


Figura 6. Efectos dosis y tiempo dependientes de los niveles de proteína de CYP2J2 con el tratamiento con BHA en células HepG2. Tomada de Lee & Murray, (2010).

Otro aditivo alimentario de relevancia es el GMS, reconocido por su contribución a la percepción del quinto sabor "umami". Este aditivo es ampliamente consumido a nivel global, siendo especialmente popular en poblaciones asiáticas. Un estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores (2017) documentó un notable aumento en la expresión del mRNA de CYP2J2 en ratas neonatas expuestas al GMS (Figura 7). Se ha establecido que, en animales con pocos días de vida, la exposición al GMS puede tener efectos duraderos en la secreción de la hormona de crecimiento (GH). No obstante, la falta de datos documentados sobre los efectos del GMS en la concentración de CYP2 en un modelo *in vivo* de ratas adultas deja

interrogantes abiertas. Se especula que el GMS podría actuar como un inductor de CYP450 con actividad epoxigenasa, potencialmente incrementando la concentración de EETs en las células y, por ende, afectando diversos procesos fisiológicos como: la disminución de procesos inflamatorios en diferentes afecciones.

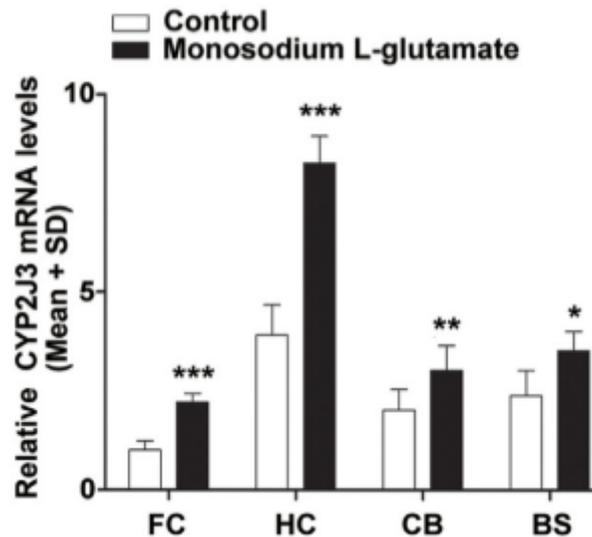


Figura 7. Incremento de los niveles de mRNA de CYP2J3 observado en la corteza frontal (FC), hipocampo (HC), cerebelo (CB) y tronco encefálico (BS), tras el tratamiento con GMS en ratas Wistar neonatas (dosis durante 1, 3, 5 y 7 días de nacidos). Tomada de Liu y colaboradores (2017)

Aunque la información bioquímica sobre el AA ha ido en aumento de manera constante, la cantidad de informes sobre los moduladores de los CYP2 es insuficiente. La investigación relacionada con los EETs ha dependido en gran medida de inhibidores de la sEH, mientras que se ha prestado escasa atención a la posibilidad de modular a los CYP450 responsables de su generación.

6. Planteamiento del problema

Se han identificado diversas funciones de la familia CYP2, así como numerosas respuestas fisiológicas relacionadas con los metabolitos derivados de la biosíntesis del AA. Entre los miembros de esta familia, CYP2J3 y CYP2C11 se destacan por su alta expresión en el cerebro y el hígado, respectivamente, y su capacidad para metabolizar tanto fármacos comunes como una variedad de compuestos endógenos. A pesar de estas funciones conocidas, no existen suficientes reportes acerca de la regulación y las vías de señalización implicadas en el control de CYP2J3 y CYP2C11.

En este estudio, se buscó ampliar el conocimiento sobre la modulación de CYP2J3 y CYP2C11 en el hígado y la corteza cerebral de ratas. Ambos miembros de la familia CYP2 en ratas comparten una notable similitud en la secuencia de aminoácidos con CYP2J2 y CYP2C11 en humanos (más del 70%). Utilizando un modelo *in vivo*, se investigaron los efectos inductores de dos aditivos alimentarios presentes en la dieta humana, específicamente el glutamato monosódico e hidroxibutilanisol, en los niveles de proteína de CYP2J3 y CYP2C11. Se especula que estos aditivos activan los factores de transcripción Nfr2 y AP-1, y su evaluación en este contexto proporcionará una comprensión más detallada de la regulación de estas enzimas cruciales en el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos.

7. Hipótesis

Ya que algunos promotores de los genes que codifican para CYP2 presentan sitios de unión para los factores de transcripción Nfr2 y AP-1, al estimular su activación con glutamato monosódico (GMS) e hidroxibutilanisol (BHA), esto se traducirá en una modulación en los niveles de proteína de los CYP2J3 y 2C11 en corteza cerebral e hígado de ratas tratadas con estos compuestos.

8. Objetivo general

- Analizar la modulación de CYP2J3 y CYP2C11 en la corteza cerebral e hígado de ratas sometidas a tratamientos con una sola dosis de GMS y BHA.

9. Objetivos particulares

- Cuantificar los niveles de proteína de CYP2J3 y CYP2C11 en la corteza cerebral y en el hígado después del tratamiento con BHA y GMS mediante Western blot.
- Identificar si existen sitios de unión para los factores de transcripción AP-1 y Nrf2 en el promotor de *CYP2J3* y *CYP2C11* utilizando herramientas bioinformáticas.
- Proponer posibles las vías involucradas en la modulación de CYP2J3 y CYP2C11 después de la exposición a BHA y GMS.

10. Estrategia experimental

10.1 Condiciones éticas

El presente estudio se realizó bajo la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. Para llevar a cabo los experimentos descritos se utilizaron como modelo experimental a 20 ratas macho Wistar. Los animales fueron sacrificados de acuerdo con el protocolo de ética aprobado por la comisión para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con número de folio: 6332.

Los desechos biológicos se procesaron según lo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, “Protección ambiental -Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo”.

10.2 Tratamiento de los animales

Se obtuvieron 20 ratas macho Wistar de 200 g del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, se dividieron en cuatro grupos, cada uno con 5 ratas. Durante el proceso de experimentación las ratas permanecieron en un cuarto con temperatura controlada (22-25°C), con un ciclo de 12 horas luz y oscuridad, con acceso libre a agua y alimento. Todos los tratamientos se siguieron durante 24 horas. La eutanasia se realizó con guillotina y se disectaron el hígado y el cerebro de todos los animales. Estos órganos se congelaron a -80°C hasta su uso.

Tratamientos:

Todos los tratamientos se aplicaron vía intraperitoneal (i.p.).

Grupo I) se les administró GMS 4 mg/kg (Sigma-Aldrich G1626 Lot # SLVV5817) diluido en solución salina estéril (Pisa Flexoval B.P).

Grupo II) control del grupo I, se trataron con solución salina estéril (Pisa Flexoval B.P).

Grupo III) se les administró 32 mg/kg de BHA (Sigma-Aldrich W218208 Lot # MKCG0079) disuelto en aceite de maíz (Sigma-Aldrich-C8267).

Grupo IV) control del grupo III, se trataron con aceite de maíz (Sigma-Aldrich-C8267).

10.3 Obtención y cuantificación de proteínas totales

10.3.1 Obtención de la fracción S9 de hígado y corteza cerebral

Los tejidos se descongelaron gradualmente a diferentes temperaturas (-80°C a -20°C y luego a 4°C) durante 20 minutos cada vez, manteniendo la cadena de frío sobre hielo y utilizando material esterilizado. En el caso del cerebro, una vez descongelado, se disectó la corteza cerebral.

Posteriormente, los tejidos se pesaron en papel aluminio, se colocaron en un vaso de precipitado con pinzas y se multiplicó su peso por tres. Esto determinó la cantidad de solución amortiguadora Tris•HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6 (con inhibidores de proteasas) y KCl 0.15M necesaria para procesar el cerebro y el hígado respectivamente.

Posteriormente, los tejidos fueron triturados para crear una mezcla homogénea utilizando un pistilo de teflón. Esta mezcla homogénea se transfirió a tubos para centrifugar y se sometió a una centrifugación de 15 minutos a 10,000 rpm a 4°C utilizando un rotor Beckman Coulter 80 Ti. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante (Fracción S9), que es la porción líquida resultante y contiene componentes solubles como enzimas. Esta fracción se transfirió a tubos estériles de 50 ml, se incubó en hielo seco y posteriormente se congeló a -80 °C para su almacenamiento hasta su utilización.

10.3.2 Obtención de microsomas de hígado y corteza cerebral

Para obtener microsomas, se utilizó material previamente esterilizado y se mantuvo la cadena fría. Los tubos de la fracción S9 se descongelaron y se tomaron 6 ml de cada uno, luego se sometieron a ultracentrifugación a 100,000 g durante 1 hora a 4°C (Beckman Coulter Rotor 80 Ti). Después, se desechó el sobrenadante, se añadieron 6 ml de amortiguador de sacarosa 0.25 M para resuspender el botón, se homogeneizaron y se sometieron nuevamente a ultracentrifugación. Se desechó el sobrenadante, y a las muestras de hígado se les agregó 2 ml de un amortiguador de fosfatos de potasio 1M, mientras que a las muestras de cerebro se les añadió amortiguador RIPA. Los botones se resuspendieron, homogeneizaron y así se obtuvo la fracción microsomal. Luego, se transfirieron a tubos de 2 ml, se tomaron alícuotas de 100 µl, se enfriaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

10.3.3 Cuantificación de proteínas totales: método de Bradford

Los microsomas de hígado se sonicaron dos veces durante 10 segundos, con pausas en hielo de 30 segundos entre cada sonicación. Estas sonicaciones fueron necesarias porque los microsomas de hígado se obtuvieron antes de la pandemia de Covid-19. En cambio, los microsomas de cerebro no fueron sonicados debido a la presencia de detergentes en el amortiguador RIPA. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando la técnica de Bradford, que utiliza un colorante llamado azul de Coomassie. Esta técnica, comúnmente usada para determinar la concentración de proteínas se realizó según las instrucciones del proveedor, con cada muestra analizada en cuadruplicado.

10.4 Inmunodetección por Western Blot

10.4.1 Preparación de muestras

Se realizaron cálculos para tomar 30 µg de proteína total de microsomas hepáticos y de la corteza cerebral, respectivamente. Se mezcló el amortiguador de carga con los microsomas en una proporción 1:1, se homogeneizó con una micropipeta, se calentó durante 5 minutos en baño maría, se enfrió en hielo (4-8°C) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

10.4.2 Preparación de geles

Antes de preparar los geles, se montó todo el equipo y se limpiaron los vidrios de 1.5 mm y los peines correspondientes a este grosor. El gel de poliacrilamida separador, preparado al 11%, se homogeneizó y se vertió entre los vidrios. Después de verterlo, se añadieron 150 µl de isopropanol para evitar burbujas. Una vez solidificado el gel separador, se absorbió el isopropanol restante con papel filtro. Luego, se vertió el gel concentrador al 6% y se colocaron los peines antes de que solidificara para formar los pozos. Después de que el gel se solidificó por completo, se retiraron cuidadosamente los peines y se verificó que no hubiera daños en los geles. (Ver cantidades exactas para la preparación de los geles en la sección de Anexo)

10.4.3 Electroforesis, transferencia y bloqueo

Electroforesis

Se preparó el equipo y se llenó la cámara con amortiguador de corrida 1X (Tris base, glicina, SDS 10%, agua mili Q; ver cantidades en la sección de Anexo). Se descongeló el marcador

de peso molecular y las muestras de microsomas con amortiguador de carga, homogeneizándolas con el vórtex antes de cargarlas en los pozos del gel de poliacrilamida. Después de cargar el gel, se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder. La electroforesis se realizó a 60 V durante una hora, luego se aumentó a 100 V y se dejó correr durante una hora más.

Transferencia

Se preparó el amortiguador de transferencia 1X que contiene Tris base, glicina, metanol absoluto y agua Milli-Q (véase cantidades en Anexo), se vació un poco del mismo en una bandeja y se desmontaron con delicadeza los geles con las proteínas separadas. En el mismo amortiguador se humedecieron las esponjas y el papel filtro correspondiente para armar los cassettes, así como la membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm, se eliminaron las burbujas y se ensambló el equipo para realizar la transferencia. La cámara se conectó a la fuente de poder por una hora con 15 minutos a 100 V a 4°C. Al terminar la transferencia, se desmontó el equipo, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau y se mantuvieron en agitación por 10 minutos, se retiró el colorante y se enjuagaron las membranas con un poco de agua desionizada, para asegurar una buena transferencia. Tomando en cuenta el peso molecular de los CYP450 a evaluar (55 kDa para CYP2C11 y 58 kDa para CYP2J3), las membranas se cortaron en dos secciones, la correspondiente al CYP450 y al gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), para su posterior bloqueo y exposición a anticuerpos.

Bloqueo

Se preparó albúmina al 5% para bloquear las membranas, y estas se mantuvieron en agitación constante durante 1 hora a 4°C para asegurar una completa saturación y bloqueo de sitios de unión no específicos de los anticuerpos.

10.4.4 Incubación con anticuerpos

Al finalizar el bloqueo de las membranas se realizaron 3 lavados con Tween-TBS 0.3% de 10 minutos cada uno con agitación constante. Pasado el tiempo, cada membrana se expuso a su anticuerpo primario correspondiente (anti-CYP2C11 1:5000; anti-CYP2J2 1:1000; anti-GAPDH 1:1000) y se mantuvieron en agitación constante toda la noche a 4°C. Las concentraciones de los anticuerpos empleados se determinaron a partir de las recomendaciones del proveedor.

Al siguiente día se lavaron las membranas 3 veces con Tween-TBS 0.3% por 10 minutos cada lavado para retirar el excedente del anticuerpo primario y se expusieron a su respectivo anticuerpo secundario (anti-mouse 1:10000; anti-rabbit 1:5000). La determinación de las concentraciones de los anticuerpos secundarios se llevó a cabo mediante investigaciones previas realizadas en el laboratorio. Las membranas con los anticuerpos se mantuvieron por una hora en agitación constante a 4°C. Finalmente las membranas se lavaron 2 veces con Tween-TBS 0.3% y 1 vez con TBS 1X.

10.4.5 Revelado de membranas y cuantificación relativa de proteínas

Para llevar a cabo la reacción de quimioluminiscencia se utilizó Luminol (Western blotting detection reagent, Amersham™ ECL™) utilizando una proporción 1:1 del reactivo A y B. Las imágenes se recopilaron en un fotodocumentador Kodak GEL Logic 1500 y cada imagen se respaldó en un formato tif. La cuantificación relativa de las proteínas se realizó con el *software* ImageJ que es capaz de cuantificar la intensidad de las bandas. Se realizaron 3 repeticiones para las muestras de hígado y cerebro de cada CYP450 evaluado, pero se presentan en este trabajo las imágenes más representativas.

10.5 Análisis de secuencias de promotores: *CYP2J3* y *CYP2C11*

Se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de los sitios de unión para factores de transcripción específicos, como c-Jun, c-Fos, AP-1, y Nrf2, dentro de los promotores de los genes *CYP2J3* y *CYP2C11* de rata. Esta búsqueda se realizó utilizando secuencias de hasta 4,500 pares de bases antes del inicio de la transcripción, las cuales fueron obtenidas de fuentes publicadas en PubMed. Además, se utilizó el programa de libre acceso AliBaba 2.1 de BIOBASE para analizar y confirmar la presencia de posibles sitios de unión en las regiones promotoras de interés.

10.6 Análisis estadístico

Se empleó una prueba de t de Student para comparar los niveles de proteína entre los grupos de control y tratados. Previamente, se evaluó la normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y se analizó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Fisher. En todos los casos, los datos demostraron provenir de una distribución normal, con varianzas homogéneas. Se consideró significancia estadística cuando el valor de $p < 0.05$.

11. Resultados

11.1 Inmunodetección por Western Blot de CYP2C11 y CYP2J3

11.1.1 Los niveles de proteína de CYP2C11 aumentan en microsomas hepáticos por el tratamiento con BHA

Después de 24 horas de la administración de BHA (i.p.) el hígado fue recolectado y se analizaron los niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 mediante Western Blot (Figura 8 A- B) Los niveles de CYP2C11 aumentaron después de una sola dosis de BHA (este aumento fue del 52% comparado con el control) ($p=0.0003$). Por otra parte, como se aprecia en la Figura 8 C-D, los niveles de proteína de CYP2J3 (la isoforma homóloga de CYP2J2 en humanos) no mostraron cambios después del tratamiento con BHA ($p=0.06$).

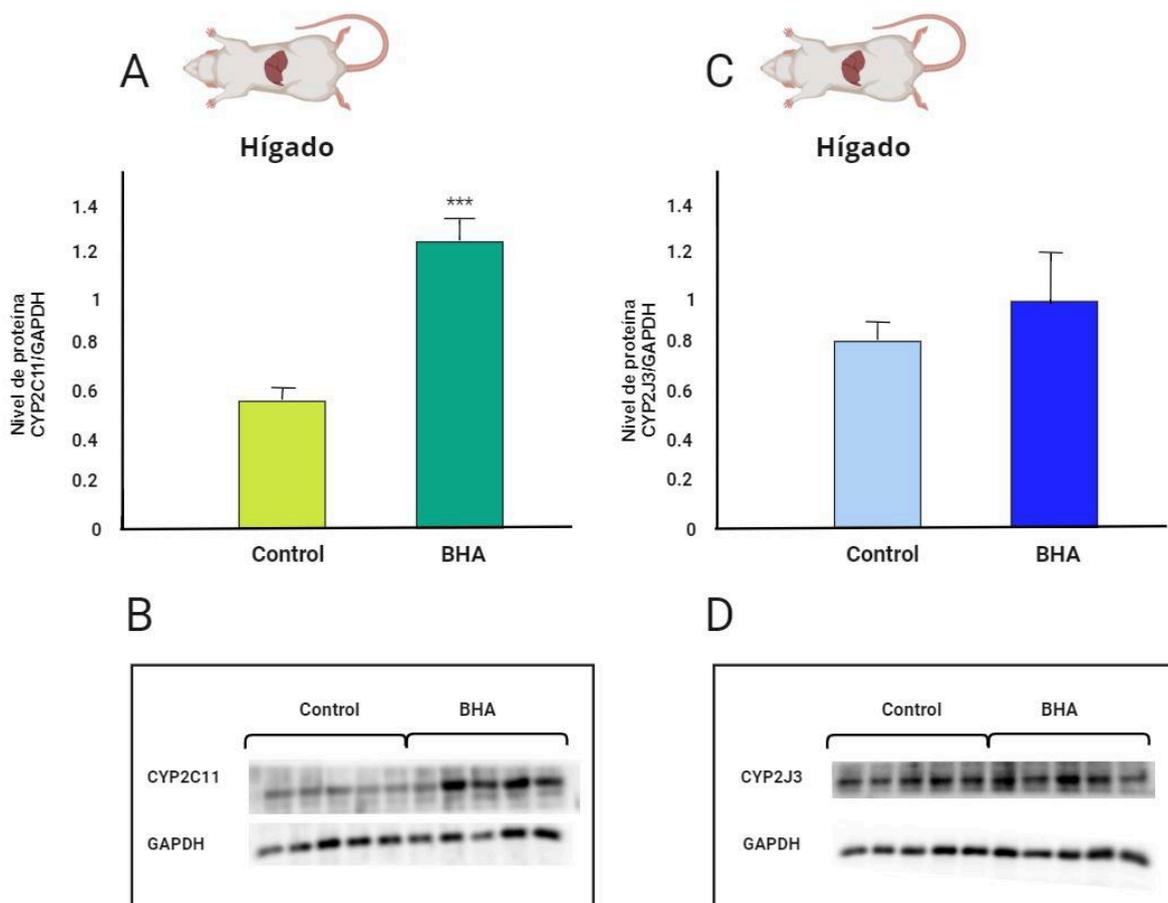


Figura 8. Niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en el hígado después de la administración con BHA: A) niveles de expresión proteica de CYP2C11 en el hígado de ratas tratadas con BHA (32 mg/kg); B) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se detecta a CYP2C11 y el

control de carga GAPDH en hígados de animales tratados con BHA y sus respectivos controles; C) niveles de expresión proteica de CYP2J3 en el hígado luego del tratamiento con BHA y los correspondientes grupos de control (32 mg/kg); D) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se detecta CYP2J3 y GAPDH en las muestras de los animales tratados con BHA o vehículo. La n para cada grupo experimental fue de 5 ratas Wistar, cada ensayo fue replicado en cinco ocasiones. Los datos están representados como las medias \pm EEM. Se utilizó t de Student para determinar las diferencias significativas (**p<0.05).

11.1.2 Los niveles de proteína de CYP2C11 aumentan en corteza cerebral por el tratamiento con BHA

En las muestras de cerebro de rata se encontró que con el tratamiento con BHA (32 mg/kg) los niveles de proteína de CYP2C11 aumentaron un 38.4% comparado con su control (p=0.00001; Figura 9 C-D). Por el contrario, los niveles de proteína de CYP2J3 no mostraron cambios significativos en la corteza cerebral (p=0.4472).

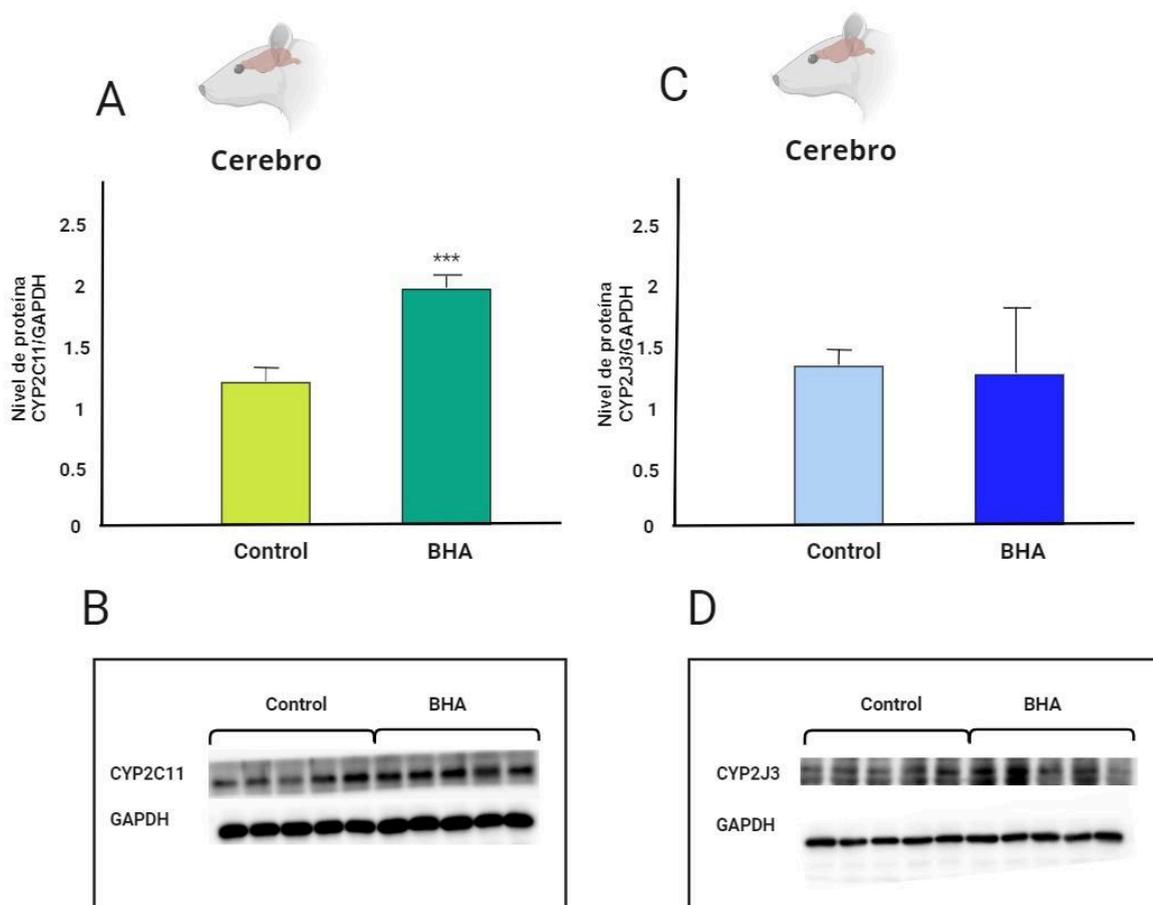


Figura 9. Niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en la corteza cerebral después de la administración con BHA: A) niveles de expresión proteica de CYP2C11 en la corteza cerebral de ratas Wistar después del tratamiento con BHA (32 mg/kg), el grupo control indica muestras sin tratamiento; B) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se detecta a CYP2C11 luego de administrar el tratamiento con BHA y el control de carga GAPDH; C) niveles de expresión proteica de CYP2J3 en la corteza cerebral después de aplicar el tratamiento con BHA (32 mg/kg); D) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, detecta a CYP2J3 y a GAPDH, en dos grupos, las ratas tratadas con BHA y los respectivos controles con ausencia del tratamiento. La n para cada grupo experimental fue de 5 ratas Wistar, cada ensayo fue replicado en tres ocasiones. Los datos están representados como las medias \pm EEM. Se utilizó la prueba t de Student para determinar las diferencias significativas (***) $p < 0.05$.

11.1.3 Las concentraciones de proteína de CYP2C11 en tejido hepático experimentan una reducción subsiguiente al tratamiento con GMS

Se determinó que los niveles de CYP2C11 del hígado disminuyen significativamente (38%) después del tratamiento con GMS comparado con su control ($p < 0.05$, Figura 10 A-B); por

otra parte, los niveles de proteína de CYP2J3 no mostraron cambios posteriores al tratamiento con GMS ($p=0.5820$, Figura 10 C-D).

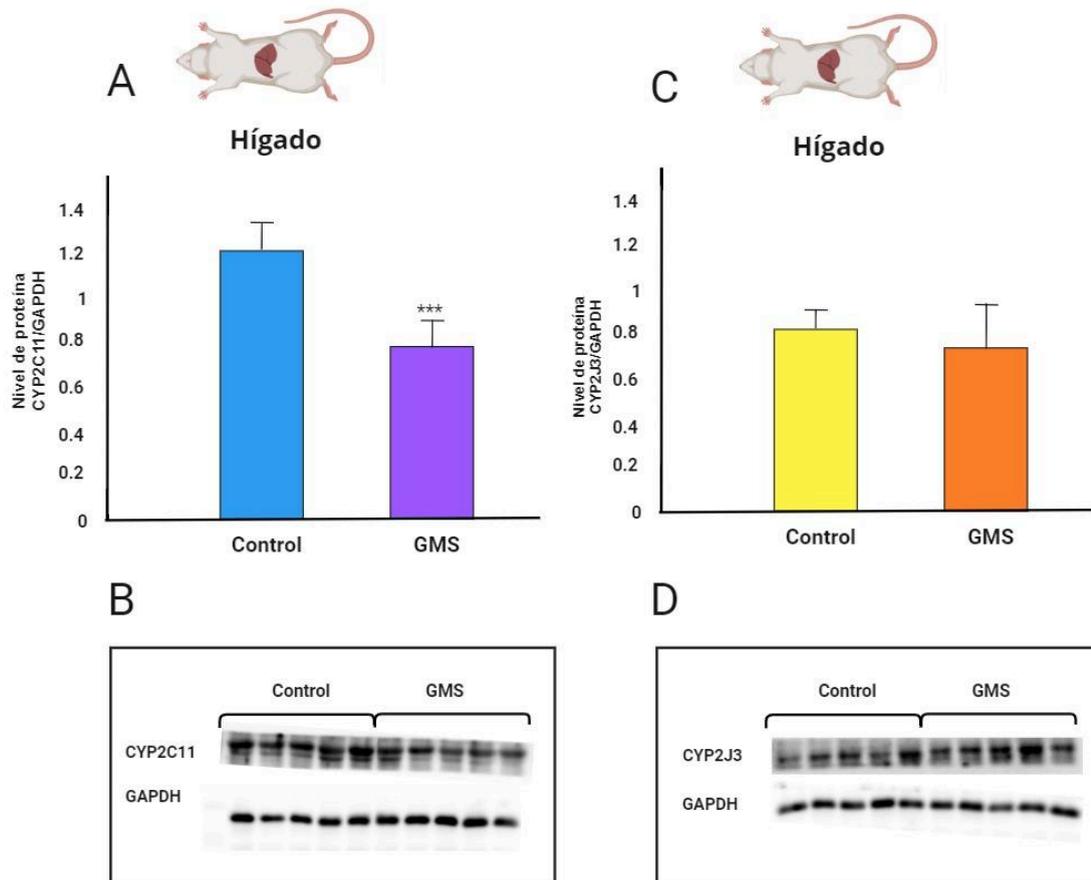


Figura 10. Niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en hígado posterior al tratamiento con GMS: A) niveles de expresión proteica de CYP2C11 en hígado de ratas Wistar después del tratamiento con GMS (4 mg/kg); B) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se detecta a CYP2C11 en tejido hepático de animales tratados con GMS, sus correspondientes controles, que indican ausencia del tratamiento con GMS y su respectivo control de carga GAPDH; C) niveles de expresión proteica de CYP2J3 en hígado después del tratamiento con GMS (4 mg/kg); D) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, detecta a la isoforma CYP2J3 y GAPDH de animales con y sin el tratamiento con GMS. Se utilizaron 5 ratas Wistar en cada grupo experimental ($n=5$), y se repitió cada inmunodetección en cinco ocasiones. Los datos están representados como las medias \pm EEM. Se utilizó la prueba t de Student para determinar las diferencias significativas (***) $p < 0.05$.

11.1.4 Reducción en los niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en la corteza cerebral posterior al tratamiento de GMS

Se observó una disminución del 52% en los niveles de CYP2C11 en la corteza cerebral después del tratamiento con GMS, en comparación con el grupo de control ($p=0.0074$, Fig. 11 A-B). Se evidenció una reducción del 40% en los niveles de proteína de CYP2J3 luego del tratamiento con GMS ($p=0.5820$, Figura 11 C-D).

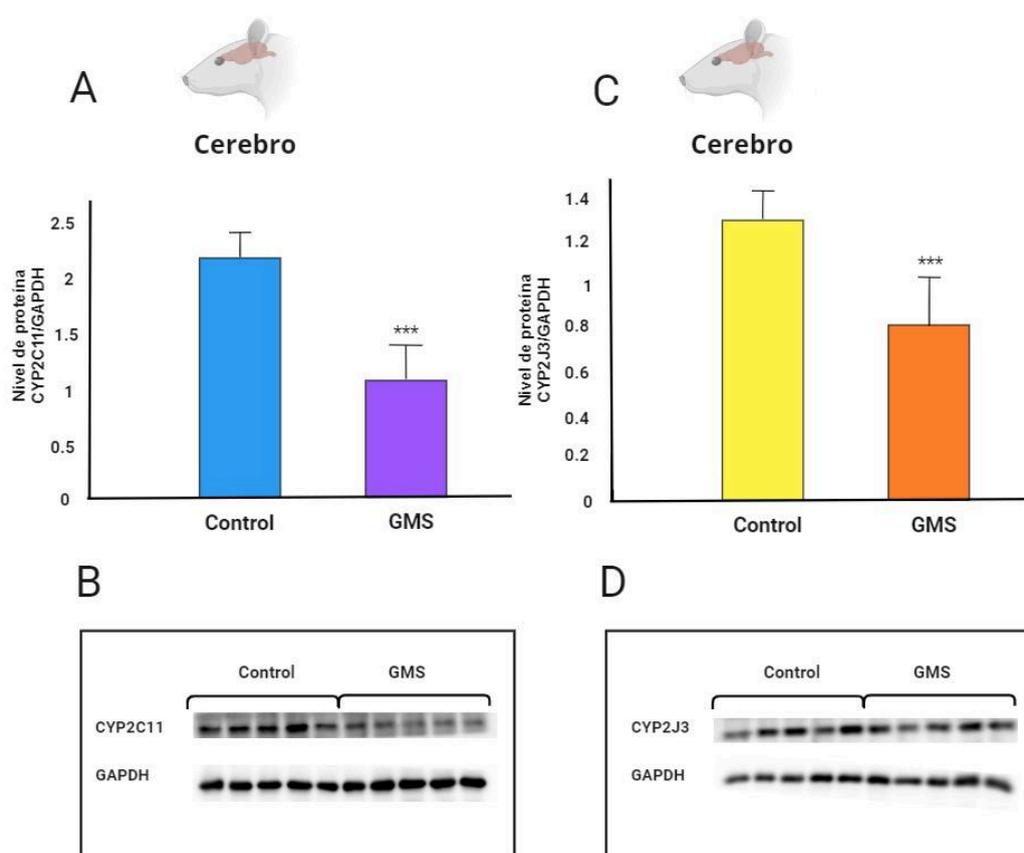


Figura 11. Niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3 en tejido de corteza cerebral después de la administración del tratamiento con GMS: A) los niveles de expresión proteica de CYP2C11 en la corteza cerebral de ratas Wistar, después del tratamiento con GMS a una dosis de 4 mg/kg, se comparan con el grupo de control no tratado; B) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se identifica a CYP2C11 y a GAPDH, en muestras de animales con y sin la administración de GMS; C) niveles de expresión proteica de CYP2J3 en la corteza cerebral posterior el tratamiento con GMS (4 mg/kg); D) membranas de inmunodetección mediante Western Blot, se identifica a CYP2J3 y GAPDH en muestras tratadas con GMS y sus respectivos controles, en ausencia al tratamiento. Se

utilizaron 5 ratas Wistar en cada grupo experimental (n=5), y se repitió cada inmunodetección en 3 ocasiones. Los datos están representados como las medias \pm EEM. Se utilizó la prueba t de Student para determinar las diferencias significativas (***) $p < 0.05$.

11.2 Análisis de secuencias de los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*

11.2.1 Detección de sitios de unión para AP-1 en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*

AP-1, o proteína activadora-1, un factor de transcripción clave que incluye miembros de las familias Jun y Fos, desempeña un papel esencial en la regulación génica y procesos celulares. En genes específicos como *CYP2J3* y *CYP2C11*, la presencia de AP-1 en sus promotores afecta la actividad de estas enzimas, influyendo en el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos (Ung *et al.*, 2021). Además, AP-1 puede ser modulado por aditivos alimentarios, añadiendo complejidad a la regulación génica y sugiriendo posibles efectos en la actividad enzimática de *CYP2J3* y *CYP2C11* (Pinkus *et al.*, 1996).

Se realizó un análisis bioinformático con el programa AliBaba 2.1 en el que se buscó la existencia de sitios de unión para el complejo AP-1 dentro de los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*: Se introdujeron al programa 4500 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción de este gen. Al analizar los resultados se encontraron 12 sitios de unión para este complejo en el gen *CYP2C11* y 13 sitios de unión en el promotor del gen *CYP2J3*. Cabe recalcar que entre las proteínas que conforman a AP-1 se encuentran c-Jun y c-Fos, por lo que al realizar el análisis algunos de estos sitios de unión de AP-1 se traslapan con alguna de las dos proteínas anteriormente mencionadas (Figura 12).

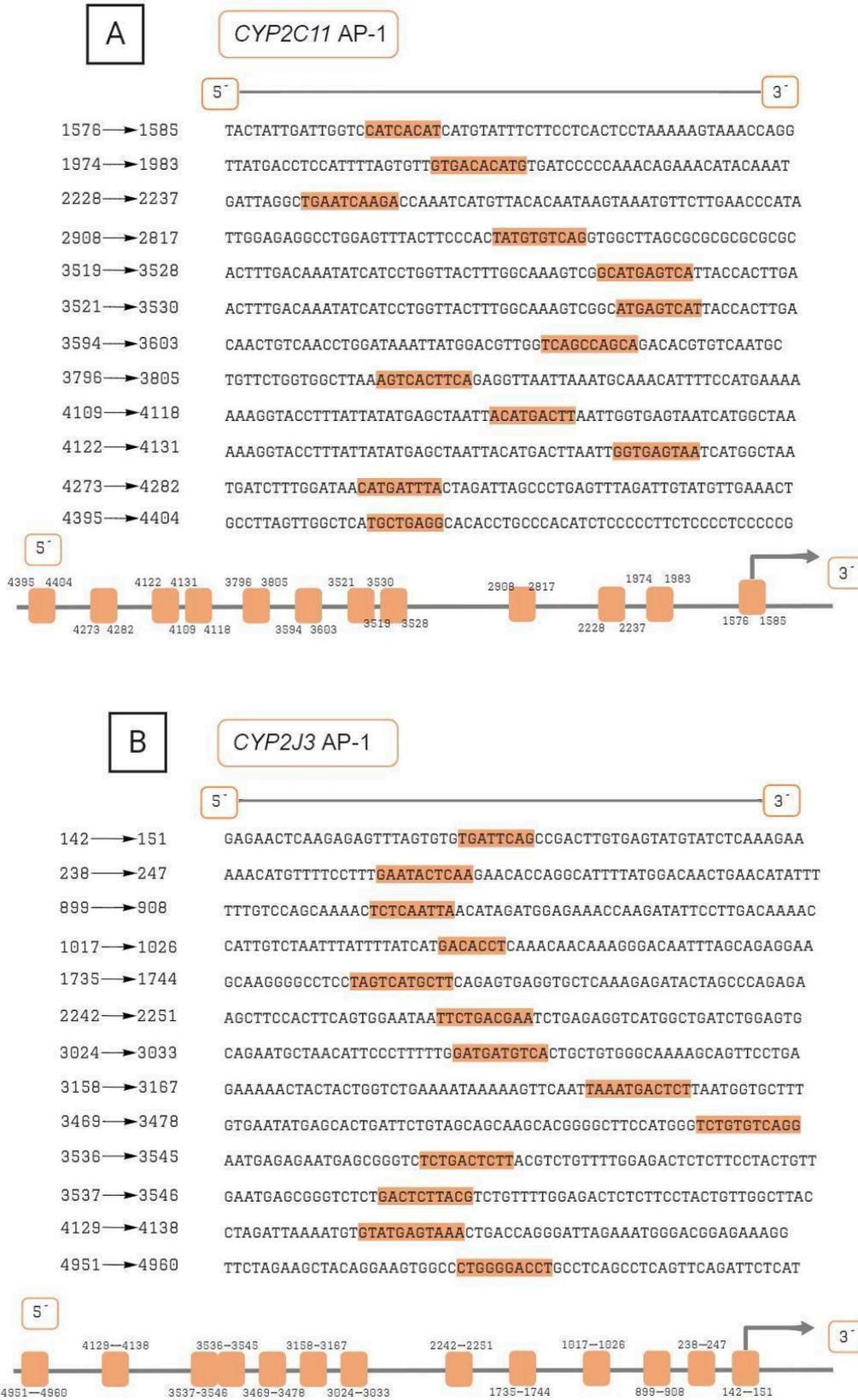


Figura 12. Sitios de unión para AP-1 en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*. Se llevó a cabo la identificación de sitios de unión para AP-1 en la región promotora de *CYP2J3* y

CYP2C11. Utilizando el *software* de libre acceso AliBaba 2.1 (BIOBASE), se llevó a cabo la búsqueda empleando 4,500 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción ATG. Se encontraron 12 posibles sitios de unión para AP-1 para el gen *CYP2C11* (A) y 13 para el gen *CYP2J3* (B). Estos sitios se resaltan con anaranjado en las figuras A y B.

11.2.2 Identificación de sitios de unión para c-Jun en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*

La proteína c-Jun es esencial dentro de la familia de factores de transcripción AP-1 y tiene un papel esencial en la regulación de la expresión génica y la respuesta a señales celulares. Se ha demostrado que este factor de transcripción es capaz de regular la transactivación del gen humano *CYP2J2*, mismo que es homólogo del gen de rata reportado en esta investigación *CYP2J3* (Marden & Murray, 2005). Se ha evidenciado la susceptibilidad de c-Jun a la influencia de aditivos alimentarios, como el BHA, lo cual añade complejidad al marco de la regulación génica y sugiere la posibilidad de alteraciones en la función enzimática de estas moléculas esenciales (Lui *et al.*, 2017).

Al realizar la búsqueda de los sitios de unión para c-Jun, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, se encontraron siete secuencias de unión para c-Jun en el promotor del gen *CYP2C11* (Figura 13 A). Por otro lado, para el gen *CYP2J3* el programa proporcionó únicamente tres sitios de unión (Figura 13 B).

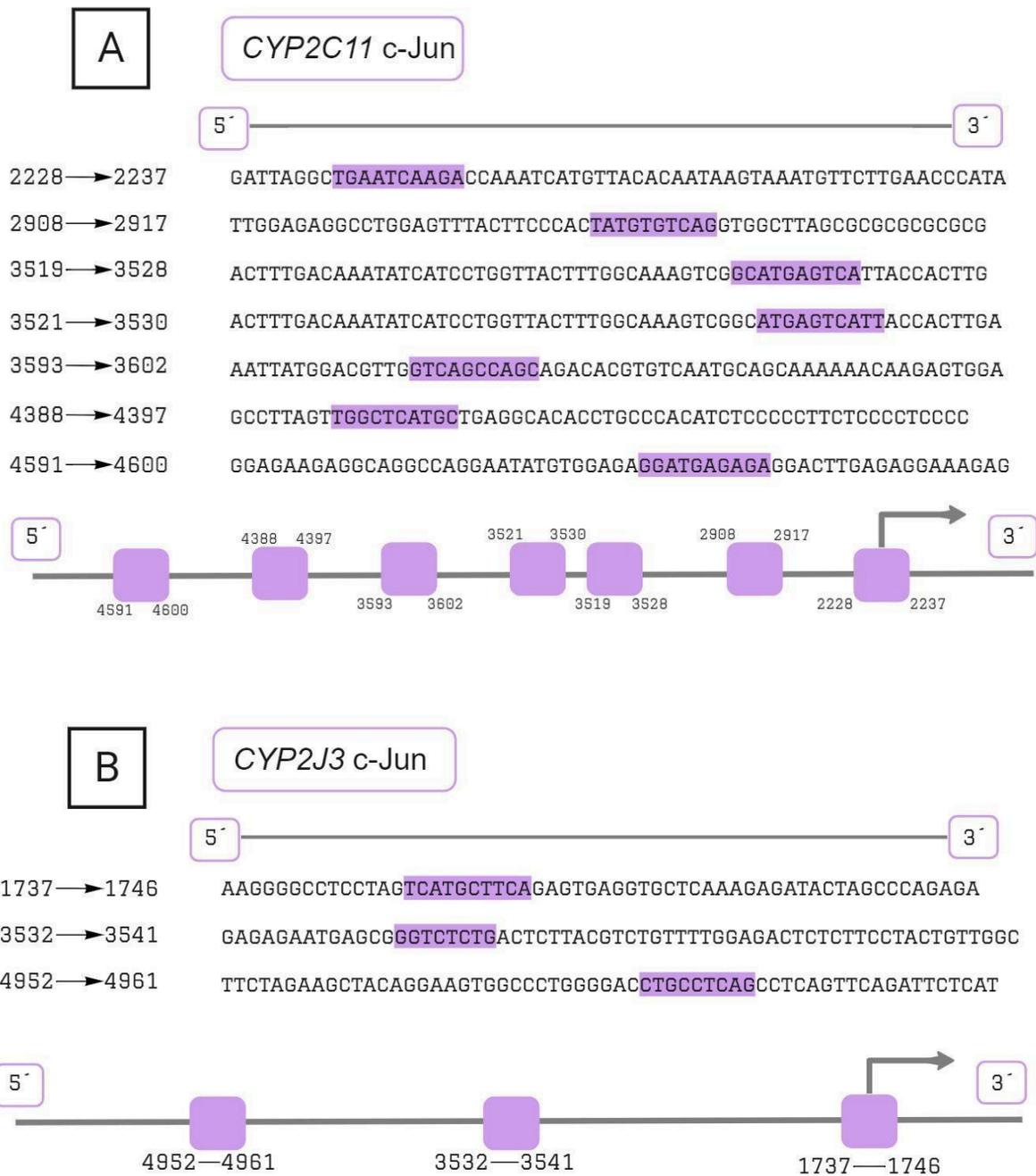


Figura 13. Sitios de unión para c-Jun en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*. Fueron examinados los sitios de unión de c-Jun en la región promotora de *CYP2J3* y *CYP2C11*. La búsqueda se ejecutó a través del *software* AliBaba 2.1 (BIOBASE), utilizando una región de 4,500 pares de bases río arriba del ATG como punto de partida. A) Se encontraron 7 posibles sitios de unión para c-Jun para el gen *CYP2C11*. B) Se encontraron 3 sitios de unión para c-Jun dentro del promotor del gen *CYP2J3*. Los sitios se resaltan en morado, tanto en A como en B.

11.2.3 Detección de sitios de unión para c-Fos en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*

Entre las proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción AP-1 se destaca c-Fos, misma que desempeña un papel fundamental en la regulación génica de muchas enzimas como lo son los CYP450. Anteriormente Gruebele y colaboradores (1996) describieron que c-Fos y c-Jun están vinculados a la activación metabólica de los CYP450.

En el análisis de sitios de unión para la proteína c-Fos se encontraron tres sitios de unión en el promotor de *CYP2C11* (Figura 14A). Sin embargo, para el promotor de *CYP2J3* el programa localizó únicamente dos secuencias de unión de esta proteína (Figura 14B).

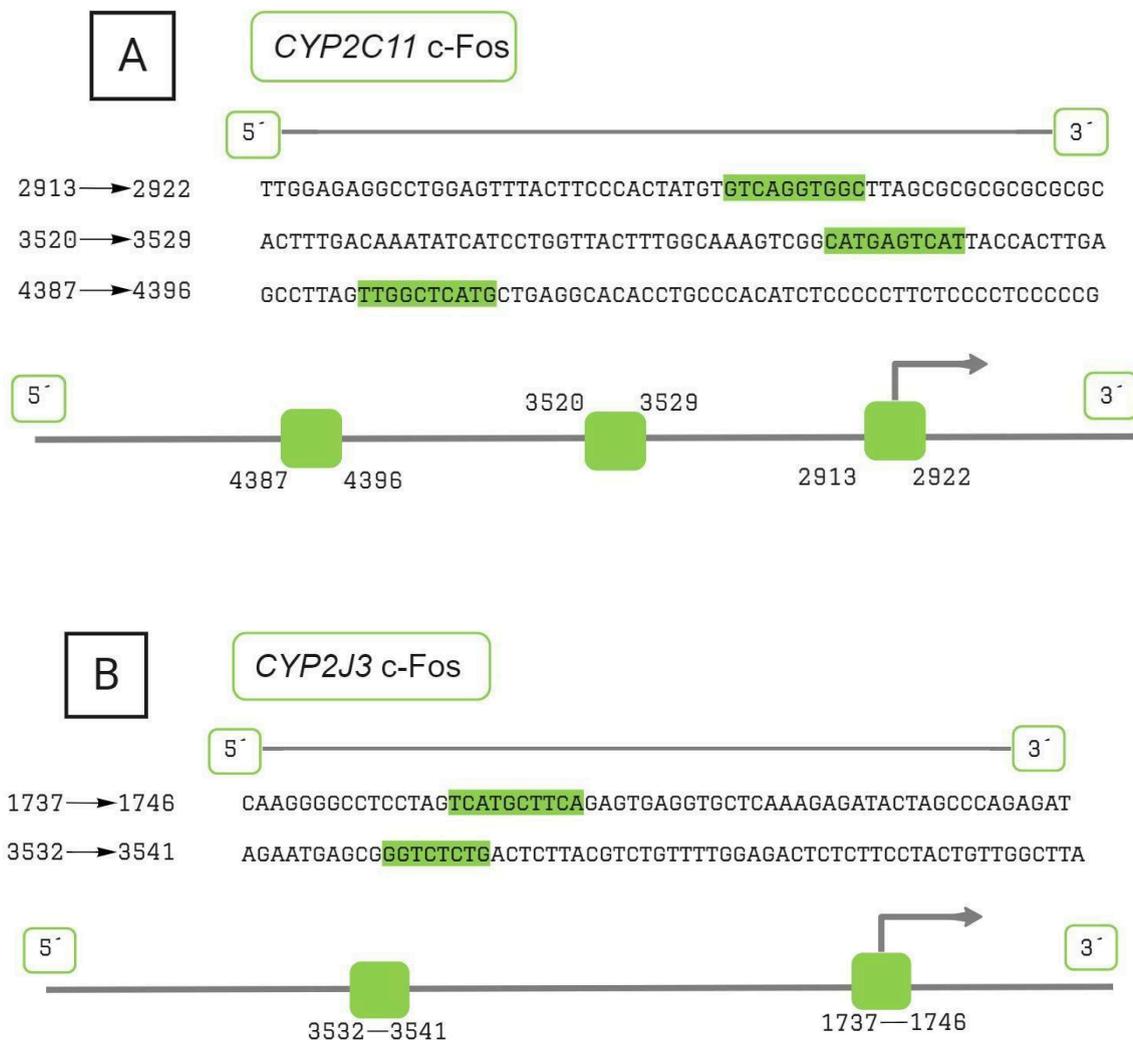


Figura 14. Sitios de unión para c-Fos en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*. Se efectuó una búsqueda de los sitios de unión de c-Fos en la región promotora de *CYP2J3* y

CYP2C11. Se empleó el *software* AliBaba 2.1 (BIOBASE) para la búsqueda, utilizando una región de 4,500 pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción ATG. A) Se encontraron 3 posibles sitios de unión para c-Fos para el gen *CYP2C11*. B) Se encontraron 2 sitios de unión para c-Fos dentro del promotor del gen *CYP2J3*. Los sitios se resaltan en verde.

11.2.4 Identificación de sitio de unión para Nrf2 en el promotor de *CYP2C11*

La interacción entre Nrf2 y CYP450 se centra en la capacidad reguladora de Nrf2 sobre isoformas específicas del sistema enzimático CYP450. Nrf2, un factor de transcripción clave en la respuesta al estrés oxidativo, influye en la expresión de ciertas isoformas de CYP450, incluyendo *CYP2J2*. Este último desempeña un papel crucial en la producción de EETs, lo que a su vez modula importantes efectos fisiológicos (Zhang *et al.*, 2023).

Al realizar la búsqueda de los sitios de unión para Nrf2, únicamente se encontró una secuencia de unión en el promotor del gen *CYP2C11* (Figura 15), para el gen *CYP2J3* el programa no proporcionó ningún resultado dentro de las 4,500 pares de bases proporcionadas al *software*.

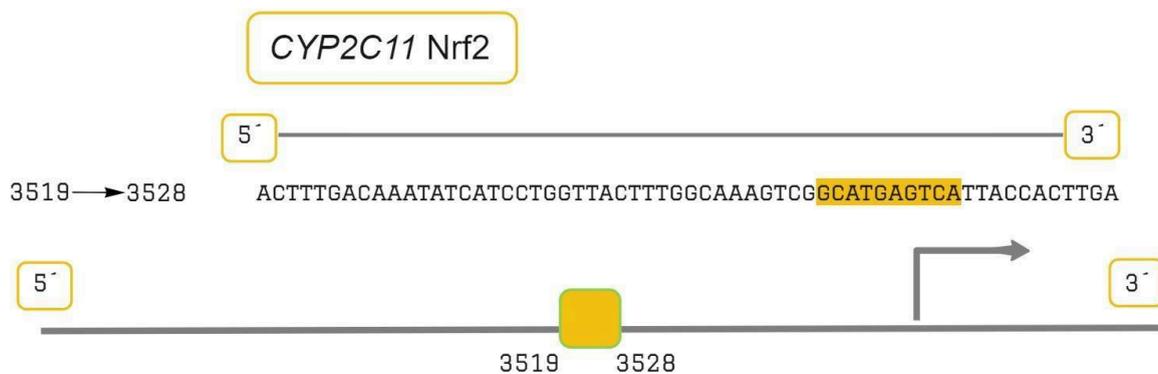


Figura 15. Sitio de unión para Nrf2 en el promotor de *CYP2C11*. La región promotora de *CYP2J3* y *CYP2C11* fue analizada para detectar sitios de unión de Nrf2. La exploración se realizó empleando el *software* AliBaba 2.1 (BIOBASE), utilizando una región de 4,500 pares de bases río arriba del ATG como área de interés. Se encontró un sitio de unión para Nrf2 para el gen *CYP2C11* (se resalta en amarillo), no se encontró ninguno para *CYP2J3*.

12. Discusión

12.1 Tratamiento con BHA

Recientemente, se ha descrito que los EETs presentan diversas propiedades clínicas importantes, incluyendo notables capacidades antiinflamatorias, vasodilatadoras, efectos antiapoptóticos y el mejoramiento de condiciones de fibrosis. A pesar de estos hallazgos, persiste una notable carencia de información acerca de los factores que podrían incidir en las enzimas CYP450, responsables de la biotransformación del AA en EETs, particularmente en miembros de la familia CYP2. (Sun *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2011, Luo *et al.*, 2018). Es por ello que este estudio se centró en la posible modulación de CYP2C11 y CYP2J3, principales isoformas responsables de la formación de los EETs, por medio de la ingesta de aditivos alimentarios sintéticos que están presentes en la dieta de la población mundial humana.

Se propuso como un posible modulador a un antioxidante sintético el BHA debido a investigaciones anteriores donde se presentaba como un inductor de la isoforma CYP2J2, tanto en niveles de proteína como en niveles de mRNA en células HepG2 (Lee & Murray., 2010). En la presente investigación se reporta que una sola dosis de BHA bastó para incrementar más del 52% de los niveles proteicos de CYP2C11 en el hígado en un modelo *in vivo* de rata Wistar. Sin embargo, dicha dosis no moduló significativamente los niveles de proteína de la isoforma CYP2J3 (homóloga de CYP2J2) (Figura 8). Es posible que esta diferencia se deba a los modelos utilizados, así como la frecuencia en la dosis aplicada de BHA. En el actual trabajo de tesis se administró una única vez vía intraperitoneal a un modelo *in vivo* (32 mg/kg). Sin embargo en el estudio publicado por Lee y Murray (2010) donde se describen diferencias en los niveles de proteína y mRNA de CYP2J2 bajo el tratamiento con BHA, se administró una concentración de 100 μ M a las 6, 12, 18, 24 y 42 horas, proponiendo que la frecuencia de consumo puede ser un factor importante para el incremento de isoformas pertenecientes a la familia CYP2. Así mismo, la disponibilidad de este aditivo alimentario es distinta al pasar por las barreras fisiológicas que presenta un organismo como lo son las ratas Wistar comparado con la disponibilidad que puede tener el compuesto en las células HepG2 al exponerlas al BHA en combinación con su medio de cultivo.

Debido a que en hígado se encontró un incremento de CYP2C11 del 52%, se decidió evaluar la corteza cerebral, ya que se ha reportado que la producción de EETs por CYP 2J3 y 2C11 puede ser beneficiosa para la mejora de algunas enfermedades originadas en el cerebro como Parkinson y Alzheimer (Sun *et al.*, 2021; Pallas *et al.*, 2020), también se ha reportado recientemente que aumentar la concentración de EETs puede aliviar el dolor crónico causado por un accidente cardiovascular (Liu *et al.*, 2021); así mismo, se ha visto que la producción de los metabolitos de los CYP450 con actividad epoxigenasa pueda ser beneficiosa para mejorar la memoria en trastornos como el TDAH y la depresión (Peng *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020), trastornos que han adquirido gran importancia actualmente por el incremento en las poblaciones que los padecen. El comportamiento en los niveles de proteína mostró que la dosis administrada de BHA también ocasionó un aumento en los niveles de CYP2C11 de un 44% en la corteza cerebral (Figura 9), demostrando que los efectos de este aditivo alimentario pueden influir aún estando presente la barrera hematoencefálica. Este hallazgo es importante ya que estamos vislumbrando que un antioxidante consumido en la dieta podría tener efectos en la regulación de estas enzimas productoras de potentes anti inflamatorios y marca un antecedente para realizar futuras investigaciones respecto al consumo del BHA para evaluar si pasando por el proceso de digestión y metabolismo se pueden observar los efectos en el incremento de esta isoforma de CYP450.

En el artículo publicado por Lee & Murray (2010) identificaron a BHA como inductor de CYP2J2 en células HepG2 y describieron la posible relación con los factores de transcripción bZIP, c-Jun y Nrf2. En otro estudio se propuso que el estrés oxidativo mediado por CYP2E1 bajo el tratamiento de BHA (100 μ M) puede translocar a Nrf2 al núcleo a través de la regulación positiva de la vía PKC/MEK, lo que resulta en la inducción de CYP2A6 en una línea celular de monocitos (U937) (Jin & Kumar., 2012). Por otra parte, Yuan y colaboradores (2006) demostraron mediante experimentos de dosis-respuesta y de evolución temporal que BHA aumentaba la acumulación de Nrf2 y, al mismo tiempo, disminuye el nivel de su proteína secuestradora Keap1, también que el tratamiento con BHA aumenta los niveles de fosforilación de ERK1/2 y JNK1/2. Cabe recalcar que además de la modificación directa en la proteína Keap1 para interrumpir la unión de Keap1/Nrf2, se ha propuesto la activación de varias cascadas de señalización de cinasas, incluidas la PI3K, PKC y la vía de MAPK para controlar la liberación de Nrf2 de la unión de Keap1 y su translocación nuclear (Shen & Kong., 2009). Por lo que en el presente estudio se realizó una búsqueda de los sitios de unión para el complejo proteico AP-1, los factores de transcripción que lo comprenden

(c-Jun y c-Fos), así como el factor de transcripción Nrf2 en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*. Se encontraron 12 sitios de unión para AP-1, 7 sitios de unión para c-Fos y 3 para c-Jun en el promotor del gen *CYP2C11*, así como 13 sitios de unión para AP-1, 3 para c-Jun y 2 para c-Fos en el promotor de *CYP2J3* y únicamente se encontró un sitio de unión para el factor de transcripción Nrf2 en el promotor de *CYP2C11* (Figuras 12-15). Lo anterior podría proponer como posible explicación de la modulación de *CYP2C11* por el tratamiento con BHA en un modelo *in vivo* se da mediante la unión de Nrf2, c-Jun y c-Fos a la secuencia promotora del gen *CYP2C11*. Además, la unión de estos tres factores de transcripción no es posible sin la modulación de vías de señalización de quinasas estimuladas por el tratamiento con BHA (Figura 16).

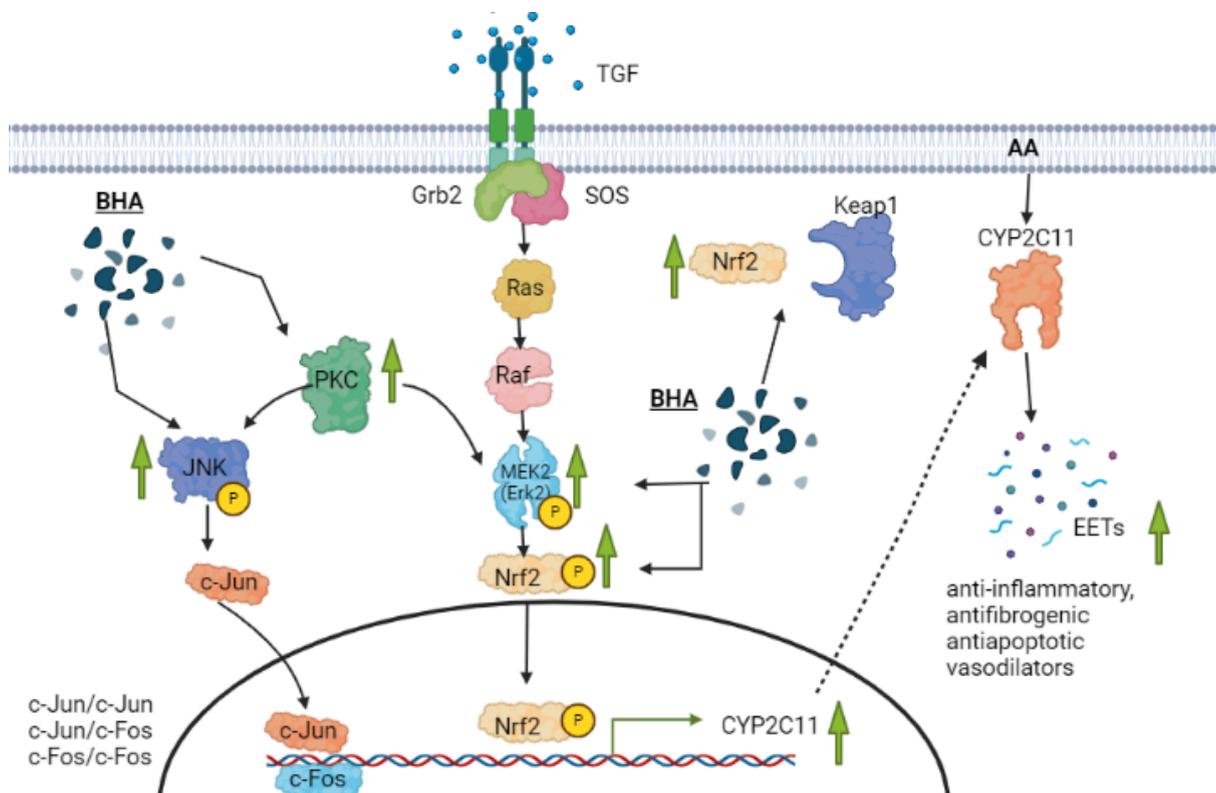


Figura 16. Esquema de la posible activación de vías de señalización de quinasas bajo el tratamiento con BHA para la modulación de CYP2C11 a través de la inducción de factores de transcripción bZIP. Se propone que el BHA puede incrementar los niveles proteicos en el citosol de la quinasa PKC. La proteína PKC puede fosforilar a la proteína JNK y así estimular la producción del factor de transcripción c-Jun, mismo que puede formar dímeros o heterodímeros con c-Fos y de esta manera unirse a los sitios de unión en la secuencia promotora del gen *CYP2C11*. Por otra parte el incremento de PKC por BHA puede estimular la fosforilación de ERK, a su vez la disociación de Nrf2/Keap1, permitiendo la entrada de Nrf2 al núcleo y su unión a la secuencia promotora del gen

CYP2C11. A través de la unión de estos factores de transcripción se puede incrementar la proteína de CYP2C11 misma que podrá biotransformar al AA en EETs que son metabolitos con relevancia clínica.

12.2 Tratamiento con GMS

En el presente estudio también se decidió administrar al modelo animal con GMS, el aditivo alimenticio más consumido en el mundo, para comprobar la posible regulación de isoformas CYP2C11 y CYP2J3, mismas que se han reportado están importantemente involucradas en la síntesis del AA en EETs.

Se había documentado con anterioridad que en modelos animales neonatos el GMS bloquea por completo la secreción de la GH y puede suprimir algunas isoformas de CYP450 incluido el CYP2C11 (Banerjee *et al.*, 2015). Sin embargo, no hay información literaria que demuestre qué pasa cuando se someten animales adultos a GMS (i.p.), ni la regulación de enzimas relacionadas con la producción de EETs.

En este estudio bajo una sola dosis de GMS (4 mg /kg) a ratas Wistar adultas, se midieron los niveles de proteína de CYP2C11 y CYP2J3. Los resultados demostraron que los tratamientos con GMS disminuyen la producción de la isoforma CYP2C11 en hígado un 38% (Figura 10). También se observa la disminución del 40% de los niveles de proteína de CYP2J3 y del 52% de la isoforma CYP2C11 en la corteza cerebral (Figura 11). Esos hallazgos son importantes ya que es el primer reporte que se tiene de la modulación de isoformas de CYP450 productoras de los EETs tras una dosis de GMS en un modelo *in vivo* adulto. No obstante, se requieren más experimentos para evaluar una disminución en los metabolitos del AA. Sin embargo este estudio proporciona antecedentes para suponer una baja en su expresión.

Un estudio realizado por Liu y colaboradores (2017) demostró que el GMS puede inhibir la vía de señalización de MAPK (ERK1/2, p38 y JNK), a su vez puede modular los niveles proteicos cerebrales de CYP2J y la producción de EETs. Se sabe que la vía de señalización MAPK afecta directamente la producción de factores de transcripción Nrf2 y c-Jun. Al realizar la búsqueda de sitios de unión a estos factores de transcripción en los promotores de los genes *CYP2J3* y *CYP2C11* se encontró 1 sitio de unión para Nrf2, 12 para AP-1, 7 sitios de unión para c-Fos y 3 para c-Jun en el promotor del gen *CYP2C11*, así como 13 sitios de unión para AP-1, 3 para c-Jun y 2 para c-Fos en el promotor de *CYP2J3* (Figuras 12-15). Con base en estos hallazgos en el presente estudio se propone para investigaciones futuras que la

regulación negativa de CYP2C11 y CYP2J3 se debe a una inhibición de la vía de señalización MAPK (ERK1/2, p38 y JNK), dado por la ya reportada obstrucción del GMS en la liberación común de la GH, misma que es ligando de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Figura 17).

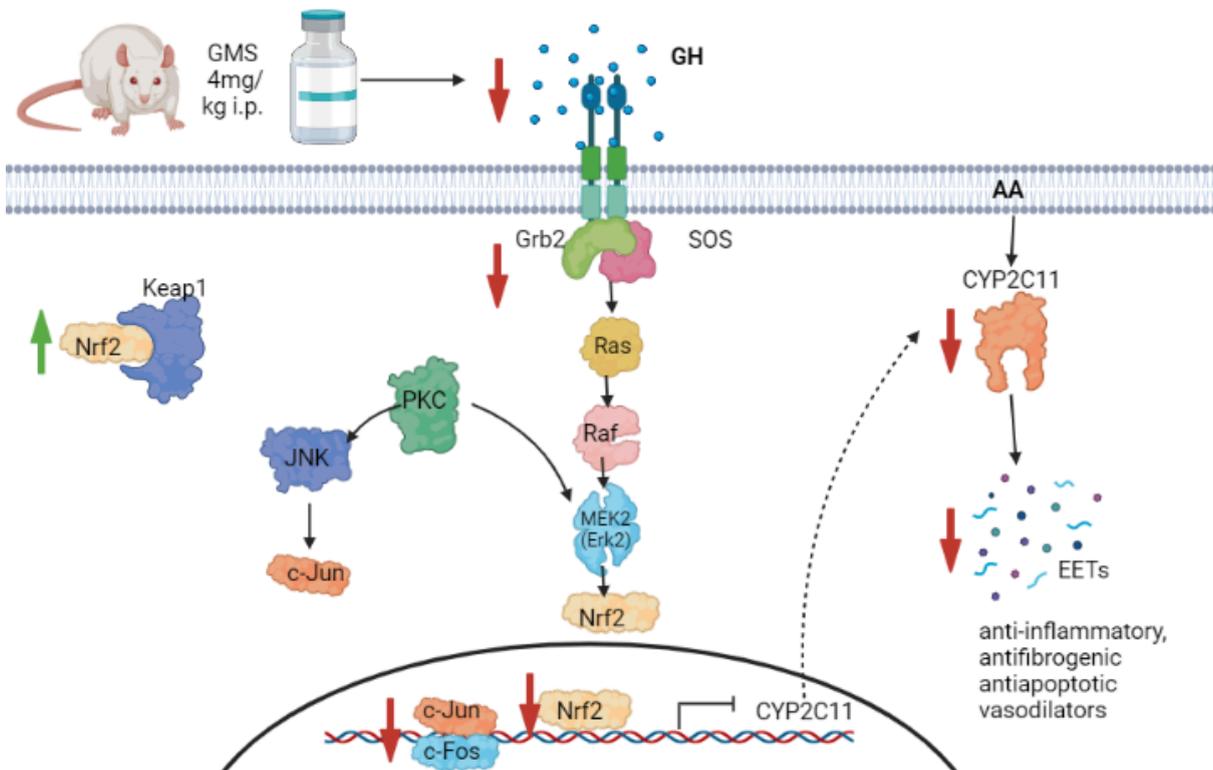


Figura 17. Esquema de la posible inhibición de la vía de señalización de MAPK bajo el tratamiento con GMS para la regulación negativa de CYP2C11 a través de la inhibición de factores de transcripción bZIP. El GMS puede obstruir con la liberación de la GH lo que podría provocar la regulación negativa de la vía MAPK, con ello el mantenimiento del complejo Nrf2/Keap1, así como la inhibición de la translocación al núcleo de c-Jun, por lo que la cantidad proteínica de CYP2C11 y CYP2J3 se mantendría a la baja, así mismo la biotransformación de AA y la producción de EETs.

Este estudio proporciona una perspectiva sobre la regulación de las proteínas involucradas en el metabolismo del AA para la síntesis de EETs, específicamente las isoformas CYP2J3 y CYP2C11 del CYP450. Destaca como novedad la evaluación de los efectos de una dosis de GMS y BHA en los niveles de proteína de CYP2 en un modelo *in vivo* adulto (i.p.). Los resultados indican que el tratamiento con BHA incrementa estos niveles en el hígado y la corteza cerebral de CYP2C11, mientras que GMS los reduce, tanto para CYP2C11 como para CYP2J3, este último no mostró modificación en tejido hepático. Estos hallazgos son

relevantes dada la amplia utilización global de estos aditivos alimentarios, especialmente considerando el extenso uso del GMS en poblaciones asiáticas y su creciente consumo a nivel mundial debido a su popularización cultural. Además, es importante mencionar que el BHA es consumido no solo por humanos, sino también por otras especies, lo que amplía la implicación de estos resultados incluyendo su impacto en diferentes organismos.

Se propone la realización de investigaciones adicionales para examinar detalladamente los efectos en los niveles de proteína y actividad de CYP2 tras la ingestión gastrointestinal y considerando la frecuencia crónica asociada al consumo habitual de estos aditivos alimentarios. Aunque este estudio presenta una perspectiva exploratoria, se enfatiza la necesidad de llevar a cabo estudios más exhaustivos para determinar la prudencia o no en el consumo de aditivos alimentarios, considerando los hallazgos que relacionan los EETs, metabolitos de CYP2, con beneficios para ciertas enfermedades, mencionadas en el presente escrito. A pesar de estas asociaciones positivas, también se ha relacionado a los EETs con procesos cancerosos, ya que pueden desencadenar procesos adversos, como la proliferación celular, la resistencia a medicamentos y la metástasis en células cancerosas. Por otra parte, este estudio propone al BHA y GMS como potenciales moduladores de CYP2C11 y CYP2J3, estableciendo un precedente para un nuevo modelo animal que podría catalizar investigaciones adicionales y más específicas en la modulación de estas enzimas, proporcionando así valiosos precedentes para futuras investigaciones en el campo.

13. Conclusiones

En este estudio, se evidenció un aumento en los niveles de proteína CYP2C11 en el hígado y la corteza cerebral mediante el tratamiento con una única dosis de BHA en un modelo *in vivo*. De manera contraria, se observó una regulación negativa de la proteína CYP2C11 en los mismos tejidos tras la administración de una sola dosis del aditivo alimentario GMS, además de una disminución de CYP2J3 en la corteza cerebral. Además, se identificaron sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, c-Jun, c-Fos y Nrf2 en los promotores de *CYP2J3* y *CYP2C11*, sugiriendo que la modulación de estas enzimas podría ocurrir a través de la interacción de BHA y GMS con miembros de la vía de las MAPK.

Dada la limitada información sobre los factores que influyen en las isoformas que biotransforman el AA en EETs, la identificación de moduladores para CYP2C11 y CYP2J3,

presentes en la dieta de la mayoría de la población es de gran relevancia académica. Los hallazgos de este trabajo no solo proporcionan indicios para investigar más sobre los mecanismos moleculares subyacentes en la modulación de estas isoformas de CYP450, los efectos del consumo de GMS y BHA en las propiedades biológicas de los EETs, sino que también abren nuevas posibilidades para utilizar estos aditivos alimentarios como modelos de modulación de los CYP450 2J3 y 2C11 en futuras investigaciones.

14. Referencias bibliográficas

Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 73 (3), 914-922.

Ates, M. B., & Ortatatli, M. (2021). Phase-1 bioactivation mechanisms of aflatoxin through AhR, CAR and PXR nuclear receptors and the interactions with *Nigella sativa* seeds and thymoquinone in broilers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111774.

Banerjee, S., Das, R. K., Giffear, K. A., & Shapiro, B. H. (2015). Permanent uncoupling of male-specific CYP2C11 transcription/translation by perinatal glutamate. *Toxicology and applied pharmacology*, 284(1), 79-91.

Barbosa Sicard, E., Markovic, M., Honeck, H., Christ, B., Muller, D. N., & Schunck, W. H. (2005). Eicosapentaenoic acid metabolism by cytochrome P450 enzymes of the CYP2C subfamily. *Biochemical and biophysical research communications*, 329(4), 1275-1281.

Bazinet, R. P., & Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Neuroscience*, 15(12), 771-785.

Brkic, S., Stivala, S., Santopolo, A., Szybinski, J., Jungius, S., Passweg, J. R., & Meyer, S. C. (2021). Dual targeting of JAK2 and ERK interferes with the myeloproliferative neoplasm clone and enhances therapeutic efficacy. *Leukemia*, 35(10), 2875-2884.

Brown, N. J., & Falck, J. R. (2013). Introduction. P450 metabolites of arachidonic acid--from biochemistry to therapy. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 104, 1-1.

Chakraborty, S. P. (2019). Patho-physiological and toxicological aspects of monosodium glutamate. *Toxicology mechanisms and methods*, 29(6), 389-396.

Chen, X., Li, Z., Zhang, B., Liu, T., Yao, W., Wan, L., & Zhang, Y. (2022). Antinociception role of 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid in a central post-stroke pain model in rats mediated by anti-inflammation and anti-apoptosis effect. *Neurochemistry International*, 154, 105291.

Chen, C., & Wang, D. W. (2015). Cytochrome P450-CYP2 family-epoxygenase role in inflammation and cancer. *Advances in Pharmacology*, 74, 193-221.

Chen, Y., & Goldstein, J. A. (2009). The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Current drug metabolism*, 10(6), 567-578.

Choi HK & Waxman DJ (2000) Plasma growth hormone pulse activation of hepatic JAK-STAT5 signaling: developmental regulation and role in male-specific liver gene expression. *Endocrinology* 141:3245–3255.

Colombero, C., Cárdenas, S., Venara, M., Martin, A., Pennisi, P., Barontini, M., & Nowicki, S. (2020). Cytochrome 450 metabolites of arachidonic acid (20-HETE, 11, 12-EET and 14, 15-EET) promote pheochromocytoma cell growth and tumor associated angiogenesis. *Biochimie*, 171, 147-157.

Cook, D. J., Finnigan, J. D., Cook, K., Black, G. W., & Charnock, S. J. (2016). Cytochromes P450: history, classes, catalytic mechanism, and industrial application. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 105, 105-126.

Cooper D. Y., Estabrook R. W. y Rosenthal O. (1963) The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 238: 1320-23.

Cooper, D. Y., Levin, S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O., & Estabrook, R. W. (1965). Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science*, 147(3656), 400-402.

Diani, S., Ma, Y., Gross, S. S., & Rifkind, A. B. (2014). Increases in levels of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids (EETs and DHETs) in liver and heart in vivo by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and in hepatic EET: DHET ratios by cotreatment with TCDD and the soluble epoxide hydrolase inhibitor AUDA. *Drug Metabolism and Disposition*, 42(2), 294-300.

Ding, X., & Kaminsky, L. S. (2003). Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 43, 149.

Donato Martín, M., & O'Connor Blasco, J. E. (2009). Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel en el metabolismo de fármacos. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Du, J., He, W., Zhang, C., Wu, J., Li, Z., Wang, M., & Liang, G. (2020). Pentamethylquercetin attenuates cardiac remodeling via activation of the sestrins/Keap1/Nrf2 pathway in MSG-induced obese mice. *BioMed research international*, 2020

Dutheil, F., Dauchy, S., Diry, M. et al. (2009) Xenobiotic-metabolizing enzymes and transporters in the normal human brain: regional and cellular mapping as a basis for putative roles in cerebral function. *Drug Metab* 37, 1528-1538.

Elahian, F., Sepehrizadeh, Z., Moghimi, B., & Mirzaei, S. A. (2014). Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Critical reviews in biotechnology*, 34(2), 134-143.

Estabrook R. W., Cooper D. Y. y Rosenthal O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex, *Biochem .*, 338: 741-55.

Gerasimidis, K., Bryden, K., Chen, X., Papachristou, E., Verney, A., Roig, M., & Parrett, A. (2020). The impact of food additives, artificial sweeteners and domestic hygiene products on the human gut microbiome and its fibre fermentation capacity. *European journal of nutrition*, 59 (7), 3213-3230.

Gibson, G. G., & Skett, P. (2013). Introduction to drug metabolism. *Springer*.

Gui, L., Xu, Q., Huang, J., Wu, G., Tang, H., Hui, L., & Zhu, Y. (2020). CYP2J2 promotes the development of hepatocellular carcinoma by increasing the EETs production to improve HIF-1 α stability. *American Journal of Translational Research*, 12(12), 7923.

Goeptar, A. R., Scheerens, H., & Vermeulen, N. P. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Critical reviews in toxicology*, 25(1), 25-65.

Gruebele, A., Zawaski, K., Kaplan, D., & Novak, R. F. (1996). Cytochrome P450E1-and cytochrome P450B1/2B2-catalyzed carbon tetrachloride metabolism: effects on signal transduction as demonstrated by altered immediate-early (c-Fos and c-Jun) gene expression and nuclear AP-1 and NF-kappa B transcription factor levels. *Drug Metabolism and Disposition*, 24(1), 15-22.

Guengerich, F. P. (2019). Cytochrome P450 research and the journal of biological chemistry. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1671-1680.

Ibáñez, F., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología*, Universidad Pública de Navarra, 3-5.

Imig, J. D. (2018). Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 192, 1-19.

Jin, M., Kumar, A., & Kumar, S. (2012). Ethanol-mediated regulation of cytochrome P450 2A6 expression in monocytes: role of oxidative stress-mediated PKC/MEK/Nrf2 pathway. *PloS one*, 7(4), e35505.

Klingenberg M. (2003) Pigments of rat liver microsomes, *Archives of biochemistry and biophysics*, 409(1): 2-6.

Klyushova, L. S., Perepechaeva, M. L., & Grishanova, A. Y. (2022). The role of CYP3A in health and disease. *Biomedicines*, 10(11), 2686.

Kikuta Y, Sogawa K, Haniu M, et al. (1991). A novel species of cytochrome P-450 (P-450ib) specific for the small intestine of rabbits. cDNA cloning and its expression in COS cells. *Journal Biol Chem* 266: 17821–17825.

Kim, H. S., Moon, S. J., Lee, S. E., Hwang, G. W., Yoo, H. J., & Song, J. W. (2021). The arachidonic acid metabolite 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid alleviates pulmonary fibrosis. *Experimental & molecular medicine*, 53(5), 864-874.

Lafargue Pérez, F., Salazar Avila, O., Díaz Velázquez, M., Leiva Aguilar, I., & Sánchez Hechavarría, J. (2015). Epoxidación del aceite vegetal de *Jatropha curcas* L con ácido per fórmico. *Tecnología Química*, 35(3), 354-361.

Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., & Weirauch, M. T. (2018). The human transcription factors. *Cell*, 172(4), 650-665.

Lewis, D. V., Lake, B. G., & Dickins, M. (2004). Substrates of Human Cytochromes P4S0 from Families CYP1 and CYP2: Analysis of Enzyme Selectivity and Metabolism. *Drug metabolism and drug interactions*, 20(3), 111-142.

Li, D., Ng, A., Mann, N. J., & Sinclair, A. J. (1998). Contribution of meat fat to dietary arachidonic acid. *Lipids*, 33(4), 437-440.

Liu, J. H., Wang, Q., You, Q. L., Li, Z. L., Hu, N. Y., Wang, Y., & Gao, T. M. (2020). Acute EPA-induced learning and memory impairment in mice is prevented by DHA. *Nature communications*, 11(1), 5465.

Liu, M., Zhu, Q., Wu, J., Yu, X., Hu, M., Xie, X., & Yue, J. (2017). Glutamate affects the production of epoxyeicosanoids within the brain: The up-regulation of brain CYP2J through the MAPK-CREB signaling pathway. *Toxicology*, 381, 31-38.

Liu, T., Li, T., Chen, X., Li, Z., Feng, M., Yao, W., & Zhang, Y. (2021). EETs/sEHi alleviates nociception by blocking the crosslink between endoplasmic reticulum stress and neuroinflammation in a central poststroke pain model. *Journal of Neuroinflammation*, 18, 1-19.

Liu, Y., Wang, Z., Xie, W., Gu, Z., Xu, Q., & Su, L. (2017). Oxidative stress regulates mitogen-activated protein kinases and c-Jun activation involved in heat stress and lipopolysaccharide-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Molecular medicine reports*, 16(3), 2579-2587.

Lee, A. C., & Murray, M. (2010). Up-regulation of human CYP2J2 in HepG2 cells by butylated hydroxyanisole is mediated by c-Jun and Nrf2. *Molecular pharmacology*, 77(6), 987-994.

Luan, R., Ding, D., & Yang, J. (2022). The protective effect of natural medicines against excessive inflammation and oxidative stress in acute lung injury by regulating the Nrf2 signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1039022.

Lu, J., Chen, A., Ma, X., Shang, X., Zhang, Y., Guo, Y., ... & Wang, X. (2020). Generation and characterization of cytochrome P450 2J3/10 CRISPR/Cas9 knockout rat model. *Drug Metabolism and Disposition*, 48(11), 1129-1136.

Lu, M. C., Ji, J. A., Jiang, Z. Y., & You, Q. D. (2016). The Keap1–Nrf2–ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update. *Medicinal research reviews*, 36(5), 924-963.

Luo, J., Yao, J. F., Deng, X. F., Zheng, X. D., Jia, M., Wang, Y. Q., & Zhu, J. H. (2018). 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin $\alpha\beta3$ and activating FAK/PI3K/AKT signaling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 1-11.

Makia, N. L., Amunom, I., Falkner, K. C., Conklin, D. J., Surapureddi, S., Goldstein, J. A., & Prough, R. A. (2012). Activator protein-1 regulation of murine aldehyde dehydrogenase 1a1. *Molecular pharmacology*, 82(4), 601-613.

Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets*, 19(1), 38-54.

Marden, N. Y., & Murray, M. (2005). Characterization of a c-Jun-responsive module in the 5'-flank of the human CYP2J2 gene that regulates transactivation. *Biochemical Journal*, 391(3), 631-640.

Martin, S. A., Brash, A. R., & Murphy, R. C. (2016). The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *Journal of lipid research*, 57(7), 1126-1132.

Mashayekhi-Sardoo, H., Mashayekhi-Sardoo, A., Roufogalis, B. D., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2021). Impact of curcumin on microsomal enzyme activities: Drug interaction and chemopreventive studies. *Current Medicinal Chemistry*, 28(34), 7122-7140.

McDonnell, A. M., & Dang, C. H. (2013). Basic review of the cytochrome p450 system. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 4(4), 263.

McMillan, D. M., & Tyndale, R. F. (2018). CYP-mediated drug metabolism in the brain impacts drug response. *Pharmacology & therapeutics*, 184, 189-200.

Miksys, S. and Tyndale, R. F. (2013) Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *Journal Psychiatry Neurosci* 38, 152-163.

Navarro Mabarak, Cynthia María. (2019). "Papel de NF- κ B en la regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM

Navarro-Mabarak, C., Camacho-Carranza, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2018). Cytochrome P450 in the central nervous system as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Drug metabolism reviews*, 50(2), 95-108.

Omura T. & Sato R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes, *The Journal of Biological Chemistry*, 237: 1375-6.

Omura, T. (2011). Recollection of the early years of the research on cytochrome P450. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 87 (10), 617-640.

Pallàs, M., Vázquez, S., Sanfeliu, C., Galdeano, C., & Griñán-Ferré, C. (2020). Soluble epoxide hydrolase inhibition to face neuroinflammation in Parkinson's disease: A new therapeutic strategy. *Biomolecules*, 10(5), 703.

Peng, Z., Zhang, C., Yan, L., Zhang, Y., Yang, Z., Wang, J., & Song, C. (2020). EPA is more effective than DHA to improve depression-like behavior, glia cell dysfunction and hippocampal apoptosis signaling in a chronic stress-induced rat model of depression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1769.

Peter, M., & Dubuis, J. M. (2000). Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes. *European Journal of Clinical Investigation*, 30, 14-20.

Pinkus, R., Weiner, L. M., & Daniel, V. (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23), 13422-13429.

Qin, X. H., Wu, Z., Dong, J. H., Zeng, Y. N., Xiong, W. C., Liu, C., & Zhu, X. H. (2019). Liver soluble epoxide hydrolase regulates behavioral and cellular effects of chronic stress. *Cell reports*, 29(10), 3223-3234.

Santes-Palacios, R., Olguín-Reyes, S., Hernández-Ojeda, S. L., Camacho-Carranza, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2020). Differential inhibition of naringenin on human and rat cytochrome P450 2E1 activity. *Toxicology in Vitro*, 69, 105009.

Sasame, H. A., Ames, M. M., & Nelson, S. D. (1977). Cytochrome P-450 and NADPH cytochrome c reductase in rat brain: formation of catechols and reactive catechol metabolites. *Biochemical and biophysical research communications*, 78 (3), 919-926.

Satoh, T., Fujisawa, H., Nakamura, A., Takahashi, N., & Watanabe, K. (2016). Inhibitory effects of eight green tea catechins on cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A4 activities. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 188-197.

Shahabi, P., Siest, G., & Visvikis-Siest, S. (2014). Influence of inflammation on cardiovascular protective effects of cytochrome P450 epoxygenase-derived epoxyeicosatrienoic acids. *Drug Metabolism Reviews*, 46(1), 33-56.

Shankar, K., & Mehendale, H. M. (2014). Cytochrome P450. *Encyclopedia of Toxicology, Third Edition*, 1125-1127

Shaulian, E., & Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, 4(5), E131-E136.

Shen, G., & Kong, A. N. (2009). Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 30(7), 345-355.

Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., & Guengerich, F. P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(1), 414-423.

Shen, G., & Kong, A. N. (2009). Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 30(7), 345-355.

Sun, C. P., Zhang, X. Y., Zhou, J. J., Huo, X. K., Yu, Z. L., Morisseau, C., ... & Ma, X. C. (2021). Inhibition of sEH via stabilizing the level of EETs alleviated Alzheimer's disease through GSK3 β signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 156, 112516.

Sun, D., Jiang, H., Wu, H., Yang, Y., Kaley, G., & Huang, A. (2011). A novel vascular EET synthase: role of CYP2C7. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(6), R1723-R1730.

Tallima, H., & El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits—a review. *Journal of advanced research*, 11, 33-41.

Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxidants & redox signaling*, 29(17), 1727-1745.

Tomankova, V., Liskova, B., Skalova, L., Bartikova, H., Bousova, I., Jourova, L., ... & Anzenbacherova, E. (2015). Altered cytochrome P450 activities and expression levels in the liver and intestines of the monosodium glutamate-induced mouse model of human obesity. *Life sciences*, 133, 15-20.

Toselli, F., Dodd, P. R., & Gillam, E. M. (2016). Emerging roles for brain drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in neuropsychiatric conditions and responses to drugs. *Drug metabolism reviews*, 48 (3), 379-404.

Trostchansky, A., Wood, I., & Rubbo, H. (2021). Regulation of arachidonic acid oxidation and metabolism by lipid electrophiles. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 152, 106482.

Panigrahy, D., Greene, E. R., Pozzi, A., Wang, D. W., & Zeldin, D. C. (2011). EET signaling in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3), 525-540.

Parvez, M., Qhanya, L. B., Mthakathi, N. T., Kgosiemang, I. K. R., Bamal, H. D., Pagadala, N. S., & Syed, K. (2016). Molecular evolutionary dynamics of cytochrome P450

monooxygenases across kingdoms: Special focus on mycobacterial P450s. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.

Pikuleva, I. A., & Waterman, M. R. (2013). Cytochromes P450: roles in diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17091-17098

Piotr & Ilia (2018). Spectroscopic studies of the cytochrome P450 reaction mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1866(1), 178-204.

Portal, P. (2013). Citocromo P450 reductasas y metabolismo redox en *Trypanosoma cruzi* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Ung, T. T., Nguyen, T. T., Li, S., Han, J. Y., & Do Jung, Y. (2021). Nicotine stimulates CYP1A1 expression in human hepatocellular carcinoma cells via AP-1, NF- κ B, and AhR. *Toxicology Letters*, 349, 155-164.

US Food and Drug Administration. (2022). CFR-code of federal regulations title *US Department of Health and Human Services Nov*, 21.

US Food and Drug Administration. (2012). Questions and Answers on Monosodium glutamate (MSG). *US Department of Health and Human Services Nov*, 19.

Vanduchova, A., Tomankova, V., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2016). Influence of sulforaphane metabolites on activities of human drug-metabolizing cytochrome P450 and determination of sulforaphane in human liver cells. *Journal of medicinal food*, 19(12), 1141-1146.

Walker, R., & Lupien, J. R. (2000). The safety evaluation of monosodium glutamate. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1049S-1052S.

Wang D, Hirase T, Nitto T, et al. (2009). Eicosapentaenoic acid increases cytochrome P-450 2J2 gene expression and epoxyeicosatrienoic acid production via peroxisome proliferator-activated receptor gamma in endothelial cells. *Journal Cardiology* 54:368–374.

Wei, Y., Yang, L., Zhang, X., Sui, D., Wang, C., Wang, K., ... & Wang, H. (2018). Generation and characterization of a CYP2C11-null rat model by using the CRISPR/Cas9 method. *Drug Metabolism and Disposition*, 46 (5), 525-531.

Wojciech & Wladyslawa (2021). Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metabolism Reviews*, 53(1), 1-29.

Wójcikowski, J., Haduch, A., & Daniel, W. A. (2013). Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacological Reports*, 65 (5), 1247-1255.

Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, et al. (1996). Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *Journal Biol Chem* 271:3460–3468.

Xu, M., Ju, W., Hao, H., Wang, G., & Li, P. (2013). Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug metabolism reviews*, 45(3), 311-352.

Xu, X., Zhang, X. A., & Wang, D. W. (2011). The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Advanced drug delivery reviews*, 63(8), 597-609.

Yu, R., Tan, T. H., & Kong, A. N. T. (1997). Butylated Hydroxyanisole and Its Metabolite tert-Butylhydroquinone Differentially Regulate Mitogen-activated Protein Kinases: The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28962-28970.

Yuan, X., Xu, C., Pan, Z., Keum, Y. S., Kim, J. H., Shen, G., ... & Kong, A. N. T. (2006). Butylated hydroxyanisole regulates ARE-mediated gene expression via Nrf2 coupled with ERK and JNK signaling pathway in HepG2 cells. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 45(11), 841-850.

Zhang, C. Y., Zhong, W. J., Liu, Y. B., Duan, J. X., Jiang, N., Yang, H. H., ... & Guan, C. X. (2023). EETs alleviate alveolar epithelial cell senescence by inhibiting endoplasmic reticulum stress through the Trim 25/Keap1/Nrf2 axis. *Redox Biology*, 102765.

Zhu, R., Liu, H., Liu, C., Wang, L., Ma, R., Chen, B., *et al* & Gao, S. (2017). Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological research*, 122, 78-89.

Zhu, W., Yang, F., Cai, X., Zhang, W., Zhang, J., Cai, M., *et al* & Cai, D. (2021). Role of glucocorticoid receptor phosphorylation-mediated synaptic plasticity in anxiogenic and depressive behaviors induced by monosodium glutamate. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(1), 151-164.

Zhou, S. F. (2008). Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Current drug metabolism*, 9(4), 310-322.

Zordoky, B. N., Aboutabl, M. E., & El-Kadi, A. O. (2008). Modulation of cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism during isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(11), 2277-2286.

15. Anexo

Reactivos para la preparación del gel separador pH 8.8

Gel separador (pH 8.8)	11% (para 1 gel)	11 % (para dos geles)
Agua Milli-Q	4.1 ml	8.2 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	5 ml
SDS 10%	100 µl	200 µl
Solución de acrilamida	3.66 ml	7.32 ml
Persulfato de amonio al 10%	50 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Reactivos para la preparación del gel concentrador pH 6.8

Gel concentrador (pH 6.8)	para 2 geles
Agua Milli-Q	6.1 ml
Tris 1.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	100 μ l
Solución de acrilamida	1.3 ml
Persulfato de amonio al 10%	50 μ l
TEMED	10 μ l

Amortiguador TRIS 1.5 M pH 8.8: Ajustar pH antes de aforar a 100 mL

TRIS BASE	18.17 g
Agua Milli-Q	100 ml

Amortiguador TRIS 1.5 M pH 6.8: Ajustar pH antes de aforar a 100 mL

TRIS BASE	6.05 g
Agua Milli-Q	100 ml

SDS 10%

SDS	Agua Milli-Q
10 g	para 100 ml
5 g	para 50 ml
2.5 g	para 25 ml

Acrilamida: Filtrar con filtro de 0.45 micras y almacenar a 4 °C en oscuridad

Acrilamida	30.0 g
Bis acrilamida	0.8 g
Agua	100 ml

Persulfato de amonio 10 %

Para preparar 500 μ l	
50 mg	Persulfato
500 μ l	agua Milli-Q

Amortiguador de carga

Amortiguador de carga o buffer Laemmli	Para preparar 10 ml
Tris 0.5 N pH 6.8	2.5 ml
SDS al 10 %	4 ml
2 Mercapto- etanol	200 μ l
Glicerol	2 ml
Pyronina	una pizca
Azul de bromofenol	una pizca
Agua Milli-Q	1.3 ml

Buffer de corrida 10 X: Aforar a 1 litro

Buffer de corrida 10 X	Para 1 L
Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS 10 %	100 ml (10g)
Agua Milli-Q	aforar

Buffer de transferencia 10 X: Aforar a 1 litro, ajustar el pH 8.1 -8.5

Buffer de transferencia 10 X	Para 1 L
Tris base	30.3 g
Glicina	144.15 g
Agua Milli-Q	aforar

Buffer de transferencia 1 X: Es importante seguir ese orden porque se precipita

Orden	Reactivo	Cantidad
1 °	Metanol absoluto	200 ml
2°	Agua mili Q	700 ml
3°	Buffer de transferencia 10 X	100 ml

TBS 10 X: El volumen final es de 1 L se debe aforar, ajustar el pH a 7.6 y filtrar

Solución	Concentración	Cantidad
Tris Base	200 mM	24.2 g
Na Cl	1.37 mM	80 g
HCl	38 mM	38 ml

TTBS 1X

TBS 10 X	100 ml
Agua Milli-Q	900 ml
Tween - 20	1ml